

ANALIZA GENKEGA ZAPISA ACIDOCINOV LF221 A IN B SEVA *Lactobacillus gasseri* LF221 *

Andreja ČANŽEK MAJHENIČ^{a)} in Irena ROGELJ^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, dr., mag.,
e-pošta: andreja.canzek@bfro.uni-lj.si

^{b)} Isti naslov kot ^{a)}, izr. prof., dr., spec.

Delo je prispelo 15. junija 2003, sprejeto 15. septembra 2003.

Received June 15, 2003, accepted September 15, 2003.

IZVLEČEK

Z metodami molekularne biologije smo pripravili odseka DNA seva LF221 z zapisom za acidocin LF221 A oziroma acidocin LF221B. Na 0,9 kb dolgem odseku *Bam*HI/*Hind*III, ki ima zapis za acidocin LF221 A, smo ugotovili prisotnost dveh bralnih okvirjev (ORF) ter del tretjega. Za OrfA2 se je izkazalo, da nosi zapis za strukturni gen za acidocin LF221 A (Acd221A), medtem ko OrfA3 nosi zapis za peptid, dolg 90 aminokislinskih ostankov, ki ima zelo verjetno vlogo proteina imunosti (Aci221A). OrfA1, za katerega je trenutno znanih 37 aminokislilin, pa je najverjetneje komplementarni peptid (Acd221 α) acidocina LF221 A. Z analizo 1,8 kb dolgega odseka *Eco*RI/*Hind*III (ima zapis za acidocin LF221 B) smo potrdili prisotnost štirih zaključenih ORF in enega nepopolnega. OrfB3, OrfB4 in OrfB5, ki nosijo zapis za komplementarni peptid (Acd221 β) acidocina LF221 B, aktivni peptid (Acd221B) acidocina LF221 B oziroma protein imunosti (Aci221B), se nahajajo na istem operonu. Iz rezultatov analiz genskega zapisa acidocinov in sosednjih genov smo zaključili, da gre za dva različna, dvo-peptidna bakteriocina seva LF221.

Ključne besede: mikrobiologija / mlečnokislinske bakterije / *Lactobacillus gasseri* LF221 / bakteriocini / acidocin LF221 A / acidocin LF221 B / molekularna genetika / genski zapis

DNA ANALYSIS OF ACIDOCIN LF221 A AND B GENES, PRODUCED BY *Lactobacillus gasseri* LF221 †

ABSTRACT

Molecular biology tools were used to locate and analyse genetic determinants coding for acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, respectively. 0.9 kb *Bam*HI/*Hind*III fragment, carrying information for acidocin LF221 A was subjected to the sequencing reaction which revealed two complete ORFs and one incomplete. OrfA2 was determined to code for acidocin LF221 A (Acd221A), while OrfA3 codes a peptide, composed of 90 amino acids which probably acts as an immunity protein. Truncated OrfA1, consisting of 37 amino acids for the moment, represents a putative complementary component (Acd221 α) of the acidocin LF221 A. Analysis of the 1.8

* Prispevek je del doktorske disertacije Andreje Čanžek Majhenič 'Klasifikacija bakteriocinov seva *Lactobacillus gasseri* LF221 na osnovi genskega zapisa', mentorica izr. prof. dr. Irena Rogelj.

† The article is a part of dissertation thesis 'Classification of *Lactobacillus gasseri* LF221 bacteriocins based on their genetic determinants', issued by Andreja Čanžek Majhenič, supervisor assoc. prof. Irena Rogelj, Ph.D.

kb *EcoRI/HindIII* fragment, carrying the acidocin LF221 B gene, confirmed the presence of 4 complete ORFs and fifth incomplete. OrfB3, OrfB4 and OrfB5 coding for the complementary component (Acd221 β) to acidocin LF221 B, the active acidocin LF221 B (Acd221B) and the putative immunity protein, respectively, are organized in one operon. Analyses of the genetic determinants of the acidocin LF221 A and acidocin LF221 B and their flanking loci revealed that LF221 acidocins are two different, two-peptide bacteriocins produced by *L. gasseri* LF221.

Key words: microbiology / lactic acid bacteria / *Lactobacillus gasseri* LF221 / bacteriocins / acidocin LF221 A / acidocin LF221 B / molecular genetics / genetic determinants

UVOD

Mlečnokislinske bakterije (MKB) naseljujejo raznolike ekosisteme. So sestavni del avtohtone mikrobne populacije humanega in živalskega dihalnega, prebavnega in genitalnega trakta, v naravi pa jih najdemo povsod tam, kjer je možnost spontane fermentacije ogljikovih hidratov. Uspešno naselitev in preživetje v mikrobno tako raznolikih ekoloških nišah pa MKB omogočajo lastni izločki s protimikrobnim učinkom kot so vodikov peroksid, ogljikov dioksid, diacetil, organske kisline, inhibitorji adhezije ter bakteriocini (Ouweland, 1998).

Z imenom bakteriocini opisujemo proteine ali proteinske komplekse, ki so baktericidni proti bakterijam iste ali sorodnih vrst (Tagg in sod., 1976), vendar pa je opisanih vedno več bakteriocinov, ki protimikrobno delujejo tudi proti bakterijskim vrstam, ki niso sorodne bakteriji proizvajalki. Kljub enotni proteinski naravi se bakteriocini razlikujejo po spektru aktivnosti, načinu delovanja, molekularni teži, mestu nahajanja genskega zapisa ter biokemijskih lastnostih. Zato jih razvrščamo v tri glavne skupine: (I) lantibiotiki, (II) nelantibiotiki in (III) toplotno občutljivi nelantibiotiki (Nes in sod., 1996). Največ danes opisanih bakteriocinov uvrščamo v II skupino, ki združuje majhne, toplotno stabilne in membransko aktivne nelantibiotike. Ribosomsko se sintetizirajo kot neaktivni prepeptidi, ki se s posttranslacijsko cepitvijo N-terminalnega vodilnega zaporedja, običajno na mestu dveh glicinskih ostankov (-2, -1), sprostitjo kot biološko aktivne molekule. Po zadnji klasifikaciji so bakteriocini II skupine razdeljeni v 6 podskupin (Van Belkum in Stiles, 2000).

Genske informacije za biosintezo bakteriocinov in z njimi povezane funkcije najdemo na plazmidu, kromosomu ali obeh. Navadno se nahajajo v skupku, ki ga sestavljajo štiri geni: gen za prebakteriocin, gen za pripadajoči protein imunosti, gen za transportne proteine ter gen za dodatni protein, ki sodeluje pri transportu bakteriocinov iz celice (Nes in sod., 1996). Geni, ki kodirajo omenjene proteine, se nahajajo na enem ali več operonih.

Neaktivne prebakteriocinske molekule, ki so sintetizirane na ribosomih, so sestavljene iz N-terminalnega vodilnega zaporedja in iz propeptidne regije. Vodilno zaporedje ima dvojno funkcijo: bakteriocinu preprečuje biološko aktivnost, dokler je ta v celici proizvajalki, hkrati pa nosi signal za prepoznavanje za transportni protein. Kljub različni dolžini (od 14 do 30 aminokislinskih ostankov) pa imajo vodilna zaporedja visoko ohranjeno zaporedje na mestih -12 do -1. Pri primarni strukturi so mesta -4, -7, -12 in -15 rezervirana za hidrofobne ostanke, medtem ko najdemo na mestih -8, -9 in -11 hidrofilne ostanke (Havarstein in sod., 1994). Med procesiranjem pa se propeptidna regija preoblikuje v biološko aktivno molekulo. Bakteriocini so dolgi od 30 pa do 100 in več aminokislinskih ostankov (Klaenhammer, 1993).

Bakteriocinogeni sevi so razvili sistem zaščite pred lastnimi bakteriocini, tako imenovano imunost. Proteini imunosti so navadno specifični. Izražajo imunost le za pripadajoči bakteriocin, njihovo zaščitno delovanje pa se izrazi hkrati z delovanjem bakteriocina. Na vseh doslej raziskanih bakteriocinskih operonih so ugotovili, da sta strukturni gen za bakteriocin in gen za imunost tesno povezana, tako z vidika lege kot prepisovanja. Geni za imunost se vedno nahajajo poleg in navzdol glede na strukturni gen za bakteriocin, prepisovanje omenjenih genov pa poteka istočasno (Nes in sod., 1996). Maskiranje receptorja, preprečevanje tvorbe por z vezavo

bakteriocina ali celo blokiranje samih por so trije, največkrat omenjeni možni mehanizmi delovanja proteinov imunosti (Moll in sod., 1999). Proteini imunosti so dolgi od 50 do 150 aminokislinskih ostankov.

Bakteriocini z dvoglicinskim tipom vodilnega zaporedja imajo lasten transportni aparat, sestavljen iz dveh, membransko vezanih proteinov (Nes in sod., 1996). Eden pripada skupini ABC prenašalcev, drugega pa opisujejo kot dodatni protein.

Uporaba bakteriocinov oziroma bakteriocinogenih sevov je zaradi njihovih številnih zanimivih lastnosti vse bolj razširjena. Tako zavzemajo bakteriocini kot bioaditivi pomembno mesto v živilski industriji, vse pogosteje pa najdemo probiotične bakteriocinogene MKB tudi v terapevtskih pripravkih, saj naj bi s svojim delovanjem znatno prispevale k preprečevanju in zdravljenju obolenj prebavnega trakta. Nenazadnje pa se vedno več bakteriocinov MKB uporablja kot specifične "food-grade" genske označevalce pri genskih manipulacijah bakterij, ki sodelujejo pri oblikovanju živil. Pred kakršnokoli komercialno uporabo mora vsak bakteriocinogeni sev prestati številne tehnološke in/ali klinične teste, ki dokažejo njegovo varno uporabo ter tehnološke in/ali fiziološke učinke (Saarela in sod., 2000). Eden od pomembnih kriterijev je tudi natančno poznavanje bakteriocinov.

V predstavljenem delu smo želeli natančno analizirati genski zapis za acidocina seva LF221 ter sosednje gene.

MATERIAL IN METODE DE LA

Bakterijski sevi in plazmidi

Preiskovano bakterijo *Lactobacillus gasseri* LF221, osamljeno iz dojenčkovega blata (Bogovič Matijašič in sod., 1998) smo vzdrževali s stalnim precepljanjem v sveže tekoče gojišče MRS (Merck, Nemčija) pri 37 °C. Za kloniranje smo uporabljali komercialni sev *Escherichia coli* JM110 (Stratagene, ZDA), ki smo ga gojili v tekočem gojišču LB (Sambrook in sod., 1989) pri 37 °C ob močnem stresanju, ali na trdnem gojišču LB, ki smo ga pripravili z dodatkom agarja (1,5-odstotka; Biolife, Italija) v tekoče gojišče LB. Selekcijo transformant *E. coli* JM110 smo izvedli z dodatkom kanamicina (Km; 50 µg ml⁻¹; Sigma, Nemčija) v trdno gojišče LB. Za kloniranje smo uporabljali vektor pCR-Blunt (Km^r; Invitrogen, ZDA).

Izolacija DNA

Kromosomsko DNA seva LF221 smo izolirali po opisanem protokolu (Čanžek Majhenič in sod., 2003), medtem ko smo plazmidno DNA transformant *E. coli* JM110 izolirali z metodo alkalne lize (Birnboim in Doly, 1979).

Reakcija kloniranja in verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Iz rezultatov hibridizacije po Southern-u smo izbrali odseke kromosomske DNA seva LF221 z genom za acidocin LF221 B (Čanžek Majhenič, 2002).

Območje s specifičnim odsekom *EcoRI/HindIII* s strukturnim genom za acidocin LF221 B smo iz 1-odstotnega agaroznega gela očistili s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Nemčija). Očiščeno DNA smo nato ligirali v vektor pCR-Blunt z uporabo ligaze T4 (Roche, Nemčija) in reakcijo vodili pri 16 °C preko noči. Kompetentne celice *E. coli* JM110 smo pripravili po protokolu, kot sta ga opisala Dinsmore in Klaenhammer (1997). Rekombinantne plazmide smo nato s toplotnim šokom (90 s, 42 °C) vnesli v *E. coli* JM110 in celice 1 h inkubirali pri 37 °C v tekočem gojišču LB. Z inkubacijo transformant smo nato nadaljevali na trdnem gojišču LB z dodanim antibiotikom (Km) pri 37 °C. Potencialne rekombinante pCR-

Blunt smo ugotavljali s pomočjo prekinitve letalnega gena. Ker so bili vsi poskusi pridobiti transformante neuspešni, smo tarčno DNA za reakcije ugotavljanja nukleotidnega zaporedja pripravili drugače. S pomočjo specifičnih začetnih oligonukleotidov za vektor pCR-Blunt (BL2: 5'-CCCTCTAGATGCATGCTCG-3'; BL5: 5'-ATGATTACGCCAAGCTATTTAGG-3') in acidocin LF221 B (BB1: 5'-TACTCCGCGAGTAGCACCAG-3'; BB2: 5'-AGTTGGTGCAGAGGATTC-3') smo skušali iz ligacijske mešanice vseh rekombinant pCR-Blunt::*EcoRI/HindIII* pridobiti le dva specifična pomnožka PCR, ki bi nastala kot produkt pomnoževanja specifičnega pCR-Blunt::*EcoRI/HindIII* konstrukta z genskim zapisom za acidocin LF221 B. Reakcijo PCR smo izvedli v 45-ih ciklih, vsak pa je bil sestavljen iz denaturacije (94 °C, 1 min), prileganja začetnih oligonukleotidov (55 °C, 1 min) in podaljševanja verige DNA (68 °C, 3 min). Začetna denaturacija je trajala 3 min in zaključno podaljševanje 5 min. Reakcijske mešanice smo pripravili po navodilih proizvajalca za polimerazo Expand High Fidelity PCR System (Roche). Pomnoževanja smo izvedli na cikličnem termostatu "Gene cycler" (Bio-Rad Laboratories, ZDA). Volumen mešanic PCR je bil 100 µl. Po 10 µl dobljenih pomnožkov PCR smo pregledali v horizontalnem agaroznem gelu (1,6-odstoten) v 1-kratnem TAE pufu.

Analize nukleotidnega zaporedja

Tarčno DNA za ugotavljanje nukleotidnega zapisa za acidocin LF221 A smo začeli pripravljati že v predhodnih raziskavah (Čanžek, 1998). Kromosomsko DNA seva LF221 smo cepili z različnimi restriktazami in dobljene odseke ločili na agaroznem gelu. S prenosom po Southern-u smo DNA z gela prenesli na membrano ter hibridizirali s specifično lovko za acidocin LF221 A. Izbrani 0,9 kb dolg *BamHI/HindIII* odsek DNA smo klonirali in s pomočjo hibridizacije kolonij poiskali klon z zapisom za acidocin LF221 A. V nadaljevanju smo DNA pozitivnega klona analizirali (restrikcija, reakcija PCR). Za ugotavljanje nukleotidnega zaporedja pa smo tarčno DNA pripravili po opisanem postopku (Birnboim in Doly, 1979) z dodatnim korakom čiščenja z mešanico fenol/kloroform/izoamilni alkohol (25:24:1; Sigma).

Podoben pristop priprave tarčne DNA smo uporabili tudi v primeru acidocina LF221 B, vendar pa smo bili pri poskusih transformacije rekombinantnih produktov pCR-Blunt::*EcoRI/HindIII* v kompetentne celice *E. coli* JM110 neuspešni. Zato smo, za reakcije ugotavljanja nukleotidnega zaporedja, tarčno DNA pripravili v reakciji PCR, ki smo jo izvedli na ligacijski mešanici pCR-Blunt::*EcoRI/HindIII*. Pomnožke PCR smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu (1,6-odstoten) in jih iz mešanice PCR očistili s kompletom QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja tako pripravljenih vzorcev DNA je bilo opravljeno v firmi Microsynth v Švici.

Sorodnosti acidocinov LF221 z bakteriocini v bazah podatkov

Zaporedja peptidov, ki smo jih našli na *BamHI/HindIII* in *EcoRI/HindIII* odsekih DNA seva LF221 z zapisom za acidocin LF221 A oziroma acidocin LF221 B, smo s programom BLAST (Standard nucleotide-nucleotide BLAST..., 2001) primerjali z že znanimi in opisanimi bakteriocini, ki so na voljo v bazi podatkov NCBI – National Center for Biotechnology Information.

REZULTATI IN RAZPRAVA

V predstavljenem delu smo analizirali genski zapis acidocina LF221 A in acidocina LF221 B ter sosednjih genov. Omenjena bakteriocina sta dva različna protimikrobna peptida, ki ju

proizvaja *Lactobacillus gasseri* LF221. V literaturi je opisanih kar nekaj sevov, ki tvorijo dva ali več bakteriocinov. Tako najdemo med bakteriocinogenimi bakterijami, ki tvorijo več kot en biološko aktiven peptid, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4 (Van Belkum in sod., 1989), *Lactobacillus plantarum* LPCO10 (Jimenez-Diaz in sod., 1993), *Carnobacterium piscicola* LV17B (Quadri in sod., 1994), *Lactobacillus acidophilus* LMG P-13139 (Contreras in sod., 1997), *Enterococcus faecalis* BFE 1071 (Balla in sod., 2000), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 (Revol-Junelles in sod., 1996) in *Enterococcus faecium* P21 (Herranz in sod., 2001).

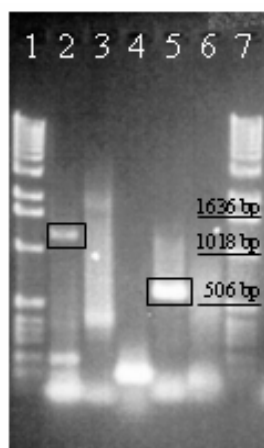
→ Del ORF A1
 GATCCTTTTT TGGTCAGCCA GTTTCTGTAG GAACAGGTGC ACTAATCGGT GCAAGTGCTG 60
 S F F G Q P V S V G T G A L I G A S A
 GTGCAATTGG CGGATCAGTA CAATGTGTGG GCTGGTTAGC TGGAGGTGGA AGATAATGAT 120
 G A I G G S V Q C V G W L A G G G R • M
 ORF A2
 CGAAAAAGTT TCTAAAAATG AACTAAGCCG GATATATGGT GGAAACAACG TAAATTGGGG 180
 I E K V S K N E L S R I Y G⁻² G⁻¹ N N V N W
 TAGTGTTCGA GGATCATGTG GTAAAGGTGC AGTAATGGAA ATATATTTTCG GGAATCCCAT 240
 G S V A G S C G K G A V M E I Y F G N P
 ATTAGGGTGC GCTAACGGAG CTGCAACATC ATTGGTTCTA CAAACTGCTA GTGGAATATA 300
 I L G C A N G A A T S L V L Q T A S G I
 TAAAAATTAT CAAAAAAGA GATAGTATAT → ORF A3 GACGGGAATA TGGATAGTAA TTATTAGTAT 360
 Y K N Y Q K K R • M T G I W I V I I S
 TATTGTGCTT TCAATAATTA TCACCAATAT AGTAGCTCTA ATACAGACAC TATTACATAA 420
 I I V L S I I I T N I V A L I Q T L L H
 GAAAAATGAA AAATATTATT TTGATAAATC TTTTGGAGCC TATGCAGGTA AAAATAATCC 480
 K K N E K Y Y F D K S F G A Y A G K N N
 AAAATATCTG TTTAATAATG TTGAACATCA TGATTTTTTC CATGTATTTT ATCAGTATTT 540
 P K Y L F N N V E H H D F F H V F Y Q Y
 TATTTGCTCA TATATTCCAT TTATAGATGT CATTTTTTGG TTCTTAGGTT CAATTTGGTA 600
 F I C S Y I P F I D V I F W F L G S I W
 ATAATCAAAA AAGGTCGAAA CTTCATCTTA GTACGAAGTT TCGACCTTTT TTTATTTCAA 660
 •
 ATTATTTTTTA TTGCTTCCAC GCTGCATCAA ATTTTGCTTT ACCTGCTTTA ATTTGATTAT 720
 CAACATTTTG ACCATTCTTA GCTGCATACA AAATCTTAGC CATAATTGGA TCTAATTGAC 780
 TGTAGGCAGC GTTTGAGTTC TTAGCTACTG GAATACTGTA CAAGTGTTTC ATAGCCCCTT 840
 CTAACCTTAGC TGGAAGCT

Slika 1. Nukleotidno zaporedje 0,9 kb velikega *Bam*HI/*Hind*III odseka kromosomske DNA seva LF221 z genskim zapisom za acidocin LF221 A (→ smer bralnega okvirja, • zaključni kodon, — inverzna ponovitev, — mesto vezave ribosoma).

Figure 1. Nucleotide sequence of the 0,9 kb *Bam*HI/*Hind*III DNA fragment from the LF221 strain carrying the acidocin LF221 A gene (→ ORF orientation, • termination codon, — inverted repeat, — ribosomal binding site).

Analiza 858 bp dolgega *Bam*HI/*Hind*III odseka DNA z zapisom za acidocin LF221 A, je razkrila dva bralna okvirja, OrfA2 in OrfA3, ki nosita zapis za peptida, dolga 69 oziroma 90 aminokislinskih ostankov, ter del domnevnega tretjega bralnega okvirja, OrfA1 (slika 1). Ko smo nukleotidno zaporedje *orfA2* prevedli in primerjali z aminokislinskim zaporedjem očiščenega acidocina LF221 A, smo našli ujemanje zaporedja med mesti 17 in 61. Iz rezultatov sklepamo, da nosi *orfA2* zapis za strukturni gen za acidocin LF221 A (*Acd221A*), ki je sestavljen iz

tipičnega, dvo-glicinskega N-terminalnega podaljška s 16 aminokislinskimi ostanki ter peptida s 53 aminokisljinami. Začetni kodon ATG najdemo na mestu 116, medtem ko se 9 nukleotidov pred njim nahaja možno mesto vezave ribosoma (RBS-ribosomal binding site) GGAGG (mesto 102). *orfA3*, ki se nahaja neposredno za *orfA2*, smo identificirali iz nukleotidnega zaporedja. Slednji nosi zapis za 90 aminokislinskih ostankov dolg peptid, z začetnim kodonom ATG na mestu 328 ter verjetnim RBS GAGA 6 nukleotidov pred njim. Pet nukleotidov za zaključnim kodonom *orfA3* najdemo inverzno ponovitev, ki ima najverjetneje vlogo terminatorja transkripcije. Z analizo zaporedja odseka *Bam*HI/*Hind*III smo ugotovili še del tretjega možnega ORF (*orfA1*), ki se nahaja neposredno pred *orfA2* in je zanj trenutno znanih 37 aminokislinskih ostankov. Delno zaporedje OrfA1 vsebuje veliko Gly, Ala in Ile, torej aminokisljin, ki so tipične za bakteriocinske molekule. Iz tega sklepamo, da je OrfA1 zelo verjetno komplementarni peptid acidocina LF221 A (*Acd221α*), potreben za njegovo aktivnost. Poleg tega med oziroma pred bralnimi okvirji *orfA1*, *orfA2* in *orfA3* nismo zasledili promotorskih ali zaključevalnih zaporedij, iz česar zaključujemo, da so vsi trije bralni okvirji del istega operona.



Slika 2. Rezultati PCR na ligacijski mešanici rekombinantnih plazmidov pCR-Blunt::*Eco*RI/*Hind*III, izvedeni s kombinacijami specifičnih začetnih oligonukleotidov za vektor pCR-Blunt (BL2, BL5) in acidocin LF221 B (BB1, BB2). Progi 1 in 7: velikostni standard DNA 1 kb; v progah 2, 3, 4, 5 oziroma 6 so pomnožki PCR, dobljeni z začetniki BL2/BB1, BL2/BB2, BL5/BB2, BL5/BB1 oziroma BL2/BL5.

Figure 2. Results of the PCR performed on the ligation mix of the pCR-Blunt::*Eco*RI/*Hind*III recombinant plasmids with the vector specific primers (BL2, BL5) and the acidocin LF221 B (BB1, BB2) specific primers. Line 1 and 7: 1 kb DNA ladder; line 2, 3, 4, 5 and 6 hold PCR products obtained by using primers BL2/BB1, BL2/BB2, BL5/BB2, BL5/BB1 and BL2/BL5, respectively.

V primeru acidocina LF221 B smo tarčno DNA za ugotavljanje nukleotidnega zaporedja uporabili pomnožke PCR (slika 2; progi 2 in 5). Zaporedji posameznih pomnožkov pa smo nato sestavili v zaporedje, dolgo 1772 bp. Pri analizi 1772 bp dolgega *Eco*RI/*Hind*III dolgega odseka DNA z zapisom za acidocin LF221 B se je izkazalo, da se 35 aminokislinskih ostankov, pridobljenih s pomočjo analize očiščenega acidocina LF221 B (Bogovič Matijašič, 1998), ujema z zaporedjem bralnega okvirja OrfB4, začenši z Asn¹⁸ (slika 3). Aktivni peptid acidocina LF221 B (*Acd221B*) je sestavljen iz 48 aminokislinskih ostankov, nastane pa po odcepitvi dvoglicinskega vodilnega zaporedja iz 65 aminokisljin dolgega prebakteriocina. Štiri nukleotide pred začetnim kodonom *orfB4* je verjetni RBS (AGGGAA). *orfB3*, nameščen neposredno pred *orfB4*, kodira 75 aminokislinskih ostankov. Kot je razvidno iz nukleotidnega zaporedja, prvih 18 aminokisljin ustreza N-terminalnemu vodilnemu zaporedju dvoglicinskega tipa, s hidrofobnimi aminokisljinami na mestih -4, -7 in -12, ter Ser na mestu -11. Vodilnemu zaporedju sledi 57 aminokisljin, ki najverjetneje nosijo informacijo za komplementarno komponento dvopeptidnega acidocina LF221 B (*Acd221β*). RBS (AGGAGG) *orfB3* je 8 nukleotidov pred začetnim ATG kodonom. Na mestu nukleotida 1310, takoj za *orfB4*, najdemo še en RBS (AGAGA), kateremu sledi peptid, sestavljen iz 112 aminokislinskih ostankov. Ker pri slednjem nismo ugotovili prisotnosti dvoglicinskega vodilnega zaporedja, domnevamo, da je *orf5* odgovoren za sintezo proteina imunosti. Navzdol od *orf5* zasledimo dve regiji, ki sta verjetno zapisa za nepopolni strukturi pecelj-zanka (stem-loop) in se raztezata od nukleotidov 1669 oziroma 1735. Ker nismo opazili zaključevalnih ali začetnih zaporedij med bralnimi okvirji *orfB3*, *orfB4* in *orfB5*,

sklepamo, da se nahajajo na istem operonu. Na analiziranem 1772 bp dolgem odseku smo zasledili še dve zaporedji ponovitve, na mestih 577 in 799. Omenjena terminatorja se prekrivata s promotorskima regijama, ki ju najdemo pred *orfB2* oziroma *orfB3*. *orfB2* kodira majhen peptid, sestavljen iz 33 aminokislin, medtem ko je *orfB1* nepopoln in se razteza od mesta 1 do 564.

→ Del ORF B1

GAATTCTATT	CCTATAAGTT	CAAGAATTTTC	TCGACAATGA	TTATTATTCC	AGCCGCTATT	60
E F Y S Y K	F K N F	S T M I I I	P A A I			
TTTGTCTAC	TTTTATTTAT	TGGATCTTTT	TTTGCTGTTA	GACAGAGTAC	AGTCTCTTCG	120
F V L L L F	I G S F	F A V R Q S	T V S S			
GTTGGCGTTG	TTGAACCAAC	GGTTGTAATT	AATCAGAAAA	ATGTTAGCTA	TGATGAGGGA	180
V G V V E P	T V V I N Q	K N V S Y D E G				
CAAGTCGTTA	CAAAACATGG	TCAAAAAATGG	GTAGCTCATG	TTGATCAAGA	TAGTGGGATT	240
Q V V T K H	G Q K W	V A H V D Q	D S G I			
AGTTTAAATGC	CTGTTATGAA	AGCTAAAGGA	AAAGTGAGGA	TTGTTACCTA	TGTGCCCACT	300
S L M P V M	K A K G K V R	I V T Y V P T				
AATAAAATCT	CGTCTATTAA	GAAGGGGCAG	AAGTTAAACT	TTTCTGTACC	TACAGTAGAC	360
N K I S S I	K K G Q K L N	F S V P T V D				
GGCTTGAATA	GTAGATTAAC	TGGTAAGGTA	AAGGAGATTG	GTGTTTATCC	AATAAAATGTG	420
G L N S R L	T G K V K E I	G V Y P I N V				
AACAAGCAAA	GTATGTATGA	AGTTATTTTCG	ATTGCCAAAG	TTAGTGATAT	AAATGTTAAG	480
N K Q S M Y	E V I S I A K	V S D I N V K				
TACGGAATGC	AAGGTAATGC	CACAATAGTG	ACAGGTCGTA	GCACATATTT	TAACTATTTT	540
Y G M Q G N	A T I V T G R	S T Y F N Y F				
TTAGATAAGG	TATTGAATAA	AAGATAAAAT	TGATGAATA	AAAAATTAAA	ATTTTATTAA	600
L D K V L N	K R •					

→ ORF B2

TCTAAAGATA	AAAATATAAG	TGAATAAAAA	AGAGATGTTA	GATAAGAATA	TTGATTTGCA	660
			M L D K N	I D L		
AAGAGCAATA	TTTCATATAA	AGCAAGATAT	TAATTTGTAT	TCTGTAGTGT	ATGGATTTAA	720
Q R A I F H I	K Q D I N L Y	S V V Y G F				
ATTGCCTGAA	ACTTAATTTT	GGGAACGAAT	TTGGATAAAA	TATACTGTTT	TGGTTAGTAA	780
K L P E T •						
GTAAGCAATA	TTAA	TCCATA	TAAAAAATAA	ATTGTTTTTT	ATAGTAGGCT	840
AGATTATTAA	TTATAGGAGG	TCTTTATTAT	GAAAAATTTT	AATACATTAT	CATTTGAAAC	900
			M K N F	N T L S F E		
ATTGGCTAAC	ATAGTTGGTG	GGAGAAATAA	TTGGGCTGCT	AATATAGGTG	GAGTAGGTGG	960
T L A N I V	G ⁻² G ⁻¹ R N	N W A A N I G	G V G			
AGCGACAGTC	GCTGGATGGG	CTCTTGAAA	TGCAGTTTGC	GGTCCTGCTT	GTGGCTTTGT	1020
G A T V A G W	A L G N A V C	G P A C G F				
TGGAGCACAC	TATGTTCCAA	TAGCATGGGC	TGGCGTAACG	GCAGCTACTG	GTGGATTCCG	1080
V G A H Y V P	I A W A G V T	A A T G G F				
AAAGATAAGA	AAGTAGGGAA	TTAATATGGC	TTTAAAAACA	TTAGAAAAAC	ATGAATTAAG	1140
G K I R K •		M A L K T L E K H E L				
AAATGTAATG	GGTGGAAACA	AGTGGGGGAA	TGCTGTAATA	GGAGCTGCTA	CGGGAGCTAC	1200
R N V M	G ⁻² G ⁻¹ N	K W G N A V I	G A A T G A			
TCGCGGAGTA	AGTTGGTGCA	GAGGATTCGG	ACCATGGGGA	ATGACTGCCT	GTGCGTTAGG	1260

nadaljevanje na naslednji strani

T R G V S W C R G F G P W G M T A C A L
 AGGTGCTGCA ATTGGAGGAT ATCTGGGATA TAAGAGTAAT TAATTTATAT AGAGATTTAT 1320
 G G A A I G G Y L G Y K S N •
 ORF B5
 GTTATTCTTT GTAAC TATTA TTAATGTAAT ACTTTTTTTTA GGTAAC TGT ATCAAACGGG 1380
 M L F F V T I I N V I L F L G N L Y Q T
 CTTTAATTAT TTTAACTTTA ATCAATTGCA AGCACTTTTA CTAAC TATTT TTCTTATTGT 1440
 G F N Y F N F N Q L Q A L L L T I F L I
 TACTGTAATA GTTATCGCTA TTAATAAAAA ATTAGAAAGA GGTTATGATC TTTCTTTTTT 1500
 V T V I V I A I N K K L E R G Y D L S F
 TGCAC TTTAT TTGTATTGGC CAATTTATGT TTTTGAAGTT AAATTATATA ATTCAACAAA 1560
 F A L Y L Y W P I Y V F E V K L Y N S T
 TTATAAAGAT GGAATAGAAT TTTGGGTTTA TTTTCG TACTA ATTTTGGCCA TATCGTTTGT 1620
 N Y K D G I E F W V Y F V L I L A I S F
 AATAGGAAAA ATATTA AAAA GAATCATAAG AAAGTAATAA TAAAAC TGAA AGTACTAAAT 1681
 V I G K I L K R I I R K •
TAGTTTTTGA ATGACTGATT TAGTGCTTTT TCTACTTTCT CCTTTATTTA AGTAAATATG 1740
AAAATCTAAT AGATTTACTT AATGTTAAGC TT

Slika 3. Nukleotidno zaporedje 1,8 kb velikega *EcoRI/HindIII* odseka kromosomske DNA seva LF221 z genskim zapisom za acidocin LF221 B (→ smer bralnega okvirja, • zaključni kodon, □ promotorska regija, — inverzna ponovitev, — mesto vezave ribosoma).

Figure 3. Nucleotide sequence of the 1,8 kb *EcoRI/HindIII* DNA fragment from the LF221 strain carrying the acidocin LF221 B gene (→ ORF orientation, • termination codon, □ promotor sequence, — inverted repeat, — ribosomal binding site).

Ugotovljeno nukleotidno zaporedje odsekov *BamHI/HindIII* in *EcoRI/HindIII* z genskim zapisom za acidocin LF221 A oziroma B smo primerjali z zapisi bakteriocinov, ki so na voljo v bazah podatkov. Podobnost zaporedij smo ugotavljali s programom BLAST. *orfA2* nosi zapis za 69 aminokislin dolg prebakteriocin, s katerega se v postopku procesiranja odcepi 16 aminokislin dolg N-terminalni podaljsek. Nastali aktivni peptid acidocin LF221 A (Acd221A), dolg 53 aminokislin, kaže delno sorodnost s peptidom BrcB (52 %) brohocina-C (McCormick in sod., 1998), peptidom laktokokcinom N (39 %) laktokokcina MN (Van Belkum in sod., 1991) ter peptidom ThmB (32 %) termofilina 13 (Marciset in sod., 1997). Vsi trije opisani bakteriocini so predstavniki Ite podskupine II. skupine bakteriocinov, takoimenovanih dvopeptidnih n-lantibiotikov (Van Belkum in Stiles, 2000). Delne homologije smo zasledili tudi med N-terminalnimi podaljški acidocina LF221 A in omenjenih peptidov (slika 4). Tako opazimo na mestih -2 in -1 prisotnost dveh ohranjenih glicinskih ostankov ter vse ostale tipične značilnosti vodilnega zaporedja dvopeptidnih bakteriocinov: hidrofobne ostanke na mestih -4(I), -7(L), -12(V) in -15 (I), hidrofilne ostanke na mestih -8(E), -9(N) in -11(S) (Havarstein in sod., 1994). Navzdol od *orfA2* se nahaja *orfA3*, ki kodira peptid, sestavljen iz 90-ih aminokislin. Vloga omenjenega peptida zaenkrat še ni znana, domnevamo pa, da gre za protein imunosti (Aci221A), saj po svojem nahajališču (neposredno za strukturnim genom za bakteriocin) ustreza sestavi vseh zaenkrat raziskanih bakteriocinskih operonov. Poleg tega je njegova dolžina (90 aminokislin) v območju pričakovane velikosti proteinov imunosti II. skupine bakteriocinov (Nes in sod., 1996). Pri analizi nukleotidnega zaporedja odseka *BamHI/HindIII* smo naleteli še na del tretjega možnega bralnega okvirja, *OrfA1*, za katerega je zaenkrat znanih 37 aminokislinskih ostankov. Skoraj polovico predstavljajo majhne aminokisliline, kot na primer glicin, kar je zelo značilno za bakteriocine II. skupine (Klaenhammer, 1993). Z veliko verjetnostjo lahko sklepamo, da je

OrfA1 pravzaprav komplementarna komponenta Acd221 α , potrebna za aktivnost acidocina LF221 A. Naš zaključek temelji tudi na dejstvu, da je acidocin LF221 A delno homologen le z dvokomponentnimi bakteriocini (brohocin-C, laktokokcin MN, termofilin 13), ki so pripadniki IIe podskupine ne-lantibiotikov in potrebujejo za svoje delovanje dva peptida (Klaenhammer, 1993).

Acidocin LF221 A (peptid Acd221A)

M I E K **V** S **K** **N** **E** **L** S R I Y G G -

Brohocin-C (peptid BrcB)

M K K **E** L L N **K** **N** **E** M S R I I G G -

Laktokokcin MN

(peptid LcnN)

M K K D E A N T F K E Y S S S F A I **V** T D E **E** L E N I N G S -

Termofilin 13 (peptid ThmB)

M K Q Y N G F **E** V L H E L D L A N V T G G -

Slika 4. Primerjava aminokislinskega zaporedja N-terminalnih podaljškov acidocina LF221 A in drugih bakteriocinov II. skupine. Odebeljene aminokislino so identične, podčrtane pa pripadajo isti skupini.

Figure 4. Alignment of the N-terminal extensions of acidocin LF221 A and other class II bacteriocins. Bold amino acids are identical, underlined are from the same group.

Bralni okvir *orfB4*, ki nosi genski zapis za acidocin LF221 B, se nahaja v družbi še dveh bralnih okvirov, namreč *orfB3*, ki naj bi kodiral drugo komponento acidocina LF221 B, ter *orfB5*, ki naj bi imel vlogo proteina imunosti, kar je tipično in najpogosteje opisano sosledje genov pri bakteriocinih II. skupine. N-terminalna podaljška obeh, *orfB3* in *orfB4*, nosita ohranjen glicinski par na mestih -2 in -1, hidrofobne aminokislino na mestih -4, -7 in -12, nabite aminokislino na mestih -8 in -10 ter Ser na mestu -11 (slika 5). Ko se v posttranslacijskih procesih 18 oziroma 17 aminokislinski dolgi vodilni zaporedji odcepita s prebakteriocinskih molekul OrfB3 in Orf B4, dobimo dva peptida sestavljena iz 57 oziroma 48 aminokislinskih ostankov. Za prvega domnevamo, da je komplementarni (Acd221 β), in drugi aktivni (Acd221B), peptid acidocina LF221 B. Pri iskanju možnih sorodnosti med 1772 bp dolgim *EcoRI/HindIII* odsekom z zapisom za acidocin LF221 B smo našli delno identičnost aminokislinskih zaporedij proteinov OrfB3 (Acd221 β) z LafA (62 %) ter OrfB4 (Acd221B) in LafX (55 %). LafA in LafX skupaj tvorita laktacin F, ki ga proizvaja *Lactobacillus johnsonii* (Allison in sod., 1994). Posebno zanimiva pa je ugotovitev, da je celoten zapis *EcoRI/HindIII* odseka skoraj 100 % soroden nedavno objavljenemu zaporedju 2874 bp dolgega odseka *HindIII/HindIII*, ki nosi genski zapis za gasicin T (Kawai in sod., 2000). Bralni okvirji B3, B4 in B5 so 100 %, 98 % in 100 % identični z GatA, GatX in proteinom imunosti seva *Lactobacillus gasseri* (Kawai in sod., 2000). Podobno kot v primeru acidocina LF221 A smo tudi za acidocin LF221 B našli delne homologije le z dvokomponentnimi bakteriocini. S podrobnejšimi analizami OrfB5 (Aci221B), potencialnega faktorja imunosti za acidocin LF221 B, smo ugotovili, da je delno homologen peptidu LafI (34 %), ki je že raziskan in potrjen protein imunosti v sistemu bakteriocina laktacina F (Allison in Klaenhammer, 1996). Poleg tega imata peptida Aci221B in LafI podobno število aminokislinskih ostankov (112 oziroma 124). OrfB2 našega *EcoRI/HindIII* odseka je 100 % identičen Orf3 odseka 2874 bp, ki naj bi imel vlogo regulatorja ekspresije gasicina T, medtem ko je okrnjen peptid iz 188 aminokislinskih ostankov (OrfB1) še najbolj podoben dodatnim faktorjem ABC prenašalcev, ki jih najdemo pri nekaterih laktobacilih.

Iz rezultatov analiz nukleotidnega zaporedja in sorodnosti z že raziskanimi bakteriocini smo sklepali, da sta acidocin LF221 A in acidocin LF221 B dvokomponentna bakteriocina, kar ju razvršča v II skupino bakteriocinov, natančneje med dvopeptidne protimikrobne snovi. Za acidocin LF221 A se je izkazalo, da je nov in še ne opisan bakteriocin, medtem ko je acidocin LF221 B močno soroden gasicinu T.

Acidocin LF221 B (peptid Acd221B)	M A L K T L E K H E L R N <u>V</u> <u>M</u> G G -
Gasericin T (peptid GatX)	M A L K T L E K H E L R N V M G G -
Laktacin F (peptid LafX)	M K L N D K E L S K <u>I</u> <u>V</u> G G -
Acidocin LF221 B (peptid Acd221β)	M K N F N T L S F <u>E</u> T L A N <u>I</u> V G G -
Gasericin T (peptid GatA)	M K N F N T L S F E T L A N I V G G -
Laktacin F (peptid LafA)	M K Q F N Y L S H <u>K</u> D L A V <u>V</u> V G G -

Slika 5. Primerjava aminokislinskega zaporedja N-terminalnih podaljškov acidocina LF221 B in drugih bakteriocinov II. skupine. Odebeljene aminokisliline so identične, podčrtane pa pripadajo isti skupini.

Figure 5. Alignment of the N-terminal extensions of acidocin LF221 B and other class II bacteriocins. Bold amino acids are identical, underlined are from the same group.

Poznavanje genskega zapisa acidocinov seva LF221 nam omogoča odkrivanje in sledenje potencialno probiotičnega seva LF221 v mešanih populacijah v kompleksnih ekosistemih kot so živila in prebavni trakt. *In vivo* testi so pokazali, da sev uspešno preživi prehod skozi prebavni trakt (miši, prašiči) in preživi v siru vsaj 6 tednov (Rogelj in sod., 2002). Zatorej ostaja sev *Lactobacillus gasseri* LF221 s svojimi bakteriocini še najprej zelo zanimiva študijska bakterija, ker zaradi številnih ugodnih lastnosti ponuja možnosti uporabe tako na področju tehnologije živil kot terapevtike.

SKLEPI

Analize nukleotidnih zaporedij odsekov *Bam*HI/*Hind*III z zapisom za acidocin LF221 A ter *Eco*RI/*Hind*III z zapisom za acidocin LF221 B so pokazale, da sta acidocina predstavnika IIe podskupine II skupine bakteriocinov, kar ju potrjuje kot dvopeptidna nelantibiotika. Iz rezultatov sorodnosti z znanimi bakteriocini smo zaključili, da je acidocin LF221 A nov bakteriocin, ki je delno soroden brohocinu-C, termofilinu 13 in laktokokcinu MN. Po drugi strani pa je acidocin LF221 B delno soroden laktacinu F in močno podoben gasericinu T. Poznavanje genskega zapisa acidocinov je dodaten podatek pri natančni identifikaciji seva LF221. Hkrati je to pomembna informacija pred kakršnokoli uporabo bakteriocinogenega seva LF221 kot probiotika, ali njegovih bakteriocinov kot bio konzervansov. Nenazadnje pa omogoča znana genska informacija acidocinov LF221 A in B pripravo specifičnih lovk za odkrivanje in sledenje seva LF221 v mešanih populacijah. Zaradi širokega spektra protimikrobnega delovanja, tvorbe bakteriocinov in potencialno probiotičnih lastnosti je sev LF221 izjemno zanimiva bakterija za nadaljnje raziskave, predvsem z možnostjo aplikacije kot dodatka funkcionalni hrani ali za razvoj farmacevtskih preparatov.

SUMMARY

Analysis of *Bam*HI/*Hind*III and *Eco*RI/*Hind*III DNA fragments, carrying genetic determinants for acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, respectively, classified LF221 acidocins as two-component nonlantibiotics. Homology studies revealed acidocin LF221 A as a novel bacteriocin, which shows certain homology only to brohocin-C, thermophilin 13 and lactococin MN. On the other hand, acidocin LF221 B is partially homologous to lactacin F and virtually identical to gasericin T. Detailed characterization of *L. gasseri* LF221 acidocins is an

important piece of background information in applying this strain as a probiotic or its bacteriocins as bio preservatives. The genetic information on both bacteriocins also enables tracking of the LF221 strain in mixed populations. Characteristics such as wide inhibitory spectrum, bacteriocin production and probiotic properties promote *Lactobacillus gasseri* LF221 as a promising candidate to be recognized as health beneficial microbe with the possible application in food and pharmaceutical industry.

VIRI

- Allison, G.E./ Fremaux, C./ Klaenhammer T.R. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.*, 176(1994), 2235–2241.
- Allison, G.E./ Klaenhammer, T.R. Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *lafI*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(1996), 4450–4460.
- Balla, E./ Dicks, L.M.T./ du Toit, M./ van der Merwe, M.J./ Holzapfel, W.H. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2000), 1298–1304.
- Bimboim, H.C./ Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(1979), 1513–1523.
- Bogovič-Matijašič, B./ Rogelj, I./ Nes, I.F./ Holo, H. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49(1998), 606–612.
- Contreras, B.G.L./ de Vuyst, L./ Devreese, B./ Busanyova, K./ Raymaeckers, J./ Bosman, F./ Sablon, E./ Vandamme, E.J. Isolation, purification, and amino acid sequence of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(1997), 13–20.
- Čanžek, A. Delni opis genov za acidocina LF221 A in B seva *Lactobacillus acidophilus* LF221. Magistrsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Medicinska fak., 1998, 68 str.
- Čanžek Majhenič, A. Klasifikacija bakteriocinov seva *Lactobacillus gasseri* LF221 na osnovi genskega zapisa. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., 2002, 80 str.
- Čanžek Majhenič, A./ Venema, K./ Allison, G.E./ Matijašič, B.B./ Rogelj, I./ Klaenhammer, T.R. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Dostopno na: http://www.springerlink.com/media/b5rhtwy4f5hdhxn7qu5m/contributions/6/v/0/p/6V0PQ7XFHCGCLBMW_html/fulltext.html (18.11.2003)
- Dinsmore, P.K./ Klaenhammer, T.R. Molecular characterization of a genomic region in a *Lactococcus* bacteriophage that is involved in its sensitivity to the phage defense mechanism *AbiA*. *J. Bacteriol.*, 179(1997), 2949–2957.
- Havarstein, L.S./ Holo, H./ Nes, I.F. The leader peptide of colicin V shares consensus sequence with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiol.*, 140(1994), 2383–2389.
- Herranz, C./ Casaus, P./ Mukhopadhyay, S./ Martinez, J.M./ Rodriguez, J.M./ Nes, I.F./ Hernandez, P.E./ Cintas, L.M. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.*, 18(2001), 115–131.
- Jimenez-Diaz, R./ Rios-Sanchez, R.M./ Desmazeaud, M./ Riuz-Barba, J.L./ Piard, J.C. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(1993), 1416–1424.
- Kawai, Y./ Saitoh, B./ Takahashi, O./ Kitazawa, H./ Saito, T./ Nakajima, H./ Itoh, T. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(2000), 2201–2208.
- Klaenhammer, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12(1993), 39–86.
- Marciset, O./ Jeronimus-Stratingh, M.C./ Mollet, B./ Poolman, B. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.*, 272(1997), 14277–14284.
- McCormick, J.K./ Poon, A./ Sailer, M./ Gao, Y./ Roy, K.L./ McMullen, L.M./ Vederas, J.C./ Stiles, M.E./ Van Belkum M.J. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an anti-botulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(1998), 4757–4766.
- Moll, G.N./ Konings, W.N./ Driessen, A.J.M. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76(1999), 185–198.

- Nes, I.F./ Diep, D.B./ Havarstein, L.S./ Brurberg, M.R./ Eijsink, V./ Holo, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(1996), 113–128.
- Ouwehand, A.C. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: Lactic acid bacteria (Eds.: Salminen, S./ Von Wright, A.). New York, Marcel Dekker, Inc., 1998, 139–160.
- Quadri, L.E.N./ Sailer, M./ Roy, K.L./ Vederas, J.C./ Stiles, M.E. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J Biol. Chem.*, 269(1994), 12204–12211.
- Revol-Junelles, A.M./ Mathis, R./ Krier, F./ Fleury, Y./ Delfour, A./ Lefebvre, G. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 synthesizes two distinct bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23(1996), 120–124.
- Rogelj, I./ Bogovič Matijašič, B./ Čanžek Majhenič, A./ Stojković, S. The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, 76(2002), 83–91.
- Saarela, M./ Mogensen, G./ Fonden, R./ Matto, J./ Mattila-Sandholm, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(2000), 197–215.
- Sambrook, J./ Fritsch, E.F./ Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 1659 str.
- Standard nucleotide-nucleotide BLAST. NCBI – National Center for Biotechnology Information, Bethesda (March 2002), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (2001)
- Tagg, J.R./ Dajani, A.S./ Wannamaker, L.W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40(1976), 722–756.
- Van Belkum, M.J./ Hayema, B.J./ Geis, A./ Kok, J./ Venema, G. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(1989), 1187–1191.
- Van Belkum, M.J./ Hayema, B.J./ Jeeninga, R.E./ Kok, J./ Venema, G. Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(1991), 492–498.
- Van Belkum, M.J./ Stiles, M.E. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 17(2000), 323–335.