

II 39. 860

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Facultatea Știința și Ingineria Alimentelor

**Studiul bacteriocinelor produse de bacteriile lactice
din genul Lactococcus lactis în scopul utilizării
acestora în industria alimentară**

Autor: drd. Cătălin Iancu

Coordonator: prof. dr. ing. Anca Nicolau

Noiembrie, 2011

CUPRINS

Obiectivele științifice ale tezei de doctorat	1
Capitolul 1. Bacteriocinele produse de specia <i>Lactococcus lactis</i>: diversitatea și caracteristicile reprezentanților din clasele I și a II-a	3
1.1 Introducere	4
1.2 Bacteriocinele. Noțiuni generale	9
1.2.1 Biosinteza bacteriocinelor	9
1.2.2 Imunitatea la acțiunea bacteriocinelor	11
1.2.3 Modul de acțiune al bacteriocinelor	14
1.3 Diversitatea bacteriocinelor din clasele I și a II-a produse de <i>L. lactis</i>	17
1.2.1 Clasa I. Lantibioticele	17
1.2.2 Genetica nizinei	21
1.2.3 Mod de acțiune	23
1.2.4 Genetica lacticinei 3147	24
1.2.5 Lactococcinele, Genetică și mod de acțiune	26
1.4 Aplicațiile practice ale bacteriocinelor produse de specia <i>L. lactis</i>	28
1.4.1 Nizina A	28
1.4.2 Lacticina 3147	29
1.4.3 Lactococcinele	30



Referințe bibliografice	32
Capitolul 2. Izolarea identificarea și caracterizarea unei tulpini bacteriocinogenice din specia <i>Lactococcus</i> spp.	42
2.1 Introducere	43
2.2 Materiale și metode	48
2.2.1 Sursele de izolare a bacteriilor lactice producătoare de bacteriocine	48
2.2.2 Izolarea bacteriilor lactice din produsele fermentate	49
2.2.3 Selecția bacteriilor lactice producătoare de bacteriocine	50
2.2.4 Evidențierea naturii proteice a compusului antimicrobian sintetizat (Testul proteinazei K)	51
2.2.5 Identificarea genotipică și fenotipică a producătorului de bacteriocine	51
2.2.6 Stabilirea antibiotipului	55
2.2.7 Sensibilitatea tulpinii <i>L.lactis ssp lactis</i> H8 la fagii litici	56
2.2.8 Dinamica biosintezei bacteriocinei	57
2.3 Rezultate și discuții	58
2.3.1 Izolarea și selecția bacteriilor lactice cu potențial bacteriogenic din produsele fermentate	58
2.3.2 Identificarea genotipică și fenotipică a tulpinii producătoare	59
2.3.3 Stabilirea antibiotipului tulpinii de <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> H8	61
2.3.4 Acțiunea fagilor asupra tulpinii <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> H8	63
2.3.5 Dinamica sintezei bacteriocinei produse de tulpina <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> H8	63

2.4 Concluzii	64
Referințe bibliografice	65
Capitolul 3. Purificarea și identificarea bacteriocinei produse de tulpina <i>L. lactis</i> ssp <i>lactis</i> H8	70
3.1 Introducere	71
3.2 Materiale și metode	75
3.2.1 Metoda I de purificare a bacteriocinei produse de tulpina <i>L. lactis</i> ssp <i>lactis</i> H8	75
3.2.2 Prepararea mediului TY	75
3.2.3 Metoda II de purificare	77
3.2.4 Determinarea masei moleculare a bacteriocinei	78
3.2.5 Identificarea genetică a bacteriocinei	79
3.3 Rezultate și discuții	80
3.3.1 Metoda I de purificare a bacteriocinei produse de tulpina <i>L. lactis</i> ssp <i>lactis</i> H8	80
3.3.2 Metoda a II-a de purificare a bacteriocinei produse de tulpina <i>L. lactis</i> ssp <i>lactis</i> H8	83
3.4 Concluzii	90
Referințe bibliografice	92
Capitolul 4. Evidențierea importanței aminoacizilor din domeniul N-terminal al lactococcinei B cu ajutorul tehnicii <i>Alanine scanning</i>	95
4.1 Introducere	96

4.2 Materiale și metode	99
4.2.1 Microorganisme, plasmide și reactivi	99
4.2.2 Amplificarea, clonarea și exprimarea operonului <i>LcnB</i>	101
4.2.3 Metoda "Alanine scanning" cu utilizarea mutagenezei situs-specifică	106
4.2.4 Purificarea parțială a mutațiilor lactococcinei B	111
4.2.5 Determinarea activității antimicrobiene a mutațiilor	112
4.3 Rezultate și discuții	114
4.3.1 Clonarea și expresia heterologă a lactococcinei B	114
4.3.2 Mutageneza prin procedeul „ <i>Alanine scanning</i> ”	116
4.3.3 Analiza mutațiilor obținute	118
4.4 Concluzii	120
Referințe bibliografice	121
Capitolul 5. Utilizarea rațională a mutagenezei induse pentru obținerea unor noi variate de lacticină 3147	126
5.1 Introducere	127
5.2 Materiale și metode	130
5.2.1 Microorganisme și condiții de cultivare	130
5.2.2 Saturarea cu aminoacizi prin mutageneză indusă	131
5.2.3 Determinarea masei moleculare a variantelor mutante prin spectrometrie de masă	135
5.2.4 Evidențierea bioactivității peptidelor mutante	136
5.3 Rezultate și discuții	137
5.3.1 Saturarea în aminoacizi prin mutageneză indusă	137

5.4 Concluzii	141
Referințe bibliografice	143
Capitolul 6. Concluzii finale	146
Capitolul 7. Diseminarea rezultatelor cercetării	148

Obiectivele științifice ale tezei de doctorat

Bacteriile lactice sunt, în general, capabile să sintetizeze o serie de compuși care prezintă o importanță deosebită în industria alimentară. Printre cei mai intens studiați compuși se număra bacteriocinele.

În ultimele două decenii au fost izolate și identificate o mare varietate de bacteriocine produse de bacteriile lactice capabile să inhibe creșterea altor bacterii. Aceste bacteriocine au fost caracterizate biochimic și genetic și au fost puse în evidență atât modul lor de acțiune cât și utilitatea lor practică în industrie. În ciuda eforturilor depuse de către cercetători, năzina a rămas, și în zilele noastre, singura bacteriocină purificată și folosită la nivel industrial ca bioconservant în peste 50 de țări din întreaga lume. Totuși, în prezent, studiile care vizează bacteriocinele promit găsirea unor noi compuși antimicrobieni sintetizați în mod natural de bacteriile lactice care să poată suplini cu succes năzina. Una dintre acestea este lacticina 3147, o bacteriocină din clasa lantibioticelor care posedă un spectru antimicrobian larg comparabil cu cel al năzinei. Nu sunt de neglijat nici bacteriocinele cu un spectru antimicrobian restrâns care posedă o specificitate foarte ridicată pentru tulpini de bacterii lactice din aceeași specie și același gen. Acestea sunt denumite generic lactococcine și sunt produse de specii ale genului *Lactococcus lactis*. Pot fi utilizate cu succes la accelerarea maturării brânzeturilor datorită efectului lor de liză rapidă a celulelor culturilor starter folosite în industria brânzeturilor.

În prima parte, teza intitulată "Studiul bacteriocinelor produse de bacteriile lactice din genul *Lactococcus lactis*, în vederea utilizării acestora în industria alimentară" aduce contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu prin izolarea și identificarea unei tulpini de bacterii lactice cu potențial bacteriocinogenic dintr-un produs

tradițional românesc, identificarea bacteriocinei și purificarea acesteia utilizând metode moderne de investigație. Partea a doua a tezei cuprinde elemente de noutate, în studiul la nivel molecular, a două bacteriocine care aparțin principalelor două clase și anume lactococcina B (Clasa a II-a) și lacticina 3147 (Clasa I). Mai jos sunt prezentate succint obiectivele prezentei teze de doctorat:

- Izolarea, identificarea și caracterizarea unei tulpini bacteriocinogenice din specia *Lactococcus* spp.
- Purificarea și identificarea bacteriocinei produse de tulpina *L. lactis* ssp *lactis* H8.
- Evidențierea importanței aminoacizilor din domeniul N-terminal al lactococcinei B cu ajutorul tehnicii *Alanine scanning*.
- Utilizarea rațională a mutagenzei induse pentru obținerea unor noi variante de lacticină 3147.

Teza de doctorat a fost realizată în perioada 2009-2011 în cadrul Universității "Dunărea de Jos" din Galați, Facultatea Știința și Ingineria Alimentelor și în cadrul University College Cork, Departamentul de Microbiologie.

Structura tezei de doctorat

Teza de doctorat are 152 de pagini și este structurată în două secțiuni: prima secțiune cuprinde studiul documentar intitulat "*Bacteriocinele produse de specia Lactococcus lactis: diversitatea și caracteristicile reprezentanților din clasele I și a II-a*"; și secțiunea de studiu experimental structurată în patru capitole. Lucrarea conține 29 de figuri și 6 tabele.

I. Studiu documentar

Studiul documentar cu titlul "*Bacteriocinele produse de specia Lactococcus lactis: diversitatea și caracteristicile reprezentanților din clasele I și a II-a*" cuprinde informații referitoare la stadiul actual al cunoașterii în domeniul bacteriocinelor produse de bacteriile lactice. Acest studiu cuprinde, în prima parte, informații generale legate de biosinteza, structura și modul de acțiune al bacteriocinelor. A doua parte a review-ului literar este consacrată doar bacteriocinelor din clasele I și a II-a, exemplificând caracteristicile acestor bacteriocine prin intermediul celor mai importanți reprezentanți: nizina, lacticina 3147 din clasa I și lactococcinele A și B din cea de-a II-a clasa. În partea de final sunt descrise succinct aplicațiile practice ale acestor bacteriocine, accentul fiind pus pe aplicațiile lor în industria alimentară.

II. Studiu experimental

Studiul experimental cuprinde tehnicile folosite și rezultatele investigațiilor realizate pe parcursul celor trei ani de program doctoral. Această parte cuprinde patru capitole după cum urmează:

CAPITOLUL 2. Izolarea, identificarea și caracterizarea unei tulpini bacteriocinogenice din specia *Lactococcus spp.* În acest capitol, sunt prezentate metodele de izolare și selecție a unor tulpini bacteriocinogenice de bacterii lactice utilizând produse fermentate lactic drept surse de bacterii lactice. Totodată, s-a urmărit și identificarea genotipică și fenotipică a tulpinii producătoare selectate precum și evidențierea anumitor caracteristici care ar putea genera date importante pentru recomandarea utilizării acestora ca tulpină industrială.

CAPITOLUL 3. Purificarea și identificarea bacteriocinei produsă de tulpina *L. lactis* ssp *lactis* H8. Acest capitol cuprinde strategiile aplicate pentru purificarea și identificarea bacteriocinei produse de tulpina identificată în capitolul anterior ca fiind *L. lactis* ssp. *lactis*. Cu ajutorul cromatografiei lichide de înaltă performanță s-a reușit separarea bacteriocinei în diferite stadii de purificare. Spectrometria de masă a permis identificarea masei moleculare a bacteriocinei iar amplificarea genei structurale a acesteia, prin tehnica PCR, a condus la identificarea peptidei antimicrobiene: lactococcina B.

CAPITOLUL 4. Evidențierea importanței aminoacizilor din domeniul N-terminal al lactococcinei B cu ajutorul tehnicii *Alanine scanning*. Acest capitol descrie evaluarea importanței funcționale a unei secvențe de aminoacizi a lactococcinei B care, conform unui studiu recent, ar putea avea o implicație majoră în potențialul antibacterian al bacteriocinei, utilizând o tehnică denumită „*Alanine scanning*”.

CAPITOLUL 5. Utilizarea rațională a mutagenezei induse pentru obținerea unor noi variante de lacticină 3147. În prezentul studiu au fost supuse bioingineriei, patru resturi de aminoacid din două domenii diferite ale moleculelor peptidice LtnA1. S-a încercat obținerea de noi variante de lacticină prin combinarea variantelor mutante obținute ale LtnA1 cu varianta sălbatică a LtnA2 și testarea comportamentului tuturor variantelor mutante nou-obținute în scopul creării unei așa-numite hărți de design a lantibioticelor.

Rezultate experimentale

2. Materiale și metode

În scopul izolării de bacterii lactice potențial producătoare de bacteriocine au fost selectate și utilizate în prezentul studiu probe prelevate din diverse alimente tradiționale, produse artisanal care au fost obținute prin fermentare lactică. În total au fost incluse în studiu 16 produse fermentate cu ajutorul bacteriilor lactice, șapte dintre acestea fiind produse artisanale din România, patru produse provenind de la centrul de cercetare "Teagasc Agriculture and Food Development Authority" Moorepark, Cork, Irlanda și șase produse având ca țară de origine Franța.

Aproximativ 10 g din fiecare probă au fost suspensionate în 90 ml soluție de săruri Ringer (8,6g NaCl, 0,3g KCl, 0,33g CaCl₂ dizolvate într-un litru de apă distilată sterilă) și omogenizate ulterior utilizând un omogenizator automat (IUL Instruments Masticator, USA). Din fiecare din aceste probe sau realizat șase diluții decimale care au fost inoculate în mediu MRS (Merck, Germania) agarizat conținând 1 % ciclohexamidă (Sigma-Adrich, Franta) ca agent antifungic. Repicarea coloniilor s-a realizat cu ajutorul unui sistem automat de repicare "Genetix QPIX II-XT colony-picking robot" (Genetix, Germania).

Selecția bacteriilor lactice producătoare de bacteriocine s-a realizat cu ajutorul metodei difuziei în gel. Pentru acest experiment au fost pregătite plăci Petri în care s-au turnat 50 ml mediu GM17 (mediu M17-Oxoid, îmbogățit cu 0,5% glucoză) cu 1,5 % agar. După expunerea la razele UV în plăci s-au adăugat aproximativ 40 ml mediu GM 17 cu 0,75 % agar, fluidificat și temperat la 50 °C pe baie de apă, în care s-au adăugat 80 μl (0,2 % v/v) inocul conținând tulpina HP *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. După solidificarea completă a celui de-al doilea strat, plăcile au fost termostatare la 30 °C timp de 16-18 ore și apoi analizate vizual pentru apariția zonelor clare de inhibiție.

Evidențierea naturii proteice a compusului antimicrobian sintetizat s-a realizat cu ajutorul testului proteinazei K.

Identificarea genotipică s-a realizat prin amplificarea unei regiuni a unității 16S a ARN-ului ribozomal și (i.e. amplicon) obținut în urma reacției de polimerizare în lanț (PCR). Identificarea subspeciei tulpinei identificate genotipic ca fiind *Lactococcus lactis* a fost realizată cu ajutorul unor teste fenotipice: capacitatea de a hidroliza arginina, creșterea pe mediu cu 4% NaCl, la 40°C și activitatea glutamatdecarboxilazei.

Stabilirea antibiotipului tulpinii *L. lactis ssp. lactis* H8 s-a realizat prin testarea rezistenței acesteia la o serie de antibiotice.

Sensibilitatea tulpinii *L. lactis ssp. lactis* H8 la fagii litici a fost evidențiată cu ajutorul a doisprezece fagi specifici bacteriilor lactice din genul *L. lactis*, din lizate celulare ale unor culturi starter infectate, folosite în industria laptelui.

Dinamica biosintezei bacteriocinei s-a evidențiat prin subcultivarea tulpinii *L. lactis ssp. lactis* H8, pe mediu M17 îmbogățit cu 0,5% glucoză lichidă la 30 °C timp de 22 de ore prelevându-se 1 ml cultură la diferite intervale de timp.

2.1 Rezultate și discuții

Izolarea și selecția bacteriilor lactice cu potențial bacteriogenic din produsele fermentate

În urma izolării aleatorii de către robot au rezultat 1500 colonii de bacterii lactice din totalul celor 16 probe de alimente fermentate. De asemenea, a rezultat un număr semnificativ de colonii de drojdii provenite în special de la materialele vegetale fermentate precum și colonii de mușgaiuri provenite de la brânzeturile cu mușgai în pastă sau la suprafață. Coloniile de bacterii lactice izolate au fost supuse unei evaluări a capacității de sinteză a compușilor antimicrobieni, rezultând astfel 10 tulpini capabile să sintetizeze un compus antibacterian care a prezentat un comportament antagonistic față de tulpina *Lactococcus lactis ssp. cremoris* HP acestora fiindu-le atribuite notațiile:

H7, H8 (colonii izolate din brânză telemea din lapte de oaie produsă în zona de munte-România); F6, F7, F8, F9 (izolate din caș obținut din lapte de vacă-Romania); E4, F4, F5, F6_{IT} (izolate din brânza de tip Provolone-Italia). Testul cu proteinaza K a evidențiat faptul că doar una din cele 10 tulpini selectate produce un compus antibacterian de natură peptidică, reacția de hidroliză enzimatică a peptidei toxice pentru tulpina indicator utilizată fiind marcată de scăderea drastică a activității antibacteriene, fapt observat vizual datorită formei de semilună a zonei de inhibiție (Figura 2.3).

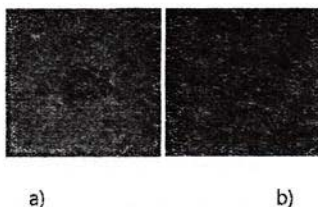


Figura 2.3 Evidențierea naturii proteice a compusului antibacterian sintetizat de tulpina H8. a) Zona de inhibiție obținută în lipsa proteinazei K, b) Zona de inhibiție obținută în urma hidrolizei unei părți din peptida antibacteriană difuzată în gel

Identificarea genotipică și fenotipică a tulpinii producătoare

În urma electroforezei în gel de agaroză a produsului obținut prin reacția în lanț a polimerazei și analiza imaginii obținute s-a observat că lungimea ampliconului obținut a fost de 1,7 kb, care corespunde celei preconizate (Figura 2.4).

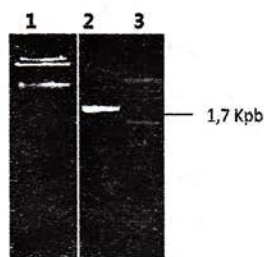


Figura 2.4 Amplificarea unității 16S a ARN-ului ribozomal prin reacția PCR utilizând ca matriță ADN-ul genomic izolat din H8, Linia 1. ADN genomic; linia 2. produsul reacției PCR; linia 3. Marker-ul cu lungimea de până 1 Kpb

Identitatea (genul și specia) tulpinii notate H8 a fost stabilită ca fiind *Lactococcus lactis* relevată pe baza procentajului de potrivire (98 %) dintre secvențele comparate (Figura 2.5). În plus analiza fragmentelor ARNr de 16 S a sugerat apartenența tulpinii H8 la subspecia *lactis*, datorită unei omologii scăzute cu fragmentele genice aparținând ARNr de 16 S de la tulpina *L. lactis* ssp *cremoris* p9B4 (linia punctată), fapt ce a fost confirmat ulterior prin teste biochimice.



Figura 2.5 Arborele filogenetic care descrie legătura dintre tulpina H8 și alte tulpini înrudite așa cum a rezultat din analiza fragmentelor genice ale ARN, 16S

Rezultatele testelor de identificare fenotipică a tulpinii *L. lactis* H8 (i.e. capacitatea de a hidroliza arginina, creșterea pe mediu cu 4 % NaCl și activitatea glutamat decarboxilazei) au fost pozitive, sugerând apartenența acestuia la subspecia *lactis*.

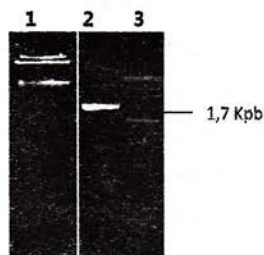


Figura 2.4 Amplificarea unității 16S a ARN-ului ribozomal prin reacția PCR utilizând ca matriță ADN-ul genomic izolat din H8, Linia 1. ADN genomic; linia 2. produsul reacției PCR; linia 3. Marker-ul cu lungimea de până 1 Kpb

Identitatea (genul și specia) tulpinii notate H8 a fost stabilită ca fiind *Lactococcus lactis* relevantă pe baza procentajului de potrivire (98 %) dintre secvențele comparate (Figura 2.5). În plus analiza fragmentelor ARNr de 16 S a sugerat apartenența tulpinii H8 la subspecia *lactis*, datorită unei omologii scăzute cu fragmentele genice aparținând ARNr de 16 S de la tulpina *L. lactis* ssp *cremoris* p9B4 (linia punctată), fapt ce a fost confirmat ulterior prin teste biochimice.

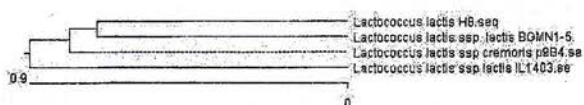


Figura 2.5 Arborele filogenetic care descrie legătura dintre tulpina H8 și alte tulpini înrudite așa cum a rezultat din analiza fragmentelor genice ale ARN, 16S

Rezultatele testelor de identificare fenotipică a tulpinii *L. lactis* H8 (i.e. capacitatea de a hidroliza arginina, creșterea pe mediu cu 4 % NaCl și activitatea glutamat decarboxilazei) au fost pozitive, sugerând apartenența acestuia la subspecia *lactis*.

Stabilirea antibiotipului tulpinii de *Lactococcus lactis ssp. lactis* H8

Antibiograma tulpinii *L. lactis ssp. lactis* H8, realizată pentru 21 de antibiotice a relevat o susceptibilitate maximă a acesteia la acțiunea minociclinei (un antibiotic cu spectru larg de acțiune din familia tetraciclinei) dar și imunitatea față de alte antibiotice utilizate pentru acest experiment (spectinomicina, cefaclor, polimixina B sau fosfomicina). Conform lui Ammor *et al.*, 2007, tulpinile speciei *L. lactis* prezintă de obicei susceptibilitate ridicată la acțiunea antibioticelor cu specificitate pentru bacteriile Gram pozitive (i.e. bacitracina, novobiocina, teicoplanina sau vancomicina), antibioticelor cu spectru larg (i.e. rifampicina, cloramfenicol) și a beta lactamilor (peniciline, ampicilina, amoxicilina, piperacilina sau ipinem). Aceste date au fost evidențiate și de antibiograma tulpinii *L. lactis ssp. lactis* H8 (Figura 2.6).

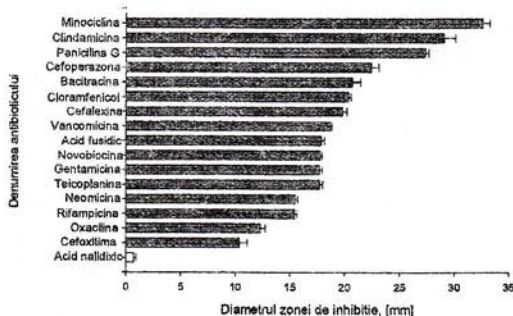


Figura 2.6 Antibiograma tulpinii *Lactococcus lactis ssp. lactis* H8. Datele sunt prezentate ca medie a trei determinări realizate în triplicat

Sensibilitatea tulpinii *L.lactis ssp lactis* H8 la fagii litici

Rezistența tulpinii *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* H8 la acțiunea tuturor fagilor utilizați în acest studiu a fost dovedită de lipsa zonelor clare de inhibiție a creșterii și dezvoltării acesteia, pe mediu semisolid agarizat, care ar fi putut avea loc datorită propagării bacteriofagilor în celulele gazdă. Totodată, s-a observat infectarea tulpinii test *Lactococcus lactis* MG1363 cu fiecare bacteriofag utilizat aparținând celor trei specii menționate.

Dinamica sintezei bacteriocinei produse de tulpina *L. lactis ssp. lactis* H8

Faza logaritmică de creștere a tulpinii bacteriene corespunde cu intensificarea sintezei bacteriocinei, urmând ca în faza staționară de creștere sinteza să stagneze, activitatea antimicrobiană aflându-se la o valoare maximă de 1260 AU/ml după 16-18 ore de cultivare (Figura 2.7).

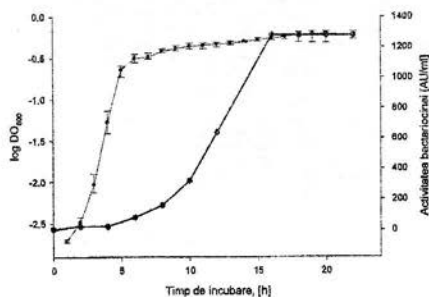


Figura 2.7 Dinamica sintezei bacteriocinei pentru tulpina *L. lactis ssp. lactis* H8. Evoluția activității antimicrobiene pe durata cultivării este reprezentată de linia continuă neagră, iar dinamica de creștere a tulpinii *L. lactis ssp. lactis* H8 este marcată de linia continuă roșie

3. Purificarea și identificarea bacteriocinei produsă de tulpina *L. lactis ssp lactis*

3.1 Materiale si metode

Pentru purificarea bacteriocinei s-au utilizat doua metode diferite, in prima utilizandu-se supernatantul iar in a doua biomasa, ca surse de bacteriocina, Purificarea s-a realizat prin cromatografie lichida de inalta performanta.

Masa moleculară a peptidei antimicrobiene produsă de tulpina *L.lactis ssp lactis*-H8 s-a determinat utilizând echipamentul de spectrometrie de masă Axima Shimadzu Biotech Plus (Shimadzu Biotech, Manchester, UK) care funcționează după principiile tehnologiei MALDI TOF-MS.

Identificarea genetică a bacteriocinei s-a realizat folosind ca punct de plecare datele obținute anterior de la analizele de purificare și determinarea masei moleculare a bacteriocinei pure active. Astfel s-a realizat designul a două oligonucleotide primer notate LcnB FOR si LcnB REV pe baza secvenței genei codificatoare a lactococcinei B descrisă anterior de van Belkum et al. 1992. Secvențele oligonucleotidelor primer sunt: TAATATTGTTTCTGATGAAG pentru oligonucleotida primer sens (LcnB FOR) și TTAGTGGAATGTTTTCCCAT pentru oligonucleotida primer antisens (LcnB REV).

3.2 Rezultate și discuții

Metoda I de purificare a bacteriocinei produsa de tulpina *L. lactis ssp lactis* H8

Utilizând primul protocol de purificare descris s-a obținut un profil de eluție al bacteriocinei descris în Figura 3.1 unde se observă că eluarea compusului a avut loc în mai multe etape corespunzătoare timpilor de retenție indicați în cromatogramă. Ca urmare, în următoarea etapă s-au analizat fracțiunile corespunzătoare *peak*-urilor majore.

266.612

17



Din analiza antagonismului bacterian a fracțiunilor colectate, utilizând ca microorganism indicator tulpina *Lactococcus lactis ssp cremoris*-HP, s-a observat că fracțiunea colectată 6 este cea mai activă, fapt observat prin aprecierea vizuală a zonei de inhibiție. Activitate antimicrobiană s-a constatat și la fracțiunile colectate 5 și 7, dar zonele de inhibiție obținute au avut dimensiuni reduse comparativ cu cea obținută în cazul fiolei 6 (Figura 3.2). Acest aspect indică faptul că eluarea compusului biologic activ a avut loc după aproximativ 30 de minute însă etapa nu a fost completă.

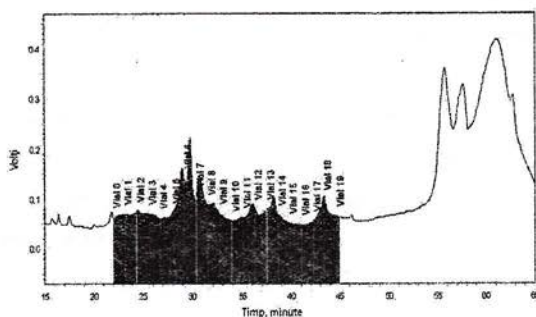


Figura 3.1 Profilul cromatogramei RP-HPLC (214 nm) obținută prin eluarea activității antimicrobiene pe coloana Phenomenex Proteo Jupiter C₁₈.

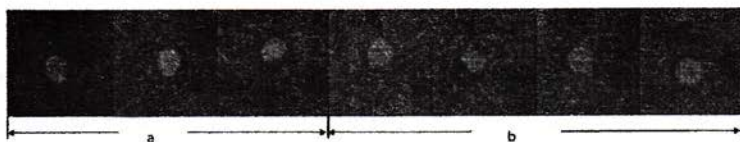


Figura 3.2 Activitatea antibacteriană a bacteriocinei purificate prin RP-HPLC produsă de tulpina *L. lactis ssp. lactis*-H8; a) fracțiuni active; b) fracțiuni inactice

Metoda a II-a de purificare a bacteriocinei produse de tulpina *L. lactis ssp. lactis* H8

Utilizând această metodă de purificare s-a încercat și identificarea compusului antimicrobian prin spectrometrie de masă. În mod nesurprinzător, profilul cromatogramei rezultat în urma eluării activității antimicrobiene de pe coloana XBridge C18, 10mm x 250mm, în gradient de propan-2-ol, a fost mai complex comparativ cu cel obținut la prima metoda (Figura 3.3). Acest fapt poate fi explicat de complexitatea mediului din care s-au realizat separarea și purificarea bacteriocinei.

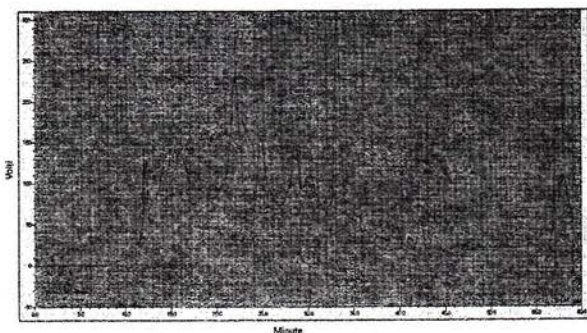


Figura 3.3 Profilul cromatogramei RP-HPLC obținut la purificarea bacteriocinei produse de tulpina *L. lactis ssp. lactis* -H8. Proba injectată a constat în preparatul brut de bacteriocină aflată în suspensie în soluție de propan 2-ol la pH=2,0. Frajeciunile active au fost colectate în fiolele 23-48 ale colectorului de fracjeciuni

În urma evaluării activității antimicrobiene, prin metoda difuziei în gel, s-a observat că bacteriocina a fost eluată de pe coloana cromatografică în mai multe etape, bacteriocina fiind prezentă în formă activă în majoritatea fracjeciunilor colectate (Figura 3.4). Eluarea continuă a compusului antimicrobian hidrofoab de pe coloană se poate datora interacjeciunilor hidrofoabe sau polare dintre bacteriocină și alți compuși cu hidrofoabitate diferită. Aceștia au fost eluați împreună la atingerea concentrației critice

specifice fiecărui compus, la care a avut loc desorbția din faza staționară și ulterior eluarea acestora de pe coloană, conform principiului cromatografiei de lichide de înaltă performanță în faza inversă. Dintre fracțiunile cele mai active s-a selectat aleatoriu un număr de zece probe care au fost supuse analizei prin spectrometrie de masă cu scopul de a determina masa moleculară a compusului activ dar și puritatea acestuia (Figura 3.5).

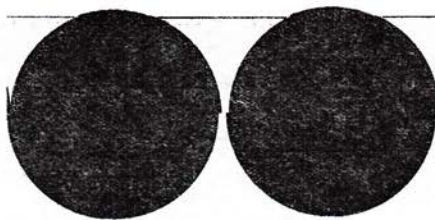


Figura 3.4 Activitatea antibacteriană a bacteriocinei detectată în fracțiunile colectate. Tulpina indicator folosită a fost *L. lactis ssp. cremoris* HP

Din analiza spectrelor a rezultat faptul că fracțiunile 33, 34 și 35 (Figura 3.5) conțin cea mai mare cantitate de bacteriocină judecând după amplitudinea intensității semnalului de detecție a ionilor purtători ai compusului cu masa de ~ 5330 Da.

Având în vedere faptul că eluarea compusului antimicrobian produs de tulpina *L. lactis ssp. lactis* – HB a avut loc în mai multe etape iar gradul de puritate a bacteriocinei, apreciată prin analiza spectrelor de masă, a fost unul scăzut, s-a decis efectuarea unei noi etape de purificare.

Cea de a doua treaptă de purificare a indicat faptul că separarea bacteriocinei din mediul de cultură se poate realiza în condiții optime printr-o îndepărtare mai

eficiență a compușilor hidrofobi din mediul de cultură GM17, care au interferat cu procesul de separare cromatografică în prima etapă de purificare (Figura 3.6).

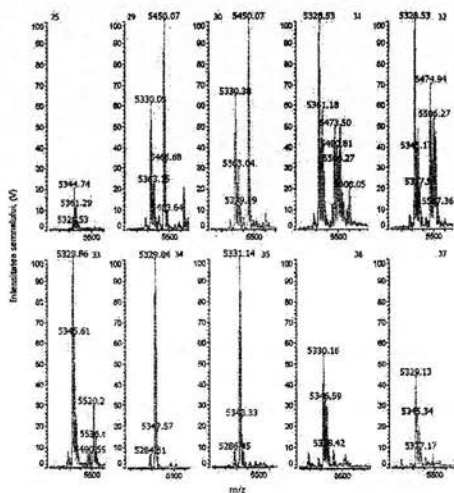


Figura 3.5 Spectrele de masă obținute în urma analizei fracțiunilor active prin spectrometrie de masă de tip MALDI TOF. În partea dreaptă a fiecărui spectru de masă detectat se află numărul fracțiunii analizate

Pentru o evaluare a procesului de separare și purificare a bacteriocinei, utilizând supernatantul ca sursă, s-a realizat raportul între activitatea specifică celei mai pure fracțiuni rezultate din etapa a doua de purificare (i.e. fracțiunea 27, Figura 3.7) și cea similară din prima etapă de purificare, rezultând un raport de recuperare relativă de 60 %. Cu toate acestea, raportul de recuperare față de activitatea antimicrobiană a supernatantului s-a situat în jurul valorii de 40 %.

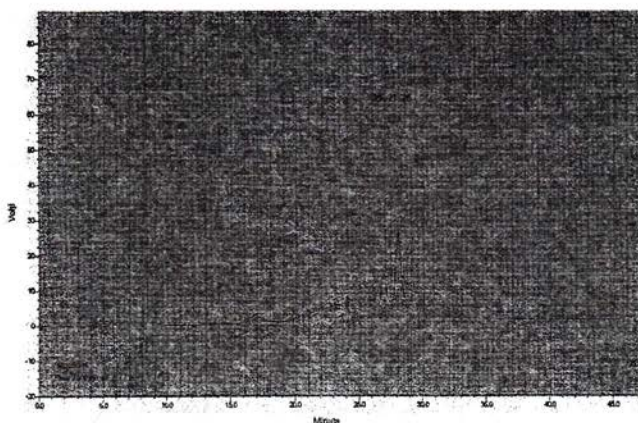


Figura 3.6 Profilul cromatogramei RP-HPLC obținut la purificarea bacteriocinei produse de tulpina *L. lactis ssp. lactis* -H8. Proba injectată a constat în forma concentrată a fracțiunii 34 colectate în experimentul anterior

Determinarea masei moleculare a compusului antimicrobian produs de tulpina *L. lactis ssp. lactis* – H8 a fost realizată utilizând cele trei fracțiuni active izolate. Pentru toate cele trei probe, masa moleculară detectată a fost 5327 Da, fiind însă detectate și forme oxidate ale moleculei (5346 Da, Figura 3.8). În cazul fracțiunii 28 bacteriocina suferă un puternic proces de oxidare care influențează și activitatea biologică a acesteia în comparație cu celelalte două probe analizate.



Figura 3.7 Activitatea antibacteriană a bacteriocinei detectată în fracțiunile 26, 27 și 28. Tulpina indicator folosită a fost *L. lactis ssp. cremoris* HP

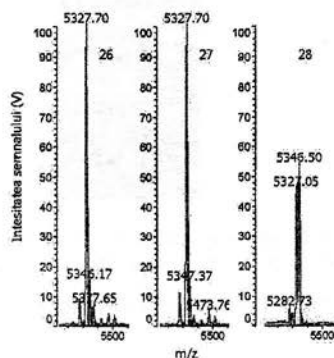


Figura 3.8 Spectrele de masă obținute în urma analizei fracțiunilor active prin spectrometrie de masă de tip MALDI TOF. Frațiunile analizate au fost 26, 27 și 28, masa moleculară detectată fiind de 5327 Da. Se observă un puternic fenomen oxidativ în cazul probei 28

Prin compararea maselor moleculare rezultate în experimentul anterior s-a concluzionat că masa moleculară a compusului peptidic antimicrobian, produs de tulpina *L. lactis* ssp. *lactis* -H8, se situează în domeniul 5327-5330 Da. Pentru o posibilă identificare a bacteriocinei, masa moleculară obținută a fost comparată cu cele ale bacteriocinelor descrise în literatura de specialitate. Astfel, s-a constatat că lactococcina B, produsă de tulpina *L. lactis* ssp. *cremoris* 9B4 (Venema, Abee et al. 1993), are o masă moleculară de 5327 Da, o valoare foarte apropiată de cea a bacteriocinei relevate în prezentul studiu.

Identificarea genetică a bacteriocinei

După migrarea în gel de agaroză 1 % a ampliconilor rezultați în urma reacției PCR, s-a observat apariția a două benzi clare cu o lungime de aproximativ 200 pb, corespunzătoare dimensiunii genei *lcnB* (Figura 3.9) (van Belkum et al., 1992a)



Figura 3.9 Electroforeza în gel de agaroză 1 % a ampliconilor genei *lcnB* obținuți în urma reacției PCR. Linia 1-markerul molecular de 1 Kb; Liniile 2 și 3 ampliconii genei *lcn B* cu lungimea de 200 pb

4. Evidențierea importanței aminoacizilor din domeniul N-terminal al lactococcinei B cu ajutorul tehnicii *Alanine scanning*

4.1 Materiale si metode

Tabel 4.1 Tulpinile și plasmidele utilizate în acest studiu

Tulpină/plasmidă	Caracteristici principale	Referință
<i>L. lactis ssp. lactis</i> H8	Tulpina producătoare de lactococcina B izolată din urdă-produs lactat tradițional românesc.	Prezenta teză
<i>L. lactis ssp. lactis biovar diacetyllactis</i> DPC938	Tulpina producătoare de lactococcina A, B și M	(Morgan <i>et al.</i> , 1995)
<i>L. lactis</i> DPC3286 [*]	Variantă a tulpinei DPC938 capabilă de superproducția lactococcinelor	
<i>L. lactis ssp. cremoris</i> HP	Tulpină indicator susceptibilă la activitatea antibacteriană a lactococcinei B	(Ryan <i>et al.</i> , 1996)
<i>L. lactis ssp. lactis</i> IL 1403	Tulpina folosită ca gazdă pentru expresia lactococcinei B	(Chopin <i>et al.</i> , 1984)
<i>L. lactis</i> MG1363	Tulpina folosită ca gazdă pentru expresia lactococcinei B	(van Asseldonk <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> TOP10	Tulpina gazdă intermediară pentru expresia LcnB	Invitrogene
Plasmide		
pCI372	Vector <i>high-copy</i> folosit pentru clonare; conține gena responsabilă de rezistența la cloramfenicol (Cm ^R)	(Field <i>et al.</i> , 2008)

^{*}DPC, Dairy Products Center, Moorepark, Fermoy, Cork, Irlanda

Amplificarea, clonarea și exprimarea operonului *LcnB*

Operonul lactococcinei B cu lungimea de 1260 perechi de baze (pb) cuprinde promoterul natural al *LcnB* sub controlul căruia se află genele care codifică sinteza bacteriocinei (*lcnB*), precum și cea care codifică proteina responsabilă de imunitate (*lciB*) (Figura 4.1).

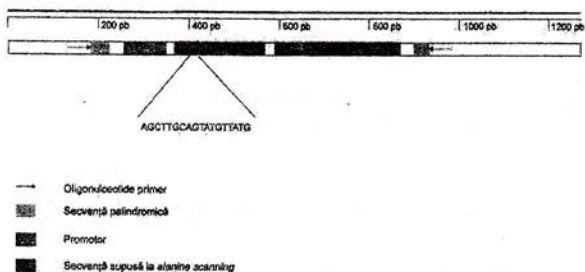


Figura 4.1 Operonul care conține genele responsabile de sinteza lactococcinei B și de imunitate la aceasta

Amplificarea operonului lactococcinei B s-a realizat cu ajutorul reacției de polimerizare în lanț (PCR – *polymerase chain reaction*) utilizând ca matriță ADN-ul plasmidial izolat de la tulpinile de *L. lactis* DPC938, DPC3286 și H8. Izolarea ADN-ului plasmidial s-a realizat cu kitul de izolare PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification (Invitrogen). Clonarea ampliconului obținut în urma reacției PCR s-a realizat utilizând un vector de tip "shuttle" denumit pCI372, cu o lungime de 5700 pb. Vectorul pCI372 este un vector "high copy", creat cu un situs multiplu de clonare care cuprinde o serie de situsuri de recunoaștere a fragmentelor restricționate cu diferite endonucleaze și cuprinde gena marker responsabilă de rezistență la cloramfenicol (Figura 4.2).

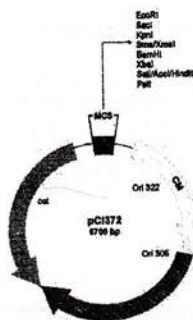


Figura 4.2 Reprezentarea grafică a vectorului pCI372. MCS – situs de clonare multiplă; CM gena responsabilă de rezistență la cloramfenicol; Ori 322 și Ori 306 origini ale replicării

Metoda "Alanine scanning" cu utilizarea mutagenezei situs-specifică

"Alanine scanning" reprezintă o analiză moleculară sistematică care urmărește evidențierea influenței specifice pe care o au aminoacizii din structura proteinelor asupra funcționalității acestora, utilizând ca instrument mutageneza-situs specifică. O reprezentare grafică simplificată a tehnicii utilizate în "alanine scanning" folosite în acest studiu este prezentată în Figura 4.3.

Plasmida pCI372, în structura căruia s-a inserat operonul LcnB (pCI372-lcnB), a fost utilizat ca matrice pentru reacția PCR care s-a realizat cu scopul înlocuirii primilor șase aminoacizi din domeniul N-terminal al lactococcinei B. Aminoacizii vizați, codonii corespunzători acestora și secvențele oligonucleotidelor primer folosite în această tehnică sunt prezentate în Tabelul 4.2.

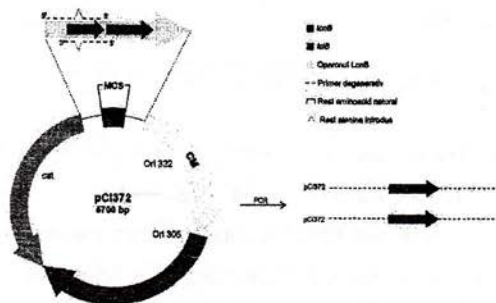


Figura 4.3 Reprezentarea grafică a mutagenzei situs-direcționată în scopul introducerii controlate a resturilor de alanină în locul resturilor de aminoacizi naturali din LcnB

Tabelul 4.2 Oligonucleotidele primer utilizate în mutagenza situs-direcționată

Aminoacid	Codon	Oligonucleotidă primer degenerativ	Oligonucleotidă primer de control
Serina (S)	AGT	5' AATGGAGGAGCTTTGCAGTATGTTATGAGTCTGGACCA 3' 3' ATACTGCAACGATCCTCCATTAACCTCTGCAAGTTCCTC 5'	5' GCAGAAGTTAATGGAGGACT 3'
Leucina (L)	TTG	5' GGAGGAAGCGCTCAGTATGTTATGAGTCTCCATACTACT 3' 3' AACATACTGCGAGCTTCTCCATTAACCTCTGCAAGTTC 5'	5' GAAGTTAATGGAGGAAGCGC 3'
Glutamina (Q)	CAG	5' GGAAGCTTGGCTTATGTTATGAGTCTGGACCATATACT 3' 3' CATAACATACGACAAGCTTCTCCATTAACCTCTGCAAG 5'	5' GTTAATGGAGGAAGCTTGGC 3'
Tirozina (Y)	TAT	5' AGCTTGCAAGCTGTTATGAGTCTGGACCATATACTGG 3' 3' ACTCATAACCGACTGCAAGCTTCTCCATTAACCTCTGC 5'	5' AATGGAGGAAGCTTGCAGGC 3'
Valina (V)	GTT	5' TTGCAAGTATGCTATGAGTCTGGACCATATACTTGGTAT 3' 3' AGCACTCATCGAATACTGCAAGCTTCTCCATTAACCTC 5'	5' GGAGGAAGCTTGCAGTATGC 3'
Metionina (M)	ATG	5' CAGTATGTTGCTAGTCTGGACCATATACTGGTATAAA 3' 3' TCCAGCACTCGAAACATACTGCAAGCTTCTCCATTAAC 5'	5' GGAAGCTTGCAGTATGTTGC 3'

4.2 Rezultate și discuții

Mutageneza prin procedeul „Alanine scanning”

La construcția celor șase mutanți ai lactococcinei B, amplificarea genelor mutante cu oligonucleotidele primer de control a relevat că majoritatea transformanților de *E. coli* TOP10 rezultați conținea plasmidele cu genele mutante dorite. Acest fapt a fost demonstrat prin reacția PCR, iar electroforeza în gel de agaroză a produșilor de reacție a evidențiat un rezultat pozitiv pentru majoritatea coloniilor testate. În cazul variantelor mutante ale resturilor de tirozină (Y), valină (V) și metionină (M) s-a obținut un număr semnificativ de reacții negative fapt ce a indicat că tratamentul produselor PCR cu endonucleaza de restricție Dpn1 nu a avut același randament ca în cazul resturilor serină (S), leucină (L) și glutamină (Q) (Figurile 4.4 și 4.5). Plasmidele care conțin gena *lcnB* mutantă pentru resturile de aminoacid vizate au fost secvențiate. Analiza secvențelor obținute a confirmat mutațiile așteptate pentru toate cele șase resturi de aminoacid din domeniul N-terminal al lactococcinei B (Figura 4.6).



Figura 4.4 Electroforeza în gel de agaroză obținută pentru coloniile transformante de *E. coli* TOP10 care conțin plasmidele cu gena *lcnB* mutantă pentru resturile de serină (S), leucină (L) și glutamină (Q)



Figura 4.5 Electroforeza în gel de agaroză obținută pentru coloniile transformante de *E. coli* TOP10 care conțin plasmidele cu gena *lcnB* mutantă pentru resturile de tirozină (Y), valină (V) și metionină (M)

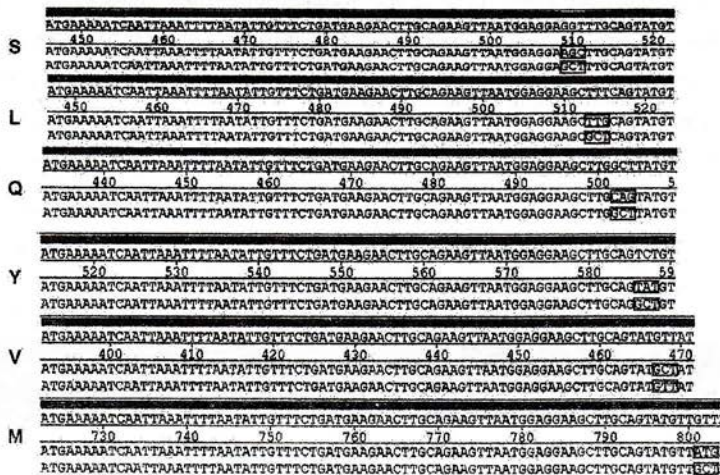


Figura 4.6 Aliniamentul secvențelor genelor parentale și cele mutante pentru resturile de aminoacizi vizate. În figură este marcată alinierea exactă a codonilor naturali și cei ai alaninei din secvența mutant

Analiza mutantilor obținuți

Analiza celor șase variante mutante ale lactococcinei B s-a realizat cu ajutorul metodei difuziei în agaroză a bacteriocinelor. În acest sens, toate variantele nou create și varianta de tip sălbatic au fost supuse în mod similar tuturor procedurilor de lucru pentru a putea evidenția în mod clar diferențele de activitate între forma sălbatică și formele mutante. S-a observat că toate variantele mutante păstrează încă activitatea antimicrobiană, însă potența acestora este variabilă, fiecare având un comportament individual diferit. Faptul că activitatea antimicrobiană s-a păstrat pentru fiecare din variantele mutante a condus la ideea că cele șase reziduuri din domeniul N-terminal al lactococcinei B nu sunt esențiale pentru activitatea biologică a peptidei. Aceștia joacă,

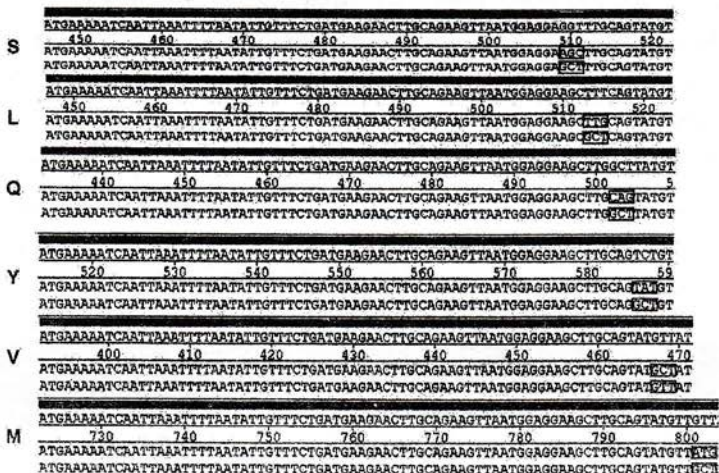


Figura 4.6 Aliniamentul secvențelor genelor parentale și cele mutante pentru resturile de aminoacizi vizate. În figură este marcată alinierea exactă a codonilor naturali și cei ai alaninei din secvența mutant

Analiza mutantilor obtinuti

Analiza celor șase variante mutante ale lactococcinei B s-a realizat cu ajutorul metodei difuziei în agaroză a bacteriocinelor. În acest sens, toate variantele nou create și varianta de tip sălbatic au fost supuse în mod similar tuturor procedurilor de lucru pentru a putea evidenția în mod clar diferențele de activitate în forma sălbatică și formele mutante. S-a observat că toate variantele mutante păstrează încă activitatea antimicrobiană, însă potența acestora este variabilă, fiecare având un comportament individual diferit. Faptul că activitatea antimicrobiană s-a păstrat pentru fiecare din variantele mutante a condus la ideea că cele șase reziduiuri din domeniul N-terminal al lactococcinei B nu sunt esențiale pentru activitatea biologică a peptidei. Aceștia joacă,

Însă, un rol important având în vedere că la majoritatea variantelor mutante s-a constatat o scădere drastică a activității antimicrobiene față de varianta de tip sălbatic (Figura 4.7).

Interesant este că una din variantele mutante (Ser→Ala) a exprimat o activitate antibacteriană îmbunătățită în comparație cu varianta de tip sălbatic. Analizând din punct de vedere a proprietăților fizice ale lactococcinei B (aceasta fiind o peptidă hidrofobă) se poate presupune că înlocuirea unui aminoacid polar (serina) cu un aminoacid hidrofob (alanina) poate conduce la o creștere a activității antibacteriene a LcnB datorită creșterii hidrofobității moleculei.



Figura 4.7 Evidențierea zonelor de inhibiție generate de tulpina de tip sălbatic a lactococcinei B și de variantele mutante ale acesteia. Experimentele realizate în triplicat au condus la rezultate identice

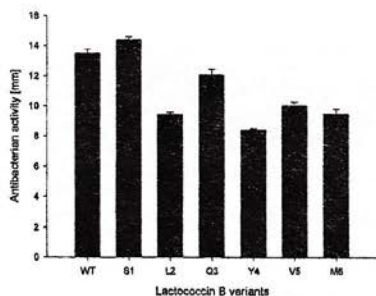


Figura 4.8 Diametrele zonelor de inhibiție generate de tulpina de tip sălbatic a lactococcinei B și de variantele mutante ale acesteia. Valorile diametrelor de inhibiție prezentate reprezintă rezultatul a trei determinări paralele

Același fapt a fost observat și în cazul înlocuirii rezidului cisteină din poziția 24 a lactococcinei B cu alanina în cazul unui studiu anterior realizat de Venema *et al.*, 1996. Măsurarea diametrelor de inhibiție obținute au condus la obținerea unor valori care au confirmat analiza vizuală a zonelor de inhibiție obținute pentru toate cele șase variante mutante ale LcnB (Figura 4.8).

5. Utilizarea rațională a mutagenzei induse pentru obținerea unor noi variante de lacticină 3147

5.1 Materiale și metode

Tulpinile bacteriene și plasmidele utilizate pentru realizarea acestui studiu sunt prezentate în Tabelul 5.1.

Tabelul 5.1 Tulpinile bacteriene și plasmidele utilizate

Tulpina/Plasmidă	Caracteristici generale	Sursa/ Referința bibliografică
<u>Tulpini</u>		
<i>L. lactis</i> MG1363 pOM44	MG1363 care conține pOM44	Coakley <i>et al.</i> , 1997
<i>L. lactis</i> MG1363 pOM44 pDF02	MG1363 care conține pOM44 și pDF02	Field <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli</i> MC1000 pPTPL	MC1000 care conține pPTPL	O'Driscoll <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	Tulpina intermediară de clonare	Stratagene UCC Culture Collection
<i>L. lactis ssp cremoris</i> HP	Tulpina susceptibilă la Lacticina 3147	
<u>Plasmide</u>		
pCI372	Marker de rezistență la cloramfenicol; Vector de clonare "high copy"	Hayes <i>et al.</i> , 1990
pOM44	pCI372 + operonul <i>ltnEFIRM1TM2J</i>	Cotter <i>et al.</i> , 2006b (Figura 5.1)
pPTPL	Vector de clonare "low copy" care conține genele <i>TetR</i> (rezistența la tetraciclină) și <i>lacZ</i>	O'Driscoll <i>et al.</i> , 2004 (Figura 5.1)
pDF01	pCI372 care conține <i>ltnA1A2</i> aflată sub controlul promoter Pbac	Cotter <i>et al.</i> , 2006b
pDF02	pPTPL care conține <i>ltnA1A2</i> aflată sub controlul promoter Pbac	Field <i>et al.</i> , 2007

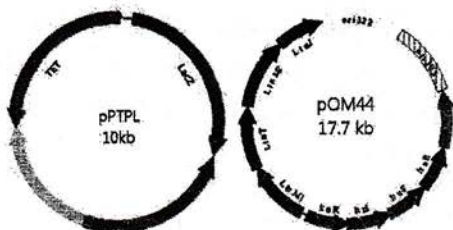


Figura 5.1. Vectorii plasmidali pPTPL și pOM44 care asigură exprimarea lacticinei 3147 prin complementaritate

Saturarea cu aminoacizi prin mutageneză indusă

Pentru reacția în lanț a polimerazei (PCR), plasmida pDF01 a fost utilizată ca matriță pentru obținerea copiilor mutante ale clusterului care conține gena structurală a peptidei LtnA1 din structura lacticinei 3147. Oligonucleotidele primer folosite au fost construite având ca matriță secvența de nucleotide a genei *ltnA1*. Pentru fiecare rest de aminoacid vizat pentru mutageneza codonului nativ din nucleotida primer corespunzătoare a fost înlocuit cu codonul NNK (unde N permite încorporarea adeninei, citozinei, guaninei sau timinei iar K permite încorporarea guaninei sau a timinei) așa cum este prezentat și în Tabelul 5.2. A fost preferată utilizarea codonului NNK în schimbul codonului NNN, pentru a preveni sau a scădea frecvența de obținere a doi dintre codonii STOP și pentru a mări șansele teoretice de a substitui restul de aminoacid nativ cu ceilalți 19 aminoacizi rămași (Cwirla *et al.*, 1990; Scott and Smith, 1990).

Tabel 5.2 Oligonucleotidele primer utilizate pentru mutageneza

Denumire primer	Secventa oligonucleotidei primer
A1T3degFOR	5'PHO-GCGGTAGTNNKAACACATTCTCGCTCAGTGATTACTGG 3'
A1T3degREV	5' GAATGTGTTMNNACTACACGCACCAAATACATCTTCATC 3'
A1N4degFOR	5'PHO-TGTAGTACTNNKACATTCTCGCTCAGTGATTACTGGGGA 3'
A1N4degREV	5' CGAGAATGTMNNAGTACTACACGCACCAAATACATCTTC 3'
A1L8degFOR	5'PHO-ACATTCTCGNNKAGTGATTACTGGGGAAATAACGGGGCT 3'
A1L8degREV	5' GTAATCACTMNNCGAGAATGTGTTAGTACTACACGCACC 3'
A1Y11degFOR	5'PHO-CTCAGTGATNNKTGGGGAAATAACGGGGCTGGGTGACA 3'
A1Y11degREV	5' ATTTCCCAMNNATCACTGAGCGAGAATGTGTTAGTACT 3'
pC1372FOR	5' CGGGAAGCTAGAGTAAGTAG 3'
pC1372REV	5'ACCTCTCGGTTATGAGTTAG 3'
TETK P1	5'AGTCCGTTAAATCGACTG 3'
pPTPLA1A2FOR	5' TCAGATCTTATATACAGATTACTA 3'
pPTPLA1A2REV	5' TGCTAGATAATTTCTGGAAAAAC 3'

5.2 Rezultate și discuții

Saturarea în aminoacizi prin mutageneză indusă

Studiul de față face parte dintr-un proiect amplu care a avut drept scop evidențierea susceptibilității individuale a fiecărui rest de aminoacid din molecula peptidei LtnA1 a lacticinei, la schimbarea acestora prin mutageneza indusă. S-a încercat ca fiecare rest de aminoacid din componența peptidei să fie înlocuit cu toate celelalte 19 resturi aminoacid, fenomen teoretic posibil.

În cazul acesta, saturarea în aminoacizi a vizat pozițiile LtnA1T3, LtnA1N4, LtnA1L8 și LtnA1Y11. Aceștia fac parte din domeniul "variabil" al moleculei LtnA1 conform rezultatelor obținute într-un studiu anterior (Cotter *et al.*, 2006).

Prin procedeul de mutageneză indusă aplicat pentru resturile de aminoacid din domeniul variabil s-au obținut 10 forme mutante distincte în cazul restului aminoacid din

poziția T3, 11 variante mutant pentru poziția N4, 7 variante mutant pentru poziția L8 și respectiv 11 variante pentru poziția Y11 (Figura 5.2).

În cazul treoninei (modificată post-translational în dehidrobutirină) din poziția T3, înlocuirea acestuia cu cele 10 variante a rezultat în patru noi variante active ale lacticei 3147 și șase variante inactivate (Tabel 5.3).

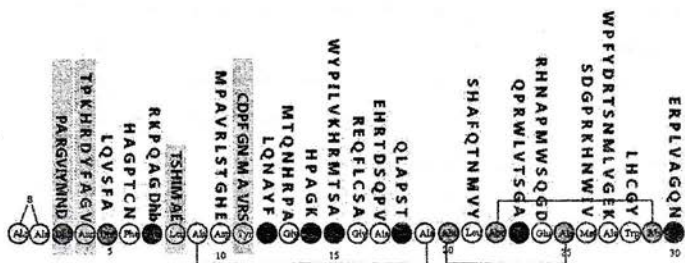


Figura 5.2 Variantele mutant ale peptidei LtnA1 a lacticei 3147. Culoarea albastru: aminoacizii care au înlocuit restul aminoacid nativ rezultând într-o variantă inactivă a lacticei 3147; Culoarea roșie: aminoacizii care au înlocuit restul aminoacid nativ rezultând într-o variantă activă a lacticei 3147

Se poate observa că șase dintre noile variante rezultate prin înlocuirea aminoacidului nativ din poziția T3 a LtnA1 sunt inactivate dar, cu toate acestea, nu se poate afirma cu siguranță că înlocuirea dehidrobutirinei cu alți aminoacizi este esențială pentru activitatea antimicrobiană a lacticei 3147. Acest fapt este confirmat și de prezența bioactivității în cazul celorlalte cinci variante mutante obținute, nivelul cel mai ridicat de activitate fiind conservat de către varianta mutantă LtnA1T3-Y (unde tirozina a înlocuit aminoacidul nativ). Datele rezultate în urma înlocuirii aminoacidului din poziția T3 cu variantele precizate anterior confirma studiile anterioare în care s-a demonstrat că înlocuirea resturilor de dehidroalanină (Dha) sau dehidrobutirină (Dhb), în general, nu afectează drastic activitatea lantibioticelor. Totuși, acest comportament variază de la un lantibiotic la altul (Cotter *et al.*, 2005; Field *et al.*, 2007).

Tabel 5.3 Activitatea antibacteriană a variantelor mutant identificate ale lacticinei 3147

Varianta aminoacid posibilă	Activitate antimicrobiană a variantelor lacticină 3147 rezultate			
	LtnA1T3	LtnA1N4	LtnA1L8	LtnA1Y11
N	++	+++++	X	0
Q	X	X	X	X
C	X	X	X	0
G	0	+	0	0
A	0	++	0	+
S	X	X	0	++
T	+++++	0	0	X
V	0	+	X	++
L	x	X	+++++	X
I	0	X	0	X
P	0	0	x	0
M	++	X	0	+++
F	X	0	X	0
Y	+++	0	X	+++++
W	X	X	X	X
D	++	0	X	0
E	X	X	++	X
R	0	0	X	++
H	X	0	X	X
K	X	0	X	X
Variante identificate din totalul posibil	10/19	11/19	7/19	11/19

Zona de inhibiție = (diametru halou clar/diametrul coloniei):

0 = inhibiție absentă; + = 1 - 4 mm; ++ = 4 - 8 mm; +++ = 8 - 12 mm; ++++ = 12 - 16 mm;

+++++ = > 16 mm (forma nativă a lacticinei 3147); X = forme mutante neidentificate

În cazul restului de asparagină (N4) din cele unsprezece noi variante rezultate în urma mutagenezei induse, doar trei au păstrat o parte din activitatea lacticinei 3147 native. Varianta mutant LtnA1N4K (lizina a înlocuit asparagina din structura nativă) este inactivă. Acest rezultat se află în contrast cu cel obținut în cazul aceleiași tip de substituție la restul asparagină din poziția 15 unde mutantul N15K are un nivel ridicat de activitate comparat cu cel al lacticinei 3147 native, acest rezultat aparținând unui studiu anterior (O'Connor *et al.*, 2007). Acest rezultat sugerează că poziționarea asparaginei între cele două resturi de Dhb poate juca un rol important în stabilitatea aceluiași domeniu

din molecula Ltn1, domeniu considerat important în interacțiunea cu peptida LtnA2 a lacticinei. Totuși, variantele active rezultate prin mutageneza asparaginei N4 crează o imagine ambiguă, fapt ce confirmă caracterul variabil al domeniului în care este cuprins asparagina din poziția N4 a LtnA1.

Restul de leucină din poziția 8 a LtnA1 reprezintă poziția care permite o singură înlocuire a aminoacidului nativ cu un altul pentru ca lacticina 3147 să păstreze o parte a activității sale biologice.

Singurul aminoacid aromatic din cei patru supuși acestui studiu, tirozina (Y11) face parte din primul inel lantioninic al peptidei A1 însă acest aminoacid nu este considerat esențial pentru activitatea biologică a moleculei conform studiului realizat de Cotter *et al.* 2005. Mutageneza indusă a permis înlocuirea acestui rest aminoacid cu unsprezece resturi de aminoacid din cele nouăsprezece posibile. Din cele 11 noi variante de lacticină obținute cinci au păstrat diferite nivele din activitatea lantibioticului nativ. Astfel, varianta mutant LtnA1Y11A (unde alanina a înlocuit tirozina nativă) a fost cea mai puțin activă dintre toate variantele mutante. Este cunoscut faptul că aminoacizii aromatici joacă un rol important în recunoașterea membranei celulare a microorganismelor țintă aceștia fiind aproape întotdeauna localizați la interfața apă-lipide în membranele celulare (Pebay-Peyroula și Rosenbusch, 2001; de Planque *et al.*, 2002; Jing *et al.*, 2003). Acest rezultat indică faptul că înlocuirea unui aminoacid aromatic cu unul alifatic conduce la o scădere drastică a activității antimicrobiene în cazul lacticinei 3147. Această ipoteză este susținută de o serie de studii în care substituția aminoacizilor aromatici cu cei de natură alifatică în alte molecule lantibiotice a condus la efecte variabile, cum ar fi creșterea bioactivității, (de exemplu mutanta F3W a mersacidinei (Szekat *et al.*, 2003)), lipsa totală a sintezei a unei variante mutant a lantibioticului Pep5 (F23 D) (Bierbaum *et al.*, 1994) și chiar pierderea totală a activității antimicrobiene a mutantei Y20G a epiderminei (Ottenwalder *et al.*, 1995). Toate aceste date obținute pot fi corelate și utilizate în designul lantibioticelor având în vedere faptul că resturile de

aminoacizi aromatici sunt conservați de la o generație de lantibiotice la alta (Dufour et al., 2007).

6. Concluzii

De la descoperirea nizeinei în 1928, bacteriocinele au devenit un domeniu de studiu abordat de tot mai mulți cercetători, această descoperire deschizând o nouă dimensiune a conservării alimentelor. După o lungă perioadă de studii intense, bacteriocinele au ajuns astăzi la limita dintre bioconservanții alimentari și antibiotice, dovedind un potențial promițător și în domenii ca medicina și industria farmaceutică. Studiul de față s-a concentrat asupra bacteriocinelor produse de genul *Lactococcus lactis* abordând doi reprezentanți din două clase diferite : lactococcina B din clasa II și lacticina 3147 din clasa I a bacteriocinelor produse de bacteriile lactice.

În prima parte a studiului, s-a reușit izolarea unei tulpini bacteriocinogenice de *L. lactis* ssp. *lactis*, având indicativul H8. Aceasta a fost izolată dintr-un produs fermentat tradițional românesc (brânză telemea) obținut artizanal.

Tehnica de identificare genetică pe baza omologiei genelor care codifică unitatea 16 S a ARN-ului ribozomal în cadrul aceleiași familii de bacterii a permis stabilirea cu precizie a identității tulpinii izolate. Aceasta a fost ulterior caracterizată fenotipic, evidențiindu-se o bună rezistență la acțiunea unor fagi specifici bacteriilor lactice utilizate în industria alimentară, capacitatea de a fermenta arginina, iar profilul antibiogramelor rezultat s-a încadrat în cele descrise anterior de alți autori care au avut ca obiectiv studiul unor tulpini de *L. lactis*. Testele care au vizat stabilirea spectrului antimicrobian al bacteriocinei produse de tulpina *L. lactis* ssp *lactis* H8 au evidențiat o bună activitate antibacteriană împotriva altor tulpini ale speciei *Lactococcus spp*.

Pentru identificarea bacteriocinei, strategia abordată a parcurs mai întâi etape succesive de purificare folosind cromatografia de lichide de înaltă performanță cu fază

inversă (RP-HPLC). În general, randamentele de purificare s-au situat în jurul valorilor de 60-80 % față de preparatele semipurificate de bacteriocină.

Determinarea masei moleculare a bacteriocinei, utilizând tehnologia MALDI-TOF în modul de lucru reflectron ion-pozitiv sau liniar, a evidențiat constant o masă moleculară de aproximativ 5330 Da. S-a concluzionat că masa de 5327 Da aparține lactococcinei B, o bacteriocină cu spectru microbial redus, doar pentru genul *Lactococcus*. Tehnicile de identificare genetică au confirmat identitatea bacteriocinei prin compararea genelor codificatoare a lactococcinei B de la tulpina *L. lactis* ssp *lactis* H8 și de la alte tulpini similare, izolate anterior în cadrul altor studii.

Ultimele două capitole au avut drept scop generarea de informații care pot constitui o parte din elementele necesare designului unor noi variante mutante ale bacteriocinelor care să servească unor noi scopuri.

Prin utilizarea rațională a mutagenezei au rezultat șase noi variante ale lactococcinei B care au păstrat în mod individual diferite nivele ale activității antibacteriene. Acest fapt a fost demonstrat utilizând metoda difuziei în agaroză, având ca tulpină test *L. lactis* ssp. *cremoris* HP. Majoritatea mutantelor au demonstrat o activitate antibacteriană inferioară în comparație cu varianta de tip sălbatic, însă a existat o variantă mutantă (Ser-Ala) care a demonstrat o activitate îmbunătățită față de varianta de tip sălbatic. Corelând datele obținute cu studii anterioare s-a putut lansa o posibilă ipoteză legată de influența creșterii hidrofobicității asupra activității lactococcinei B. În privința lacticinei 3147, tehnica mutagenezei induse a ajutat la evidențierea unor noi posibilități de explorare a lantibioticelor, în general, și a lacticinei 3147, în particular.

Posibilitatea teoretică ca fiecare din cele patru resturi aminoacid care fac parte din structura peptidului LtnA1 incluse în studiu, să fie înlocuite cu restul de 19 aminoacizi s-a materializat practic într-un număr de 39 de noi variante de lacticină 3147. Trei din cele patru

poziții (T3, N4, L8 și Y11) au permis înlocuirea aminoacidului nativ din molecula LtnA1, cu cel puțin jumătate din cele 19 posibilități, acest rezultat relevând susceptibilitatea acestor aminoacizi din domeniul "variabil" la aplicarea cu succes a bioingineriei și dezvoltarea unor tehnici raționale de design a unor noi compuși antibiotici care să facă față noilor provocări.

Diseminarea rezultatelor cercetării

Rezultatele cercetărilor desfășurate în cadrul tezei de doctorat au fost prezentate pentru diseminare în două articole (aflate în diferite stadii de publicare) și o comunicare la manifestări științifice internaționale, reprezentative pentru domeniul abordat, după cum urmează:

A. Publicații în reviste ISI:

Catalin Iancu, Aoife Grainger, Des Field, Paul D. Cotter, Colin Hill and R. Paul Ross, 2011. Comparison of the potency of the lipid II targeting antimicrobials nisin, lacticin 3147 and vancomycin against Gram positive bacteria- in curs de publicare la "*Applied and Environmental Microbiology*";

Des Field, Evelyn Molloy, Catalin Iancu, Floor Hugenholtz, Lorraine Draper, Paula M. O' Connor, Paul D. Cotter, Colin Hill and R. Paul Ross. "Second generation bioengineering of lacticin 3147. Saturation mutagenesis of amino acid residues from LtnA1 peptide- in pregătire pentru propunerea spre publicare.

B. Comunicări științifice susținute la conferințe naționale și internaționale:

Catalin Iancu, Viorica Barbu, Anca Nicolau. The biopreservative effect of some probiotic lactic acid bacteria isolated from cereal, on soybean milk; 2009. EFFoST Conference New Challenges in Food Preservation: Processing - Safety - Sustainability/11-13 noiembrie 2009/ Budapesta, Ungaria

Lista publicațiilor din stagiul doctoral 2008-2011

A. Publicații în reviste ISI

Bahrim, G., Iancu, C., Butu, N., Negoita, T.G., 2010. Production of a novel microbial transglutaminase using *Streptomyces* sp. polar strains. Romanian Biotechnological Letters 15, 5197-5203.

B. Publicații în reviste indexate în baze de date internaționale

Iancu C., Barbu V., Nicolau A., Iordachescu G., 2010. *Attempts to obtain a new symbiotic product based on soy milk*. Innovative Romanian Food Biotechnology vol. 7, p. 21-29, ISSN: 1843-6099;

Iancu, C., Butu, N., Bahrim, G., 2009. Preliminary studies regarding transglutaminase synthesis by polar filamentous bacteria of the genus

Streptomyces sp.. Innovative Romanian Food Biotechnology ISSN 1843-6099, vol.

4 p., 12-15;

Barbu,V., Iancu,C., Neagu C., 2010. Isolation and Identification of Some Strains of Lactic Acid Bacteria from Rye. Bulletin USAMV Agriculture 67 (2) ISSN 1843-5246, 173-177.

Bibliografie selectivă

Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int J Food Microbiol 28, 169-185.

Aso, Y., Okuda, K., Nagao, J., Kanemasa, Y., Thi Bich Phuong, N., Koga, H., Shioya, K., Sashihara, T., Nakayama, J., Sonomoto, K., 2005. A novel type of immunity protein, NukH, for the lantibiotic nukacin ISK-1 produced by *Staphylococcus warneri* ISK-1. Biosci Biotechnol Biochem 69, 1403-1410.

- Begley, M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2009. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Appl Environ Microbiol* 75, 5451-5460.
- Field, D., Collins, B., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2007. A system for the random mutagenesis of the two-peptide lantibiotic lactacin 3147: analysis of mutants producing reduced antibacterial activities. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 226-234.
- Holo, H., Nilssen, O., Nes, I.F., 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J Bacteriol* 173, 3879-3887.
- Kaletta, C., Entian, K.D., Kellner, R., Jung, G., Reis, M., Sahl, H.G., 1989. Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. *Arch Microbiol* 152, 16-19.
- Kellner, R., Jung, G., Horner, T., Zahner, H., Schnell, N., Entian, K.D., Gotz, F., 1988. Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur J Biochem* 177, 53-59.
- Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., 2011. Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Appl Environ Microbiol* 77, 3335-3342.
- Klein, C., Kaletta, C., Entian, K.D., 1993. Biosynthesis of the lantibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl Environ Microbiol* 59, 296-303.
- McAuliffe, O., Hill, C., Ross, R.P., 2000b. Identification and overexpression of ltnI, a novel gene which confers immunity to the two-component lantibiotic lactacin 3147. *Microbiology* 146 (Pt 1), 129-138.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev* 25, 285-308
- van Belkum, M. J., J. Kok, et al. (1992). "Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6." *Appl Environ Microbiol* 58(2): 572-577.
- Van den Berghe, E., G. Skourtas, et al. (2006). "Streptococcus macedonicus ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture." *International Journal of Food Microbiology* 107(2): 138-147.
- Venema, K., M. L. Chikindas, et al. (1997). "Rapid and Efficient Purification Method for Small, Hydrophobic, Cationic Bacteriocins: Purification of Lactococcin B and Pediocin PA-1." *Appl Environ Microbiol* 63(1): 305-309.

Yonezawa, H., Kuramitsu, H.K., 2005. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 541-548.

Yuan, J., Zhang, Z.Z., Chen, X.Z., Yang, W., Huan, L.D., 2004. Site-directed mutagenesis of the hinge region of nisinZ and properties of nisinZ mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 806-815.



266.612