Bakteriocinska aktivnost autohtonih Lactobacillus plantarum sojeva izoliranih iz različitih fermentiranih proizvoda

Gagić, Antonio

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:489064

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij: Biotehnologija

Antonio Gagić
7539/BT

BAKTERIOCINSKA AKTIVNOST AUTOHTONIH *Lactobacillus plantarum* SOJEVA IZOLIRANIH IZ RAZLIČITIH FERMENTIRANIH PROIZVODA

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: Ovaj završni rad izrađen je u sklopu projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika" (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.)

Mentor: prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

BAKTERIOCINSKA AKTIVNOST AUTOHTONIH Lactobacillus plantarum SOJEVA IZOLIRANIH IZ RAZLIČITIH FERMENTIRANIH PROIZVODA

Antonio Gagić, 0006039178

Sažetak:
Bakteriocini su mali ribosomski sintetizirani peptidi koji inhibiraju rast srodnih mikroorganizama, onemogućavanjem normalnog funkcioniranja staničnih struktura. U ovom radu proučavani su plantaricini, proizvedeni s tri različita soja Lactobacillus plantarum. Antimikrobno djelovanje sojeva ispitivano je na test-mikroorganizmima Listeria monocytogenes ATCC 19111 i Staphylococcus aureus 3048, koji su učestali patogeni. Ispitivanje antibakterijskog djelovanja plantaricina temeljeno je na dvije metode: metodi s rupama u agaru i metodi s dvostrukim slojem agara. Rezultati dobiveni navedenim metodama ukazali su na najveću inhibicijsku sposobnost soja Lb. plantarum M92C. Također, u svrhu ostvarivanja bolje spoznaje aktivnosti i funkcije plantaricina, provedena je analiza gena proučavanih triju Lactobacillus plantarum sojeva pomoću PCR metode. Pritom je PCR metodom dokazana prisutnost gena plnA, plnEF i plnJ koji kodiraju za plantaricine kod svih proučavanih Lb. plantarum sojeva.

Ključne riječi: antimikrobno djelovanje, bakterije mliječne kiseline, bakteriocini, plantaricin
Rad sadrži: 30 stranica, 4 slike, 6 tablica, 42 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: prof. dr. sc. Jagoda Šušković
Pomoć pri izradi: Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.
Datum obrane: 1. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

BACTERIOCIN ACTIVITY OF AUTOCHTHONOUS Lactobacillus plantarum STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS FERMENTED PRODUCTS

Antonio Gagić, 0006039178

Abstract:

Bacteriocins are small ribosomally synthesized peptides which inhibit growth of closely related strains of microorganisms, by disrupting normal functioning of important cellular structures. In this research we examined plantaricins produced by three different strains of Lb. plantarum. Antimicrobial activity was examined on test-microorganisms, Listeria monocytogenes ATCC 19111 and Staphylococcus aureus 3048, which are common pathogens. Assaying for plantaricin activities of three examined Lb. plantarum strains were based on two methods: agar well diffusion method and agar spot test method. Results obtained by these methods demonstrated strongest inhibitory ability of Lb. plantarum M92C. Moreover, to acquire better understanding of plantaricin activity and function, gene analysis was conducted by PCR method for three strains of Lb. plantarum that we used. PCR method demonstrated presence of genes plnA, plnEF and plnJ which code for plantaricines in all Lb. plantarum strains used in analysis.

Keywords: antimicrobial activity, bacteriocins, lactic acid bacteria, plantaricins
Thesis contains: 30 pages, 4 figures, 6 tables, 42 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: PhD Jagoda Šušković, Full professor
Technical support and assistance: Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.
Defence date: September 1st, 2020

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1

2. TEORIJSKI DIO ... 2

2.1. Bakterije mliječne kiseline ... 2

2.2. Podjela BMK prema načinu provođenja fermentacije ... 3

2.3. Bakteriocini ... 4

2.4. Uloga bakteriocina ... 5

2.5. Podjela bakteriocina ... 7

2.5.1. Lantibiotici – prva skupina bakteriocina ... 7

2.5.2. Nelantibiotici – druga skupina bakteriocina ... 8

2.5.2.1. Plantaricin ... 10

2.5.3. Treća skupina bakteriocina ... 11

3. MATERIJALI I METODE ... 12

3.1. MATERIJALI ... 12

3.1.1. Radni mikroorganizmi ... 12

3.1.2. Hranjive podloge ... 12

3.1.3. Kemikalije ... 13

3.1.4. Aparatura i pribor ... 13

3.2. METODE ... 14

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama ... 14

3.2.2. Metoda difuzije s rupama u agaru (engl. agar well-diffusion method) ... 14

3.2.3. Metoda s dvostrukim slojem agara (engl. agar spot-test method) ... 15

3.2.4. Izolacija genomske DNA ... 16

3.2.5. Mjerenje koncentracije DNA ... 16

3.2.6. Detekcija gena koji kodiraju za plantaricine PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) metodom ... 17

4.REZULTATI I RASPRAVA ... 18

4.1. Detekcija antimikrobnog djelovanja Lb. plantarum sojeva ... 18

4.2. Detekcija gena koji kodiraju za plantaricine ... 22

5. ZAKLJUČCI ... 25

6. LITERATURA ... 26

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina gram-pozitivnih bakterija koje se koriste za provođenje niza fermentacijskih procesa i čiji nusprodukti imaju široku primjenu u svrhu poboljšanja kvalitete života. Među ključnim proizvodima BMK nalaze se bakteriocini, mali ribosomski sintetizirani peptidi, koji inhibiraju bakterijske vrste srodne soju producenta samog bakteriocina, pri čemu se ograničavanjem rasta drugih mikroorganizama postiže optimalno iskorištenje okolišnih limitirajućih čimbenika rasta od strane producenta bakteriocina. Otkrićem nisina, započeto je s korištenjem bakteriocina u svrhu očuvanja hrane i namirnica sklonih kvarenju zbog štetnog djelovanja patogenih mikroorganizama. Proučavanjem mehanizma djelovanja bakteriocina, započinje istraživenje bakteriocina kao alternative antibioticima, pri čemu je kao glavna prednost bakteriocina uzeta specifičnost njihovog djelovanja i peptidna građa, na koju se direktno može utjecati modifikacijom DNA. Bakteriocini se mogu podijeliti na više skupina ovisno o njihovoj veličini, termolabilnosti i postranslacijskoj modifikaciji. Cilj ovog rada zasniva se na istraživanju bakteriocinskog djelovanja plantaricina, bakteriocina druge skupine koji je pokazao brojne pozitivne karakteristike primjenjive u svrhu sprječavanja rasta patogenih mikroorganizama. Ispitano je antimikrobno djelovanje različitih Lactobacillus plantarum sojeva, izoliranih iz različitih prirodnih izvora, prema srodnim patogenim mikroogranizmima, Staphylococcus aureus 3048 i Listeria monocytogenes ATCC 19111. Mikrobiološke metode difuzije s rupama u agaru i metode s dvostrukim slojem agara, poslužile su za istraživanje potencijalnog bakteriocinskog djelovanja ispitivanih Lb. plantarum sojeva prema ispitanim patogenim mikroorganizmima. Provođenjem lančane reakcije polimeraze (eng. Polymerase Chain Reactin, PCR) je istražena prisutnost gena koji kodiraju za bakteriocine plantaricine kod ispitanih Lb. plantarum sojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su fakultativno anaerobne bakterije što upućuje na mogućnost rasta bakterija sa i bez prisutnosti kisika (Kandler, 1983).
Prema Šušković i sur. (2010) BMK se može svrstati u gram-pozitivne, nesporulirajuće, mezofilne bakterije, koje optimalan rast postižu pri umjerenim temperaturama od 20 do 45 °C, isključivo na kompleksnim podlogama koje sadrže hranjive supstance među kojima se nalaze peptidi, aminokiseline, nukleotidi, vitamini, minerali, ugljikohidrati te masne kiseline. Također, važna karakteristika bakterija mliječne kiseline je i odsutnost enzima katalaze i citokroma.

BMK kao jedno od svojih svojstava pokazuju toleranciju na niske pH vrijednosti, što omogućava sintezu mliječne kiseline kao krajnjeg produkta fermentacije (Šušković i sur., 2010). Optimalan rast pokazuju pri pH vrijednosti od 5,5 – 5,8. U okolišu ih se može pronaći na fermentiranim mliječnim proizvodima (svježi sir, mlijeko), fermentiranoj ribi i mesu, žitaricama, krumpirima te ostalim biljnim, razgradnim materijalima, a značajno pridonose i u fermentacijskim procesima proizvodnje vina.

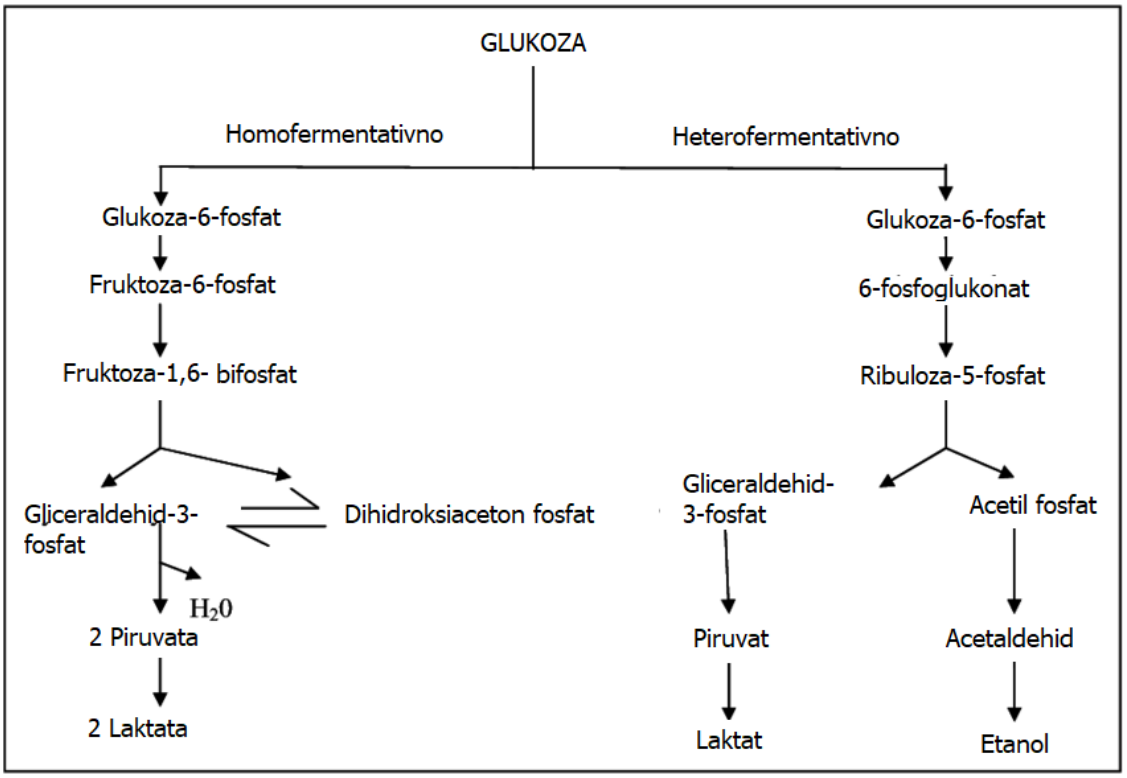
Prema morfološkim obilježjima BMK se može podijeliti: na štapićaste (bacili), kuglaste (koki) ili štapićasto-kuglaste (kokobacilli). Bakterije mliječne kiseline su fermentativni organizmi koji većinu energije dobivaju procesom fosforilacije na razini supstrata. Prema Siezen i sur. (2002) pretvorbom glukoze u laktat oslobađaju se 2 ATP molekule nužne za sintezu bitnih staničnih makromolekula i za energetski zahtjevne citoplazmatske procese. Prinos metaboličke energije vrlo je malen pa često ograničava maksimalan rast i prinos bakterija mliječne kiseline. Proces fermentacije heksoza može se provoditi na više načina, različitim metaboličkim putevima.

2.2. Podjela BMK prema načinu provođenja fermentacije

Prema metaboličkim putevima kojima provode proces fermentacije u svrhu dobivanja energije iz heksoza, BMK se mogu podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne (slika 1).

Homofermentativne bakterije mliječne kiseline iz šećera procesom glikolize proizvode mliječnu kiselinu.

Heterofermentativne bakterije, se zbog nedostatka aldolaze, jednog od ključnih enzima u procesu glikolize, koriste alternativnim biosintetskim putem poput put pentoza fosfata, te zato mogu proizvoditi više produkata među koje ubrajamo mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, ugljikov dioksid, alkohol i diacetil (Heldman i Moraru, 2011). Tijekom metaboličkih procesa dobivanja energije, umjesto kisika, krajnji akceptori elektrona su endogeni ugljikovi izvori.



Slika 1. Proizvodnja mliječne kiseline homoferementativnim i heterofermentativnim bakterijama mliječne kiseline (Forsythe, 2000)

BMK su jedne od najznačajnijih mikroorganizama koji pridonose okusu, teksturi i nutritivnoj vrijednosti fermentiranih proizvoda prehrambene industrije, pri čemu se njihov utjecaj na kakvoću proizvoda može modificirati metodama genetičkog inženjerstva, obogaćivanjem korištenog soja BMK. Bakterije mliječne kiseline imaju bitnu ulogu u očuvanju stabilnosti fermentiranih proizvoda antimikrobnim djelovanjem, te samim time onemogućavaju kvarenje proizvoda uzrokovano patogenim mikroorganizmima.

BMK imaju kompetitivno djelovanje na druge mikroorganizme tijekom kojeg izlučuju antagonističke spojeve poput bakteriocina i pritom modificiraju mikrookolinu djelovanjem svojeg metabolizma (Lindgren i Dobrogosz, 1990).

U porodicu bakterija mliječne kiseline spadaju Lactobacillus kao najveći rod, te rodovi Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Dolosigranulum i Weissella.

2.3. Bakteriocini

Među ključnim produktima BMK, osim prethodno navedenih produkata su i diacetil, vodikov peroksid (koji bakterijskim stanicama pruža oblik zaštite od oksidacije, te ih čini aerotolerantnima) te bakteriocini. Bakteriocini su vrlo važna skupina peptida koji se međusobno razlikuju po strukturi, načinu te spektru antimikrobnog djelovanja. Proizvodnja i prinos bakteriocina značajno ovise o sastavu hranjive podloge i uvjetima uzgoja. Prema Kelstrup i Gibbons (1969) otkriveno je da se povećanjem viskoznosti medija za uzgoj, dodatkom agara, povećava prinos bakteriocina.

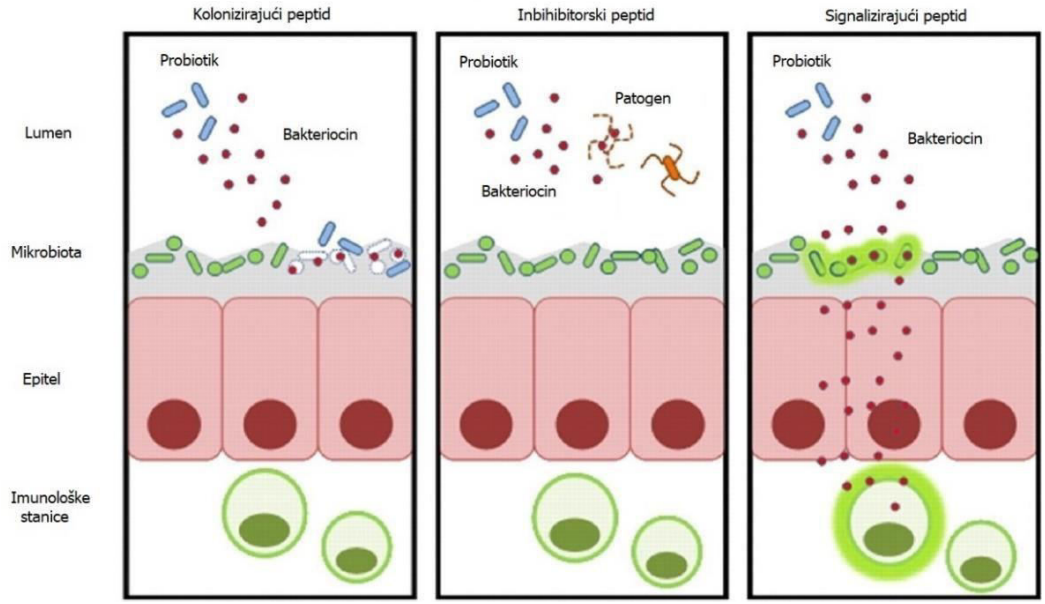
Bakteriocini su ribosomski sintetizirani peptidi ili proteini s antimikrobnim djelovanjem prema sojevima bakterija srodnim soju producenta samog bakteriocina. Među najčešće proučavanim producentima bakteriocina nalaze se upravo bakterije mliječne kiseline. Bakteriocini su manje molekule čija molekulska masa rijetko prelazi 10 kDa. Građom bakteriocini spadaju u kationske amfipatske molekule čemu pridonosi povećan udio određenih aminokiselinskih ostataka koji ih izgrađuju, jer bakteriocini sadrže više ostataka lizina i arginina. Bakteriocine karakterizira uzak spektar djelovanja jer inhibiraju sojeve bakterijskih vrsta koje su u bliskom srodstvu. Unatoč tome postoje i bakteriocini sa širokim spektrom inhibicijskog djelovanja, poput nisina i epidermina.

2.4. Uloge bakteriocina

Prema Dobson i sur. (2011) bakteriocini mogu imati trostruku ulogu (slika 2). Mogu djelovati kao signalizirajući peptidi, pri čemu signaliziraju druge bakterije ili mikrobne zajednice, i omogućavaju međubakterijsku komunikaciju koja otvara mogućnost za višestanično obavljanje funkcija bakterijskom sinkronizacijom. Porastom bakterijske populacije, dolazi do porasta broja signalizirajućih peptida pri čemu populacija odlučuje o zajedničkom sinkroniziranom djelovanju. Bakteriocini u ulozi signalizirajućih peptida mogu djelovati i kao stimulatori imuno sustava, pri čemu ukazuju na novonastalu infekciju i na taj način omogućavaju brže uklanjanje patogena.

Bakteriocini mogu djelovati i kao tvari čija prisutnost pospješuje razvoj bakterija (producenata odgovarajućeg bakteriocina) na određenim tkivima ili podlogama. Bakteriocini inhibiraju razvoj drugih sojeva bakterija te samim time, otežavaju razvoj konkurentnih sojeva i olakšavaju kolonizaciju željenog bakterijskog soja na odgovarajućoj podlozi ili tkivu.

Posljednja uloga bakteriocina svodi se na antimikrobno djelovanje, pri čemu se provodi direktna inhibicija srodnih sojeva ili patogena koji ne sadrže otpornost na bakteriocin. U crijevnoj mikrobioti čovjeka uočeno je inhibicijsko djelovanje bakteriocina, proizvedenih od strane autohtonih bakterija gastrointestinalnog trakta, prema bakterijama otpornim na lijekove. Ovim djelovanjem, autohtone bakterije osiguravaju svoj razvoj, limitiranjem rasta konkurentnih bakterija (Drider i sur., 2016).



Slika 2. Mehanizmi kojima bakteriocinska aktivnost može pridonijeti probiotičkom djelovanju (Dobson i sur., 2011)

Jedna od uloga BMK kao sojeva producenata bakteriocina je inhibicija rasta patogenih mikroorganizama zbog čega se bakteriocini najčešće koriste u svrhu konzerviranja hrane. Bakteriocini mogu imati bakteriostatsko djelovanje kojim sprječavaju rast drugih sojeva i bakteriocinogeno djelovanje kojim uništavaju/ubijaju druge sojeve.

Važno područje istraživanja je upravo pronalazak sojeva BMK koje proizvode visoko učinkovite bakteriocine s uskim spektrom djelovanja, u cilju sprječavanja rasta patogena sa stečenom antibiotičkom rezistencijom. Uzak spektar djelovanja bakteriocina može se postići bioinženjerstvom peptida, pri čemu se izmjenjivanjem genske upute direktno utječe na promjenu produkta translacije. Unošenjem promjena u sastav bakteriocina, mijenja se spektar djelovanja promatranog bakteriocina, s ciljem postizanja užeg spektra djelovanja na točno određeni soj patogena. Ovim postignućem se smanjuje broj ciljanih stanica na koje odabrani bakteriocini djeluju, a samim time dovodi se i do smanjene mogućnosti razvijanja rezistencije na djelovanje bakteriocina, i smanjenog antimikrobnog utjecaja na "dobre bakterije" (Drider i sur., 2016).

Prema Cotter i sur. (2012) lantibiotici poput nisina, epidermina, planosporicina, actagardina i njihovi bioinženjerstvom dobiveni derivati pokazali su in vitro antimikrobnu aktivnost protiv klinički bitnih patogena poput Streptococcus pneumoniae, MRSA i VRE, mikobakterija i Clostridium difficile.

2.5. Podjela bakteriocina

Bakteriocini koje proizvode bakterije mliječne kiseline mogu se razlikovati po svojim biokemijskim i genetičkim karakteristikama, po spektru patogenih mikroorganizama na koje djeluju, te aktivnosti kojom djeluju. Prema Šušković i sur. (2010) bakteriocini imaju širok spektar djelovanja, poput modifikacije enzimske aktivnosti, inhibicije nastanka spora i formiranja pora u staničnoj membrani.

Promatrajući djelovanje na staničnu membranu, većina bakteriocina djeluje na anionske lipide prisutne u membranama, formirajući pritom pore. Uočavajući njihove sličnosti može ih se podijeliti u četiri skupine, na temelju njihove molekularne mase, termostabilnosti, molekularnog rasporeda i primarne strukture (Cotter i sur., 2005).

Unatoč tome što se promatrajući karakteristike bakteriocina, ovi antimikrobni peptidi najčešće dijele na četiri skupine, u nekim se podjelama izuzima četvrta skupina kao zasebna skupina spojeva imenovana bakteriolizinima u koje se ubrajaju leukonocin S i laktocin 27 (Gulluce i sur., 2013).

2.5.1. Lantibiotici – prva skupina bakteriocina

Prva skupina bakteriocina poznata je pod nazivom lantibiotici, peptidi koji veličinom dosežu do pedeset aminokiselina. Sinteza lantibiotika karakteristična je zbog mnogobrojnih posttranslacijskih modifikacija, koje omogućavaju specifičnost u strukturi ovih peptida, a samim time i specifičnu funkciju koju ova skupina provodi. Naime nizom posttranslacijskih modifikacija se iz prvotno nastalih "standardnih" aminokiselina dobivaju za ovu skupinu karakteristične aminokiseline poput metilantionina i lantionina. Na temelju aminokiselina sadržanih u strukturi ove skupine bakteriocina može ih se nadalje podijeliti na lantibiotike, sanktibiotike i labrintopeptine (Cuozzo i Sesma, 2001).

Nisin, poznat još od dvadesetih godina 20. stoljeća, najpoznatiji je predstavnik prve skupine bakteriocina. Prema Davidson i sur. (2005) nisin u svojoj strukturi sadrži lantionin, metilantionin, dehidrobutirin te dehidroalanin, koji formiraju trodimenzionalnu strukturu određenu tioesterskim prstenovima.

Djelovanje nisina temelji se na vezanju nisina na lipid 2, pri čemu nisin onemogućava normalnu funkciju lipida 2. Lipid 2 pritom ne obavlja svoju funkciju transporta peptidoglikana, i samim time je onemogućena izgradnja stanične stijenke, što dovodi do smrti bakterijske stanice. Alternativno, nisin se vezanjem na lipid 2, može ugraditi u staničnu membranu ciljane stanice, pritom formirajući pore u njenoj strukturi. Nastankom pora dolazi do nekontroliranog izlaska unutarstaničnih komponenti stanice, s čim je postignuta inhibicija rasta neželjenih mikroorganizama (Davidson i sur. 2005).

Nisin je peptid sintetiziran od strane bakterije Lactococcus lactis, te se pokazao kao vrlo efikasan bakteriocin s antimikrobnom aktivnošću prema brojnim gram-pozitivnim bakterijama.

2.5.2. Nelantibiotici – druga skupina bakteriocina

Za razliku od lantibiotika, druga skupina bakteriocina ne podliježe mnogobrojnim posttranslacijskim modifikacijama. Prema Kumariya i sur. (2019) ovoj skupini pripadaju termostabilni peptidi male molekulske mase. Djelovanje bakteriocina druge skupine temelji se na poremećaju djelovanja protonske pumpe ciljane stanice. Uspostavljanjem elektrostatskih i hidrofobnih interakcija s citoplazmatskom membranom, dolazi do onemogućavanja normalnog rada protonske pumpe što posljedično dovodi do nastanka pora te izlaska unutarstaničnih proteina, nukleinskih kiselina i iona iz ciljane stanice. Posljedica ovih događaja je konačna liza stanice uzrokovana bakteriocinskom djelatnošću (Héchard i Sall, 2002; Ennahar i sur., 2000).

Dodatna podjela ove skupine bakteriocina je na četiri podskupine: bakteriocini slični pediocinu, dvopeptidni nemodificirani bakteriocini, bakteriocini s kružnom strukturom te linearni nepediocinski bakteriocini.

Bakteriocini slični pediocinu, svoju inhibitornu ulogu rasta nepoželjnih mikroorganizama provode vezanjem na manoza permeazu. Njihovo djelovanje ovisi o prisutnosti manoza fosfotransferaznog sustava jer reagiraju s Man-PTS transporterom. Navedeni sustav zadužen je za unos glukoze u bakterijsku stanicu, a vezanjem bakteriocina na Man-PTS transporter dolazi do nastanka pore unutar transportera, što uzrokuje slobodan protok iona i ostalih unutarstaničnih tvari izvan stanice. Kod gram-pozitivnih i gram-negativnih

bakterija se na ovaj način uzrokuje permeabilizacija membrane formiranjem pora, te konačna liza stanica (Diep i sur., 2007).

Dvopeptidni nemodificirani bakteriocini također djeluju stvarajući pore unutar stanične membrane, pri čemu je za aktivan oblik ove skupine, potrebna prisutnost dva različita peptida. Prema Kjos i sur. (2014) dvopeptidni nemodificirani bakteriocini karakteristično se vežu za UPPp (undekaprenil pirofosfat fosfatazu), membranski protein vezan uz sintezu stanične stijenke. Reakcijom s UPPp utječu na djelovanje protonske pumpe formiranjem kationsko ili anionsko specifičnih pora i na taj način inhibiraju rast Gram-pozitivnih bakterija. Proizvodnja dvopeptidnih nemodificiranih bakteriocina uočena je i kod Lb. plantarum (plantaricin EF, plantaricin JK) i L. lactis vrsta (Ekblad i sur., 2016).

Kružni bakteriocini druge skupine uzrokuju nastanak pora u strukturama stanične membrane, pri čemu koriste ABC transporter kao ciljano mjesto vezanja. Ova podskupina bakteriocina inhibiciju provodi permeabilizacijom membrane, specifičnom inhibicijom formiranja septuma i feromonskom aktivnošću (Belkum i sur., 2011). Primjeri kružnih bakteriocina kojima je određena 3D struktura su subtilozin A, karnociklin A i enterocin AS 48.

Posljednja podskupina druge skupine bakteriocina obuhvaća linearne nepediocinske bakteriocine, koji također uzrokuju formiranje pora u staničnoj membrani. Primjeri bakteriocina ove skupine su lactococcin A, lactococcin 972 i lacticin Q. Lactococcin A i lactococcin B djeluju vezanjem na manoza fosfotransferazni sustav, poput bakteriocina sličnih pediocinu. Lactococcin 972 djeluje onemogućavanjem formiranja septuma, pri čemu inhibira rast stanice. Lacticin Q, predstavnik linearnih nepediocinskih bakteriocina, je kationski peptid građen od 53 aminokiseline, aktivan protiv širokog spektra Gram-pozitivnih bakterija (Fujita i sur., 2007). Lacticin Q za razliku od drugih bakteriocina ne zahtijeva prisutnost specifičnih receptora (Yoneyama i sur., 2009).

2.5.2.1. Plantaricin

Najpoznatiji predstavnici druge skupine bakteriocina su plantaricini zbog inhibicijskog djelovanja prema patogenim bakterijama koje uzrokuju kvarenje hrane poput Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus i Bacillus aureus. Jedan od najpoznatijih predstavnika ove skupine bakteriocina je plantaricin 423 kojeg proizvodi soj 423 bakterije Lactobacillus plantarum.

Bakterijska vrsta Lactobacillus plantarum, jedan je od najčešće korištenih producenata bakteriocina u prehrambenoj industriji (Brinques i sur., 2009). Lactobacillus plantarum je fakultativno fermentativna bakterija mliječne kiseline, s GRAS (eng. Generally Regarded as Safe) statusom, tolerantna prema niskim pH vrijednostima.

Široka primjenjivost ovog mikroorganizma omogućila je njegovo korištenje u hrani obogaćenoj probiotičkim kulturama, pri čemu je poznata primjena soja Lb. plantarum 299v u širokom rasponu probiotičkih proizvoda (Siezen i Vlieg, 2011).

Tolerancija niskih pH vrijednosti omogućuje Lb. plantarum vrstama preživljavanje tijekom prolaska kroz probavni trakt sisavaca. Lactobacillus plantarum ima raširenu široku primjenu, što ga čini izuzetno bitnim pripadnikom roda Lactobacillus. Može ga se pronaći u različitim produktima prehrambene industrije: mliječnim proizvodima, meso, žitarice, voće, povrće i pića (Ricciardi i sur., 2012).

Proučavanjem djelovanja različitih sojeva Lactobacillus plantarum, dokazana je inhibicija patogenih mikroorganizama koji se često nalaze u prehrambenim proizvodima.

Izvor mnogobrojnih sojeva producenata bakteriocina je mesna industrija. Kod plantaricina UG1, izoliranog iz suhih kobasica je dokazana je bakteriocinska aktivnost prema patogenim sojevima poput L. monocytogenes, C. perfringens i C. sporogenes, ali i srodnih sojeva roda Lactobacillus i Lactococcus (Enan i sur., 1996). Plantaricin UG1 je jednopeptidni bakteriocin, molekulske mase između 3 do 10 kDa, a uputa za njegovu proizvodnju kodirana je unutar bakterijskog kromosoma.

Također, bakterija mliječne kiseline izolirana s talijanskih kobasica, pokazala se kao producent plantaricina 35d, bakteriocina veličine 4,5 kDa. Plantaricin 35d pokazao je antimikrobno djelovanje na sojeve S. aureus, L. monocytogenes i A. hydrophila (Messi i sur., 2001).

Lactobacillus plantarum LT154, pokazao se kao još jedan bakteriocinogeni soj, koji je uspješno inhibirao rast patogenih mikroorganizama poput: Enterococcus faecalis, Bacillus spp., Staphylococcus spp. te S. typhimurium (Kanatani i Oshimura, 1994). Izolirani bakteriocin ovog soja je plantacin 154, jednopeptidni bakteriocin molekulske mase do 3 kDa. Za razliku od plantaricina UG1, za čiju se proizvodnju genetska uputa nalazi u bakterijskom kromosomu, uputa za proizvodnju plantacina 154 nalazi se zapisana na plazmidu.

Plantaricin 423 pokazao se kao uspješan inhibitor rasta bakterije L. monocytogenes u mesnim proizvodima (Dicks i sur., 2004). Druge vrste plantaricina su opisane kao dvopeptidni bakteriocini, čija aktivnost ovisi o komplementarnosti djelovanja dva različita peptida, pri čemu je njihova kationska priroda ključna jer utječe na primarni kontakt između samih bakteriocina, ali i na kontakt između bakteriocina i negativno nabijenih membrana (Diep i sur., 2009). Ova vrsta bakteriocina ubraja se u podskupinu dvopeptidnih nemodificiranih bakteriocina u koju se ubrajajaju plantaricini EF, JK, NC8 i J51 (Anderssen i sur., 1998; Diep i sur., 1996).

Plantaricinima pripada i jednopeptidni bakteriocin, plantaricin A, koji pokazuje svojstvo blagog antimikrobnog djelovanja na uži spektar bakterija roda Lactobacillus (Lactobacillus casei, Lactobacillus sakei, Lactobacillus viridescens i Lactobacillus plantarum). Plantaricin A, kao jednopeptidni bakteriocin, ne modificira se posttranslacijski. Usporedbom plantaricina A s plantaricinima EF i JK, plantaricin A je pokazao 10 do 100 puta manju antimikrobnu aktivnost nego prethodno spomenuti plantaricini (Anderssen i sur., 1998).

2.5.3. Treća skupina bakteriocina

Treću skupinu bakteriocina karakteriziraju visoka molekulska masa i termolabilnost. Poznati predstavnici bakteriocinskih spojeva ove skupine su helveticini M i J, i enterolizin A (Kumariya i sur., 2019).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu su korišteni sojevi vrste Lactobacillus plantarum i test-mikroorganizmi prikazani u tablici 1. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 1. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka	Uvjeti čuvanja
Lactobacillus plantarum	M92C	MRS, 37 °C, anaerobno
Lactobacillus plantarum	ZG1C	MRS, 37 °C, anaerobno
Lactobacillus plantarum	L4	MRS, 37 °C, anaerobno
Staphylococcus aureus	3048	HB, 37 °C, aerobno
Listeria monocytogenes	ATCC 19111	HB, 37 °C, aerobno

3.1.2. Hranjive podloge

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvaščev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $MgSO_4x7H_2O$ 0,1; $MnSO_4x7H_20$ 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121ºC tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test – mikroorganizama

- BHI (Brain heart infusion) agar sastava (g/L destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- BHI bujon je istog sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.

- HA (hranjivi agar) sastava (g/l destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao podloga hranjivi agar, ali bez dodatka agara.

3.1.3. Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen", SAD
- 5X Green Go Tay Flexi pufer, „Promega", SAD
- agaroza, „Appligane", Francuska
- DNA polimeraze, „Takara", Japan
- dNTP, „Takara", Japan
- etanol, 70 % „Kemika", Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Manheim GmbH", Mainheim, SR Njemačka
- Genomic Wizard DNA kita za izolaciju DNA, "Promega", SAD
- glicerol, „Alkaloid", Sjeverna Makedonija
- glukoza, „Kemika", Hrvatska
- izopropranol, „Kemika", Hrvatska
- lizozim, „EuroBio", Francuska
- magnezijev klorid, „Promega", SAD
- „nuclease Free Water", „Takara", Japan
- početnice „Invitrogen", SAD
- RNase A, „Qiagen", Španjolska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas", Kanada

3.1.4. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska", Jugolavija
- automatske pipete, „Eppendorf", SAD
- BioSpec Nano, „Shimatzu"", Japan
- Bušač rupa
- centrifuga Centric, „Tehtnica", Slovenija
- elektroforetska kadica, „Bio-Rad", SAD
- ependorfice

- filter papir
- hladnjak, „Gorenje", Slovenija
- mikrobiološka ušica
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio- Rad", SAD
- Petrijeve zdjelice
- staklene epruvete
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- termostat, „Instrumentarija", Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT,Izrael
- vaga, „Tehtnica", Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell", Italija
- vodena kupelj, „Sutjeska", Jugoslavija
- zamrzivač (-80˚C), „New Brunswick Scientific", SAD

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80 °C u hranjivom bujonu s 15 % (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u tablici 1.

3.2.2. Metoda difuzije s rupama u agaru (engl. agar well-diffusion method)

Antimikrobno djelovanje odabranih sojeva BMK prema patogenim test-mikroorganizmima podrijetlom iz hrane (Staphylococcus aureus 3048 i Listeria monocytogenes ATCC 19111) ispitano je metodom difuzije u agar, na krutim hranjivim podlogama prema Šušković i Kos (2007).

Prekonoćne bakterijske kulture test-mikroorganizama (150 µL) su nacijepljene u 12 mL odgovarajućeg agara koji je prethodno otopljen i ohlađen na 50 ˚C. Staphylococcus aureus 3048 je nacijepljen u Brain Heart Infusion (BHI) agar (1,5 % agara), a Listeria monocytogenes ATCC 19111 u hranjivi agar (1,5 % agara). Tako inokulirane podloge su

izlivene u Petrijeve zdjelice. Nakon što su se hranjive podloge skrutnule, sterilnim bušačem promjera 8 mm su izbušene „rupe" u agaru te su sterilnom mikrobiološkom ušicom uklonjeni agarni diskovi, a u nastalu rupu je nanešeno 50 µL supernatanta kulture ispitivane BMK. Supernatanti kultura su pripremljeni na način da su odabrani sojevi BMK, kojima se ispituje antimikrobna aktivnost, prethodno uzgojeni u anaerobnim uvjetima preko noći pri 37 °C, nakon čega je provedeno centrifugiranje tijekom 5 min pri 9000 o/min.

Tako pripremljene Petrijeve zdjelice su stavljene u hladnjak na 4 °C tijekom 3 sata, kako bi se omogućila difuzija supernatanta u agarnu podlogu prije početka rasta bakterijskih kultura. Nakon toga je slijedila inkubacija pri 37 °C preko noći, te mjerenje promjera zona inhibicije.

3.2.3. Metoda s dvostrukim slojem agara (engl. agar spot-test method)

Antimikrobno djelovanje odabranih izolata BMK prema patogenim test-mikroorganizmima podrijetlom iz hrane (Staphylococcus aureus 3048 i Listeria monocytogenes ATCC 19111) ispitano je metodom s dvostrukim slojem agara prema Kos i sur. (2011).

Prekonoćne bakterijske kulture odabranih sojeva BMK su nacijepljene po 5 µL na de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar u dvije paralele i stavljene na anaerobnu inkubaciju preko noći pri 37°C. Preko poraslih kolonija BMK u jednoj paraleli je preliveno 10 mL Brain Heart Infusion (BHI) „soft" agara (s 0,7 % agara), prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 °C, inokuliranog s 250 µL suspenzije test-mikroorganizma Staphylococcus aureus 3048, a u drugoj paraleli sa 10 mL hranjivog agra (s 0,8 % agara), prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 °C, inokuliranog sa 250 µL suspenzije test-mikroorganizma Listeria monocytogenes ATCC 19111. Aerobna inkubacija trajala je 24 sata pri 37 °C, nakon koje je slijedilo mjerenje bistrih zona inhibicije. Izmjereni su promjeri porasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID) te je izračunat efektivni inhibicijski odnos (EIR) prema slijedećem izrazu:

$$\mathbf{EIR = (ID-CD)/CD}$$

Ovisno o dobivenim vrijednostima, rezultati se interpretiraju prema slijedećem:

EIR < 0,5 → slaba inhibicija

0,5 < **EIR** < 1,5 → srednja inhibicija

EIR >1,5 → jaka inhibicija

3.2.4. Izolacija genomske DNA

Ekstrakcija genomske DNA iz bakterija mliječne kiseline provedena je pomoću Genomic Wizard DNA kita za izolaciju DNA (Promega, SAD). Po 5 mL prekonoćne kulture svake bakterije je centrifugirano 2 minute na 13000 o/min. Nakon uklanjanja supernatanta, talog stanica je suspendiran u 480 µL 50 mM EDTA i 120 µL otopine lizozima (10 mg/mL) te inkubiran u vodenoj kupelji na 37 °C tijekom 30-60 min. Nakon inkubacije, uzorak je centrifugiran te je dobiveni talog stanica suspendiran u otopini za lizu jezgre koja je dio korištenog kita i inkubiran u vodenoj kupelji na 80 °C tijekom 5 min. Nakon što je stanični lizat ohlađen na sobnoj temperaturi, dodano je 3 µL otopine RNAze te je provedena inkubacije na 37 °C tijekom 15-60 min. Nakon ponovnog hlađenja na sobnoj temperaturi, uzorku je dodano 200 µL otopine za taloženje proteina te je vorteksiran 20 sekundi, inkubiran 5 minuta na ledu i centrifugiran na 13000 o/min 3 minute. Supernatant koji sadrži DNA je prebačen u čistu epicu u koju je prethodno dodano 600 µL izopropanola sobne temperature te je izmiješano okretanjem epice dok niti DNA nisu formirale vidljivu masu. Nakon toga je slijedilo centrifugiranje, uklanjanje supernatanta i sušenje epice na čistom apsorbirajućem papiru. Talog DNA je zatim ispran sa 600 µL 70 % etanola. Nakon sušenja uzorka 10-15 minuta na zraku, talogu je dodano 100 µL otopine za rehidraciju DNA koja je dio kita za izolaciju te se talog rehidriran jednosatnom inkubacijom na 65 °C u vodenoj kupelji. Tako dobivena DNA je pohranjena na 2-8 °C (Leboš Pavunc i sur., 2012).

3.2.5. Mjerenje koncentracije DNA

Mjerenje koncentracije DNA izolirane iz bakterijskih sojeva, provedeno je iz 2 µL uzorka pomoću uređaja BioSpec-Nano pri valnoj duljini 0,7 nm, pri čemu se kao slijepa proba korištena otopina za rehidraciju DNA koja je dio kita za izolaciju DNA (Leboš Pavunc i sur., 2012).

3.2.6. Detekcija gena koji kodiraju za plantaricine PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) metodom

U PCR reakciji za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocine odabrane početnice prikazane su u tablici 2. Reakcijska smjesa sastojala se od $MgCl_2$ (Promega, SAD), 5X Green Go Tay Flexi pufera (Promega, SAD), DNA polimeraze (Takara, Japan), dNTP (Takara, Japan), vode (Takara, Japan), DNA i početnica, a reakcije su provedene u uvjetima kako je opisano u literaturi navedenoj u tablici 2 uz svaku početnicu. Kao negativna kontrola korišten je uzorak bez dodane bakterijske DNA kao provjera da DNA fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD). Nakon završene reakcije uzorci su stavljani na agarozni gel (1 %), a elektroforeza je provedena pri 200 V. Gel je nakon završetka elektroforeze obojan u otopini etidijevog bromida koncentracije 0,5 µg/mL, stavljen na UV transiluminator (DNR Bio-Imaging Systems, Izrael) pri valnoj duljini od 254 nm i vizualiziran upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 2. Početnice korištene u PCR reakcijama za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocine

Ciljani gen	Bakteriocin	Forward primer (5´-3´)	Reverse primer (5´-3´)	Očekivana veličina PCR produkta	Literatura
plnA	Plantaricin A	GTACAGTACTAATGGGAG	CTTACGCCAATCTATACG	450 bp	Diep i sur. (1996); Remiger i sur. (1996)
plnEF	Plantaricin EF	GGCATAGTTAAAATTCCCCCC	CAGGTTGCCGCAAAAAAAG	428 bp	Anderssen i sur. (1998); Diep i sur. (1996)
plnJ	Plantaricin J	TAACGACGGATTGCTCTG	AATCAAGGAATTATCACATTAGTC	475 bp	Anderssen i sur. (1998); Diep i sur. (1996)
plnNC8	Plantaricin NC8	GGTCTGCGTATAAGCATCGC	AAATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTC	207 bp	Maldonado i sur. (2004)
plnS	Plantaricin S	GCCTTACCAGCGTAATGCCC	CTGGTGATGCAATCGTTAGTTT	320 bp	Stephens i sur. (1998)
plnW	Plantaricin W	TCACACGAAATATTCCA	GGCAAGCGTAAGAAATAAATGAG	165 bp	Holo i sur. (2001)

4.REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Detekcija antimikrobnog djelovanja Lb. plantarum sojeva

Lb. plantarum sojevi, čija antimikrobna aktivnost se ispituje u ovom radu, izolirani su iz autohtonih fermentiranih proizvoda, kao što su svježi sir (Lactobacillus plantarum ZG1C), fermentirano mlijeko (Lactobacillus plantarum M92C) i silaža (Lactobacillus plantarum L4). Navedeni bakterijski sojevi ispitani su i uspoređeni s obzirom na prikazanu inhibicijsku aktivnost prema odabranim test-mikroorganizmima, Staphylococcus aureus 3048 i Listeria monocytogenes ATCC 19111, temeljenu na vrijednostima inhibicijskog promjera. Metodom difuzije s rupama u agaru došlo je do difuzije bakteriocina plantaricina unutar podloge s test-mikroorganizmima, pri čemu je antimikrobna aktivnost unutar pripremljenih supernatanata uzrokovala nastanak zona inhibicije, vidljivih na slici 3. Rezultati su prikazani u tablici 3 pri čemu se može uočiti kako su u slučaju kada su supernatanti kultura primijenjeni na podloge s Listeria monocytogenes ATCC 19111, ovim postupkom dobivene jednake inhibicijske zone, iznosa 2 cm. Korištenjem Lb. plantarum supernatanata na podlozi na kojoj je kao test-mikroorganizam nacijepljen Staphylococcus aureus 3048, uočene su inhibicijske zone jednakih promjera kod Lactobacillus plantarum M92C i Lactobacillus plantarum L4, koje su iznosile 1,4 cm. Lactobacillus plantarum ZG1C je pokazao bolju antimikrobnu aktivnost od ostala dva korištena Lb. plantarum soja iznosom promjera nastale inhibicijske zone u vrijednosti od 1,5 cm.

U istraživanju provedenom od strane Gong i sur. (2010) provedeno je ispitivanje antimikrobnog djelovanja Lb. plantarum sojeva koji su proizvodili plantaricin MG. U ovom eksperimentu su među test-mikroorganizmima korišteni Staphylococcus aureus ATCC25923 i Listeria monocytogenes NICPBP54002, a inhibicijsko djelovanje promatrano je provedbom metode difuzije s rupama u agaru. Plantaricin MG pokazao je uspješnu inhibiciju patogena Listeria monocytogenes NICPBP54002 i Staphylococcus aureus ATCC25923. Zona inhibicije nastala djelovanjem plantaricina MG na Staphylococcus aureus ATCC25923 iznosila je (18,24 ± 0,14) mm u promjeru, dok je u slučaju Listeria monocytogenes NICPBP54002 inhibicijska zona iznosila (15,75 ± 0,35) mm.

Usporedbom naših rezultata s rezultatima dobivenim eksperimentom s plantaricinom MG prema Gong i sur. (2010), može se uočiti kako je plantaricin MG pokazao bolja inhibicijska svojstva tijekom pokusa sa Staphylococcus aureus. Nadalje promatrajući rezultate inhibicije u slučaju kad je kao test mikroorganizam korišten Listeria monocytogenes, usporedbom s plantaricinom MG, uočena je izraženija antimikrobna aktivnost plantaricina proizvedenih od strane Lb. plantarum ZG1C, Lb. plantarum M92C i Lb. plantarum L4.

Tablica 3. Promjeri zona inhibicije rasta test-mikroorganizama Staphylococcus aureus 3048 i Listeria monocytogenes ATCC 19111 (cm) dobiveni sa supernatantima kultura bakterija mliječne kiseline metodom difuzije s rupama u agaru

Sojevi BMK	**Pomjeri zona inhibicije (cm)**	
	Staphylococcus aureus 3048	**Listeria monocytogenes ATCC 19111**
Lactobacillus plantarum ZG1C	1,50	2,00
Lactobacillus plantarum M92C	1,40	2,00
Lactobacillus plantarum L4	1,40	2,00

Za ispitivanje inhibicijskog potencijala promatranih Lactobacillus plantarum sojeva, korištena je također metoda s dvostrukim slojem agara, prikazana na slici 3. Inhibicija rasta ponovno je provedena s test-mikroorganizmima Listeria monocytogenes ATCC 19111 i Staphylococcus aureus 3048. Rezultati provedene metode za dokazivanje inhibicijskog učinka izraženi su pomoću: promjera zone inhibicije, promjera kulture Lb. plantarum te s pomoću efektivnog inhibicijskog odnosa računski dobivenog iz vrijednosti promjera zone inhibicije i promjera porasle kulture, kao što je opisano u poglavlju 3.2.3. Ovom metodom se iz dobivenih rezultata u tablici 4 može uočiti kako su promjeri svih korištenih kultura Lb. plantarum sojeva bili jednakog iznosa od 0,8 cm. Lb. plantarum ZG1C i Lb. plantarum L4 pokazali su jednak antimikrobni učinak na podlozi s Listeria monocytogenes, dok se Lb. plantarum M92C pokazao kao soj s najjačom inhibicijskom aktivnošću.

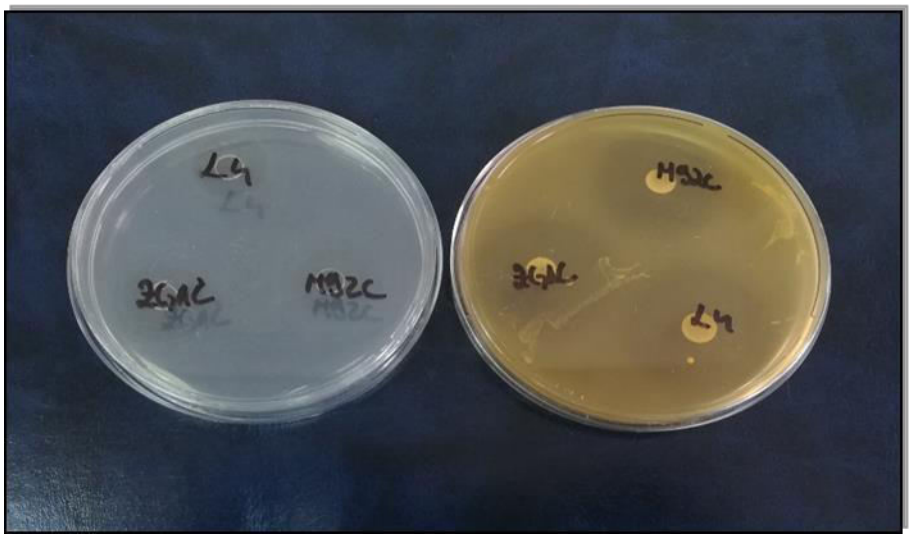
U drugom slučaju korištena je podloga s test-mikroorganizmom Staphylococcus aureus 3048. Prema rezultatima iz tablice 4, uočena je različita antimikrobna djelatnost kod sva tri soja Lb. plantarum unatoč jednakom promjeru naraslih kultura. Ponovno je i u ovom slučaju, vidljivo najjače antimikrobno djelovanje Lb. plantarum M92C prema ispitivanom test-mikroorganizmu, pri čemu je izmjerena inhibicijska zona promjera 2,80 cm. Manju antimikrobnu djelatnost pokazao je soj Lb. plantarum ZG1C stvarajući inhibicijsku zonu promjera 2,60 cm, dok je je na posljednjem mjestu gledajući jakost antimikrobnog djelovanja prema Staphylococcus aureus 3048 soj Lb. plantarum L4. Kod metode s dvostrukim slojem agara, uočena je veća raznolikost dobivenih vrijednosti kojima se opisuje antimikrobno djelovanje ispitivanih sojeva Lb. plantarum.

Veće razlike u vrijednostima rezultata mogu se pripisati tome što se u metodi dvostrukog sloja agara, za razliku od metode difuzije s rupama u agaru, mjeri inhibicijska aktivnost Lb. plantarum sojeva koji rastu i pritom proizvode bakteriocine, ali i druge antimikrobne tvari poput vodikovog peroksida, mliječne kiseline, octene kiseline, diacetila i alkohola. Iz navedenih razloga su dobivene veće inhibicijske zone nego tijekom metode difuzije s rupama u agaru, tijekom kojih je kao djelatna tvar korišten supernatant kultura nakon prekonoćnog uzgoja stanica sojeva Lb. plantarum.

Dobivene rezultate u tablici 4 može se usporediti s rezultatima dobivenim promatranjem antimikrobnog djelovanja Lb. plantarum SF9C (Butorac i sur., 2020). Ispitana je sposobnost inhibicije rasta patogenih gram-pozitivnih mikroorganizama, Listeria monocytogenes ATCC 19111 i Staphylococcus aureus 3048. Metodom s dvostrukim slojem agara Lb. plantarum SF9C pokazao je veću sposobnost inhibicije rasta od Lb. plantarum sojeva L4, ZG1C i M92C čiji se antimikrobni učinak ispitivao. Prema Butorac i sur. (2020) Lb. plantarum SF9C je inhibirao rast Staphylococcus aureus 3048 u zoni promjera (3,32 ± 0,13) cm, dok je u slučaju inhibicije rasta Listeria monocytogenes ATCC 19111 uočena inhibicijska zona veličine (3,5 ± 0,1) cm. Ovim je utvrđen veći antimikrobni potencijal Lb. plantarum SF9C prema rastu korištenih gram-pozitivnih patogena, naspram uočenog inhibicijskog učinka postignutog analiziranjem djelovanja ispitivanih sojeva Lb. plantarum (L4, ZG1C i M92C).

Tablica 4. Rezultati inhibicije rasta test-mikroorganizama Staphylococcus aureus 3048 i Listeria monocytogenes ATCC 19111, izraženi kao promjeri porasle kulture Lb. plantarum sojeva (CD), promjeri zone inhibicije (ID) i efektivni inhibicijski odnos (EIR), dobiveni metodom s dvostrukim slojem agara

Sojevi BMK	Listeria monocytogenes ATCC 19111			Staphylococcus aureus 3048		
	CD (cm)	ID (cm)	EIR	CD (cm)	ID (cm)	EIR
Lb. plantarum ZG1C	0,80	2,30	1,88	0,80	2,60	2,25
Lb. plantarum M92C	0,80	2,50	2,13	0,80	2,80	2,50
Lb. plantarum L4	0,80	2,30	1,88	0,80	2,30	1,88



Slika 3. Prikaz antimikrobnog djelovanja Lb. plantarum sojeva dobivenih metodom difuzije s rupama u agaru i metodom s dvostrukim slojem agara

4.2. Detekcija gena koji kodiraju za plantaricine

Nakon eksperimentalnog dokazivanja antimikrobnog učinka sojeva Lactobacillus plantarum prema Listeria monocytogenes ATCC 19111 i Staphylococcus aureus 3048, primjenom metode difuzije s rupama u agaru i metode s dvostrukim slojem agara ustanovljena je prisutnost antimikrobnih tvari koje su inhibirale rast korištenih test-mikroorganizama.

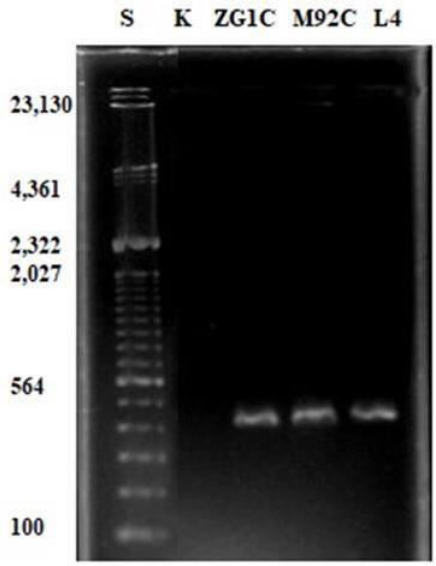
Idući korak analize bio je određivanje prisutnosti plantaricina na genomskoj razini kod ispitivanih Lb. plantarum sojeva. Među ispitivanim plantaricinima čija se prisutnost detektirala bili su plantaricin A, plantaricin EF, plantaricin J, plantaricin NC8, plantaricin S i plantaricin W. Postupak je proveden PCR reakcijom pomoću dviju početnica za svaki od prethodno spomenutih gena za plantaricin, pri čemu se jedna početnica komplementarno sparivala sa sekvencom na jednom kraju ispitivanog gena, dok se druga početnica sparivala sa sekvencom drugog kraja ispitivanog gena plantaricina.
Provedenim postupkom ispitivanja prisutnosti gena, uz dodatak parova početnica za sve vrste gena plantaricina, PCR reakcijom su umnoženi samo oni geni plantaricina kod kojih su se početnice komplementarno vezale na početak i kraj navedene sekvence.

Također je provedeno mjerenje koncentracije DNA ispitivanih Lb. plantarum sojeva, opisano u poglavlju 3.2.5. Rezultati mjerenja koncentracije DNA Lb. plantarum sojeva prikazani su u tablici 5. Uočena je najveća koncentracija DNA u slučaju Lb. plantarum M92C, u vrijednosti od 761,07. Nadalje, kod soja Lb. plantarum ZG1C uočena je također visoka koncentracija DNA od 681,14, dok je soj Lb. plantarum L4 pokazao veliko odstupanje u vrijednosti koncentracije izmjerene DNA, sa najnižom zabilježenom koncentracijom DNA od 98,21.

Tablica 5. Izmjerena koncentracija DNA Lb. plantarum sojeva

Soj	Koncentracija
Lactobacillus plantarum M92C	761,07
Lactobacillus plantarum ZG1C	681,14
Lactobacillus plantarum L4	98,21

Nakon PCR reakcije, provedena je DNA elektroforeza u agaroznom gelu, s ciljem provjere veličine umnoženih gena plantaricina. Prema literaturi, kako je navedeno i u tablici 2, dobivene su očekivane veličine umnoženih fragmenata, koje su iznosile 450 pb za plantaricin A, 428 pb za plantaricin EF te 475 pb za plantaricin J (slika 4).



Slika 4. DNA elektroforeza PCR produkata u agaroznom gelu, umnoženih specifičnim plnA PCR početnicama: S-standard, K-negativna kontrola, ZG1C-Lactobacillus plantarum ZG1C, M92C - Lactobacillus plantarum M92C, L4 - Lactobacillus plantarum L4

U tablici 6 navedeni su rezultati PCR reakcija, iz kojih se može uočiti kako su geni za plantaricin A, plantaricin EF i plantaricin J prisutni u svim ispitivanim sojevima Lb. plantarum čiju smo antimikrobnu aktivnost određivali. Geni za plantaricin NC8, plantaricin S i plantaricin W nisu bili detektirani PCR reakcijom, čime je odbačena mogućnost njihove prisutnosti u genomu analiziranih sojeva.

Tablica 6. Usporedba rezultata dobivenih nakon provođenja PCR reakcija za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocine (Pln – plantaricin)

Soj:	PlnA	PlnEF	PlnJ	PlnNC8	PlnS	PlnW
Lactobacillus plantarum L4	+	+	+	-	-	-
Lactobacillus plantarum ZG1C	+	+	+	-	-	-
Lactobacillus plantarum M92C	+	+	+	-	-	-
Kontrola	-	-	-	-	-	-

+ detektiran gen za bakteriocin; - nije detektiran gen za bakteriocin

5. ZAKLJUČCI

1. Dokazana je antimikrobna aktivnost kod ispitivanih autohtonih Lactobacillus plantarum sojeva (L4, ZG1C i M92C), pri čemu je soj M92C pokazao najbolje inhibicijsko djelovanje prema test-mikroorganizmima Staphylococcus aureus 3048 i Listeria monocytogenes ATCC 19111

2. Dokazana je prisutnost gena koji kodiraju za plantaricine A, EF i J kod sva tri ispitana Lb. plantarum soja (L4, ZG1C i M92C)

6. LITERATURA

Anderssen E. L., Diep B. D., Nes I. F., Eijsink V. G., Nissen-Meyer J. (1998) Antagonistic activity of Lactobacillus plantarum C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Applied and Environmental Microbiology **64(6)**: 2269–2272.

Belkum M. J., Martin-Visscher L. A., Vederas J. C. (2011) Structure and genetics of circular bacteriocins. Trends in Microbiology **19(8)**: 411-418.

Brinques G. B., Peralba M. D., Ayub M. A. (2009) Optimization of probiotic and lactic acid production by Lactobacillus plantarum in submerged bioreactor systems. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **37(2)**: 205-212.

Butorac K., Banić M., Novak J., Leboš Pavunc A., Uroić K., Durgo K., Oršolić N., Kukolj M., Radović S., Scalabrin S., Žučko J., Starčević A., Šušković J. i Kos B. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing Lactobacillus plantarum SF9C and S-layer-carrying Lactobacillus brevis SF9B to withstand gastrointestinal transit. Microbial Cell Factories **19(1)**.

Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology **3(10)**: 777-788.

Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. (2012) Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? Nature Reviews Microbiology **11(2)**: 95-105.

Cuozzo S., Sesma F. (2001) Methods for the detection and concentration of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Food Microbiology **14**: 141–146.

Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L. (2005) Antimicrobials in food, Taylor & Francis, Boca Raton, SAD, str. 238-241.

Dicks L. M. T., Mellett F. D., Hoffman L. C. (2004) Use of bacteriocin-producing starter cultures of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus curvatus in production of ostrich meat salami. Meat Science **66(3):** 703–708.

Diep D. B., Håvarstein L. S., Nes I. F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in Lactobacillus plantarum C11. Journal of Bacteriology **178(2):** 4472–4483.

Diep D. B., Straume D., Kjos M., Torres C., Nes I. F. (2009) An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from Lactobacillus plantarum. Peptides **30(8)**: 1562–1574.

Diep D. B., Skaugen M., Salehian Z., Holo H., Nes I. F. (2007) Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. Proceedings of the National Academy of Sciences **104(7)**: 2384-2389.

Dobson A., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. (2011) Bacteriocin Production: A Probiotic Trait? Applied and Environmental Microbiology **78(1)**: 1-6.

Drider D., Bendali F., Naghmouchi K., Chikindas M. L. (2016) Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. Probiotics and Antimicrobial Proteins **8(4)**: 177-182.

Ekblad B., Kyriakou P. K., Oppegard C., Nissen-Meyer J., Kaznessis Y. N., Kristiansen P. E. (2016) Structure-function analysis of the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. Biochemistry **55**: 5106–5116.

Enan G., El-Essawy A., Uyttendaele M., Debevere J. (1996) Antibacterial activity of Lactobacillus plantarum UG1 isolated from dry sausage: Characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. International Journal of Food Microbiology **30(3)**: 189-215.

Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, 382 structure and activity. FEMS Microbiology Reviews **24(1)** 85-106.

Forsythe S. J. (2000) The Microbiology of Safe Food, 1.izd., Wiley-Blackwell, Oxford, UK, str. 96–142.

Fujita K., Ichimasa S., Zendo T., Koga S., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K. (2007) Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. Applied and Environmental Microbiology **73**: 2871–2877.

Gong H., Meng X., Wang H. (2010) Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by Lactobacillus plantarum KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream from China. Food Control **21(1)**: 89-96.

Gulluce M., Karadayi M., Baris O. (2013) Bacteriocins: promising antimicrobials U: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Mendes-Villa A., ed., FORMATEX, str. 1016–1027.

Héchard Y., Sahl H. G. (2002) Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Biochimie **84(5-6)**: 545-557.

Heldman D. R., Moraru C. I. (2011) Anaerobic reactions. U: Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering, 2.izd., CRC Press, Boca Raton, SAD, str. 46-54.

Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanovic S., Nes I. F. (2001) Plantaricin W from Lactobacillus plantarum belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. Microbiology **147:** 643–651.

Kanatani K., Oshiumra M. (1994) Plasmid-associated bacteriocin production by Lactobacillus plantarum strain. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **58(11)**: 2084-2086.

Kandler O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria, Antonie van Leeuwenhoek **49(3)**: 209-224.

Kelstrup J., Gibbons R. J. (1969) Bacteriocins from human and rodent streptococci. Archives of Oral Biology **14:** 251-258.

Kjos M., Oppegård C., Diep D. B., Nes I. F., Veening J., Nissen-Meyer J., Kristensen T. (2014) Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. Molecular Microbiology **92(6)**: 1177-1187.

Kos B., Beganović J., Jurašić L., Švađumović M., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Šušković J. (2011) Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture Lactococcus lactis. Mljekarstvo **61**: 273-282.

Kumariya R., Garsa A. K., Rajput Y., Sood S., Akhtar N., Patel S. (2019) Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. Microbial Pathogenesis **128**: 171-177.

Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos B., Uroić K., Blažić M., Šušković J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. Food Technology and Biotechnology **50(2)**: 141-151.

Lindgren S. E. i Dobrogosz W. J. (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology Letters **87(1–2)**: 149–163.

Maldonado A., Jimenez-Diaz R., Ruiz-Barba J. L. (2004) Induction of plantaricin production in Lactobacillus plantarum NC8 after coculture with specific gram positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. Journal of Bacteriology **186**: 1556–1564.

Messi P., Bondi M., Sabia C., Battini R., Manicardi G. (2001) Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a Lactobacillus plantarum strain. International Journal of Food Microbiology **64(1-2)**: 193-198.

Remiger A., Ehrmann M. A., Vogel R. F. (1996) Identification of bacteriocin genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). Systematic and Applied Microbiology **19**: 28–34.

Ricciardi A., Parente E., Guidone A., Ianniello R. G., Zotta T., Sayem S. A., Varcamonti M. (2012) Genotypic diversity of stress response in Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paraplantarum and Lactobacillus pentosus. International Journal of Food Microbiology **157(2)**: 278-285.

Siezen R. J., Kok J., Abee T., Schaafsma G. (2002) Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, 1.izd., Egmond aan Zee, Nizozemska, str.5.

Siezen R. J., Vlieg J. E. (2011) Genomic diversity and versatility of Lactobacillus plantarum, a natural metabolic engineer. Microbial Cell Factories **10**: 3.

Stephens S., Floriano B., Cathcart D. P., Bayley S. A., Witt V. F., Jiménez-Díaz R.,Warner P. J., Ruiz-Barba J. L. (1998) Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum LPCO10. Applied and Environmental Microbiology **64**: 1871–1877.

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanić K., Matošić S. (2010) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. Food Technology & Biotechnology **48**: 296-307.

Šušković J., Kos B. (2007) Mikrobiološke metode i antibiotici. U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović Ristov A. i sur. (ured.), Institut «Ruđer Bošković», Zagreb, str. 949-963.

Yoneyama F., Imura Y., Ichimasa S., Fujita K., Zendo T., Nakayama J., Matsuzaki K., Sonomoto K. (2008) Lacticin Q, a Lactococcal Bacteriocin, Causes High-Level Membrane Permeability in the Absence of Specific Receptors. Applied and Environmental Microbiology **75(2)**: 538–541.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Antonio Grgić

ime i prezime studenta