

Povezanost antilisterijske i antistafilokokne aktivnosti *Lactiplantibacillus plantarum* sojeva i fenotipa sinteze plantaricina

Perica, Jana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:076685>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Jana Perica

**POVEZANOST ANTIListERIJSKE
I ANTISTAFILOKOKNE
AKTIVNOSTI *Lactiplantibacillus
plantarum* SOJEVA I FENOTIPA
SINTEZE PLANTARICINA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak, te uz pomoć dr. sc. Katarine Butorac i Nine Čuljak, mag. ing. biotechn.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta *Hrvatske zaklade za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“* (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Novak na savjetima, stručnosti i podršci tijekom izrade ovog diplomskog rada. Posebnu zahvalu upućujem Katarini i Nini na iznimnoj pomoći i prijateljstvu koje mi je uljepšalo ponekad duge i napore dane tijekom realizacije rada. Veliko hvala mojoj Heleni na beskrajnom prijateljstvu i potpori tijekom cijelog fakultetskog obrazovanja. Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci, ljubavi i lijepim riječima. Veliko hvala mom Karlu za sve najsretnije trenutke.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

POVEZANOST ANTILISTERIJSKE I ANTISTAFILOKOKNE AKTIVNOSTI *Lactiplantibacillus plantarum* SOJEVA I FENOTIPA SINTEZE PLANTARICINA

Jana Perica, univ. bacc.ing. biotechn. 0058212561

Sažetak: Pojedini *Lactiplantibacillus plantarum* sojevi sintetiziraju antimikrobne metabolite bakteriocine, čiji aplikativni aspekt obuhvaća primjenu u biokonzerviranju, ali je i potencijalna strategija za smanjenje antibiotske rezistencije. Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti povezanost fenotipa sinteze bakteriocina s antimikrobnim učinkom *L. plantarum* sojeva prema *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ i *Staphylococcus aureus* 3048. Supernatant kulture *L. plantarum* sojeva je inhibirao formiranje biofilma test-mikroorganizama. PCR metodom potvrđena je prisutnost gena *plnA*, *plnEF* i *plnJ* u genomu *L. plantarum* sojeva. Tijekom kultivacije *Lactiplantibacillus* sojeva uz određivanje antimikrobne aktivnosti, praćen je bakterijski rast i acidifikacija. Prema rezultatima, sojevi *L. plantarum* SF15C i *L. plantarum* D13 iskazuju značajno inhibicijsko djelovanje tijekom stacionarne faze rasta, koje se pripisuje proizvedenim plantaricinima. Gubitak antimikrobnog djelovanja supernatanta kulture pojedinih *Lactiplantibacillus* sojeva pripisuje se inaktivaciji bakteriocinske aktivnosti. Ovi rezultati su temelj za daljnju izolaciju i karakterizaciju plantaricina koje proizvode *L. plantarum* D13, s ciljem primjene u fermentacijskim procesima za smanjenje kontaminacija ovim patogenima.

Ključne riječi: antimikrobna aktivnost, bakteriocini, plantaricini, bakterije mliječne kiseline, probiotici

Rad sadrži: 45 stranica, 11 slika, 7 tablica, 48 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi: Katarina Butorac, dr.sc., Nina Čuljak, mag.ing.biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Novak (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Markov (član)*
4. prof. dr. sc. Anita Slavica (zamjenski član)

Datum obrane: 20. srpnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

ASSOCIATION OF ANTILISTERIC AND ANTISTAPHYLOCOCCAL ACTIVITY OF *Lactiplantibacillus plantarum* STRAINS AND PLANTARICIN SYNTHESIS PHENOTYPE

Jana Perica, univ. bacc.ing. biotechn. 0058212561

Abstract: Certain *Lactiplantibacillus plantarum* strains synthesize antimicrobial metabolites bacteriocins, with applications in biopreservation and potential as an alternative antimicrobial strategy. This thesis aimed to examine the correlation between bacteriocin synthesis phenotype and the antimicrobial effect of *L. plantarum* strains against *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ and *Staphylococcus aureus* 3048. The culture supernatant of *L. plantarum* strains inhibited biofilm formation by the test-microorganisms. PCR analysis confirmed the presence of *plnA*, *plnEF*, and *plnJ* genes in the *L. plantarum* genome. During cultivation of *Lactiplantibacillus* strains, bacterial growth, acidification, and antimicrobial activity were monitored. *L. plantarum* SF15C and D13 strains exhibited a significant inhibitory effect during the stationary growth phase, attributed to plantaricin production. The reduction in antimicrobial activity in the culture supernatants of certain *Lactiplantibacillus* strains is attributed to bacteriocin inactivation. These findings lay the groundwork for further isolation and characterization of plantaricins produced by *L. plantarum* D13, facilitating their application in fermentation processes to mitigate contamination.

Keywords: antimicrobial activity, bacteriocins, plantaricins, lactic acid bacteria, probiotics

Thesis contains: 45 pages, 11 figures, 7 tables, 48 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Jasna Novak, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD, Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor (president)
2. Jasna Novak, PhD, Full professor (mentor)
3. Ksenija Markov, PhD, Full professor (member)
4. Anita Slavica, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 20th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE.....	2
2.2. PROBIOTICI.....	3
2.2.1. Definicija i izbor probiotičkih sojeva.....	3
2.2.2. Učinak probiotika na ljudsko zdravlje	4
2.3. BAKTERIOCINI.....	6
2.3.1. Karakteristike i klasifikacija bakteriocina.....	6
2.3.2. Mehanizmi djelovanja bakteriocina	9
2.3.3. Plantaricini	10
2.3.4. Potencijalne primjene bakteriocina	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	18
3.1.2. Hranjive podloge	18
3.1.3. Kemikalije	19
3.1.4. Aparatura i pribor	20
3.2. METODE RADA	21
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	21
3.2.2. Određivanje utjecaja visoke temperature i proteolitičkih enzima na plantaricinsku aktivnost sojeva producenata metodom difuzije s rupama u agaru (<i>engl. agar well-diffusion method</i>)	21
3.2.3. Analiza formiranja biofilma djelovanjem supernatanta kulture <i>L.plantarum</i> sojeva	21
3.2.4. Izolacija genomske DNA <i>L.plantarum</i> sojeva	22
3.2.5. Mjerenje koncentracije izolirane DNA	23

3.2.6. Detekcija gena koji kodiraju za plantaricine PCR (<i>engl. polymerase chain reaction</i>) metodom	23
3.2.7. Ispitivanje staničnog rasta, acidifikacije i antimikrobne aktivnosti tijekom kultivacije <i>L.plantarum</i> sojeva	24
3.2.8. Obrada podataka.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. UTJECAJ VISOKE TEMPERATURE I PROTEOLITIČKIH ENZIMA NA PLANTARICINSKU AKTIVNOST SOJEVA PRODUCENATA.....	27
4.2. INHIBICIJA FORMIRANJA BIOFILMA DJELOVANJEM SUPERNATANTA <i>L.plantarum</i> SOJEVA	31
4.3. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA PLANTARICINE I PRAĆENJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI <i>Lactiplantibacillus</i> SOJEVA.....	33
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Probiotici se definiraju kao "živi mikroorganizmi koji, primijenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na zdravlje domaćina". Pojedini sojevi bakterija mliječne kiseline (BMK) se smatraju probioticima jer ispunjavaju kriterije selekcije probiotičkih sojeva. Probiotičke BMK se razmatraju u terapijskim i tehnološkim primjenama zbog fermentacijskih svojstava, proizvodnje polisaharida i vitamina, proteolitičke aktivnosti, sposobnosti adhezije i kolonizacije probavne sluznice te sinteze antimikrobnih spojeva. U svrhu ekskluzije konkurentnih mikroorganizama, BMK proizvode različite antimikrobne metabolite kao što su mliječna i octena kiselina, diacetili, vodikov peroksid, ugljikov dioksid i specifične antimikrobne supstancije poput bakteriocina (Kon i Rai, 2016; Šušković i sur., 2009).

Bakteriocini su mali, ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi koji djeluju antagonistički prema drugim mikrobnim vrstama, dok je sam soj producent imun na njihovo djelovanje. Posebna pozornost se posvećuje BMK producentima bakteriocina, zbog dokazane inhibicije patogena i nepoželjnih mikroorganizama u fermentiranim namirnicama, kao i u gastrointestinalnom okruženju. Osim što se mogu koristiti u biokonzerviranju i poboljšanju sigurnosti prehrambenih proizvoda, bakteriocini pokazuju obećavajuću primjenu kao klinička terapija u borbi protiv antibiotske rezistencije. Stoga je nužno nastaviti istraživanja identifikacije bakteriocina, njihovih mehanizama djelovanja i inhibicijskog spektra, što može rezultirati novim, raznovrsnim i učinkovitim antimikrobnim sredstvima (Soltani i sur., 2021; Reis i sur., 2012).

Cilj ovog rada bio je ispitati bakteriocinsko djelovanje odabranih *Lactiplantibacillus* sojeva prema patogenim gram-pozitivnim bakterijama koje su učestali kontaminanti u hrani, *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ i *Staphylococcus aureus* 3048. Da bi se ustanovila bakteriocinska aktivnost, provedeno je ispitivanje učinka visoke temperature i proteolitičkih enzima na antimikrobno djelovanje, metodom difuzije s rupama u agaru. Kvantificirana je sposobnost inhibicije formiranja biofilmova test-mikroorganizama djelovanjem supernatanta *L. plantarum* sojeva, koji potencijalno sadrže bakteriocinsku komponentu. Provođenjem PCR reakcije istražena je prisutnost gena koji kodiraju za bakteriocine te je ispitana inhibicija rasta test-mikroorganizama tijekom različitih faza bakterijskog rasta odabranih *L. plantarum* izolata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne, nesporulirajuće, mezofilne, katalaza-negativne bakterije koje rastu na kompleksnim hranjivim podlogama poput mlijeka, mesa i povrća, a dio su i autohtone mikroflore gastrointestinalnog trakta sisavaca. Ne sadrže citokrome te unatoč svojoj anaerobnoj prirodi toleriraju niske koncentracije kisika. Također, BMK pokazuju toleranciju na niske pH vrijednosti te je glavni proizvod fermentacije ugljikohidrata mliječna kiselina. Fermentacija heksoza karakterizirana je homofermentativnim metabolizmom, dok kod pojedinih sojeva heterofermentativnom razgradnjom uz mliječnu kiselinu nastaju ugljikov dioksid, etanol i acetat (Šušković i sur., 2010).

BMK se koriste u brojnim industrijskim primjenama, od starter kultura u mliječnoj industriji do probiotika u dodacima prehrani. Među BMK koje se najviše iskorištavaju i proučavaju razlikuju se dva koljena: *Firmicutes* i *Actinobacteria*. Unutar koljena *Firmicutes* najvažniji rodovi su *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Weissella*, koji svi pripadaju redu *Lactobacillales* te ih karakterizira niski udio GC parova baza (31-49%). Unutar koljena *Actinobacteria*, BMK pripadaju rodu *Bifidobacterium*, s visokim sadržajem GC parova baza (58–61 %) (Liu i sur., 2014)

Identifikacija i klasifikacija BMK se može provesti fenotipskim, biokemijskim i fiziološkim testovima. Međutim, precizna identifikacija bakterijskih sojeva ovim pristupima je ograničena uslijed različitih nutritivnih potreba i uvjeta rasta sojeva BMK te niske mogućnosti diskriminacije između srodnih sojeva. Stoga se danas najčešće koriste genotipske metode za klasifikaciju koje omogućavaju brže, pouzdanije i ponovljive rezultate te mogu razlikovati čak i vrlo blisko srodne vrste. Jedna od najčešćih metoda je lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), pri čemu je ključni korak za točnu molekularnu analizu odabir odgovarajućeg genskog markera ili gena koji amplificira PCR, kako bi se razlikovale vrste BMK (Sharma i Park, 2020). Drugi alati za genetičko-molekularnu tipizaciju uključuju analizu slučajno umnoženih fragmenata DNA (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD), usporedbu sekvenci očuvanih regija 16S rRNA gena, elektroforezu u pulsirajućem električnom polju (eng. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE), elektroforezu u denaturirajućem gradijentu (eng. *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*, DGGE) i sekvencioniranje cijelog genoma (Castro-González i sur., 2019).

Mliječna kiselina kao glavni produkt metabolizma BMK snižava pH vrijednost okoline i stvara nepovoljne uvjete za rast konkurentnih mikroorganizama. Dodatno, BMK imaju sposobnost proizvodnje niza drugih antimikrobnih spojeva koji povećavaju njihovo preživljenje i kompetitivnost unutar određenog ekosustava (Reis i sur., 2012). Uz mliječnu kiselinu, BMK proizvode i octenu kiselinu pri čemu nedisocirani oblici kiseline difundiraju kroz staničnu membranu i ometaju bitne metaboličke funkcije gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te kvasaca i plijesni. Proizvodnja vodikovog peroksida (H₂O₂) uzrokuje jak oksidativni učinak na konkurentne bakterijske stanice. Diacetili su aromatske komponente koje su posebno učinkovite protiv gram-negativnih bakterija. Brojne BMK proizvode bakteriocine, antimikrobne tvari peptidne prirode, što je važna karakteristika koja se proučava u svrhu eliminacije patogena u fermentiranoj hrani i u gastrointestinalnom okruženju (Šušćković i sur., 2010; Reis i sur., 2012).

2.2. PROBIOTICI

2.2.1. Definicija i izbor probiotičkih sojeva

Izraz probiotik prvi put je korišten 1960-ih i dolazi od grčke riječi *pro bios* koja znači „za život“. Blagotvorni učinci određene hrane koja sadrži žive bakterije prepoznati su stoljećima. Međutim, tek početkom 20. stoljeća istraživači su predložili koncept kojim se poremećena crijevna mikroflora može modulirati pomoću korisnih bakterija, što dovodi do uspostave probiotičkog koncepta (Williams, 2010). Probiotik je jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflora probavnog sustava domaćina (Šušćković i sur., 1997). Istraživanja probiotika su znatno napredovala u posljednja dva desetljeća te je postignut značajan napredak u odabiru i karakterizaciji specifičnih probiotičkih kultura koje iskazuju značajne zdravstvene prednosti nakon konzumacije. Najčešće vrste koje se koriste kao probiotici pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus Lactococcus Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* te *Pediococcus* (George Kerry i sur., 2018). Prema načinu primjene probiotici se mogu podijeliti na bioterapeutike i funkcionalne dodatke hrani. Bioterapeutici podrazumijevaju uporabu probiotičkih sojeva u svrhu terapije ili prevencije bolesti te se stoga svrstavaju u kategoriju živih lijekova. S druge strane, probiotici kao funkcionalni dodatci prehrani promoviraju zdravlje domaćina pozitivnim učinkom na ravnotežu crijevne mikrobiote (Šušćković i sur., 2009).

Mikroorganizmi koji se koriste u probiotičke svrhe moraju zadovoljiti strogu selekcijsku strategiju koja uključuje opće, tehnološke i funkcionalne aspekte.

Opći kriteriji podrazumijevaju točnu taksonomsku identifikaciju soja, zdravstvenu sigurnost potvrđenu GRAS (*engl. generally regarded as safe*) statusom, humano podrijetlo ukoliko se primjenjuju kod ljudi, netoksičnost, nepatogenost i genetičku stabilnost te otpornost prema žučnim solima i niskim pH vrijednostima.

Tehnološki kriteriji odnose se na stabilnost željenih karakteristika tijekom pripreme, skladištenja i distribucije, visoku brojnost živih bakterija u probiotičkom proizvodu, jednostavnost uzgoja, izolacije, koncentriranja, smrzavanja i liofilizacije te poželjna organoleptička svojstva prilikom uključivanja u fermentacijske procese.

Funkcionalni kriteriji uključuju antimikrobno djelovanje (posebice prema patogenim i kariogenim mikroorganizmima), mogućnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela, poticanje imunološkog odgovora i promjenu mikrobnog metabolizma probavnog trakta. Također, probiotički soj mora biti producent antimikrobnih tvari poput bakteriocina, vodikovog peroksida i organskih kiselina, posjedovati mogućnost kompeticije s autohtonom mikroflorom i otpornost na antimikrobne supstancije koje proizvode njeni sudionici, imati imunomodulacijski učinak na domaćina i iskazivati jedan ili više dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje (Šušković i sur., 2009).

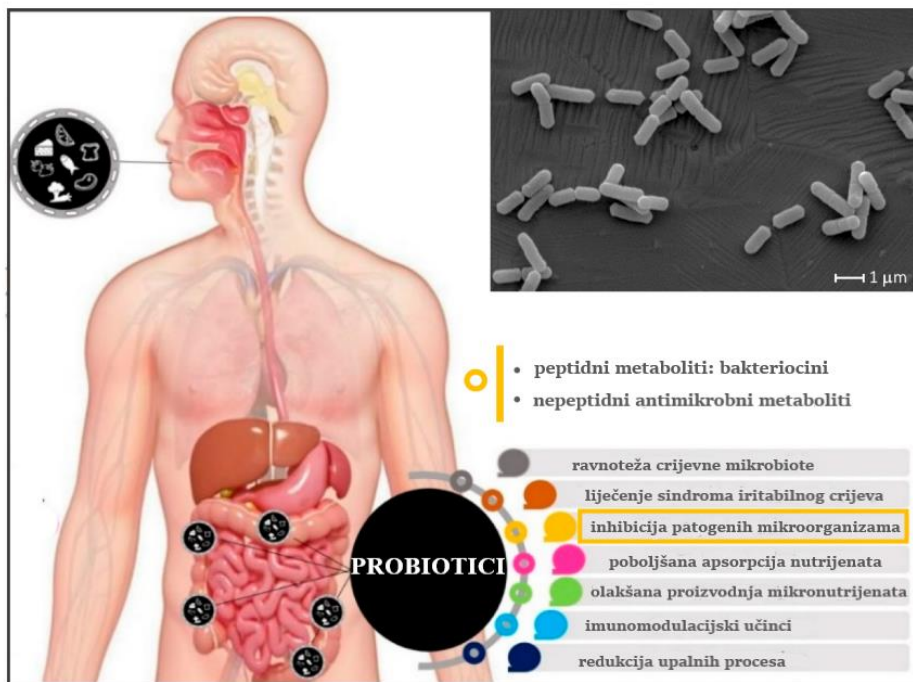
2.2.2. Učinak probiotika na ljudsko zdravlje

Ljudi su evoluirali zajedno s mnogobrojnim crijevnim mikrobnim vrstama koje povoljno djeluju na domaćina, igrajući važnu ulogu u sprječavanju patogenih aktivnosti i održavanju ravnoteže crijevne mikroflore. Općenito se smatra da je sastav mikrobne populacije stabilan tijekom odrasle dobi, međutim, upotreba antibiotika, kirurški zahvati, lijekovi, zračenje, stres, neprikladna prehrana i drugi čimbenici mogu uzrokovati porast patogenih bakterija i poremetiti homeostazu crijevne mikroflore, što se naziva disbiozom (Williams, 2010; George Kerry i sur., 2018). Disbioza crijevne mikrobiote se povezuje s povećanom incidencijom kroničnih, tumorskih, autoimunih, endokrinih, metaboličkih, kardiovaskularnih, gastrointestinalnih i neuroloških bolesti. Zbog otpornosti patogena na antibiotike, ključno je pronaći alternativno jednostavno, jeftino, lako dostupno i učinkovito rješenje za prevenciju i/ili terapiju patoloških stanja. U ovom kontekstu, probiotici mogu igrati važnu ulogu zaštite od raznih crijevnih patogena kao dodatak autohtonom mikroflori domaćina (George Kerry i sur., 2018).

Probiotici inhibiraju rast nepoželjnih mikroorganizama unutar gastrointestinalnog trakta proizvodnjom antimikrobnih supstancija (bakteriocini, H₂O₂, diacetili itd.) i snižavanjem pH okoline uslijed proizvodnje organskih kiselina. Dodatni mehanizmi suzbijanja kolonizacije

patogena uključuju natjecanje za mjesta vezanja na epitelnoj površini crijeva i kompeticiju za hranjive tvari. Probiotici modificiraju metaboličke procese unutar probavnog trakta, što dovodi do inhibicije proizvodnje toksičnih i kancerogenih metabolita, stimulacije enzimskih reakcija koje eliminiraju potencijalno toksične tvari i koje su uključene u razgradnju kompleksnih hranjivih sastojaka te sinteze enzima i ostalih esencijalnih nutrijenata koji nisu dostupni u dostatnim količinama kroz prehranu. Također, određeni probiotički sojevi posjeduju imunomodulacijska svojstva koja uključuju stimulaciju fagocitoze limfocita i makrofaga te povećanu proizvodnju imunoglobulina A (IgA) i citokina (Williams, 2010).

Brojni zdravstveni učinci probiotika uključuju poboljšani nutritivni status pojedinca i veću dostupnost vitamina i minerala, povećano lučenje probavnih enzima, liječenje dijareje i konstipacije, sniženje kolesterola, poboljšanje imunološkog sustava i peristaltike crijeva, održavanje pravilne funkcije sluznica i crijevne mikroflore, sprječavanje alergijskih reakcija i antikancerogeno djelovanje. Istraživanja pokazuju učinkovitost probiotika u liječenju sindroma iritabilnih crijeva, upalnih bolesti crijeva, infekcije bakterijom *Helicobacter pylori*, malapsorpcije laktoze i mnoge druge potencijalne primjene (slika 1) (Yadav i Shukla, 2017).



Slika 1. Pozitivni učinci konzumacije probiotičkih BMK na zdravlje čovjeka (prema Rocchetti i sur., 2021)

2.3. BAKTERIOCINI

2.3.1. Karakteristike i klasifikacija bakteriocina

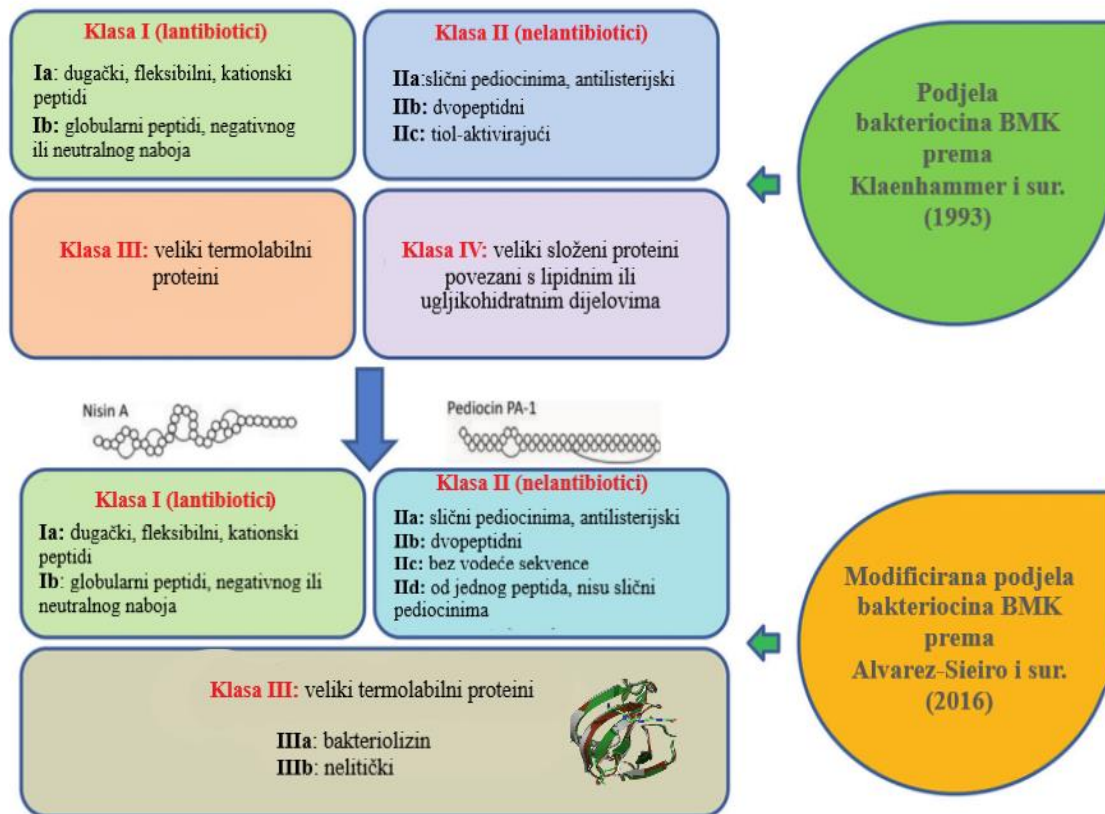
Bakteriocini su mali, termostabilni, ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi koji djeluju antagonistički prema drugim bakterijskim vrstama, dok sam soj producent je imun na njihovo djelovanje. Probiotički sojevi *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus* također sintetiziraju bakteriocine, no većina ovih antimikrobnih peptida karakteristična je za rod *Lactobacillus* (Hegarty i sur., 2016). Općenito su kationske amfipatske molekule jer sadrže suvišak lizinskih i argininskih ostataka. Iako ih karakterizira baktericidno i bakteriostatsko djelovanje, bakteriocini nisu klasični antibiotici. Pokazuju uži spektar djelovanja koji je najčešće ograničen na vrste blisko srodne mikroorganizmu producentu, dok antibiotici djeluju na širi spektar bakterijskih vrsta i ne pokazuju preferencijalni učinak na srodne sojeve. Nadalje, bakteriocini se ribosomski sintetiziraju, dok su antibiotici obično metaboliti sintetizirani višestupanjskim enzimskim putovima. Proizvedeni bakteriocini mogu se zadržati u stanici, ali se češće izlučuju u ekstracelularni matriks te su osjetljivi na proteaze i promjenjive stabilnosti pri različitim pH i temperaturama (Kon i Rai, 2016).

Poznata je njihova primjena u prehrambenoj industriji kao prirodnih konzervansa. Korištenje BMK i njihovih metaboličkih produkata općenito se smatra sigurnim. Primjena bakteriocina kao prirodne barijere protiv patogena i kvarenja hrane kao posljedica bakterijskih uzročnika dokazano je učinkovito (Zacharof i Lovitt, 2012). Osim njihove primjene kao prirodnih konzervansa, posebno se istražuje potencijalna primjena bakteriocina kao terapijskih molekula, pri čemu bi probiotički sojevi producenti igrali ulogu u sprječavanju različitih poremećaja gastrointestinalnog trakta koji su posljedica infekcije patogenim sojevima (Soltani i sur., 2021).

Klasifikacija bakteriocina predstavlja kompleksan zadatak s obzirom na veliku varijabilnost ovih antimikrobnih molekula. Broj identificiranih bakteriocina, posebice onih koje proizvode gram-pozitivne bakterije, neprestano raste što rezultira čestim promjenama i nadopunama klasifikacije. Stoga, ne postoji jedinstveni sustav kategorizacije ovih molekula, već se primjenjuju različiti pristupi utemeljeni na njihovoj primarnoj strukturi, molekulskoj masi, posttranslacijskim modifikacijama i genetičkim karakteristikama (Kon i Rai, 2016).

Klaenhammer je prvi predložio podjelu bakteriocina koje proizvode bakterije mliječne kiseline na 4 glavne skupine na temelju zajedničkih strukturnih karakteristika i mogućih mehanizama djelovanja (Klaenhammer, 1993). Alvarez-Sieiro i sur. (2016) predložili su noviju klasifikaciju, uzimajući u obzir najnovija saznanja o strukturnim značajkama, mehanizmima

djelovanja i biosinteze temeljenim na biokemijskim i genetičkim analizama mnogobrojnih bakteriocinskih molekula (slika 2). Podjela se sastoji od tri glavne grupacije: klasa I koja uključuje lantibiotike, klasa II koja uključuje nelantibiotike i klasa III koju u osnovi čine peptidi veće molekulske mase osjetljivi na temperaturu.



Slika 2. Klasifikacija bakteriocina koje proizvode bakterije mliječne kiseline (prema Kaur Sidhu i Nehra, 2021).

Između navedene tri grupacije, klasa I i klasa II privlače veliku pozornost znanstvene zajednice zbog njihove široke rasprostranjenosti i mnogobrojnih potencijalnih industrijskih primjena, posebice u prehrambenom sektoru. Unatoč tome, samo dva bakteriocina iz ove dvije skupine, nisin (klasa I) i pediocin PA-1 (klasa II), trenutno se komercijalno koriste kao prehrambeni aditivi. Nisin, koji se na tržištu prodaje pod nazivom Nisaplin, odobren je u gotovo 50 zemalja za upotrebu kao konzervans u različitim prehrambenim proizvodima, dok se Pediocin PA-1 koristi kao aditiv u mesnim proizvodima (Soltani i sur., 2021; Silva i sur., 2018).

Prva klasa bakteriocina su mali (< 5 kDa), termostabilni peptidi, nazvani lantibiotici. Ova klasa obuhvaća peptide koji podliježu posttranslacijskoj enzimskoj modifikaciji tijekom biosinteze koja dovodi do prisutnosti rijetkih aminokiselina i strukturnih karakteristika, što rezultira specifičnim svojstvima. Lantibiotike karakterizira vodeća sekvenca koja služi za

enzimsko prepoznavanje i transport. U podklasu Ia svrstavaju se izduženi, pozitivno nabijeni, fleksibilni peptidi koji sadrže neuobičajene aminokiseline poput lantionina i/ili metil-lantionina. Njihov mehanizam djelovanja uključuje stvaranje pora unutar osjetljivih bakterijskih membrana. Podklasu Ib karakteriziraju globularni, nefleksibilni, negativno ili neutralno nabijeni peptidi koji inhibiraju specifične neophodne enzimske reakcije ciljnih bakterija (Zacharof i Lovitt, 2012; Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

Klasi Ia pripada najpoznatiji i najproučavaniji primjer bakteriocina - nisin, peptid od 34 aminokiseline kojeg proizvodi bakterija *Lactococcus lactis* (Alvarez-Sieiro i sur., 2016). Nisin ima široku primjenu u proizvodnji konzervirane hrane i mliječnih proizvoda zbog svojih prikladnih karakteristika koje uključuju termostabilnost, netoksičnost, laku razgradivost probavnim enzimima, pri čemu ne utječe na okus i miris proizvoda. Odobren je od strane Europske unije (E234), kao i od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) kao siguran i praktičan prehrambeni konzervans u više od 50 zemalja (Zacharof i Lovitt, 2012). Nakon ribosomske sinteze, nisin prepeptid prolazi kroz značajne posttranslacijske modifikacije, uključujući proteolitičko uklanjanje vodećeg peptida i uvođenje atipičnih aminokiselina (dehidroalanin, dehidrobutirin lantionin i metil-lantionin) (Panina i sur., 2020). Uporaba nisina produljuje rok trajanja hrane inhibicijom gram-pozitivnih bakterija uzročnika kvarenja kao što su *Listeria* sp., *Staphylococcus* sp. i *Mycobacterium* sp., kao i sporogenih bakterija roda *Bacillus* i *Clostridium* (Šušković i sur., 2010).

Klasa II bakteriocina uključuje male (<10 kDa), termostabilne peptide, poput pediocina-PA-1 i sakacina A. Ovi peptidi ne sadrže neuobičajene aminokiseline te su posttranslacijske modifikacije rijetke. Mehanizam njihovog djelovanja svodi se na destabilizaciju i permeabilizaciju bakterijskih membrana ili na formiranje pora unutar istih (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

Grupu IIa čine bakteriocini slični pediocinima koji imaju široki spektar antimikrobne aktivnosti, posebice prema bakterijama iz roda *Listeria*. Ovi bakteriocini posjeduju N-terminalnu konsenzus sekvencu Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys koja sudjeluje u interakciji s ciljnom stanicom i C-terminalni dio koji je manje konzerviran i pretpostavlja se njegova uloga u prepoznavanju bakterijske stanice. Podklasa IIb sastoji se od dvopeptidnih bakteriocina (npr. laktokocin G, plantaricini EF, JK, NC8) pri čemu su za potpuni učinak antimikrobne aktivnosti potrebna oba peptida. U određenim slučajevima, poput termofilina 13, pojedini peptidi samostalno pokazuju antimikrobno djelovanje, ali njihova kombinacija uvijek rezultira većom aktivnošću. Podklasu IIc čine bakteriocini koji su sintetizirani bez vodećeg lanca na N-

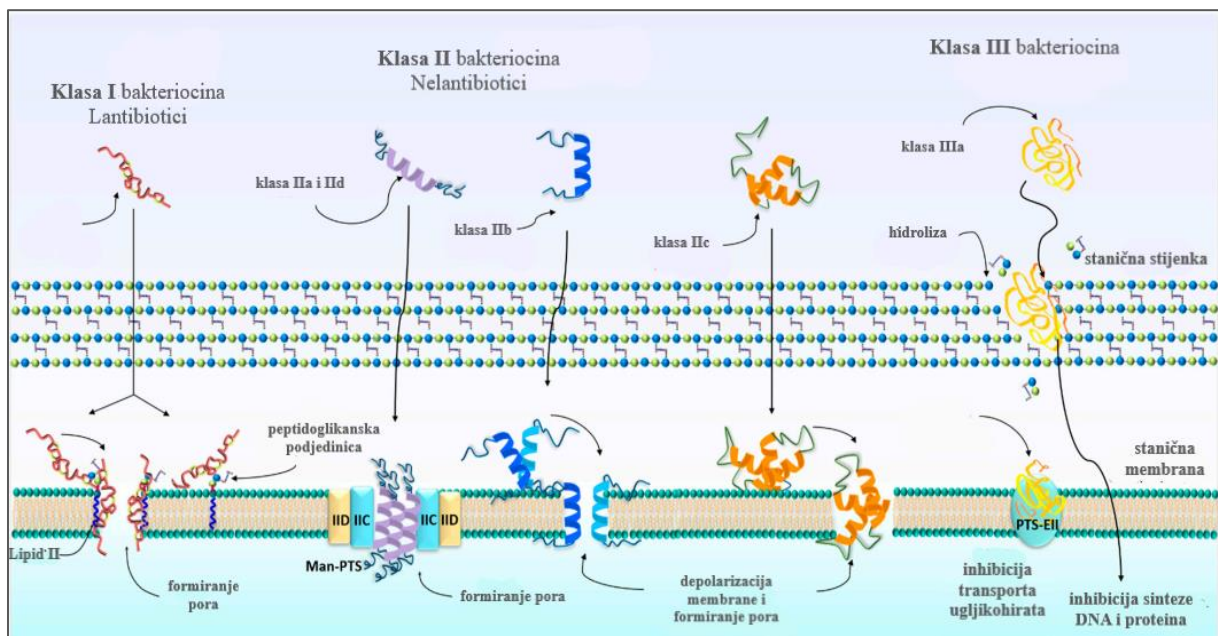
terminalnom kraju, dok se skupina IId sastoji od heterogene skupine pojedinačnih linearnih bakteriocina koji nisu slični pediocinima (Alvarez-Sieiro i sur., 2016; Zacharof i Lovitt, 2012).

Klasu III čine veliki (>30 kDa), termolabilni antimikrobni proteini koji mogu biti litički (zoocin A, enterolizin A) i ne litički (helveticus J). Ova skupina nije opsežno istražena u odnosu na druge grupe. (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

2.3.2. Mehanizmi djelovanja bakteriocina

Opći mehanizam inhibicijske aktivnosti bakteriocina uključuje prepoznavanje molekule receptora, koja može biti nespecifična ili specifična za ciljnu stanicu, što omogućuje bakteriocinu formiranje pora i narušavanje integriteta stanične membrane (Kon i Rai, 2016).

Utvrđeno je da bakteriocini imaju raznolike načine djelovanja koji se razlikuju od mehanizama djelovanja antibiotika (slika 3). Mnogi bakteriocini pokazuju visoko specifičnu aktivnost protiv klinički važnih sojeva, uključujući one rezistentne na antibiotike. Osim toga, pokazuju različite načine djelovanja u odnosu na trenutno dostupne kemoterapijske proizvode te zbog njihove peptidne prirode može se poboljšati djelotvornost metodama proteinskog inženjerstva (Cotter i sur., 2013).



Slika 3. Prikaz mehanizama djelovanja različitih klasa bakteriocina (prema Hernández-González i sur., 2021)

Klasa I koju čine lantibiotici, poput nisina, posjeduju dvostruki način djelovanja. Mogu se vezati na hidrofobni nosač monomera peptidoglikana, poznat kao lipid II, te inhibirati pravilnu sintezu stanične stijenke bakterija. Važno je napomenuti da se nisin i neki lantibiotici vežu na lipid II na različitom mjestu u odnosu na određene antibiotike, poput vankomicina, i tako zadržavaju aktivnost protiv rezistentnih patogena. Također, mogu koristiti lipid II kao molekulu koja omogućuje prijanjanje i pokretanje procesa umetanja u membrane i formiranja pora koje povećavaju permeabilnost membrane i dovode do stanične smrti (Hernández-González i sur., 2021; Cotter i sur., 2013).

Tipični nelantibiotici klase II imaju amfifilnu heličnu strukturu, koja im omogućuje umetanje u membranu ciljne stanice, što dovodi do depolarizacije i smrti stanice. Bakteriocini klase IIa i IIb vežu se na MptC i MptD podjedinice ugljikohidratnog transportera manosa fosfotransferaze permeaze (Man-PTS). Umetanje u membranu osjetljive stanice dovodi do stvaranja pora, difuzije iona i izlivanja staničnih komponenti, uzrokujući smrt stanice (Hernández-González i sur., 2021; Cotter i sur., 2013).

Istraženi dvopeptidni bakteriocini klase IIb (poput laktokocina G, plantaricina EF, plantaricina JK, termofilina 13) tvore heličnu strukturu koja stupa u interakciju s membranskim receptorom osjetljivih bakterija uzrokujući lizu stanice. Ovi bakteriocini pokazuju specifičnost s obzirom na propusnost iona preko relativno sofisticiranih pora. Na primjer, laktokocin G permeabilizira membrane ciljnih stanica za niz monovalentnih kationa poput Na⁺, K⁺, Li⁺, Cs⁺ i Rb⁺, ali ne i za H⁺ ione, dok plantaricini EF i JK ometaju transport i vodikovih kationa (Alvarez-Sieiro i sur., 2016; Nissen-Meyer i sur., 2010).

Mehanizam djelovanja litičkih pripadnika klase III uključuje raspad bakterijskih stanica kao posljedica kataliziranja hidrolize stanične stijenke. Dok se bakteriocini klase I i II vežu na membranske receptore, bakteriocini poput lizostafina izravno djeluju na staničnu stijenku gram-pozitivnih bakterija (Alvarez-Sieiro i sur., 2016; Cotter i sur., 2005). Nelitički pripadnici klase III djeluju bez liziranja bakterijske stanice, poput disgalakticina iz *S.pyogenes* koji se veže na glukozu i/ili Man-PTS, što rezultira inhibicijom unosa ugljikohidrata i staničnom smrti. (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

2.3.3. Plantaricini

Bakterija mliječne kiseline *Lactiplantibacillus plantarum* može se pronaći u raznolikim mikrokolišima koji su bogati hranjivim tvarima. Također se nalazi u sluznicama probavnog trakta i pokazuje pozitivne učinke na zdravlje domaćina. *L.plantarum* sojevi proizvode različite

spojeve poput organskih kiselina, masnih kiselina, amonijaka, vodikovog peroksida, diacetila i bakteriocina kako bi osigurali optimalne uvjete rasta i suzbili rast konkurentnih mikroorganizama (Azizi i sur., 2017; Diep i sur., 2009).

Bakteriocini koje proizvodi *L.plantarum* nazvani su plantaricini te se najčešće svrstavaju u klasu II ovih antimikrobnih peptida. Mnogi od karakteriziranih plantaricina pripadaju klasi IIb bakteriocina, poznati kao dvopeptidni bakteriocini, za čije optimalno djelovanje je potrebna prisutnost oba peptida. Primjeri ovih dvopeptidnih plantaricina uključuju plantaricin J51, plantaricin JK i plantaricin EF. Ostali plantaricini sastoje se od jednog peptida te pripadaju klasi I bakteriocina (lantibiotici) kao plantaricin C ili klasi IIa (bakteriocini slični pediocinu) poput bakteriocina BM-1 i plantaricina ST8SH (Seddik i sur., 2017). Istraživanja pokazuju da *L.plantarum* sojevi i njihove plantaricinske supstancije imaju značajnu ulogu u mnogim područjima poput prehrambene industrije kao biokonzervansi i starter kulture u mliječnim, mesnim i ribljim proizvodima, kao i u terapiji bolesti uzrokovanih patogenim bakterijama. Osim toga, plantaricini imaju potencijalno korisnu medicinsku primjenu u redukciji kolesterola, ublažavanju simptoma sindroma iritabilnog crijeva (IBS) i zaštiti od infekcija mokraćnog sustava (Kareem i Razavi, 2020; Seddik i sur., 2017).

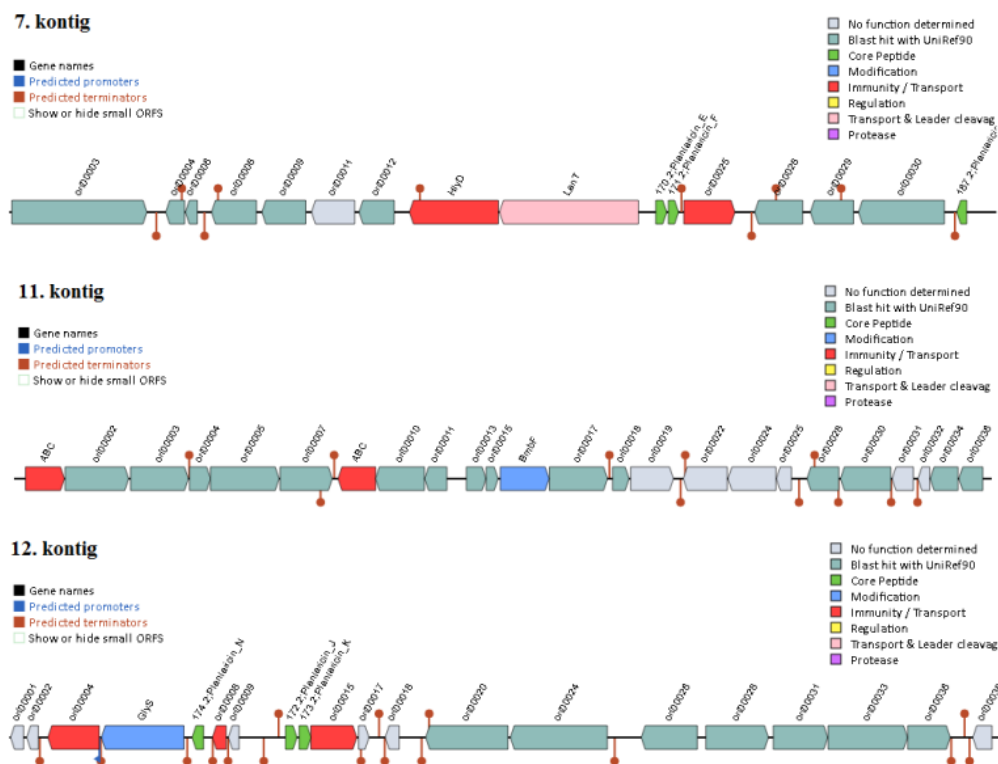
Stoga su intenzivna istraživanja antagonističkih *L.plantarum* sojeva koji sintetiziraju plantaricine s ciljem primjene u osiguravanju sigurnosti i poboljšanju kvalitete hrane. Antimikrobna sredstva ispituju se zbog njihove baktericidne učinkovitosti protiv patogena kao što su *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*. Potencijalna primjena bi produžila rok trajanja hrane i smanjila i/ili zamijenila uporabu kemijskih aditiva, što odgovara zahtjevima potrošača (Čanak i sur., 2018; Azizi i sur., 2017).

Geni za biosintezu bakteriocina obično su organizirani u operonske klustere koji se mogu nalaziti na bakterijskom kromosomu, plazmidu ili mobilnim genetičkim elementima. Biosinteza plantaricina klase II uvjetovana je nakupinom četiri gena, uključujući strukturni gen za antimikrobni peptid, gen za imunost soja producenta, kao i gene za transportne i pomoćne proteine. Utvrđeno je da *L. plantarum* proizvodi najmanje šest različitih bakteriocina (Antoshina i sur., 2022). *L.plantarum* C11 je jedan od prvih opisanih sojeva producenta bakteriocina kod kojeg su detaljno istraženi genetičko-molekularni mehanizmi odgovorni za regulaciju gena i biosintezu plantaricina. Mnogi sojevi, *L.plantarum* WCFS1, NC8, J51, V90, J23 i I-UL4, sadrže sličan bakteriocin-producirajući lokus u svom genomu. Okarakterizirano je 5 različitih *pln* lokusa iz različitih *L.plantarum* sojeva. Svaki lokus je duljine 18-19 kb i sastoji se od 22-25 gena organiziranih u 5-6 operona. Lokus *pln* genoma soja *L.plantarum* C11 sadrži

pet inducirajućih operona: *plnEFI* i *plnJKLR* kodiraju dva dvopeptidna plantaricina (EF i JK) i njihove srodne proteine za imunost soja producenta na plantaricinsko djelovanje, *plnMNOP* kodira četiri pretpostavljena proteina uključujući prekursor plantaricina N, *plnGHSTUVW* operon sadrži gene odgovorne za procesiranje i ekstracelularni transport bakteriocina i drugih proteina i konačno, *plnABCD* regulatorni operon koji igra važnu ulogu u regulaciji ekspresije svih gena *pln* lokusa. Operoni *plnEFI* i *plnGHSTUVW* predstavljaju konzervirani dio uobičajen u svim lokusima, dok regulatorni i drugi operoni su manje očuvani među sojevima (Belguesmia i sur., 2011; Diep i sur., 2009).

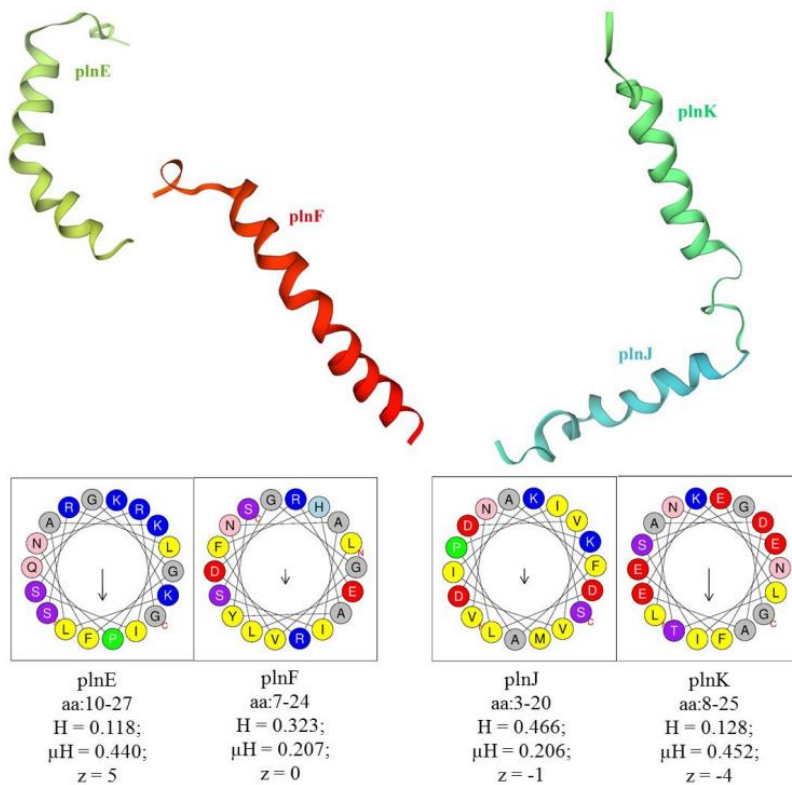
Indukcija *pln* regulona, odgovornog za sintezu plantaricina, odvija se putem tzv. *quorum-sensing* mehanizma. Ovaj mehanizam podrazumijeva regulaciju ekspresije gena ovisnu o gustoći bakterijskih stanica. Najčešće su uključeni dvo- ili trokomponentni regulatorni sustavi koji zahtijevaju prisutnost dodatnih gena: gen koji kodira induksijski faktor, koji može biti poseban peptid ili sam bakteriocin, kao i senzorski gen za histidin protein kinazu (HPK) i gen regulatora odgovora za DNA-vezujući protein koji aktivira ekspresiju gena bakteriocina i gena drugih proteina uključenih u njegovu biosintezu (Antoshina i sur., 2022). Komunikacija između stanica često se odvija putem izlučenih inducirajućih peptidnih feromona. Inducirajući peptid prvotno se ribosomski sintetizira u niskim koncentracijama kao prepeptid koji sadrži N-terminalnu signalnu sekvencu. Nakon što se prepeptid izluči iz stanice pomoću ABC transportera, N-terminalna sekvencu se odstranjuje. Koncentracija inducirajućeg peptida povećava se ovisno porastu gustoće bakterijske kulture i ukoliko se dostigne granična koncentracija aktivira se trokomponentni sustav. Dolazi do autofosforilacije transmembranske histidin kinaze (HPK) te se prenosi fosfatna skupina na odgovarajući regulatorni protein. Fosforilirani regulatorni protein je aktiviran i djeluje kao transkripcijski aktivator koji se veže na promotore i pokreće ekspresiju klastera biosintetskih gena bakteriocina (Antoshina i sur., 2022; Belguesmia i sur., 2011).

Ukoliko *L.plantarum* sojevi posjeduju gene koji kodiraju za nekoliko različitih bakteriocina, u procesu sinteze mogu se koristiti zajednički transportni i regulatorni sustavi. Jedan primjer je kombinirani sustav za biosintezu sinergističkih dvokomponentnih bakteriocina EF i JK (klasa Iib), koje proizvodi soj *L. plantarum* C11. U ovom slučaju regulatorni operon *plnABCD* kodira za inducirajući peptid plantaricin A (klasa IId) koji djeluje kao induksijski signal za proizvodnju bakteriocina. Kada se dosegne granična koncentracija plantaricina A, aktivira se autoindukcijski ciklus koji rezultira produkcijom plantaricina EF i JK (Antoshina i sur., 2022; Diep i sur., 2009).



Slika 4. Prikaz genskih klastera odgovornih za biosintezu plantaricina soja *L. plantarum* D13 (Butorac, 2022)

Prema Butorac i sur. (2022) analizom genoma soja *L. plantarum* D13 i preostalnih *L. plantarum* sojeva, bioinformatičkom obradom ustanovljena su tri područja od interesa koja se nalaze na kontizima 7., 11. i 12. koji odgovaraju genskim klasterima plantaricina soja D13. Otkriveni su geni koji kodiraju za plantaricine A, EF, JK, N i dodatni geni potrebni za biosintezu i transport plantaricina te otpornost soja producenta. Predviđena struktura plantaricina soja *L. plantarum* D13 pokazuje homologiju sa peptidima PlnJK i PlnEF prethodno opisanog soja *L. plantarum* C11. Slika 4 prikazuje genske klasterne u prokariotskoj DNA uključene u biosintezu plantaricina soja *L. plantarum* D13, dok je na slici 5 prikazana trodimenzionalna struktura i sastav α -uzvojnica PlnJK i PlnEF plantaricina.



Slika 5. Predviđena trodimenzionalna struktura plantaricina PlnJK i PlnEF soja *Lactiplantibacillus plantarum* D13 te prikaz svojstava α -uzvojnice (Butorac, 2022)

2.3.4. Potencijalne primjene bakteriocina

Bakteriocini pokazuju vrlo širok raspon potencijalnih primjena u raznim biotehnološkim poljima, s konačnim ciljem poboljšanja zdravlja ljudi i životinja. Ovi antimikrobni peptidi su se prvo pojavili u području prehrambene industrije kao sigurni i prirodni biokonzervansi, dok se danas intenzivno istražuje njihova primjena u raznim zdravstvenim proizvodima, kao posljedica rastuće antimikrobne rezistencije na konvencionalne antibiotike. Dodatno, brz razvoj naprednih istraživačkih alata, posebice u području genomike i nanotehnologije, olakšava otkrivanje različitih bioaktivnosti pojedinih bakteriocina te sintezu novih ili modificiranih bakteriocina, sa specifičnim primjenama u borbi protiv patogenih mikroorganizama (Daba i sur., 2022; Chikindas i sur., 2018).

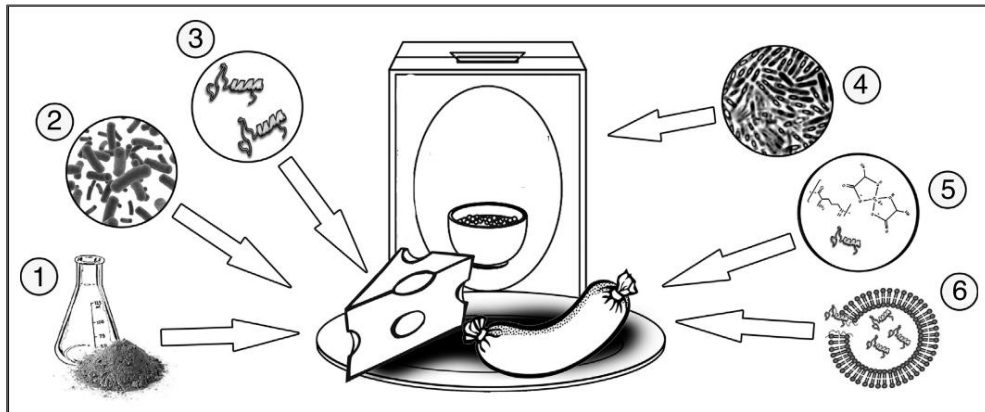
Kao prirodni antimikrobni agensi, bakteriocini predstavljaju adekvatnu zamjenu za kemijske konzervanse u prehrambenoj industriji, u skladu sa sve većim potrošačkim potrebama za zdravijim alternativama i sigurnom hranom spremnom za konzumaciju uz minimalnu obradu. Bakteriocini se lako razgrađuju proteolitičkim enzimima gastrointestinalnog trakta

sisavaca zbog čega su sigurni za ljudsku uporabu. Budući da ne posjeduju boju, miris niti okus, mogu se lako inkorporirati u prehrambene proizvode bez utjecaja na organoleptička svojstva (Chikindas i sur., 2018; Zacharof i Lovitt, 2012). Bakteriocini su učinkoviti u produljenju trajnosti hrane, pružajući dodatnu zaštitu tijekom neoptimalnih temperatura skladištenja i na drugim kritičnim kontrolnim točkama. Također, smanjuju rizik prijenosa patogena koji se prenose hranom kroz prehrambeni lanac, što može rezultirati manjim zarazama i ekonomskim gubitcima zbog kvarenja hrane i povlačenja proizvoda s tržišta. Primjena bakteriocina omogućuje uporabu manje rigoroznih postupaka obrade hrane bez ugrožavanja sigurnosti hrane, što dovodi do boljeg očuvanja hranjivih tvari, vitamina i svojstava hrane koji utječu na njen okus, miris i izgled (Soltani i sur., 2021).

U prehrambenim proizvodima mogu se primijeniti u (polu)pročišćenom obliku ili kao bioaktivni praškovi, koji najčešće sadrže mješavinu antimikrobnih sastojaka (bakteriocini, organske kiseline itd.). Razlikuju se tri različite metode primjene: (1) izravna inokulacija hrane određenim sojevima BMK, koje zatim proizvode bakteriocine; (2) dodavanje u hranu pročišćenih ili polupročišćenih bakteriocina kao sredstvo za konzerviranje; i (3) korištenje prethodno fermentiranog proizvoda koji sadrži bakteriocin kao sastojak prerađene hrane (Kon i Rai, 2016). Uz prethodno navedenu uporabu nisina i pediocina PA-1 kao biokonzervansa, na tržištu se mogu pronaći bioaktivni bakteriocinski praškovi koji su učinkoviti protiv kvasaca, plijesni te gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Soltani i sur., 2021).

Bakteriocini se također mogu koristiti kao aktivni sastojci u filmovima za pakiranje hrane kako bi se spriječilo kvarenje ili rast patogenih mikroorganizama tijekom skladištenja prehrambenih proizvoda. Primjena ove tehnologije pakiranja može značajno produžiti rok trajanja hrane i poboljšati njenu sigurnost. Bioaktivno pakiranje može se pripremiti izravnim imobiliziranjem bakteriocina na pakiranje hrane. Alternativno, može se dodati vrećica koja sadrži bakteriocin u zapakiranu hranu, koja će otpuštati antimikrobni peptid tijekom skladištenja prehrambenog proizvoda. Metoda oslobađanja bakteriocina iz folije za pakiranje na površinu hrane ima prednost pred uranjanjem i prskanjem hrane bakteriocinima jer se antimikrobna aktivnost može izgubiti ili smanjiti ukoliko dođe u kontakt s drugim komponentama hrane ili ako se razrijedi ispod aktivne koncentracije zbog migracije u proizvod. Bakteriocini se mogu ugraditi izravno u filmove od biorazgradivih proteina poput zrna kukuruza ili soje. Osim toga, bakteriocin se može adsorbirati na površine polimera ili koristiti za obnavljanje površinskog polimera. Primjeri su uporaba nisin metilceluloznog premaza za polietilenske filmove prilikom skladištenja mesa peradi ili adsorpcija nisina na polietilen, etilen,

vinil acetat, polipropilen, poliamid, poliester akril i polivinil klorid. Dokazano je da kombinacija temperature blizu točke smrzavanja uz bioaktivna bakteriocinska pakiranja je vrlo učinkovita za održavanje visoke mikrobiološke kvalitete mesa, inhibirajući patogene poput *B. thermosphacta*, *L. monocytogenes*, *S.aureus* i *B. cereus* (Zacharof i Lovitt, 2012; Kon i Rai, 2016).



Slika 6. Bakteriocini: od jednostavne uporabe do sofisticirane ciljane primjene. 1) mlijeko ili drugi fermentirani proizvod je obogaćen bioaktivnim praškom; 2) zaštićena mikroba kultura proizvodi bakteriocin; 3) (polu)pročišćeni bakteriocin kao konzervans; 4) modificirana aktivna probiotička kultura proizvodi bakteriocine; 5) bakteriocini sinergistički djeluju uz druge antimikrobne tvari prirodnog porijekla; 6) implementacija sustava kontrolirane isporuke za poboljšanu stabilnost i ciljanu učinkovitost bakteriocina (*prema* Chikindas i sur., 2018)

Intenzivno se istražuje doprinos bakteriocina koje proizvode BMK u modulaciji crijevne populacije, inhibiciji patogena i njihovoj ulozi u održavanju zdravlja domaćina. Jedna nova potencijalna uloga bakteriocina usmjerena je na funkcionalnu hranu gdje će se BMK producenti bakteriocina konzumirati ili s obogaćenom hranom ili kao formulacija dodatka prehrani, pri čemu bi se mogle inducirati željene pozitivne promjene intestinalne mikrobiote (slika 6). Primjer je bakteriocin-producirajući soj *Lactobacillus salivarius* UCC118 koji je uzrokovao povoljnu promjenu crijevne mikrobiote pretilih miševa u odnosu na kontrolnu skupinu te spriječio infekciju *L.monocytogenes* (Chikindas i sur., 2018; Soltani i sur., 2021). Također, porast rezistencije životinjskih patogena na lijekove i njezin potencijalni prijenos sa stoke na ljude doveo je do porasta broja istraživanja producenata bakteriocina, sa svrhom uključivanja u stočnu hranu za promicanje rasta i smanjenje infekcija uz poboljšanje zdravlja životinja i ljudi. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja farmakodinamičkog ponašanja, apsorpcije, distribucije i metabolizma ovih bioloških molekula. Uključivanje ovakvih probiotičkih pripravka u hranu za životinje i ljude izazov je koji se rješava otkrivanjem i razvojem novih

sojeva producenata bakteriocina i prikladnih tehnika za zaštitu i isporuku ovih molekula (Soltani i sur., 2021).

Razvoj multirezistentnih bakterija rezultirao je intenzivnom potragom za alternativnim lijekovima protiv uzročnika bolesti. Bakteriocini pokazuju značajne karakteristike za primjenu u medicini, uključujući visoku aktivnost u nanomolarnom rasponu, specifične i raznolike mehanizme djelovanja i visoku specifičnu aktivnost prema mnogim patogenim mikroorganizmima. Bakteriocini su se pokazali učinkovitima protiv uzročnika potencijalno vrlo opasnih sistemskih infekcija kao što su *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Također, različiti bakteriocini pokazuju inhibitorne učinke protiv patogena odgovornih za bolničke infekcije, kao što je *Staphylococcus aureus* otporan na meticilin (MRSA), vankomicin-rezistentne *Enterococcus* vrste, *Clostridium difficile* i mnoge gram-negativne patogene bakterije, kao što su *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria* sp. i *Haemophilus influenza*. Pročišćeni i mikrobiološki okarakterizirani bakteriocini, poput mutacina 1140 i salivaricina D, pokazali su visoku inhibitornu aktivnost protiv sojeva odgovornih za respiratorne infekcije uzročnika *S.pneumoniae* (Soltani i sur., 2021). Nekoliko istraživanja potvrđuju učinkovitost bakteriocina protiv gastrointestinalnih infekcija. Bakteriocin kojeg proizvodi izolat fecesa *P. acidilactici* BA28 je obećavajući tretman za želučani ulkus i neke spolno prenosive bolesti, kada se konzumira u kombinaciji s antibiotskom terapijom. Mnogi bakteriocini su se pokazali učinkovitima u eliminaciji patogenih bakterija usne šupljine te se mogu primijeniti kao aktivni sastojci u proizvodima za oralnu njegu, poput macedocina, polilizina i nisina te salivaricina. Također, utvrđena je antikancerogena aktivnost bakteriocina selektivnim djelovanjem na tumorske stanice. Citotoksičnost ovih antimikrobnih peptida protiv stanica raka je posljedica inhibicije sinteze DNA i membranskih proteina, što dovodi do indukcije apoptoze i/ili depolarizacije stanične membrane (Daba i sur., 2022). Utvrđeno je da nisin, fermenticin i lakticin 3147 posjeduju spermicidna svojstva jer uzrokuju smanjenje ili izmjenu pokretljivosti humanih spermija, što ukazuje na njihov potencijal kao kontraceptivnih sredstava. Pojedini bakteriocini pokazuju obećavajuću ulogu u liječenju vulvovaginitisa, kožnih infekcija te mastitisa kod dojilja (Soltani i sur., 2021; Daba i sur., 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korišteni su sojevi BMK *Lactiplantibacillus plantarum* izolirani iz različitih mikrookoliša 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 izolirani iz prirodnih izvora korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Izvor
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	SF15C	Kiseli kupus
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	D13	Dimljeni svježi sir
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	M92C	Fermentirano mlijeko
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	L4	Silaža
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	ZG1C	Svježi sir
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	M5	Sušeni svježi sir
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC®19111™	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	/

3.1.2. Hranjive podloge

U ovom radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

- a) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj sojeva *L.plantarum*
- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvasčev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- b) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj sojeva *L. monocytogenes* i *S. aureus*
- BHI (*engl. brain heart infusion*) agar sastava (g/L destilirane vode) (Biolab, Mađarska): 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 tekuća podloga je istog sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara

3.1.3. Kemikalije

- etanol 96%, „Kemika“, Hrvatska
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „CarloErba“, Italija
- EDTA, „Sigma-Aldrich“, SAD
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- početnice, „Invitrogen“, SAD
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Njemačka
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- EmeraldAmp, Max HS PCR MasterMix (2x Premix), „Takara“, Japan
- GoTaq G2 Hot Start polimeraza, „Promega“, SAD
- The Quick-Load Purple 1 kb DNA Ladder standard, „New England BioLabs“, SAD
- Nuclease-Free Water, „Takara“, Japan
- proteinaza K, „Invitrogen“, SAD
- pankreatin, „AppliChem“, Njemačka
- pepsin, „AppliChem“, Njemačka
- žučne soli, „Torlak“, Beograd
- natrijev hidroksid „Kemika“, Hrvatska
- fenolftalein, „Kemika“, Hrvatska
- kristal violet, „Merck“, Njemačka
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska

3.1.4. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec”, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec Nano spektrofotometar, „Shimatzu“, Japan
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan”, Švicarska
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAdel
- elektroforetska kadica, „Bio-Rad“, SAD
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- filter za špricu Qpore PES 0,22 nm „NeoLab“, Njemačka
- mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, Engleska
- mikrobiološka ušica, „Syntesys“, Italija
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH metar, „Metrohm”, Švicarska
- pinceta, „Isolab“, Njemačka
- stalci za Eppendorf kivete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- stolni homogenizator Vortex V-1 plus, „BioSan”, Latvija
- transiluminator, „UVITEC“, UK
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vodena kupelj, „Inkolab”, Hrvatska
- zamrzivač (-80°C), „Eppendorf”, Njemačka
- parafilm, „BemisTM“, SAD
- injekcijske šprice
- igle za injekcijsku špricu

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline *Lactiplantibacillus plantarum* čuvani su pri -80°C u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Test-mikroorganizmi *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S.aureus* 3048 čuvani su pri -80°C u hranjivom bujonu s 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u odgovarajuću svježu hranjivu podlogu i inkubiraju pri optimalnim uvjetima rasta, *Lactiplantibacillus* sojevi anaerobno pri 37°C , *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S.aureus* 3048 aerobno pri 37°C .

3.2.2. Određivanje utjecaja visoke temperature i proteolitičkih enzima na

plantaricinsku aktivnost sojeva producenata metodom difuzije s rupama u agaru

(*engl. agar well-diffusion method*)

Nakon što su sojevi *L. plantarum* inkubirani preko noći, 10 mL suspenzije centrifugira se na 4200 o/min tijekom 5 minuta. Zatim se supernatant profiltrira kroz filter veličine pora $0,22\ \mu\text{m}$, a potom se razdijeli u 6 različitih Eppendorf kiveta. Svaki uzorak supernatanta podvrgnut je različitim tretmanima, uključujući tretman s proteinazom K koncentracije 1 mg/mL tijekom 2 h pri 37°C , zagrijavanje do 100°C tijekom 30 minuta te tretman s pepsinom i pankreatinom koncentracije 1 mg/mL. Jedan uzorak supernatanta ostao je netretiran kao kontrola. Zatim se po 100 μL pojedinog patogena nacijepi u 12 mL BHI agara, koji je prethodno otopljen i temperiran u vodenoj kupelji pri 55°C , te izlije u Petrijevu zdjelicu. Nakon što su se hranjive podloge skrutnule, izbuše se rupe u agaru sterilnim bušačem promjera 8 mm te se sterilnom mikrobiološkom ušicom uklone agarni diskovi. Zatim se u svaku rupu dodaje po 50 μL pripremljenih supernatanta različitih *L.plantarum* uzoraka. Petrijeve zdjelice se najprije stave u hladnjak na 4°C tijekom 2 h kako bi se omogućila difuzija različitih uzoraka u podlogu prije početka rasta patogenih kultura. Slijedi inkubacija tijekom 24 h u aerobnim uvjetima pri 37°C te mjerenje promjera zona inhibicije. Promjeri zona inhibicije tretiranih supernatanta pojedinih BMK sojeva se uspoređuju s promjerom zone inhibicije netretiranih supernatanta.

3.2.3. Analiza formiranja biofilma djelovanjem supernatanta kulture *L.plantarum*

sojeva

Najprije se određuje broj živih bakterijskih stanica koje će potencijalno formirati biofilm indirektnom metodom. Nakon prekonoćnog uzgoja *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i

S.aureus 3048 patogenih sojeva, nacijepi se po 10 μ L pripremljenih decimalnih razrjeđenja suspenzija sojeva na BHI agar u dvije paralele. Petrijeve zdjelice se inkubiraju pri 37 °C tijekom 24 h, nakon čega se izbroje porasle kolonije (*engl. colony-forming units*, CFU) i izračuna broj živih stanica po mililitru uzorka. Potom se mikrotitarska ploča inokulira s 100 μ L prekonocnih kultura patogenih sojeva. Izdvoji se 5 mL prekonocnih kultura različitih *L.plantarum* sojeva i centrifugira 5 min pri 4200 o/min. Supernatanti se profiltriraju kroz filter veličine pora 0,22 μ m. Zatim se 100 μ L profiltriranog supernatanta svakog BMK soja dodaje na mikrotitarsku ploču i inkubira se 24 h u aerobnim uvjetima pri 37 °C, zajedno sa prethodno dodanim suspenzijama prekonocnih kultura patogena. Na mikrotitarskoj ploči nalaze se i uzorci slijepe probe koji sadrže samo medij uzgoja i uzorci test-mikroorganizama gdje nije dodan supernatant *L.plantarum* sojeva, kako bi se izmjerilo formiranje biofilma samih patogenih sojeva. Nakon inkubacije, uklanja se medij iz jažica te se tri put ispiru s 100 μ L PBS-a. Dodaje se 100 μ L kristal violeta i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se uklanja i jažice se ispiru pet puta sterilnom destiliranom vodom. Zatim se u jažice dodaje 200 μ L 96%-tnog etanola i inkubira se na sobnoj temperaturi 10 minuta. Prenese se 100 μ L obojenog etanola na novu mikrotitarsku ploču i izmjeri se OD pri 540 nm za svaku jažicu. Izmjerene srednje vrijednosti OD₅₄₀ ispitivanih uzoraka se uspoređuju sa srednjim vrijednostima OD₅₄₀ negativnih kontrola, uzoraka patogena gdje nisu dodani supernatanti *L.plantarum* sojeva, i određuje se značajnost formiranja biofilma prema tablici 2. Ispitivanje inhibicije tvorbe biofilma djelovanjem supernatanta *L.plantarum* ispitano je prema Esteban i sur. (2010), uz određene modifikacije.

Tablica 2. Klasifikacija formiranja biofilмова (prema Stepanović i sur., 2007)

Usporedba OD ₅₄₀ (uzorka) i OD ₅₄₀ (negativne kontrole)	Oznaka	Klasifikacija formiranja biofilma
$OD_{UZ} - OD_{NK} > 0$	+	slabo
$OD_{UZ} - OD_{NK} > OD_{NK}$	++	umjereno
$OD_{UZ} - OD_{NK} > 2 \times OD_{NK}$	+++	izraženo
$OD_{UZ} - OD_{NK} > 3 \times OD_{NK}$	++++	vrlo izraženo

3.2.4. Izolacija genomske DNA *L.plantarum* sojeva

Ekstrakcija genomske DNA iz bakterijskih sojeva provodi se pomoću Promega Genomic Wizard kita za izolaciju DNA. Po 5 mL prekonocne kulture svake bakterije se centrifugira 2 minute na 13000-16000 g. Nakon uklanjanja supernatanta, talog stanica se

resuspendira u 480 μ L 50 mM EDTA i 120 μ L otopine lizozima (10 mg/mL) te se inkubira u vodenoj kupelji na 37 °C 30-60 min. Nakon inkubacije, uzorak se centrifugira te se dobiveni talog stanica resuspendira u otopini za liziranje jezgre koja je dio korištenog kita i inkubira u vodenoj kupelji na 80 °C 5 min. Nakon što se stanični lizat ohladi na sobnu temperaturu, doda mu se 3 μ L otopine RNAze te se inkubira na 37 °C 15-60 min. Nakon ponovnog hlađenja na sobnoj temperaturi, uzorku se doda 200 μ L otopine za taloženje proteina te se vorteksira 20 sekundi, inkubira 5 minuta na ledu i centrifugira na 13000-16000 g 3 minute. Supernatant koji sadrži DNA se prebaci u čistu mikroeprevetu u koju je prethodno dodano 600 μ L izopropanola sobne temperature te se izmiješa okretanjem mikroeprevete dok niti DNA ne formiraju vidljivu masu. Nakon toga slijedi centrifugiranje, uklanjanje supernatanta i sušenje epice na čistom apsorberajućem papiru. Talog DNA se zatim ispiri sa 600 μ L 70 % etanola. Nakon sušenja uzorka 10-15 minuta na zraku, talogu se doda 100 μ L otopine za rehidraciju DNA koja je dio kita za izolaciju te se talog rehidrira jednosatnom inkubacijom na 65 °C u vodenoj kupelji. Tako dobivena DNA se može pohraniti na 2-8 °C.

3.2.5. Mjerenje koncentracije izolirane DNA

Izmjerena je koncentracija izolirane genomske DNA *L.plantarum* sojeva iz 2 μ L uzorka pomoću uređaja BioSpec-Nano, pri valnoj duljini 0,7 nm. Za slijepu probu korištena je otopina za rehidraciju DNA koja je sastavni dio Promega Genomic Wizard kita za izolaciju DNA.

3.2.6. Detekcija gena koji kodiraju za plantaricine PCR (*engl. polymerase chain reaction*) metodom

Za umnožavanje gena koji kodiraju za ciljane plantaricine PCR metodom odabrane su oligonukleotidne početnice prikazane u Tablici 3. Reakcijska smjesa sadrži 1x GoTaq Flexi pufera bez $MgCl_2$, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP-a, 1 μ M početnica, 0.025 U/ μ L U Taq polimeraze, vodu i 10 ng/ μ L DNA uzorka te su PCR reakcije provedene pri uvjetima opisanim u literaturi navedenoj u tablici 3 uz pojedine početnice. Negativna kontrola se sastojala od uzorka koji nisu sadržavali bakterijsku DNA, kako bi se provjerilo da dobiveni DNA fragment nakon provedene PCR reakcije nije posljedica dimerizacije dviju početnica. Dobiveni PCR produkti razdvojeni su elektroforezom na agaroznom gelu (1 %) pri 200 V. Kao standard korišten je The Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs, SAD). Nakon završetka DNA elektroforeze, gel se inkubira 30 minuta u otopini etidijevog bromida koncentracije 0,5 μ g/mL. Potom se dobivene vrpce vizualiziraju na transiluminatoru (UVITEC, UK).

Tablica 3. Početnice korištene u PCR reakcijama za umnožavanje i detekciju gena koji kodiraju za ciljane bakteriocine

Ciljani gen	Bakteriocin	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Očekivana veličina PCR produkta	Literatura
<i>plnA</i>	Plantaricin A	GTACAGTACTAAT GGGAG	CTTACGCCAATCT ATACG	450 bp	Ben Omar i sur. (2008)
<i>plnEF</i>	Plantaricin EF	GGCATAGTTAAAA TTCCCCC	CAGGTTGCCGCA AAAAAAG	428 bp	Ben Omar i sur. (2008)
<i>plnJ</i>	Plantaricin J	TAACGACGGATTG CTCTG	AATCAAGGAATTA TCACATTAGTC	475 bp	Ben Omar i sur. (2008)
<i>plnNC8</i>	Plantaricin NC8	GGTCTGCGTATAA GCATCGC	AAATTGAACATAT GGGTGCTTTAAAT TC	207 bp	Maldonado i sur. (2004)
<i>plnS</i>	Plantaricin S	GCCTTACCAGCGT AATGCC	CTGGTGATGCAAT CGTTAGTTT	320 bp	Ben Omar i sur. (2008)
<i>plnW</i>	Plantaricin W	TCACACGAAATAT TCCA	GGCAAGCGTAAG AAATAAATGAG	165 bp	Holo i sur. (2001)

3.2.7. Ispitivanje staničnog rasta, acidifikacije i antimikrobne aktivnosti tijekom kultivacije *L.plantarum* sojeva

Proveden je uzgoj preko noći odabranih *L.plantarum* sojeva, nakon čega se inokulira 150 mL MRS bujona s 1% suspenzije prekonocne kulture. Nastavlja se uzgoj inokuliranih sojeva u MRS tekućoj podlozi pri 37 °C. Sakupljaju se uzorci nakon 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 i 48 sati te se provode analize za utvrđivanje staničnog rasta i acidifikacije *Lactiplantibacillus* sojeva. Osim toga, prati se i njihova antimikrobna aktivnost prema patogenim sojevima *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048. U svrhu praćenja rasta bakterijskih stanica uzima se 200 µL suspenzije u određenim vremenskim intervalima, prenosi na mikrotitarsku ploču i mjeri se optička gustoća (OD) pri 620 nm. Slijepa proba se sastoji od 200 µL MRS bujona, odnosno hranjivog medija bez bakterijskih stanica. Praćenje acidifikacije uključuje određivanje pH vrijednosti i postotka proizvedene mliječne kiseline. Uzorkuje se 5 mL suspenzije za svaki vremenski interval, centrifugira 10 min pri 4200 o/min te se uzima supernatant kulture za daljnje analize. Pomoću pH metra se određuje pH vrijednost supernatanta kulture. Postotak mliječne kiseline se određuje iz 1 mL uzorka supernatanta kulture koji je razrijeđen s 19 mL destilirane vode. U razrijeđeni uzorak dodaje se fenolftalein kao indikator i

uzorak se titrira s 0,1 M NaOH. Titracija se odvija do pojave svijetlo ružičaste boje te se zabilježi broj mililitara utrošene 0,1 M NaOH, odnosno volumen lužine koji je potreban za neutralizaciju. Kiselost u stupnjevima Soxhlet-Henkela (°SH) dobiva se množenjem broja mililitara 0,1 M NaOH utrošenih za neutralizaciju s faktorom dva prema formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 20 \times f_{\text{NaOH}} \times 2$$

od čega je $a = \text{mL}$ utrošene 0,1 M NaOH, $f_{\text{NaOH}} = \text{faktor molariteta lužine koji iznosi 1}$. Dobiveni stupnjevi kiselosti u °SH preračunaju se dalje u postotak proizvedene mliječne kiseline (%) pomoću sljedećeg izraza:

$$\begin{aligned} \% \text{ mliječne kiseline} &= ^{\circ}\text{SH} \times 0,0225 \\ (1^{\circ}\text{SH} &\sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%)). \end{aligned}$$

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti supernatanta odabranih *L. plantarum* sojeva provedeno je metodom difuzije s rupama u agaru. Uzima se 5 mL suspenzije inokuliranog MRS bujona u određenim vremenskim intervalima. Suspenzija se centrifugira 10 min na 4200 o/m te se dobiveni supernatant kultura profiltrira kroz filter veličine pora 0,22 μm . U međuvremenu se 12 mL BHI agara otopi i temperira u vodenoj kupelji na 55 °C, nakon čega se inokulira s 250 μL prekonoćnih bakterijskih kultura patogenih sojeva i izlije u Petrijeve zdjelice. Nakon skrtnjavanja hranjivih podloga, sterilnim bušačem promjera 8 mm izbuše se rupe u agaru i sterilnom mikrobiološkom ušicom uklone se agarni diskovi. Zatim se u nastale rupe dodaje 50 μL pripremljenog profiltriranog supernatanta BMK sojeva. Petrijeve zdjelice se inkubiraju u aerobnim uvjetima pri 37 °C tijekom 24 h. Potom se za svaki vremenski interval izmjere zone inhibicije svakog patogenog soja, nastale djelovanjem supernatanta pojedinih *L. plantarum* kultura.

3.2.8. Obrada podataka

Rezultati eksperimenata izraženi su kao srednja vrijednost tri paralele za svaki uzorak \pm standardna devijacija. Statistička značajnost je procijenjena jednosmjernom analizom varijance (*engl. one-way analysis of variance, one-way ANOVA*), primjenom Statistics Kingdom računalnog programa (<https://www.statskingdom.com/180Anova1way.html>). Statističke razlike između uzoraka smatraju se značajnim ukoliko je $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

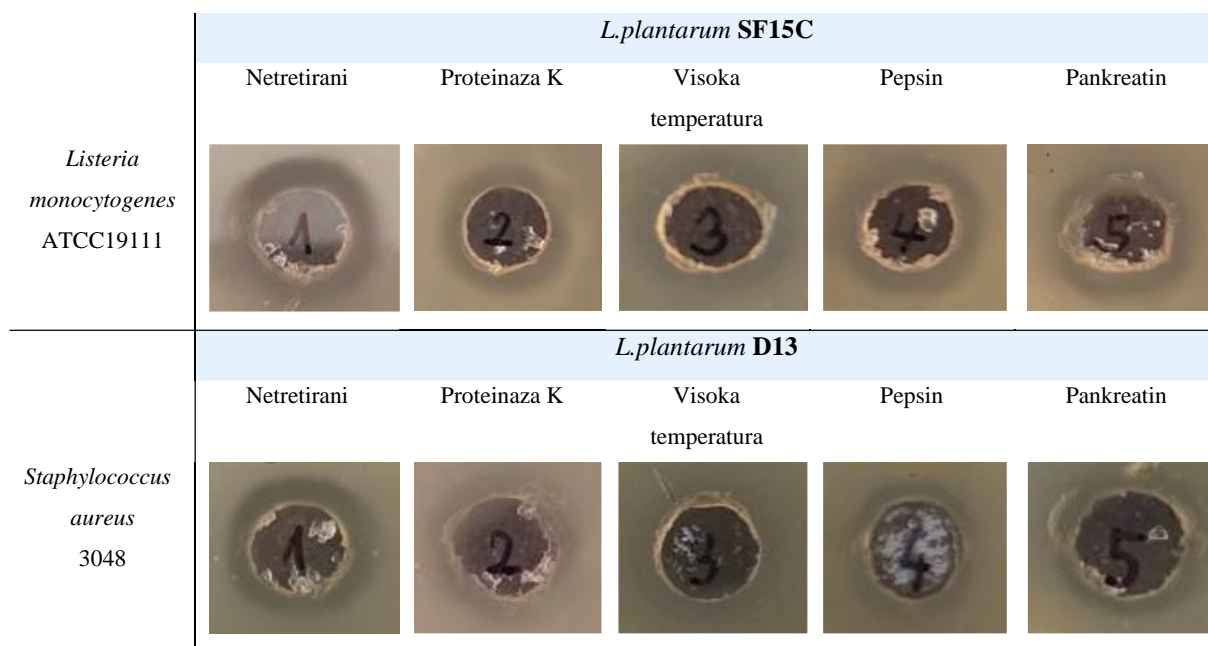
U ovom radu određeno je antimikrobno djelovanje autohtonih *Lactiplantibacillus plantarum* sojeva prema test-mikroorganizmima *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ i *Staphylococcus aureus* 3048. S obzirom da *L.plantarum* sojevi, kao i većina svih BMK, sintetiziraju niz antimikrobnih spojeva, naglasak je na karakterizaciji specifičnih rjeđe prisutnih metabolita, bakteriocina. Bakteriocini su okarakterizirani kao ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi ili proteini, stoga je ključni korak u istraživanjima bakteriocinske aktivnosti ustanoviti proteinsku prirodu antimikrobne komponente, čime se dokazuje da uočeno djelovanje ne potječe isključivo od mliječne kiseline i ostalih nepeptidnih metabolita BMK. U tu svrhu, provedeno je ispitivanje utjecaja visoke temperature i proteolitičkih enzima proteinaze K, pepsina i pankreatina na antimikrobno djelovanje supernatanta koji potencijalno sadrži peptidnu antimikrobnu supstanciju *L.plantarum* sojeva, metodom difuzije s rupama u agaru. Prema literaturi se ističe da *L.monocytogenes* i *S.aureus* bakterije mogu tvoriti biofilmove, koji predstavljaju dodatnu opasnost od kontaminacije u prehrambenoj i drugim industrijama. Kako bi se dalje istražio potencijal bioaktivnog metabolita u supernatantu BMK kultura, kvantificirana je proizvodnja biofilмова test-mikroorganizama u kontrolnom uzorku. Zatim je ispitana sposobnost inhibicije formiranja biofilмова u prisustvu supernatanta *Lactiplantibacillus* sojeva u odnosu na kontrolni uzorak. Za potvrdu indicirane bakteriocinske aktivnosti provedeno je ispitivanje prisutnosti gena koji kodiraju za plantaricine PCR metodom, uz primjenu specifičnih početnica. Usporedbom rezultata, izdvojili su se izolati koji su statistički značajno inhibirali formiranje biofilмова patogena i gdje je zabilježen statistički značajan gubitak antimikrobnog djelovanja nakon tretmana temperaturom i proteazama, uz detekciju *pln* lokusa u genomu soja. Kako bi se istražila plantaricinska aktivnost ovisno o dinamici rasta soja producenta, praćen je rast odabranih sojeva *L.plantarum* SF15C, D13 i M92C tijekom 48-satnog uzgoja. Uzorkovali su se supernatanti kulture ispitivanih sojeva u vremenskim intervalima od 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 i 48 h. Određivali su se parametri bakterijskog rasta mjerenjem optičke gustoće pri 620 nm, uz mjerenje pH vrijednosti i postotka proizvedene mliječne kiseline. Uz to, analizirana je antimikrobna aktivnost prema test-mikroorganizmima za svaki uzorkovan supernatant, metodom difuzije s rupama u agaru.

4.1. UTJECAJ VISOKE TEMPERATURE I PROTEOLITIČKIH ENZIMA NA PLANTARICINSKU AKTIVNOST SOJEVA PRODUCENATA

Antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline pripisuje se proizvodnji različitih metabolita (organskih kiselina, vodikovog peroksida, diacetila itd.) te se posebna pozornost posvećuje proizvodnji specifičnih inhibicijskih supstancija, kao što su bakteriocini. Bakteriocini BMK peptidi nižih molekulskih masa ili proteini koji posjeduju antimikrobno djelovanje prema srodnim gram-pozitivnim bakterijama, dok su stanice producenta imune na djelovanje bakteriocina kojeg sintetiziraju (Šušković i sur., 2010). Sintetiziraju se na ribosomima, i najčešće se izlučuju izvan stanice, što je poželjna karakteristika za inhibiciju patogena u fermentiranoj hrani, kao i u gastrointestinalnoj okolini (Kon i Rai, 2016).

Jedna od konvencionalnih metoda za ispitivanje inhibitorne aktivnosti sojeva BMK je metoda difuzije s rupama u agaru. Ova metoda podrazumijeva inokulaciju test-mikroorganizma, najčešće patogenog soja, u eksponencijalnoj fazi rasta u odgovarajući agar koji se izlije u Petrijevu zdjelicu. Zatim se naprave „rupe“ koje se mogu ispuniti odgovarajućom suspenzijom BMK sojeva, koja difundira u podlogu i time potencijalno iskazuje antimikrobno djelovanje, koje se očituje bistrim zonama (Zou i sur., 2018). Pretpostavka je da će se nakon uzgoja antimikrobni spojevi koje proizvode različiti *L.plantarum* sojevi izlučiti ekstracelularno te su stoga prisutni u supernatantu kultura, koji može difundirati u podlogu i potencijalno inhibirati patogene sojeve *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048. Primarni produkt BMK je mliječna kiselina koja se također izlučuje ekstracelularno, stoga važan korak u istraživanjima bakteriocinske aktivnosti predstavlja procjena proteinske prirode antimikrobne supstancije. Budući da bakteriocini posjeduju peptidnu strukturu, očekuje se snižavanje ili gubitak antimikrobne aktivnosti supernatanta nakon tretmana visokim temperaturama i proteolitičkim enzimima poput tripsina, pepsina, papaina i pankreatina (Pereira i sur., 2022; Reis i sur., 2012).

Kako bi se utvrdio peptidni karakter ekstracelularnih antimikrobnih supstancija koje proizvode *L.plantarum* sojevi, ispitan je učinak visoke temperature i proteolitičkih enzima proteinaze K, pepsina i pankreatina na njihovo antibakterijsko djelovanje. Uočeno je smanjenje zona inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048 kod tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolni, netretirani uzorak na pločama sa supernatantima *L.plantarum* sojeva (slika 7).



Slika 7. Učinak specifičnih eksperimentalnih uvjeta na antistafilokoknu i antilisterijsku aktivnost supernatanata kulture *L.plantarum* sojeva

Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 4 i 5, vidljivo je da tretmani visokom temperaturom i proteolitičkim enzimima pojedinih *L.plantarum* sojeva statistički značajno umanjuju promjer inhibicije test-mikroorganizama, u odnosu na netretirane supernatante. Ističu se sojevi *L.plantarum* SF15C i D13 gdje je antimikrobna aktivnost statistički značajno smanjena ($p < 0,05$) tretmanima visokom temperaturom i proteinazama kod oba patogena soja, što ukazuje da je inhibitorna aktivnost posljedica proizvodnje plantaricina. Inhibicijsko djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC®19111 soja *L.plantarum* ZG1C je značajno smanjeno tretmanom supernatanta pepsinom i soja *L.plantarum* M92C tretmanom pankreatinom. Također, *L.plantarum* M92C pokazuje statistički značajno reduciranu bakteriostatsku aktivnost prema *S.aureus* 3048 nakon tretmana svim proteinazama, što ukazuje na peptidni karakter inhibitorne komponente, odnosno plantaricinsku aktivnost. Uz to, može se primijetiti da je plantaricin soja producenta *L.plantarum* M92C otporan na djelovanje povišene temperature budući da ne dolazi do značajnog gubitka aktivnosti u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Antimikrobna aktivnost soja *L.plantarum* L4 prema *S.aureus* 3048 može biti rezultat aktivnosti plantaricina koji je relativno termostabilan, ali gubi svoju aktivnost kao posljedica denaturacije pepsinom i pankreatinom.

Tablica 4. Usporedba antilisterijske aktivnosti supernatanta kulture *L.plantarum* sojeva nakon izlaganja specifičnim tretmanima, ispitano metodom difuzije s rupama u agaru

		<i>L. monocytogenes</i> ATCC®19111™
<i>Lactiplantibacillus</i> soj	Tretman supernatanta	Promjer inhibicije [mm]
<i>L.plantarum</i> D13	Netretirani	12,67 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	10,67 ± 0,58 ^b
	100°C/30 min	11,00 ± 0,00 ^b
	Pepsin	10,50 ± 0,71 ^b
	Pankreatin	10,00 ± 0,00 ^b
<i>L.plantarum</i> M5	Netretirani	11,67 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	11,00 ± 1,00 ^a
	100°C/30 min	10,67 ± 0,58 ^a
	Pepsin	11,50 ± 0,71 ^a
	Pankreatin	10,25 ± 0,35 ^a
<i>L.plantarum</i> SF15C	Netretirani	12,67 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	10,67 ± 0,58 ^b
	100°C/30 min	11,33 ± 0,58 ^{ab}
	Pepsin	10,50 ± 0,00 ^b
	Pankreatin	10,00 ± 0,00 ^b
<i>L.plantarum</i> ZG1C	Netretirani	11,67 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	11,00 ± 0,00 ^a
	100°C/30 min	11,33 ± 0,58 ^a
	Pepsin	9,50 ± 0,00 ^b
	Pankreatin	10,25 ± 0,35 ^a
<i>L.plantarum</i> M92C	Netretirani	11,67 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	10,33 ± 0,58 ^a
	100°C/30 min	11,33 ± 0,58 ^a
	Pepsin	10,25 ± 0,35 ^a
	Pankreatin	10,00 ± 0,00 ^b
<i>L.plantarum</i> L4	Netretirani	10,33 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	10,00 ± 0,00 ^a
	100°C/30 min	10,00 ± 0,00 ^a
	Pepsin	9,75 ± 0,35 ^a
	Pankreatin	9,50 ± 0,71 ^a

^{ab} statistički značajna razlika ($p < 0.05$) između različitih tretmana supernatanta unutar istog *L.plantarum* soja

Tablica 5. Usporedba antistafilokokne aktivnosti supernatanta kulture *L.plantarum* sojeva nakon izlaganja specifičnim tretmanima, ispitano metodom difuzije s rupama u agaru

		<i>S. aureus</i> 3048
<i>Lactiplantibacillus</i> soj	Tretman supernatanta	Promjer inhibicije [mm]
<i>L.plantarum</i> D13	Netretirani	12,67 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	10,67 ± 0,58 ^b
	100°C/30 min	10,67 ± 0,58 ^b
	Pepsin	9,5 ± 0,00 ^b
	Pankreatin	10,75 ± 0,35 ^b
<i>L.plantarum</i> M5	Netretirani	11,00 ± 0,00 ^a
	Proteinaza K	10,33 ± 0,58 ^a
	100°C/30 min	11,00 ± 0,00 ^a
	Pepsin	11,00 ± 0,00 ^a
	Pankreatin	10,75 ± 0,35 ^a
<i>L.plantarum</i> SF15C	Netretirani	12,00 ± 0,00 ^a
	Proteinaza K	10,67 ± 0,58 ^b
	100°C/30 min	10,67 ± 0,58 ^b
	Pepsin	9,50 ± 0,71 ^b
	Pankreatin	9,50 ± 0,71 ^b
<i>L.plantarum</i> ZG1C	Netretirani	10,67 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	10,33 ± 0,58 ^a
	100°C/30 min	10,33 ± 0,58 ^a
	Pepsin	10,00 ± 0,00 ^a
	Pankreatin	10,50 ± 0,00 ^a
<i>L.plantarum</i> M92C	Netretirani	11,33 ± 0,58 ^a
	Proteinaza K	10,00 ± 0,00 ^b
	100°C/30 min	11,00 ± 0,00 ^a
	Pepsin	10,00 ± 0,00 ^b
	Pankreatin	10,00 ± 0,00 ^b
<i>L.plantarum</i> L4	Netretirani	11,00 ± 1,00 ^a
	Proteinaza K	10,33 ± 0,58 ^a
	100°C/30 min	10,67 ± 0,58 ^a
	Pepsin	10,00 ± 0,00 ^b
	Pankreatin	10,00 ± 0,00 ^b

^{ab} statistički značajna razlika ($p < 0.05$) između različitih tretmana supernatanta unutar istog *L.plantarum* soja

Liu i sur. (2016) u svom istraživanju su ispitivali plantaricinsko djelovanje na nekolicinu gram-pozitivnih i gram-negativnih patogena, uzročnika kvarenja hrane. Uočena je inhibicija rasta sojeva *L.monocytogenes* ATCC19111 i *S.aureus* korištenjem supernatanta istraživnog *L.plantarum* soja. Antimikrobno djelovanje je značajno inaktivirano tretmanima proteolitičkim enzimima, što potvrđuje proteinsku prirodu antimikrobne komponente u supernatantu te se pripisuje identificiranom plantaricinu. Arrijoja-Bretón i sur. (2020) su također pokazali antimikrobno djelovanje supernatanta *L.plantarum* soja prema *S.aures* i *L.monocytogenes* te su usporedili inhibicijski učinak netretiranog i neutraliziranog supernatanta. Rezultati pokazuju najveće inhibitorno djelovanje netretiranog supernatanta, što se pripisuje kombiniranoj aktivnosti mliječne kiseline i drugih antimikrobnih komponenti. Međutim, antilisterijska aktivnost se značajno gubi kod netretiranog i neutraliziranog supernatanta nakon tretmana proteinazom K, što autori povezuju sa denaturacijom antimikrobnog peptida plantaricina.

Dobiveni rezultati prikazani u tablici 4 i 5 upućuju na izraženo antimikrobno djelovanje *L.plantarum* sojeva prema test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S.aureus* 3048 koje ne potječe isključivo od mliječne kiseline, već i kao posljedica proizvodnje plantaricina.

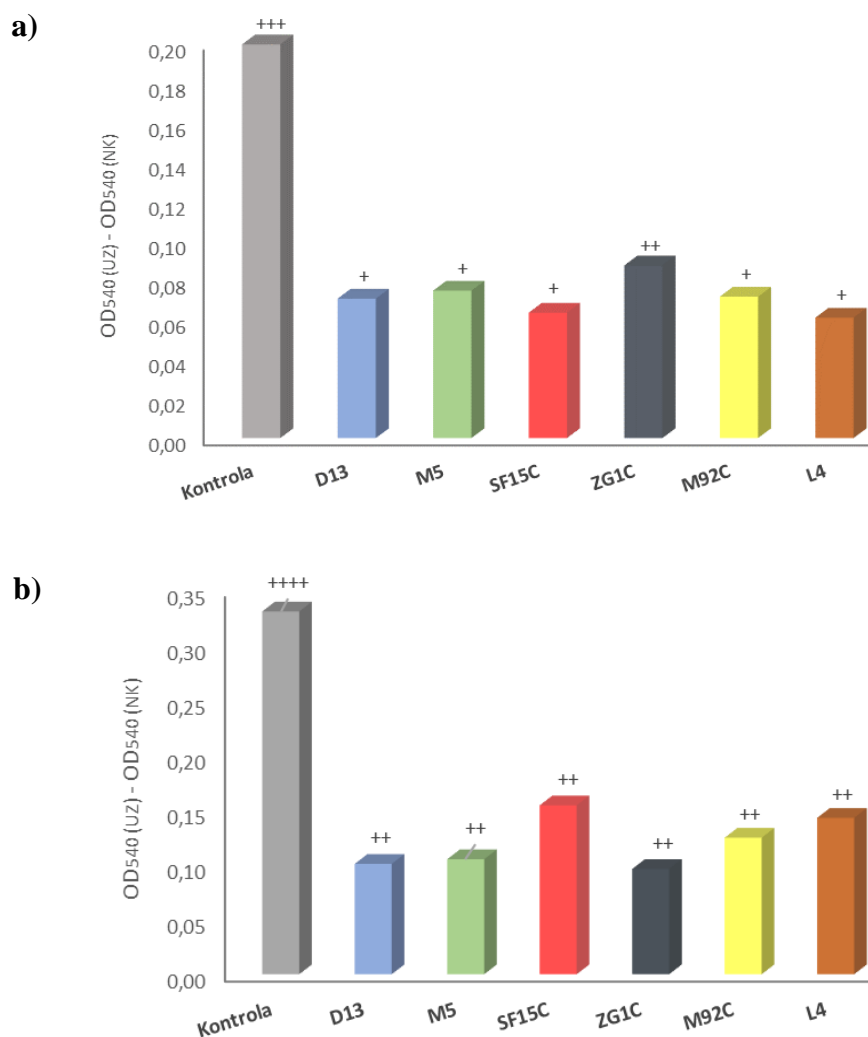
4.2. INHIBICIJA FORMIRANJA BIOFILMA DJELOVANJEM SUPERNATANTA *L.plantarum* SOJEVA

Poznato je da određeni patogeni mikroorganizmi imaju sposobnost tvorbe biofilмова, koji štite mikrobnu zajednicu od vanjskih utjecaja te posredno povećavaju mogućnost razvoja antibiotske rezistencije. Uzročnici infekcija i česti kontaminanti hrane *L.monocytogenes* i *S.aureus* mogu formirati biofilmove na opremi i materijalima koji se koriste u prehrambenoj industriji, što predstavlja ozbiljnu prijetnju kvaliteti i sigurnosti hrane. Osim toga, biofilmovi mogu izlučivati toksične metabolite koji dodatno kontaminiraju prehrambene proizvode. S ciljem pronalaska potencijalne „biokontrolne“ za sprječavanje zaraza, utvrđeno je da određene probiotičke BMK mogu inhibirati stvaranje biofilмова patogenih sojeva te se istražuje uloga njihove bakteriocinske aktivnosti (Kirtonia i sur., 2021; Lee i sur., 2021).

Kako bi se pobliže istražio potencijal inhibicijskog djelovanja antimikrobnih komponenti odabranih izolata, ispitana je sposobnost formiranja biofilma test-mikroorganizama u prisutnosti supernatanta *L.plantarum* sojeva. Određena koncentracija stanica patogenih sojeva koje će formirati biofilm bila je istog reda veličine od 10^8 CFU/mL.

Dobiveni rezultati kvantifikacije proizvodnje biofilмова prikazani na slici 8 pokazuju kako *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u eksperimentalnim uvjetima izraženo formira biofilm, dok *S.aureus* 3048 pokazuje vrlo izraženu sposobnost stvaranja biofilma. U prisustvu supernatanta svakog od ispitivanih *L.plantarum* sojeva dolazi do statistički značajnog opadanja sposobnosti formiranja biofilma oba ispitana patogena. Prema rezultatima, inkubacija s *Lactiplantibacillus plantarum* sojevima utječe na slabije stvaranje biofilma *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u odnosu na kontrolu. Izuzetak je supernatant kulture *L.plantarum* ZG1C čiji je inhibicijski učinak manji te je formiranje biofilma opisano kao umjereno. Supernatant svakog od ispitivanih *L.plantarum* sojeva utječe na sposobnost stvaranja biofilma *S.aureus* 3048 te se smanjuje i klasificira kao umjereno. Statistički nije zabilježena značajnija razlika u efektu inhibicije između *L.plantarum* sojeva za pojedini patogen. U skladu s prethodnim rezultatima, značajna redukcija formiranja biofilмова test-mikroorganizama može biti rezultat prisutne antimikrobne komponente u supernatantu kulture pojedinih *Lactiplantibacillus plantarum* sojeva.

Lee i sur. (2021) su pokazali značajnu inhibiciju formiranja biofilмова *L.monocytogenes* i *S.aureus* učinkom supernatanta *L.plantarum* soja. Također, praćenjem ekspresije gena oba patogena soja može se zaključiti da djelovanje supernatanta suprimira transkripciju gena odgovornih za formiranje biofilma. Ray Mohapatra i sur. (2021) su analizirali antimikrobnu i antibiofilm aktivnost dva pročišćena bakteriocina koje proizvodi *L.plantarum* soj. Pročišćeni bakteriocini su pokazali širok spektar antimikrobnog djelovanja, uključujući *L.monocytogenes* i *S.aureus*, pri čemu je zabilježen potpuni gubitak aktivnosti nakon tretmana proteazama kao dokaz proteinske prirode spoja. Kontrolni uzorak patogena *S.aureus* je klasificiran kao snažan producent biofilma te su oba pročišćena bakteriocina značajno inhibirali formiranje biofilma, što je dodatno potvrđeno fluorescentnom i SEM mikroskopijom. Uz to, qPCR metodom je utvrđeno da prisutnost bakteriocina dovodi do smanjene ekspresije *ica* gena odgovornih za formiranje biofilma kod *S.aureus*. Stoga, inhibicija tvorbe biofilмова pokazala se kao dodatni učinak bakteriocinskog djelovanja te se dalje razmatraju kao moguća prirodna barijera protiv patogena i posljedičnih infekcija (Kirtonia i sur., 2021).



Slika 8. Sposobnost formiranja biofilma bakterije a) *L.monocytogenes* ATCC®19111™; b) *S.aureus* 3048, u prisutnosti supernatanta *L.plantarum* sojeva. Klasifikacija jačine proizvedenog biofilma prema Stepanović i sur. (2007): + OD_{UZ} – OD_{NK} > 0, ++ OD_{UZ} – OD_{NK} > OD_{NK}, +++ OD_{UZ} – OD_{NK} > 2*OD_{NK}, ++++ OD_{UZ} – OD_{NK} > 3*OD_{NK}

4.3. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA PLANTARICINE I PRAĆENJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI *Lactiplantibacillus* SOJEVA

Kako bi se dalje istražila uloga plantaricinske aktivnosti u antimikrobnom učinku sojeva producenata, provedeno je utvrđivanje prisutnosti gena koji kodiraju za plantaricine kod ispitivanih *L.plantarum* vrsta. Nakon genomske izolacije ispitivanih *Lactiplantibacillus* sojeva, određena je koncentracija DNA te su rezultati mjerenja prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Izmjerena koncentracija izolirane DNA *L.plantarum* sojeva

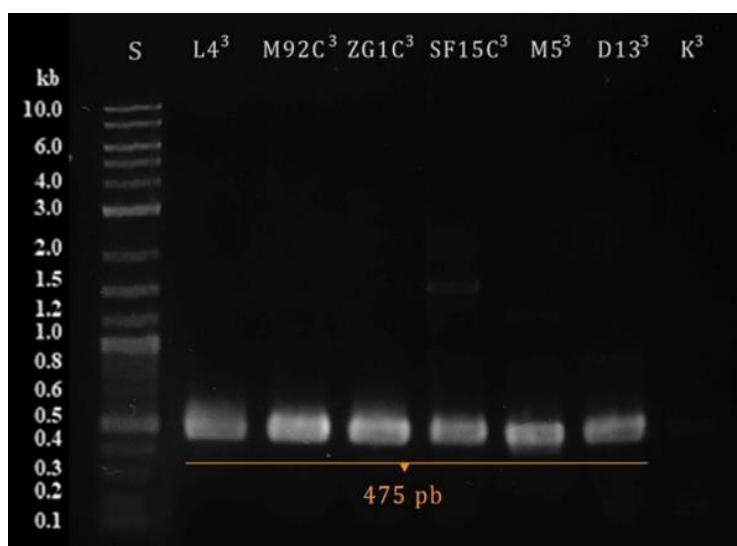
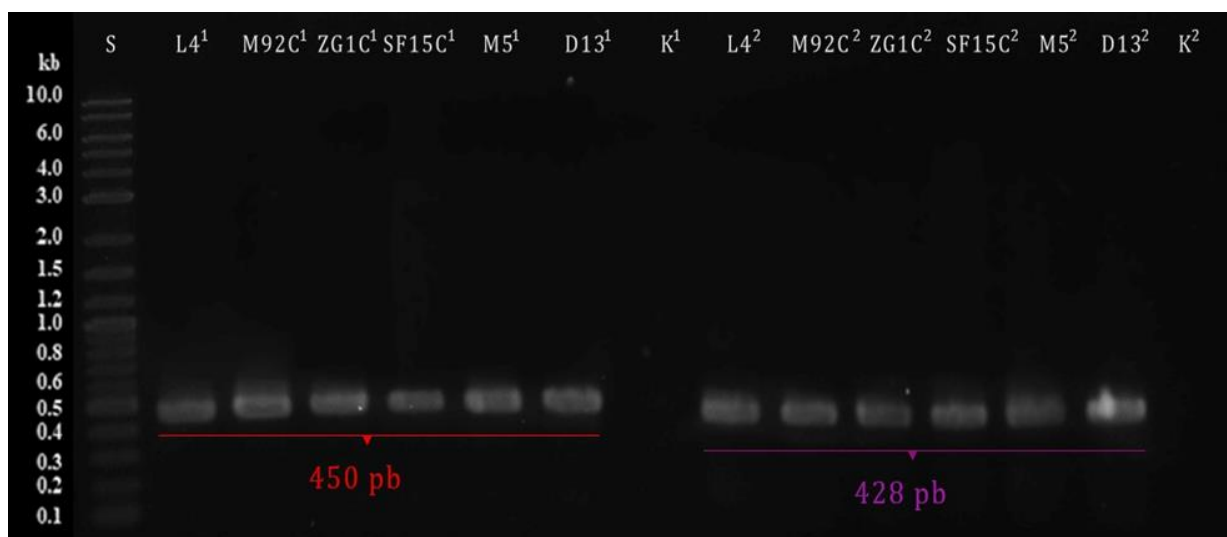
Soj	Koncentracija DNA [ng/ μ L]
<i>L.plantarum</i> D13	119, 43
<i>L.plantarum</i> M5	399, 89
<i>L.plantarum</i> SF15C	784, 84
<i>L.plantarum</i> ZG1C	173, 02
<i>L.plantarum</i> M92C	193, 26
<i>L.plantarum</i> L4	141, 06

Zatim je provedena lančana reakcija polimeraze, primjenom specifičnih početnica za detekciju gena koji kodiraju za plantaricin A, plantaricin EF, plantaricin J, plantaricin NC8, plantaricin S i plantaricin W (tablica 7). Dobiveni PCR produkti su analizirani gel elektroforezom te su kod svih ispitivanih *Lactiplantibacillus* sojeva detektirani geni *plnA*, *plnEF* i *plnJ* koji kodiraju za plantaricine PlnA, PlnEF i peptid PlnJ plantaricina PlnJK. Amplikoni *plnA*, *plnEF* i *plnJ* su očekivane veličine od 450 pb, 428 pb i 475 pb, dok amplikoni za *plnNC8*, *plnS* i *plnW* gene nisu detektirani. Izostanak DNA vrpce svih negativnih kontrola isključuje mogućnost kontaminacije uzoraka i nespecifične amplifikacije, što označava pozitivan rezultat PCR reakcije (slika 9).

Tablica 7. Zabilježeni PCR produkti nakon provedene detekcije gena koji kodiraju za plantaricine (*pln* – plantaricin)

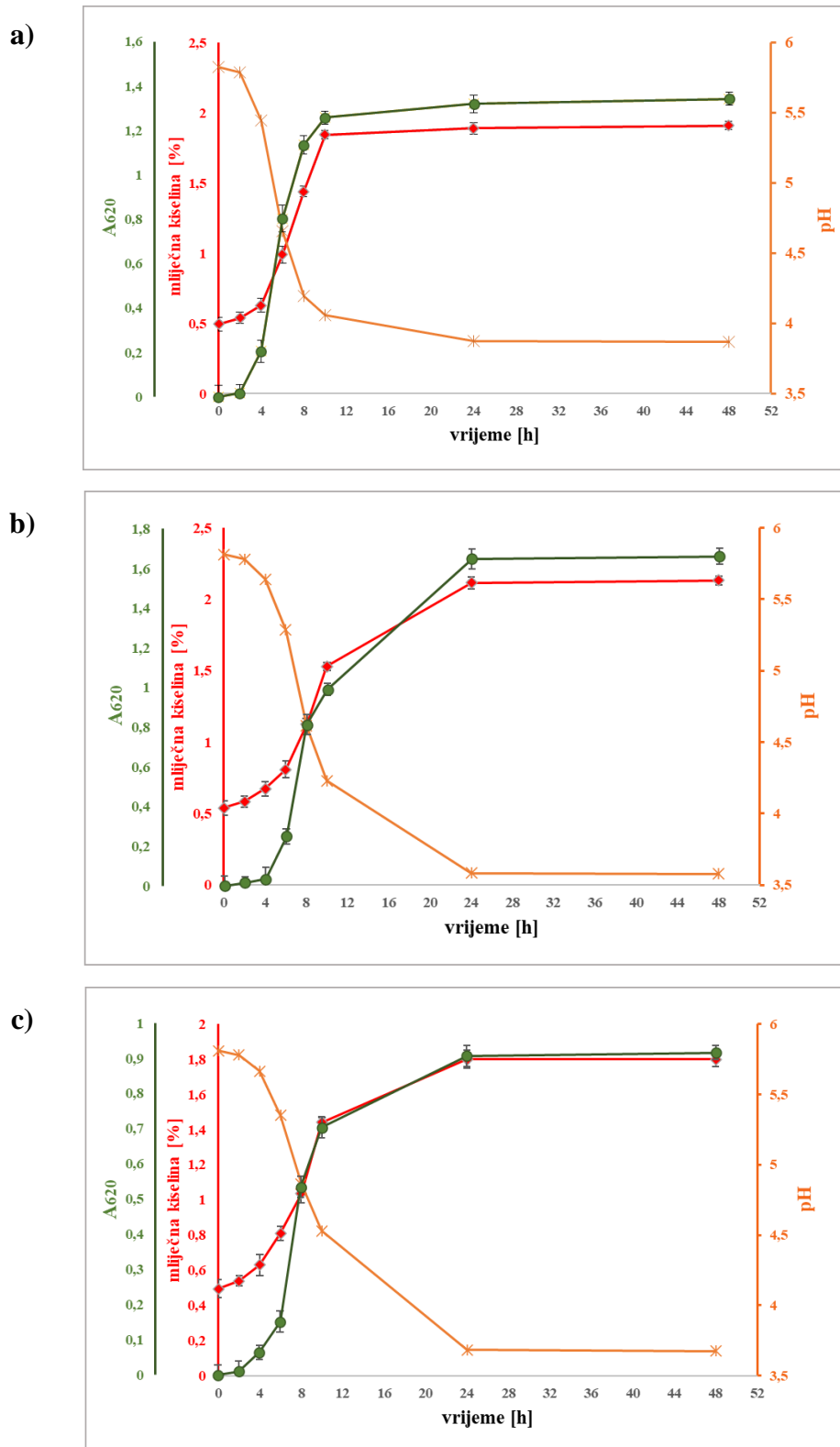
Soj	<i>pln A</i>	<i>pln EF</i>	<i>pln J</i>	<i>pln NC8</i>	<i>pln S</i>	<i>pln W</i>
<i>L.plantarum</i> D13	+	+	+	-	-	-
<i>L.plantarum</i> M5	+	+	+	-	-	-
<i>L.plantarum</i> SF15C	+	+	+	-	-	-
<i>L.plantarum</i> ZG1C	+	+	+	-	-	-
<i>L.plantarum</i> M92C	+	+	+	-	-	-
<i>L.plantarum</i> L4	+	+	+	-	-	-
kontrola	-	-	-	-	-	-

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

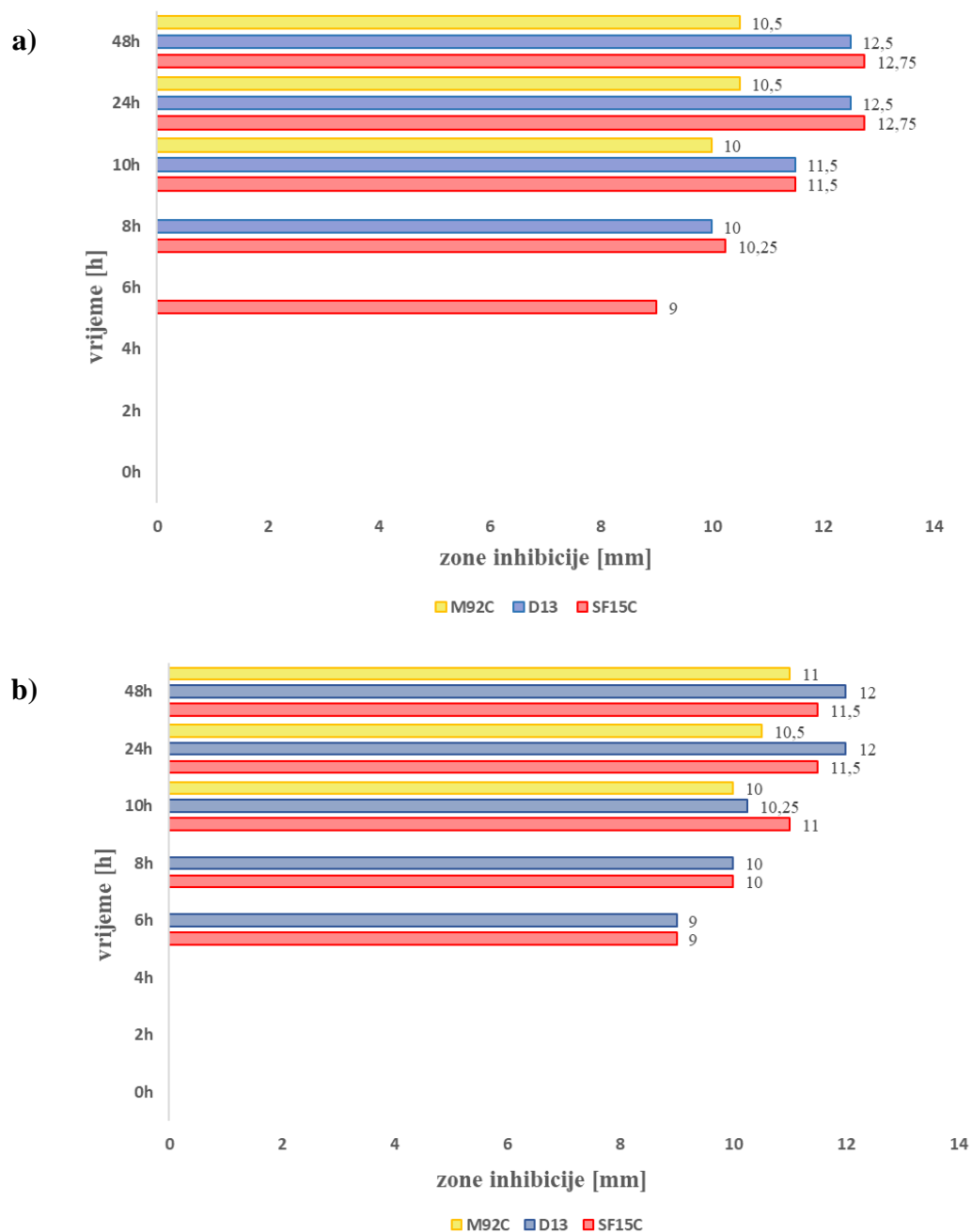


Slika 9. Detekcija *pln* amplikona *L.plantarum* sojeva analiziranih agaroznom gel elektroforezom. PCR reakcija je provedena korištenjem specifičnih početnica za pojedine plantaricine: **S** – standard, **1** - *plnA*, **2** – *plnEF*, **3** – *plnJ*, **K** – negativna kontrola

Na temelju dobivenih rezultata, odabrani su sojevi *L.plantarum* D13, *L.plantarum* SF15C i *L.plantarum* M92C budući da je antimikrobno djelovanje prema test-mikroorganizmima statistički značajno umanjeno djelovanjem visoke temperature i/ili proteaza, prisustvo supernatanta kulture je dovelo do značajne inhibicije formiranja biofilмова patogena te je utvrđena prisutnost *pln* lokusa primjenom specifičnih početnica. Navedeni ishodi eksperimenata indiciraju da je antimikrobna aktivnost odabranih *Lactiplantibacillus* sojeva povezana sa biosintezom plantaricina. Stoga je dalje analiziran antilisterijski i antistafilokokni učinak istaknutih sojeva tijekom perioda od 48 sati.



Slika 10. Praćenje staničnog rasta i acidifikacije sojeva: **a)** *L.plantarum* SF15C; **b)** *L.plantarum* D13; **c)** *L.plantarum* M92C u MRS bujonu pri 37 °C tijekom 48 sati



Slika 11. Grafički prikaz antimikrobne aktivnosti supernatanta *L.plantarum* SF15C, D13 i M92C sojeva uzorkovanih tijekom 48 sati prema test-mikroorganizmu: a) *L.monocytogenes* ATCC®19111™; b) *S.aureus* 3048

Tijekom 48-satnog perioda pratio se stanični rast mjerenjem optičke gustoće pri 620 nm i acidifikacija, odnosno pH vrijednost i postotak proizvedene mliječne kiseline odabranih *Lactiplantibacillus* sojeva te su rezultati prikazani na slici 10. Dodatno, supernatant *L.plantarum* kultura je izuzet za svaki vremenski interval te je ispitano inhibicijsko djelovanje prema patogenim sojevima, prikazano na slici 11. Očekivano, pH vrijednost supernatanta se smanjuje, dok se koncentracija mliječne kiseline povećava do početka stacionarne faze rasta.

Antimikrobno djelovanje *L.plantarum* SF15C i D13 uočeno je između 6 i 8 sati od početka uzgoja, što odgovara eksponencijalnoj fazi bakterijskog rasta. Soj *L.plantarum* M92C pokazuje inhibicijsku aktivnost tek nakon 10 sati fermentacije, odnosno bliže kraju eksponencijalne faze rasta. Najveće antimikrobno djelovanje svih ispitivanih *Lactiplantibacillus* sojeva detektirano je nakon 24 sata, i opstaje nakon 48 sati, gdje je postignuta stacionarna faza rasta. Statističkom analizom podataka utvrđeno je da od 10. do 48. sata uzgoja supernatant soja *L.plantarum* SF15C značajnije inhibira *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u usporedbi s *S.aureus* 3048. Također, između 24. i 48. sata uzgoja, supernatant soja *L.plantarum* D13 statistički značajnije inhibira soj *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u odnosu na *S.aureus* 3048. Soj *L.plantarum* M92C pokazuje podjednaku inhibiciju oba test-mikroorganizma. U stacionarnoj fazi rasta, supernatanti kultura *L.plantarum* SF15C i D13 pokazuju statistički izraženije antimikrobno djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u odnosu na inhibicijsko djelovanje *L.plantarum* M92C. Najznačajniju inhibicijsku aktivnost prema *S.aureus* 3048 pokazuje *Lactiplantibacillus* soj D13 između 24. i 48. sata uzgoja, dok se *L.plantarum* M92C ističe najslabijim bakteriostatskim djelovanjem. Uočena antimikrobna aktivnost ispitanih BMK sojeva dijelom je posljedica snižavanja pH uslijed proizvodnje organskih kiselina, ali i drugih antimikrobnih metabolita kao što su bakteriocini. S obzirom da je utvrđena prisutnost *pln* lokusa, ispitani *L.plantarum* sojevi posjeduju mogućnost sinteze ekstracelularne antimikrobne komponente te je plantaricinska aktivnost u uzorcima supernatanta dokazana tretmanima visokom temperaturom i proteinazama, pri čemu su uočene zone inhibicije manjeg promjera u usporedbi s kontrolom.

Slične rezultate u svom radu potvrđuje Butorac (2022), gdje je u svrhu poticanja antimikrobnog djelovanja i biosinteze plantaricina soja producenta proveden združeni uzgoj soja *L. plantarum* D13 s osjetljivim sojevima *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048. Utvrđeno je bakteriostatsko djelovanje soja *L. plantarum* D13 prema oba test-mikroorganizma, pri čemu je pokazana značajnija inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u usporedbi sa *S. aureus* 3048. U oba slučaja stimulacija bakteriocinske aktivnosti je vidljiva tijekom eksponencijalne faze rasta *L.plantarum* D13, te je zadržana i tijekom stacionarne faze rasta. Dodatno, pri koncentracijama mliječne kiseline u uzorcima nakon 24 h kokultivacije nije utvrđena inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC®19111™ niti *S.aureus* 3048, stoga se može pretpostaviti da inhibicijsko djelovanje *L. plantarum* D13 proizlazi iz bakteriocinske aktivnosti. Pojedini autori su istražili ekspresiju gena *pln* lokusa u ovisnosti o bakterijskom rastu sojeva producenata. Di Cagno i sur. (2010) su utvrdili da sinteza PlnA bakteriocina kod istraživanih *L.plantarum* sojeva započinje sredinom eksponencijalne

faze i raste do kasne eksponencijalne faze rasta soja producenta. Doulgeraki i sur. (2013) su primijetili prekomjernu ekspresiju *plnEF* i *plnJK* gena pojedinih *L.plantarum* sojeva tijekom kasne eksponencijalne i stacionarne faze rasta sojeva producenata. Navedeni rezultati koreliraju sa zamijećenom antimikrobnom aktivnošću odabranih *Lactiplantibacillus* sojeva tijekom eksponencijalne i stacionarne faze rasta, koja se može pripisati plantaricinskom djelovanju sojeva producenata.

5. ZAKLJUČCI

1. Supernatanti kulture pojedinih *Lactiplantibacillus* sojeva nakon izlaganja visokoj temperaturi i djelovanju proteolitičkih enzima iskazuju statistički značajno manju antilisterijsku i antistafilokoknu aktivnost, što se pripisuje inaktivaciji bakteriocinske aktivnosti uslijed denaturirajućeg djelovanja primijenjenih tretmana.
2. Supernatanti kulture analiziranih *L.plantarum* sojeva značajno inhibiraju sposobnost formiranja biofilмова stanica *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S.aureus* 3048.
3. Prisutnost gena koji kodiraju za plantaricine A, EF i J u genomu *L.plantarum* sojeva potvrđena je PCR metodom, uz korištenje specifičnih početnica.
4. Supernatanti kultura *L.plantarum* SF15C i D13, koji sadrže njihove plantaricinske komponente, pokazuju podjednako antimikrobno djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™. Najznačajnije inhibicijske vrijednosti su postignute tijekom stacionarne faze rasta sojeva producenata.
5. Između analiziranih sojeva, soj *L.plantarum* D13 iskazuje najznačajnije antimikrobno djelovanje prema *S.aureus* 3048, tijekom stacionarne faze svog rasta.

6. LITERATURA

- Abdulhussain Kareem R, Razavi SH (2020) Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation - A review. *J Food Saf* **40**, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfs.12735>
- Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Antoshina DV, Balandin SV, Ovchinnikova T V (2022) Structural Features, Mechanisms of Action, and Prospects for Practical Application of Class II Bacteriocins. *Biochem* **87**, 1387–1403. <https://doi.org/10.1134/S0006297922110165>
- Arrijoja-Bretón D, Mani-López E, Bach H, López-Malo A (2020) Antimicrobial activity of protein-containing fractions isolated from *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 culture. *Brazilian J Microbiol* **51**, 1289–1296. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00266-5>
- Azizi F, Habibi Najafi MB, Edalatian Dovom MR (2017) The biodiversity of *Lactobacillus* spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *AMB Express* **7**. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0474-2>
- Belguesmia Y, Naghmouchi K, Chihib N (2011) Prokaryotic Antimicrobial Peptides. *Prokaryotic Antimicrob Pept* 171–195. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7692-5>
- Ben Omar N, Abriouel H, Keleke S, Sánchez Valenzuela A, Martínez-Cañamero M, Lucas López R, Ortega E, Gálvez A (2008) Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *Int. J. Food Microbiol.* **127**, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.037>
- Butorac K (2021) Funkcionalna uloga egzopolisaharida i bakteriocina u probiotičkoj aktivnosti autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline (doktorski rad), Prehrambeno biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Castro-González JM, Castro P, Sandoval H, Castro-Sandoval D (2019) Probiotic lactobacilli precautions. *Front Microbiol* **10**, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00375>

- Chikindas ML, Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM (2018) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotechnol* **49**, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>
- Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3**, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013) Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol* **11**, 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Čanak I, Markov K, Melvan E, Starčević A, Živković M, Zadavec M, i sur. (2018) Isolation and characterisation of *L. plantarum* O1 producer of plantaricin as potential starter culture for the biopreservation of aquatic food products. *Food Technol Biotechnol* **56**, 581–589. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.04.18.5707>
- Daba GM, Elnahas MO, Elkhateeb WA (2022) Beyond biopreservatives, bacteriocins biotechnological applications: History, current status, and promising potentials. *Biocatal Agric Biotechnol* **39**, 102248. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102248>
- Di Cagno R, De Angelis M, Calasso M, Vincentini O, Vernocchi P, Ndagijimana M, i sur. (2010) Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: Induction of plantaricin a (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics* **10**, 2175–2190. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900565>
- Diep DB, Straume D, Kjos M, Torres C, Nes IF (2009) An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* **30**, 1562–1574. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.014>
- Doulgeraki AI, Paraskevopoulos N, Nychas GJE, Panagou EZ (2013) An in vitro study of *Lactobacillus plantarum* strains for the presence of plantaricin genes and their potential control of the table olive microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* **103**, 821–832. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9864-2>
- Esteban J, Molina-Manso D, Spiliopoulou I, Cordero-Ampuero J, Fernández-Roblas R, Foka A, i sur. (2010) Biofilm development by clinical isolates of *Staphylococcus* spp. from retrieved orthopedic prostheses. *Acta Orthop* **81**, 674–679. <https://doi.org/10.3109/17453674.2010.537810>

- George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal* **26**, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Hegarty JW, Guinane CM, Ross RP, Hill C, Cotter PD (2016) Bacteriocin production: A relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Research* **5**. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9615.1>
- Hernández-González JC, Martínez-Tapia A, Lazcano-Hernández G, García-Pérez BE, Castrejón-Jiménez NS (2021) Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals* **11**. <https://doi.org/10.3390/ani11040979>
- Holo H, Jeknic Z, Daeschel M, Stevanovic S, Nes IF (2001) Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* **147**, 643–651. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-3-643>
- Kaur Sidhu P, Nehra K (2021) Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria as Potent Antimicrobial Peptides against Food Pathogens. *Biomimetics* **10**. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95747>
- Kirtonia K, Salauddin M, Bharadwaj KK, Pati S, Dey A, Shariati MA, i sur. (2021) Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries. *Biocatal Agric Biotechnol* **36**, 102141. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102141>
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 39–85. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90057-G](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90057-G)
- Kon K, Rai M (2016) Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. *Academic press*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00001-0>
- Lee JE, Lee NK, Paik HD (2021) Antimicrobial and anti-biofilm effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 isolated from kimchi. *Food Sci Biotechnol* **30**, 97–106. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00837-0>
- Liu W, Pang H, Zhang H, Cai Y (2014) Biodiversity of lactic acid bacteria. *Lactic acid bacteria: fundamentals and practice*, 103-203. [10.1007/978-94-017-8841-0_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_2)

- Liu H, Zhang L, Yi H, Han X, Chi C (2016) Identification and characterization of plantaricin Q7, a novel plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* Q7. *Lwt* **71**, 386–390. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.009>
- Maldonado A, Jimenez-Diaz R, Ruiz-Barba JL (2004) Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific grampositive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J. Bacteriol.*, **186**, 1556–1564. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1556-1564.2004>
- Nissen-Meyer J, Opegård C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE (2010) Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins* **2**, 52–60. <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9021-z>
- Panina I, Krylov N, Nolde D, Efremov R, Chugunov A (2020) Environmental and dynamic effects explain how nisin captures membrane-bound lipid II. *Sci Rep* **10**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65522-y>
- Pereira WA, Piazzentin ACM, de Oliveira RC, Mendonça CMN, Tabata YA, Mendes MA, et al. (2022) Bacteriocinogenic probiotic bacteria isolated from an aquatic environment inhibit the growth of food and fish pathogens. *Sci Rep* **12**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09263-0>
- Ray Mohapatra A, Lakshmanan D, Mahesh R, Suchiang K, Jeevaratnam K (2021) Characterization and Cytotoxic Evaluation of Bacteriocins Possessing Antibiofilm Activity Produced by *Lactobacillus plantarum* SJ33. *Int J Pept Res Ther* **27**, 1783–1797. <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10210-2>
- Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB (2012) Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng Rev* **4**, 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- Rocchetti MT, Russo P, Capozzi V, Drider D, Spano G, Fiocco D (2021) Bioprospecting antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: Key factors underlying its probiotic action. *Int J Mol Sci* **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms222112076>
- Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G, Drider D (2017) *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics Antimicrob Proteins* **9**, 111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>

- Sharma A, Park SLY (2020) Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Sci Biotechnol* **29**, 1301-1318. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00802-x>
- Silva CCG, Silva SPM, Ribeiro SC (2018) Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front Microbiol* **9**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Soltani S, Hammami R, Cotter PD, Rebuffat S, Said L Ben, Gaudreau H, i sur. (2021) Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiol Rev* **45**, 1–24. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura G Di, Djukić S, Ćircović I, i sur. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates. *Apmis* **115**, 891–899
- Šušković J, Brkić B, Matošić S (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**(1), 57-73.
- Šušković J, Kos B, Beganović J, Pavunc AL, Habjanič K, Matoć S (2010) Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol* **48**, 296–307
- Šušković J, Kos B, Frece J, Beganović J, Leboš Pavunc A (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici Probiotic Concept - Probiotics as Food Supplements and Probiotics as Biotherapeutics. *Hrvat časopis za prehrambenu Tehnol Biotehnol i Nutr* **4**, 77–84
- Williams NT (2010) Probiotics. *Am J Heal Pharm* **67**, 449–458. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>
- Yadav R, Shukla P (2017) Probiotics for Human Health: Current Progress and Applications. *Recent Adv Appl Microbiol*, 133-147. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5275-0>
- Zacharof MP, Lovitt RW (2012) Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* **2**, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>
- Zou J, Jiang H, Cheng H, Fang J, Huang G (2018) Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Int J Biol Macromol* **117**, 781–789. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.233>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (JANA PERICA) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Vlastoručni potpis