

Antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline

Obadić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:483806>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-08**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Valentina Obadić

799/MB

**ANTIMIKROBNA AKTIVNOST
BAKTERIJA MLIJEČNE
KISELINE**

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 doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Katarine Butorac, mag. ing., u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009).

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

ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Valentina Obadić, 799/MB

Sažetak: Antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline predstavlja veliki značaj za prehrambenu industriju jer omogućava korištenje prirodnih konzervansa. Organske kiseline, diacetil, vodikov peroksid, reuterin i bakteriocini predstavljaju antimikrobne komponente metabolizma bakterija mliječne kiseline. Bakteriocini, koji su antimikrobni peptidi proizvedeni na ribosomima, imaju i primjenu u medicini kao tvari koje bi potencijalno mogle smanjiti uporabu antibiotika. U ovom radu ispitivana je antibakterijska aktivnost različitih sojeva, prisutnost bakteriocina te kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* s odabranim *Lactobacillus plantarum* sojevima. Najjače antimikrobno djelovanje prema patogenima *L. monocytogenes* i *S. aureus* dokazano je za sojeve *L. plantarum* D13, SF9C i SF15C kod kojih je i potvrđena prisutnost bakteriocina. Kompetitivna ekskluzija dokazala je da navedeni sojevi utječu na adheziju *S. aureus* dok na adheziju *L. monocytogenes* nemaju utjecaja.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, antimikrobna aktivnost, bakteriocini

Rad sadrži: 41 stranica, 10 slika, 12 tablica, 40 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Pomoć pri izradi: Katarina Butorac, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
2. Doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc
3. Prof.dr.sc. Ksenija Markov
4. Prof.dr.sc. Jadranka Frece (zamjena)

Datum obrane: 27. 9. 2018.

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

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA

Valentina Obadić, 799/MB

Abstract: Antimicrobial activity of lactic acid bacteria is of high importance for food industry because it enables use of natural preservatives. Organic acids, diacetyl, hydrogen peroxide, reuterin and bacteriocines are antimicrobial components of lactic acid bacteria metabolism. Bacteriocines, which are ribosomally synthesised antimicrobial peptides, can also be used in medicine as substances which can reduce antibiotic consumption. In this thesis antimicrobial activity of lactic acid bacteria, presence of bacteriocines and competitive exclusion of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* with different *Lactobacillus plantarum* strains is researched. The strongest antimicrobial effect towards *L. monocytogenes* and *S. aureus* is detected for *L. plantarum* D13, SF9C and SF15C strains in which also presence of bacteriocines is confirmed. Competitive exclusion proved that chosen strains affect adhesion of *S. aureus* while they have no affect on adhesion of *L. monocytogenes*.

Keywords: lactic acid bacteria, antimicrobial activity, bacteriocines

Thesis contains: 41 pages, 10 figures, 12 tables, 40 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Andreja Leboš Pavunc*

Technical support and assistance: *Katarina Butorac, mag. ing. biotech.*

Reviewers:

1. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
2. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor
3. PhD. *Ksenija Markov*, Full professor
4. PhD. *Jadranka Frece*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 27 September 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1. Bakterijski kontaminanti u mliječnim proizvodima.....	3
2.2. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	4
2.2.1. Organske kiseline	4
2.2.2. Vodikov peroksid	5
2.2.3. Diacetil	5
2.2.4. Reuterin	6
2.2.5. Bakteriocini	6
2.2.5.1. Podjela bakteriocina	6
2.2.5.2. Mehanizam djelovanja bakteriocina	10
2.2.5.3. Imunost na bakteriocine	11
2.2.5.4. Primjena bakteriocina.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	16
3.1.2. Hranjive podloge	17
3.1.3. Kemikalije	18
3.1.4. Aparatura i pribor	19
3.2. METODE RADA	20
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	20
3.2.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara (“Agar-spot-test metoda”)	20
3.2.3. Priprava supernatanata kultura za određivanje antibakterijske aktivnosti	21
3.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije iz jažica u agaru	21

3.2.5. Izolacija kromosomske DNA	22
3.2.6. PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) sa specifičnim početnicama za bakteriocin plantaricin.....	22
3.2.7. Kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija s odabranim <i>Lb. plantarum</i> sojevima primjenom Caco-2 stanične linije	24
3.2.8. Razlikovanje odabranih izolata BMK s bakteriocinskom aktivnošću primjenom RAPD (eng. Random Amplified Polymorphic DNA) metode.....	25
3.2.9. Razlikovanje odabranih izolata BMK s bakteriocinskom aktivnošću primjenom elektroforeze u denaturirajućem gradijentu - DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA:	29
4.1. Odabir sojeva sa bakteriocinskom aktivnosti, detekcija gena koji kodiraju za bakteriocine, te kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija	29
4.2. Razlikovanje odabranih izolata BMK s bakteriocinskom aktivnošću primjenom RAPD i DGGE metode	33
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Prehrambena industrija susreće se s problemom sigurnosti hrane, a ujedno raste i zabrinutost potrošača zbog uporabe sintetičkih konzervansa. Zbog toga se teži korištenju prirodnih proizvoda koji djeluju kao konzervansi. Osim što prirodni konzervansi ne utječu na zdravlje i manje utječu na senzorne karakteristike, dovode i do smanjenja troškova procesiranja jer ne zahtijevaju korištenje naprednih tehnologija. Manji troškovi znače da bi se njihova uporaba mogla proširiti i na slabije razvijene zemlje u kojim su infekcije izazvane hranom češće. Bakterije mliječne kiseline zahvaljujući svojoj antimikrobnoj aktivnosti koriste se kao konzervansi koji sprječavaju rast patogenih bakterija, a ujedno i čuvaju i nutritivne karakteristike hrane. Antimikrobno djelovanje posljedica je proizvodnje organskih kiselina, vodikovog peroksida, diacetila, bakteriocina itd. Bakteriocini osim primjene u prehrambenoj industriji imaju i potencijalnu primjenu u zdravstvu te je većina istraživanja bakteriocina orijentirana na gram pozitivne bakterije, najčešće bakterije mliječne kiseline.

Antibiotici su lijekovi koji se koriste za liječenje bakterijskih infekcija. Trenutno jedan od vodećih svjetskih zdravstvenih problema predstavlja otpornost na antibiotike koju su bakterije razvile prema antibioticima koji se koriste u humanoj medicini (Tambić Andrašević, 2007). Otpornost na antibiotike povećava medicinske troškove, produžuje bolničko liječenje i povećava smrtnost. Upravo zbog postojećeg problema ulažu se veliki naponi u otkrivanje novih rješenja, a upotreba bakteriocina nametnula se kao potencijalno alternativno rješenje. Postoji mogućnost da bi i korištenje bakteriocina moglo biti popraćeno razvojem otpornosti, no razumijevanje mehanizma koji dovodi do otpora omogućit će razvijanje strategija za rješavanje problema. Prednost bakteriocina je njihova niska toksičnost, potencijal, dostupnost peptida širokog i uskog spektra te mogućnost *in situ* proizvodnje (Cotter i sur., 2012).

U ovom diplomskom radu ispitivana je antibakterijska aktivnost odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline nakon čega su izdvojeni sojevi koji pokazuju najbolja antibakterijska svojstva. Antibakterijska aktivnost dokazana je metodom difuzije s dvostrukim slojem agara i metodom difuzije iz jažica u agaru. Izolirana je kromosomska DNA odabranih sojeva i provedena PCR reakcija kako bi se detektirali geni koji kodiraju za bakteriocin plantaracin korištenjem specifičnih početnica. Ispitana je i kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* s odabranim *Lactobacillus plantarum* sojevima. Korištenjem RAPD i DGGE metode provedeno je razlikovanje izolata bakterija mliječne kiseline s bakteriocinskom aktivnošću.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su gram-pozitivne, nesporigene, katalaza-negativne bakterije koje nemaju citokrom. Rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama poput mlijeka, mesa i povrća, a dio su i autohtone mikroflore gastrointestinalnog trakta sisavaca. Pojavile su se među prvim živućim organizmima na Zemlji u prijelazu između anaerobioze i aerobioze pa zahvaljujući tome sadrže proteine nužne za respiraciju kao i enzime uključene u fermentacijske procese, odnosno prilagođene su i aerobnim i anaerobnim uvjetima (Özogul i Hamed, 2018). Iako se gore navedenim karakteristikama opisuju bakterije mliječne kiseline, jedina značajka koja vrijedi za sve njih je da su gram-pozitivne bakterije dok sve ostale značajke pokazuju odstupanja ovisno o vrsti pa tako primjerice neke BMK mogu formirati citokrome i postati katalaza pozitivne ovisno o uvjetima uzgoja. Bakterijama mliječne kiseline pripadaju rodovi: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Vagococcus*.

Prema morfologiji BMK se dijele na štapiće i koke, dok prema metabolizmu na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK fermentiraju glukozu u mliječnu kiselinu, a heterofermentativne osim mliječne kiseline stvaraju i druge metabolite poput etanola, acetata i CO₂. Heterofermentativni rodovi su *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* i podgrupa iz roda *Lactobacillus* dok su ostali homofermentativni (von Wright i Axelsson, 2011).

Bakterije mliječne kiseline se u industriji najviše primjenjuju kao starter kulture te kao biokonzervansi zahvaljujući sposobnosti redukcije pH i fermentacije šećera u organske kiseline. S obzirom da zahvaljujući svojem metabolizmu proizvode različite spojeve, u prehrambenoj industriji doprinose i različitim aromama određenih proizvoda poput kefira, jogurta, maslaca itd. (Reis i sur., 2012). BMK imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) status dodijeljen od strane FDA (Food and Drug Administration), odnosno QPS (Qualified presumption of safety) status kojeg dodjeljuje EFSA (European Food Safety Authority). Druga važna primjena bakterija mliječne kiseline povezana je s pozitivnim utjecajem na zdravlje potrošača pa se BMK koriste kao probiotici. Probiotici različitim mehanizmima djeluju na patogene mikroorganizme u intestinalnom traktu: smanjuju broj živih bakterija, mijenjaju metabolizam mikroorganizma i stimuliraju imunološki sustav domaćina (Šušćković i sur., 1997). Bakterije koje se koriste kao

probiotici pozitivno djeluju kod stanja poput intolerancije na laktozu na načina da razgrađuju laktozu u mliječnu kiselinu, ublažavaju alergije, jačaju imunitet, smanjuju kolesterol, preveniraju i liječe dijareju itd.

2.1.1. Bakterijski kontaminanti u mliječnim proizvodima

Dominantni patogeni koji se mogu prenijeti u mlijeko uključuju bakterije *Listera monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Populacija koja je podložna takvim infekcijama uključuje ljude s imunodeficijencijom, trudnice, djecu i starije osobe. Iako je pasterizacija proces koji uništava navedene patogene, procesi koji slijede nakon pasterizacije mogu ponovno uzrokovati pojavu patogena (Arqués i sur., 2015). Za izbjegavanje takvih infekcija nužna je higijena od početka do kraja samog procesa.

L. monocytogenes ima širok spektar djelovanja pa tako zaraženi mogu imati blage simptome do onih ozbiljnijih uključujući bakterijemiju, meningitis te probleme u trudnoći poput preranog poroda, pobačaja ili neonatalnih infekcija. Problem kontrole kontaminacije predstavlja činjenica da *L. monocytogenes* može rasti na niskim temperaturama i održavati se u nepovoljnom okruženju. Zbog visoke stope smrtnosti listerioza je nakon salmoneloze drugi najčešći uzrok smrti povezan s trovanjem hranom u Europi (Arqués i sur., 2015).

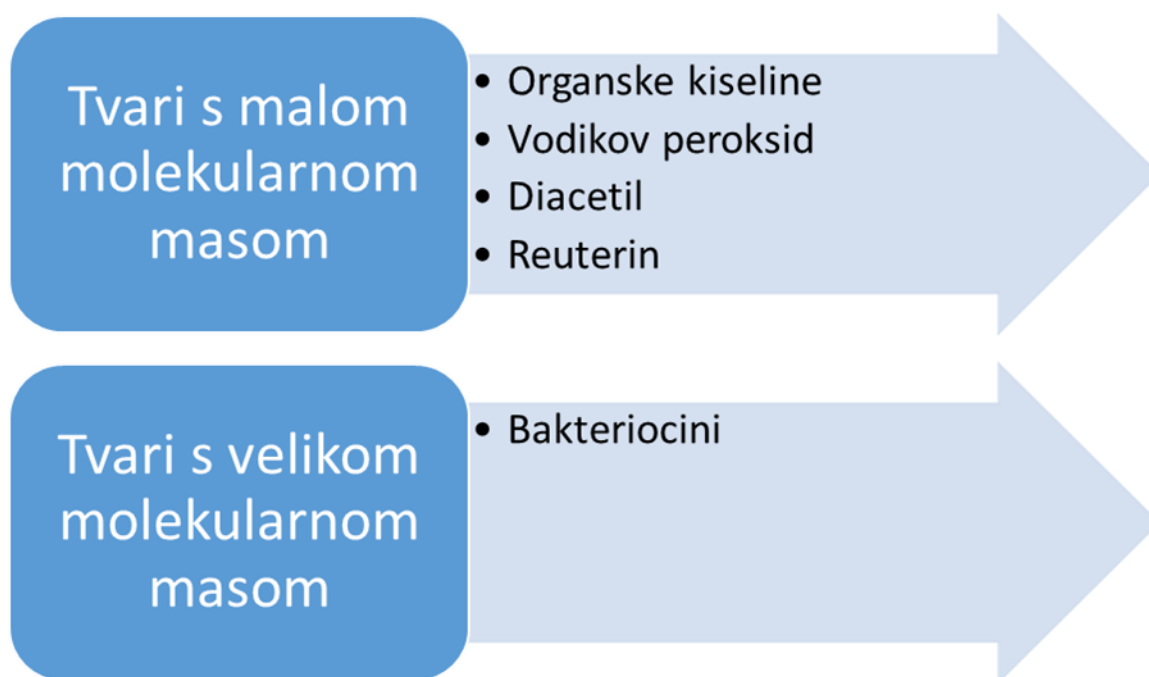
S. aureus može uzrokovati abdominalne grčeve, mučninu, dijareju i povraćanje. Najčešći uzrok stafilokokne kontaminacije je ljudski faktor no u obzir se mora uzeti i stoka koja proizvodi mlijeko ukoliko trovanje ukazuje na mlijeko i mliječne proizvode. Uzrok može biti i neadekvatno hlađenje hrane nakon termičke obrade. Stafilokokno trovanje hranom je uglavnom kratka bolest koja prolazi sama od sebe (Alagić i sur., 2015).

E. coli se može naći u mlijeku koje ne pokazuje nikakve promjene ukoliko je bakterija prisutna pa je potrebno vršiti kontrole na prisustvo.

Salmonella se uglavnom nalazi u okolišu i probavnom traktu životinja. Konzumacija zaraženih mliječnih proizvoda, mesa i jaja su najčešći uzrok salmoneloze. Salmoneloza u mliječnim proizvodima posljedica je neadekvatne pasterizacije i kontaminacije nakon procesiranja (Arqués i sur., 2015).

2.2 ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline proizvode različite antimikrobne metabolite koji se mogu podijeliti na tvari s malom molekularnom masom i tvari s velikom molekularnom masom (Şanlıbaba i Güçer, 2015). Tvari male molekulske mase imaju manje od 1000 Da dok se tvarima velike molekulske mase smatraju sve one iznad 1000 Da. Sve antimikrobne tvari koje nisu bakteriocini spadaju u grupu tvari s malom molekularskom masom (slika 1) (Šušković i sur., 2010).



Slika 1. Podjela antimikrobnih metabolita (Šušković i sur., 2010)

2.2.1. Organske kiseline

BMK proizvode organske kiseline homofermentativnim i heterofermentativnim putem. Takav okoliš s niskim pH sprječava rast i razmnožavanje mikroorganizama te tako pridonosi antimikrobnoj aktivnosti BMK. Organske kiseline imaju širok spektar djelovanja te sprječavaju rast i gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te kvasaca i plijesni. Najvažnije organske kiseline koje proizvode bakterije mliječne kiseline su mliječna i octena, a količina i vrsta kiseline koja se proizvodi tijekom fermentacije utječe na mikrobnu aktivnost (Šušković i sur., 2010). Smatra se da je mehanizam inhibicije rasta mikroorganizama povezan s nedisociranim

oblikom kiselina koji može prodrijeti u stanicu i interferirati s metabolizmom, sniziti pH, utjecati na potencijal stanične membrane i aktivni transport (Ricke, 2003; Ross i sur., 2002). BMK proizvode mliječnu kiselinu u L i D obliku. L izomer pokazuje jači inhibitorni efekt, a D oblik je toksičan za ljude pa se L oblik češće koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Papagianni, 2012). Pri niskom pH postoji velika količina nedisociranog oblika mliječne kiseline što je inhibitorno no različiti mikroorganizmi imaju različitu osjetljivost pa tako pri pH 5,0 mliječna kiselina djeluje inhibitorno prema sporogenim bakterijama, ali ne i prema kvascima i plijesnima (Şanlıbaba i Güçer, 2015). I octena i mliječna kiselina imaju sinergističko djelovanje, no octena kiselina ima jače inhibicijsko djelovanje od mliječne što se objašnjava činjenicom da je količina disocirane octene kiseline 2-4 puta veća od nedisocirane u usporedbi s mliječnom kiselinom (Šušković i sur., 1997).

2.2.2. Vodikov peroksid

BMK proizvode vodikov peroksid u prisutnosti kisika djelovanjem flavoprotein oksidaze ili NADH peroksidaze. Koncentracija vodikovog peroksida može doseći antimikrobni učinak zbog nedostatka katalazne aktivnosti bakterija mliječne kiseline (Šušković i sur., 1997). Antimikrobni učinak vodikovog peroksida posljedica je oksidacije sulfhidrilnih grupa što dovodi do denaturacije enzima i peroksidacije membranskih lipida što utječe na permeabilnost membrane. Vodikov peroksid je i prekursor u proizvodnji superoksidnog i hidroksilnog radikala što dovodi do oštećenja DNA (Byczkowski i Gessner, 1988). Nastali vodikov peroksid može inhibirati rast psihotropnih i patogenih mikroorganizama (Şanlıbaba i Güçer, 2015).

2.2.3. Diacetil

Diacetil može nastati i homolaktičnim i heterolaktičnim fermentativnim putem. Proizvodi se iz piruvata u prisutnosti limunske kiseline ili alternativno iz acetaldehida. Gram-negativne bakterije su osjetljivije na diacetil od gram-pozitivnih te se inhibicijsko djelovanje očituje kroz reakciju s arginin vezujućim proteinom. Diacetil je odgovoran za aromu mliječnih proizvoda te nastaje tijekom fermentacije kod proizvodnje maslaca, mlaćenice i nekih sireva (Şanlıbaba i Güçer, 2015). Upravo zbog karakteristične arome koju uzrokuje kao i činjenice da je potrebna velika koncentracija kako bi djelovao kao konzervans ograničena je njegova uporaba (Šušković i sur., 2010).

2.2.4. Reuterin

Reuterin se proizvodi tijekom konverzije glicerola u 1,3- propandiol te se metabolizira u specijalnom bakterijskom odjeljku. Proizvodnja se odvija pod anaerobnim uvjetima i pojačana je prisustvom glicerola. Inhibira rast rodova *Aspergillus* i *Fusarium* te ima ulogu u sprječavanju nastanka mikotoksina u fermentiranoj hrani. Djeluje na gram-negativne i gram-pozitivne bakterije, kvasce, gljive, protozoe i viruse (Şanlıbaba i Güçer, 2015).

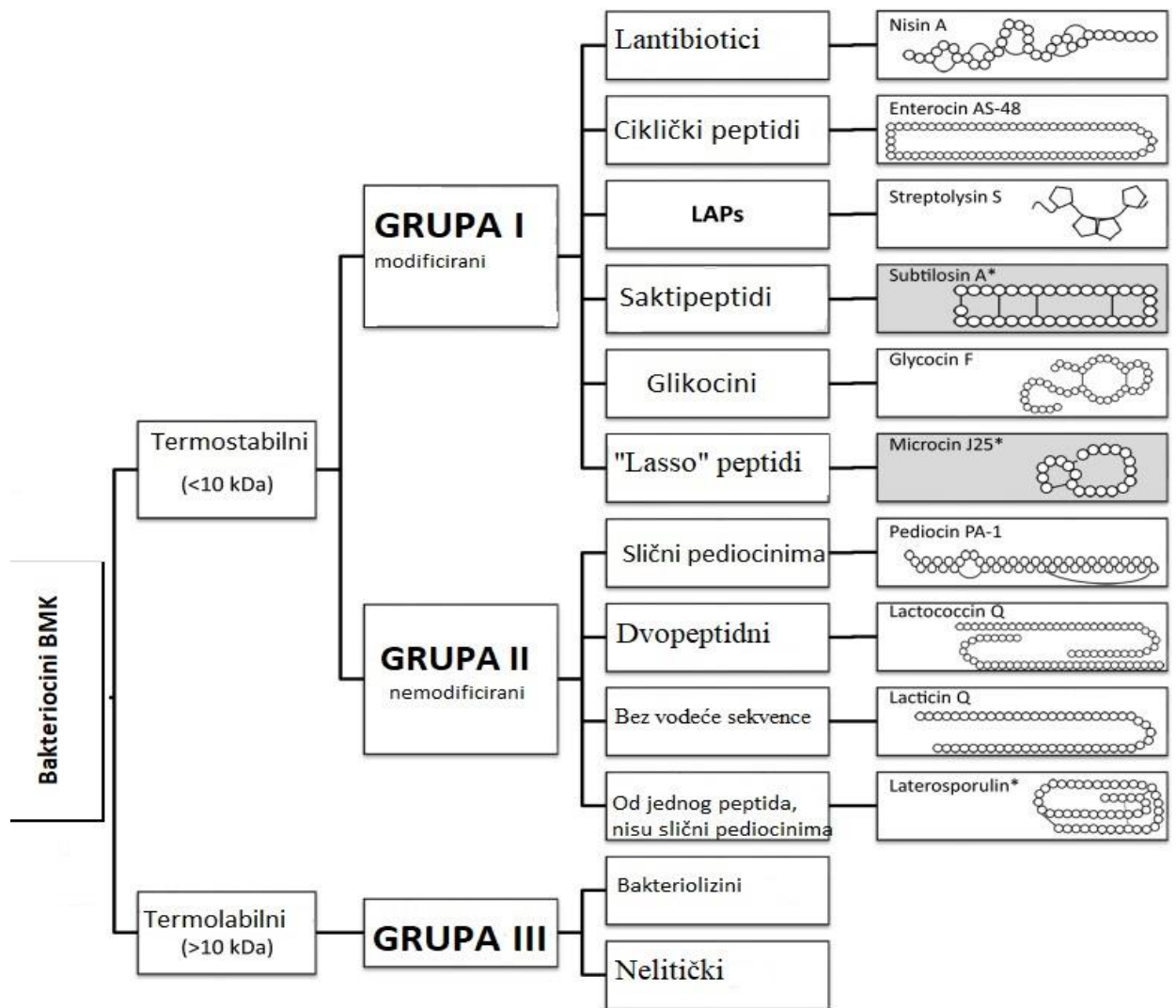
2.2.5. Bakteriocini

Bakteriocini su antimikrobni peptidi koje proizvode bakterije na ribosomima, koji mogu, ali i ne moraju imati posttranslacijske modifikacije te se izlučuju u ekstracelularni matriks. Glavna razlika između bakteriocina i antibiotika je da bakteriocini djeluju na sojeve iste ili srodne vrste dok antibiotici imaju širi spektar djelovanja i ne pokazuju prioritetni učinak prema srodnim sojevima. Osim navedenog razlika je i u tome da se bakteriocini proizvode u primarnoj fazi rasta dok su antibiotici proizvodi sekundarne faze rasta. Bakteriocini se lako razgrađuju djelovanjem proteolitičkih enzima posebice djelovanjem proteaza gastrointestinalnog trakta sisavaca zbog čega su sigurni za ljudsku uporabu (Zacharof i Lovitt, 2012).

Bakterije mliječne kiseline proizvode bakteriocine koji su mali termostabilni ili veliki termolabilni proteini ili proteinski kompleksi koji djeluju na gram-pozitivne bakterije dok su sojevi producenti imuni na vlastite bakteriocine. Proizvodnja bakteriocina ovisi o pH, izvorima nutrijenata i temperaturi inkubacije. Obično se proizvodnja bakteriocina postiže pri slabijim uvjetima od onih potrebnih za optimalan rast (Şanlıbaba i Güçer, 2015).

2.2.5.1. Podjela bakteriocina

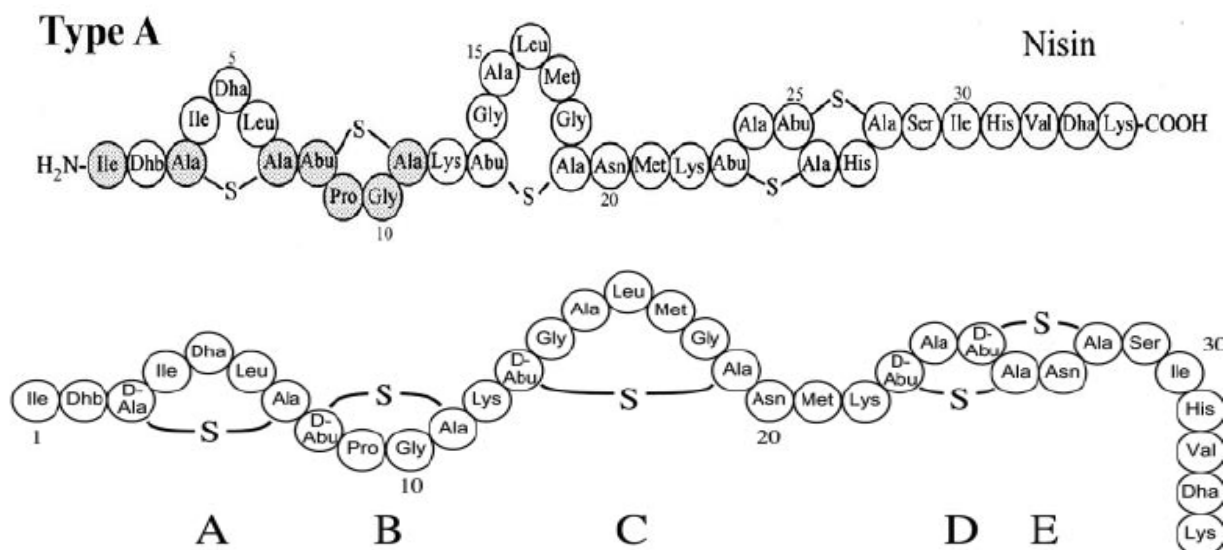
Klasifikacija bakteriocina je prikazana na slici 2 (Alvarez-Sieiro i sur., 2016). Grupu I čine lantibiotici koji su mali termostabilni peptidi od kojih je najpoznatiji nisin. Veličine su manje od 10 kDa i uključuju peptide koji se enzimski modificiraju tijekom biosinteze što rezultira molekulama koje sadrže rijetke aminokiseline i strukture koje imaju utjecaj na njihove karakteristike. Oni sadrže vodeći peptid koji služi za prepoznavanje od strane enzima i transport. Grupa I se može podijeliti na podgrupe (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).



Slika 2. Klasifikacija bakteriocina (Alvarez-Sieiro i sur., 2016)

Grupu Ia čine lantibiotici koji sadrže neobične aminokiseline poput lantionina i/ili metil lantionina. S obzirom na posttranslacijske modifikacije mogu se podijeliti na 4 tipa, no samo se tip 1 i 2 smatraju lantibioticima dok tip 3 i 4 nemaju poznatu antimikrobnu aktivnost (Alvarez-Sieiro i sur., 2016). Tip 1 čine amfifilni lantibiotici poput nisina koji su pozitivno nabijeni i djeluju na formiranje pora u bakterijskoj membrani što dovodi do trošenja membranskog potencijala (Šušković i sur., 2010).

Nisin je najpoznatiji bakteriocin kojeg proizvodi bakterija *Lactococcus lactis*. Nisin se sastoji od 34 aminokiseline i ima pentacikličku strukturu s jednim lantioninskim ostatkom i 4 β -metillantioninska ostatka. Nisin Z se razlikuje od spomenutog nisina A u jednoj aminokiselini (slika 3). Sintetizira se na ribosomima kao prekursor koji se kasnije enzimski modificira čime nastaje aktivna komponenta (Zacharof i Lovitt, 2012).



Slika 3. Struktura nisina A i nisina Z koji se razlikuju u jednoj aminokiselini na položaju 27 gdje je histidin nisina A zamijenjen aparaginom u nisinu Z (Bharti i sur., 2015)

Djeluje na širok raspon gram-pozitivnih i nešto slabije na gram-negativne bakterije, ali samo kad se koristi u visokoj koncentraciji ili kada su stanice na koje djeluje tretirane s EDTA (Şanlıbaba i Güçer, 2015). Slabija aktivnost nisina prema gram-negativnim bakterijama može se poboljšati fuzijom anti gram-negativnih peptida na nisin ili dodatkom EDTA. EDTA veže magnezijeve i kalcijeve ione na staničnu membranu čime se pojačava osjetljivost bakterija na nisin (Kaškonien i sur., 2016). Nisin je stabilan pri pH 2,0 i temperaturi od 121°C. Pod alkalnim uvjetima dolazi do gubitka aktivnosti, a kompletna inaktivacija nastupa nakon 30 minuta pri pH 11 i temperaturom od 63°C (Şanlıbaba i Güçer, 2015). Nisin formira pore u lipidnoj membrani preko interakcija s peptidoglikanskim prekursorom lipidom II. Prisutnost lipida II pojačava sposobnost nisina da depolarizira transmembranski električni potencijal i poremeti organizaciju lipidnog dvosloja kad se veže na membranu (Zacharof i Lovitt, 2012).

Grupu Ib čine glava-rep ciklizirani peptidi koje karakterizira peptidna veza između C i N terminalnog kraja zbog čega imaju ciklizirani oblik. Djeluju na dva načina, a oba uključuju formiranje pora. S obzirom da nemaju C terminalni kraj i da je vodeći peptid odsječen u zasebnom koraku ukazuje da se ciklizacija odvija tijekom transporta i uključuje ATPaznu aktivnost koja osigurava energiju za formiranje peptidne veze (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

Grupu Ic čine saktipeptidi koji sadrže intramolekulske veze između sumpora i α ugljika. Trenutno nisu nađeni saktipeptidi koje proizvode bakterije mliječne kiseline.

Grupu Id čine linearni peptidi koji sadrže azol. Pojavljuju se u raznim kombinacijama heterocikličkih prstena koji sadrže tiazol i metiloksazol; derivate cisteina, serina i treonina. Najvažniji takav peptid kojeg proizvode bakterije mliječne kiseline je streptolizin S.

Glikocini ili grupa Ie su bakteriocini koji sadrže glikozilirane ostatke. Prvi opisani glikocin kojeg proizvode bakterije mliječne kiseline je glikocin F, no mehanizam njihovog djelovanja je još uvijek relativno nepoznat (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

„Lasso“ peptidi čine grupu If. Glavna karakteristika im je pojava amidne veze između prve aminokiseline u srži peptidnog lanca i negativno nabijenog aminokiselinskog ostatka na položaju +7 do +9 čime nastaje prsten koji obuhvaća C terminalni linearni dio peptida. „Lasso“ peptidi osim antibakterijske imaju i antiviralnu te antikancerogenu aktivnost. Trenutno nije identificiran ni jedan „lasso“ peptid kojeg proizvode bakterije mliječne kiseline, ali postoje predviđanja njihovog pojavljivanja kod streptokoka (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

Grupu II čine mali, termostabilni peptidi koji nisu modificirani i ne sadrže lantibiotike. Mogu se podijeliti na 4 podgrupe. Grupu IIa čine bakteriocini slični pediocinima koji imaju široki spektar antimikrobne aktivnosti, posebice prema bakterijama iz roda *Listeria*. Ti bakteriocini imaju N terminalnu sekvencu koja sadrži 2 cisteinska ostatka, međusobno povezana disulfidnim mostom i konsenzus sekvencu Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. C terminalni kraj je manje konzerviran i uključen je u prepoznavanje određene stanice. Mehanizam djelovanja grupe IIa sastoji se od vezanja pediocina na manoznu jedinicu fosfotransferaznog sustava, ubacivanja u citoplazmatsku membranu i formiranja pora. Bakteriocini koji trebaju dva različita peptida za aktivnost čine grupu IIb, dok grupu IIc čine bakteriocini koji su sintetizirani bez vodećeg peptida na N terminalnom kraju. Jedna od karakteristika bakteriocina grupe IIc je nedostatak proteina koji osiguravaju imunitet pa je stoga i nepoznat mehanizam održavanja imuniteta prema vlastitim bakteriocinima. Grupu IId čine bakteriocini koji se sastoje od jednog peptida i nisu slični pediocinima (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

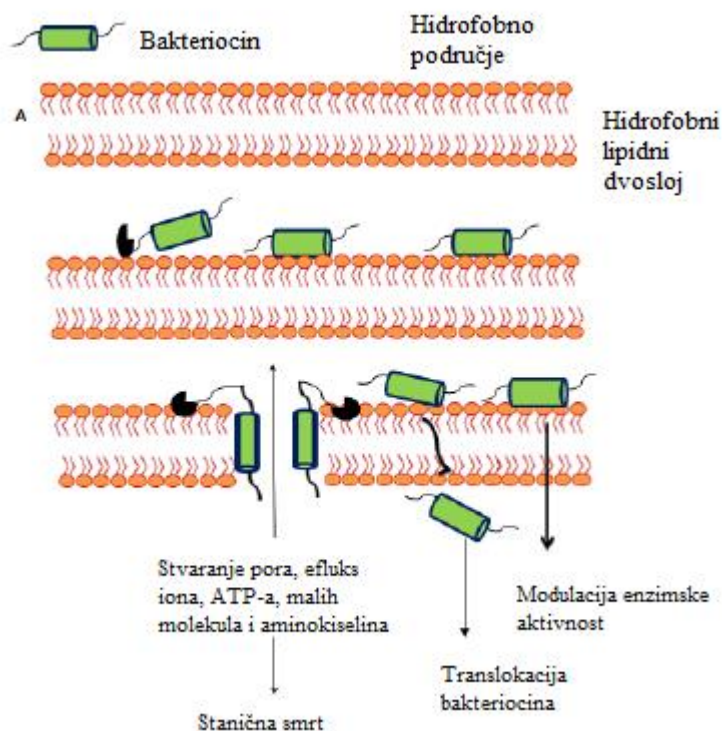
Grupu III čine veliki, termostabilni antimikrobni proteini koji se uglavnom sastoje od različitih domena. Mehanizam djelovanja obuhvaća lizu osjetljivih stanica do koje dolazi zbog kataliziranja hidrolize stanične stjenke (Alvarez-Sieiro i sur., 2016).

Neki autori navode i 4. grupu bakteriocina kojoj pripadaju kompleksni bakteriocini s komponentama poput lipida ili ugljikohidrata, no ta skupina još uvijek nije dobro definirana i zahtjeva dodatnu karakterizaciju (Šušković i sur., 2010).

2.2.5.2. *Mehanizam djelovanja bakteriocina*

Postoje dvije hipoteze o djelovanju bakteriocina. Prema prvoj mehanizam djelovanja bakteriocina uključuje adsorpciju bakteriocina na specifični ili nespecifični receptor na površini stanice što rezultira smrću stanice. Bakterije mliječne kiseline proizvode bakteriocine koji imaju bakteriocidno djelovanje koje može rezultirati lizom stanice. Primarni cilj djelovanja bakteriocina koje proizvode BMK je citoplazmatska membrana s obzirom da djeluju na način da mijenjaju permeabilnost membrane i tako utječu na transport ili proton motornu silu što dovodi do inhibicije proizvodnje energije i biosinteze proteina i nukleinskih kiselina. Takav način djelovanja je suprotan djelovanju antibiotika koji stehiometrijski inhibiraju određenu reakciju metabolizma najčešće djelovanjem nekog enzima. Molekule bakteriocina mogu stupiti u interakciju s regulatornim sustavom bakterije koji se nalazi u citoplazmatskoj membrani ciljne stanice ili su za nju vezani. Prema drugoj, manje vjerojatnoj hipotezi, bakteriocin nakon povezivanja s receptorom inducira svoje djelovanje s ekstracelularne pozicije (Šušković i sur., 1997).

Ipak opći model (slika 4) ne može točno opisati djelovanje bakteriocina BMK jer svaka skupina ima specifični cilj djelovanja preko kojeg dolazi do formiranja pora u membrani. Lantibiotici koji čine grupu I koriste lipid II kao mjesto vezanja. Lipid II služi kao transporter peptidoglikanskih podjedinica iz citoplazme do stanične stjenke pa se vezanjem lantibiotika ometa pravilna sinteza stanične stjenke. Bakteriocini grupe II imaju amfifilnu heličnu strukturu koja im omogućava umetanje u membranu što dovodi do depolarizacije i stanične smrti (Reis i sur., 2012). Grupa IIa koristi manoza permeazu PTS sustava kao specifični cilj, grupa IIb stvara kation ili anion specifične pore i tako utječe na proton motornu silu dok grupa IIc ima različite mehanizme djelovanja poput permeabilizacije membrane, inhibicije formiranja septuma i feromonske aktivnosti (do Carmo de Freire Bastos i sur., 2015). Peptidi grupe III direktno djeluju na staničnu stjenku gram-pozitivnih bakterija i tako dovode do smrti stanice (Reis i sur., 2012).



Slika 4. Opći model djelovanja bakteriocina (Bharti i sur., 2015)

2.2.5.3. Imunost na bakteriocine

Mikroorganizmi producenti razvili su mehanizam koji ih štiti od djelovanja vlastitih bakteriocina. Smatra se da je imunost rezultat sinteze određenog proteina za koji kodiraju geni u sastavu bakteriocinskog operona i / ili djelovanja ABC transportnog sustava koji uključuje 2 ili 3 podjedinice koje izbacuju bakteriocin preko membrane mikroorganizma producenta (Šušković i sur., 2010). Proteini koji osiguravaju imunost nalaze se ili na površini membrane ili su ugrađeni u membranu. Mehanizam djelovanja tih proteina uključuje inhibiciju vezanja bakteriocina za membranu ili zaštitu komponente za koju se bakteriocin treba vezati (do Carmo de Freire Bastos i sur., 2015).

Kod lantibiotika za imunost je odgovoran protein LanI koji se nalazi na citoplazmatskoj membrani i osigurava imunost soju producentu tako da sprječava formiranje pora. LanEFG ABC transportnog sustava izbacuje bakteriocine koji su prošli kroz membranu izvan stanice i tako održava koncentraciju bakteriocina ispod kritičnog nivoa (Šušković i sur., 2010).

Protein koji je odgovoran za imunost u bakteriocinim grupe II formira kompleks s bakteriocinom koji je vezan za receptor i tako sprječava uništavanje stanice. U bakteriocinima

grupe IIb takav receptor je manozna podjedinica PTS sustava. Za neke bakteriocine grupe II imunost je posljedica djelovanja metaloproteaze koja pripada Abi obitelji proteina. Proteini koji pripadaju Abi obitelji osiguravaju imunost ili degradacijom bakteriocina ili modifikacijom receptora (Kjos i sur., 2010).

2.2.5.4. Primjena bakteriocina

Prehrambena industrija je u stalnoj potrazi za novim načinima proizvodnje hrane koja je minimalno procesirana i visoke kvalitete. Posljednjih godina istraživanja su fokusirana na pronalazak alternativnih načina sprječavanja kvarenja hrane. Svjetska zdravstvena organizacija navodi da je zdravstveno opterećenje uzrokovano bolestima koje se prenose hranom usporedivo s bolestima poput HIV/AIDS, malarije i tuberkuloze. U 2010. godini procijenjena je pojava od 600 milijuna bolesti uzrokovanih hranom koje su rezultirale smrću 420 tisuća ljudi. Najčešća bolest uzrokovana hranom je dijareja (Havelaar i sur., 2015).

Bakterije mliječne kiseline se često koriste u proizvodnji i konzerviranju hrane zahvaljujući GRAS statusu. Posljedica toga je i da se i bakteriocini i drugi metaboliti BMK smatraju sigurnim. Primjena bakteriocina u prehrambenoj industriji može smanjiti uporabu kemijskih konzervansa kao i intenzitet toplinskih tretiranja što rezultira hranom koja ima bolje senzorne i nutritivne karakteristike. Bakteriocini koje proizvode BMK imaju nekoliko karakteristika zbog kojih su pogodni za korištenje kao konzervansi:

1. Inaktiviraju se proteolitičkim enzimima gastrointestinalnog trakta
2. Nisu toksični za pokusne životinje te ne uzrokuju imunološki odgovor
3. Inaktivni su prema eukariotskim stanicama
4. Termorezistentni su (nakon pasterizacije i sterilizacije zadržavaju antimikrobnu aktivnost)
5. Imaju široki spektar djelovanja na gram-pozitivne bakterije i neke gram-negativne bakterije što uključuje razne patogene. Uglavnom su to gram-negativne bakterije kojima je oštećena vanjska membrana npr. nakon osmotskog šoka, niskog pH ili zbog djelovanja detergenata
6. Genetički materijal je lociran u plazmidu zbog čega je lakše provesti genetičke manipulacije kojima se osigurava raznolikost analoga prirodnih peptida s poželjnim karakteristikama.

Primjena bakteriocina ima i mnoge koristi:

1. Omogućena je dodatna zaštita tijekom nepovoljnih temperaturnih uvjeta
2. Smanjen je rizik prenošenja patogena iz hrane kroz prehrambeni lanac
3. Smanjena je količina prehrambenog otpada kojeg uzrokuje kvarenje hrane
4. Smanjena je uporaba kemijskih konzervansa
5. Koriste se slabiji toplinski tretmani
6. Bolje su očuvane nutritivne vrijednosti hrane
7. Razvija se tržište nove hrane čime se zadovoljavaju potrebe industrije i potrošača (Reis i sur., 2012).

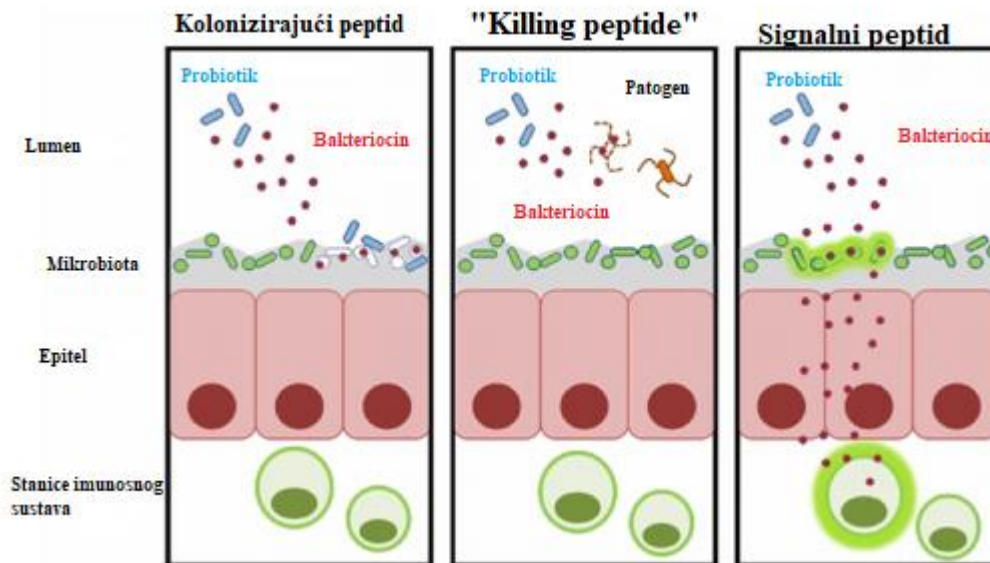
Nisin je jedini bakteriocin koji se koristi kao konzervans. Europska unija dozvoljava uporabu nisina u nekoliko kategorija – mliječni proizvodi i jaja, no zbog širokog spektra djelovanja postoji mogućnost korištenja i u mesu te voću i povrću. Uporaba nisina produljuje rok trajanja hrane jer inhibira gram-pozitivne bakterije poput onih iz rodova *Listeria*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Bacillus* i *Clostridium*. Spore su osjetljivije na nisin od vegetativnih stanica pa se nisin koristi u termalno obrađenoj hrani poput konzerviranog povrća (Kaškonić i sur., 2016).

Raširena uporaba antibiotika dovela je do sve veće otpornosti na antibiotike čime je smanjen broj opcija liječenja pojedinih bolesti. Alternativni način liječenja predstavljaju probiotici i njihovi antimikrobni metaboliti poput bakteriocina (tablica 1). Probiotici su živi mikroorganizmi koji primijenjeni u životinja ili ljudi djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture (Šušković i sur., 1997). Probiotici se dijele na funkcionalnu hranu, dodatke prehrani ili bioterapeutike. Razvija se i nova generacija probiotika koja se smatra lijekovima, a koristi se za liječenje različitih gastrointestinalnih i urogenitalnih bolesti te kao transportni sustav za cjepiva, imunoglobuline i druge terapijske proteine. Nisin ima potencijal za primjenu u liječenju čira te *Helicobacter pylori*, a u kombinaciji s antibioticima potvrđeno je i djelovanje na MRSA (metilicin rezistentni *Staphylococcus aureus*) i VRE (vankomicin rezistentni enterokok) (Šušković i sur., 2010).

Tablica 1. Usporedba antibiotika i bakteriocina (Cleveland i sur., 2001)

	Bakteriocini	Antibiotici
Primjena	Hrana	Klinička
Sinteza	Ribosomalna	Sekundarni metabolit
Aktivnost	Uski spektar	Varirajući spektar
Imunost stanica domaćina	Da	Ne
Mehanizam rezistencije ili tolerancije	Prilagodba sastava stanične membrane	Genetički prenosiva determinanta koja utječe na različita mjesta
Interakcija	„Docking“ molekule	Specifični cilj
Mehanizam djelovanja	Većinom stvaranje pora, ali u nekim slučajevima sinteza stanične stijenke	Stanična membrana ili unutarstanične mete
Toksičnost/nuspojave	Nije poznato	Da

Bakteriocini djeluju i unutar gastrointestinalnog trakta na način da doprinose funkcionalnosti probiotika tako da djeluju kao kolonizirajući peptidi koji omogućuju lakše uvođenje ili dominaciju bakterije koja proizvodi bakteriocin u gastrointestinalnom traktu (slika 5). Mogu djelovati kao antimikrobni peptidi koji izravno ubijaju druge bakterije, kao signalni peptidi kroz „quorum sensing“ ili kao signalne stanice imunološkog sustava domaćina. Bakteriocini mogu inhibirati konkurentne ili patogene sojeve ili modulirati sastav mikrobiote i imunološki sustav domaćina (Arqués i sur., 2015).



Slika 5. Prikaz mehanizma preko kojeg bakteriocini pridonose funkcionalnosti probiotika (Dobson i sur., 2012)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korišteni su autohtoni sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz tradicionalno proizvedenih fermentiranih proizvoda bez dodatka starter kultura, kao što su svježi sir, dimljeni svježi sir, sušeni svježi sir, fermentirano mlijeko, kiseli kupus, silaža te majčino mlijeko i dvije vrste komercijalnih sojeva test-mikroorganizma, prikazani u tablici 2. 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 2. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu, prirodna niša iz koje su izolirani i optimalni uvjeti uzgoja

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Izvor	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus pentosus</i>	D3	Dimljeni sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D4	Dimljeni sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D5	Dimljeni sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D7	Dimljeni sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Enterococcus durans</i>	D8	Dimljeni sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus casei</i>	D10	Dimljeni sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus fermentum</i>	D12	Dimljeni sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D13	Dimljeni sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	SF9C	Kiseli kupus	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	SF15C	Kiseli kupus	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MM2	Majčino mlijeko	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MM4	Majčino mlijeko	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MM23	Majčino mlijeko	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	L3	Silaža	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	A7	svježi sir	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	/	HB, 37°C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC19111	/	HB, 37°C, aerobno

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće podloge:

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. 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) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test – mikroorganizama

- BHI (Brain heart infusion) agar sastava (g/l destilirane vode): infuzije telećeg mozga i govedeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- BHI bujon je istog sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.
- HA (hranjivi agar) sastava (g/l destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao podloga hranjivi agar, ali bez dodatka agara.

c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju test–mikroorganizma *Staphylococcus aureus*

- BP (baird-Parker) agar sastava (g/l destilirane vode): pepton od kazeina 10; goveđi ekstrakt 5; kvašćev ekstrakt 1; natrijev piruvat 10; litijev klorid 5; glicin 12; agar 17. pH podloge je 6,8, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta. Nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 5% emulzije telurita i žumanjka.

d) selektivna hranjiva podloga za izolaciju test-mikroorganizma *Listeria monocytogenes*

- ChromoBio® Listeria agar sastava (g/l destilirane vode): peptoni 34; glukoza 2; mineralne soli 15,5; natrijev piruvat 2; L- α -fosfatidilinositol 2; kromogeni supstrat 0,05; antibiotici 0,17; amfotericin B 0,01; puferi 3,5; agar 13. pH podloge je 6,8. 35 g podloge se resuspendira u 400 ml destilirane vode i zagrije, uz često miješanje, do vrenja. Nakon toga se provodi sterilizacija pri 121°C tijekom 15 minuta, a nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 100 ml tekućeg dodatka i jedna bočica selektivnog dodatka.

e) hranjiva podloga za kultivaciju staničnih linija

- Reduced Serum Medium 1x (MEM) medij za kultivaciju Caco-2 stanične linije (Gibco)

3.1.3. Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- Akrilamid/bisakrilamid, „Sigma“, SAD
- amonij-perokosodisulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- Dcode dye solution „BioRad“, SAD
- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan
- etanol, 70% „Kemika“, Hrvatska
- etanol, apsolutni, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- Formamid „BioRad“, SAD
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- izopropranol, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska

- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- početnice „Invitrogen“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- TAE „BioRad“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletlen), „Sigma“, SAD
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- Triton X, „AppliChem“, Njemačka
- Urea „BioRad“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

3.1.4. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- DGGE system, „BioRad“, SAD
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- elektroforetska kadica, „Bio-Rad“, SAD
- ependorfice
- epruvete
- Erlenmayer tikvice
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija

- Mikrotitarske pločice (s 96 i 24 jažice)
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio- Rad“, SAD
- Petrijeve zdjelice
- pinceta
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- T-boca
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT, Izrael
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Sutjeska“
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80°C u hranjivom bujonu s 15% (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u tablici 2.

3.2.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara (“Agar-spot-test metoda”)

Ova metoda se koristi za testiranje antagonističkog međudjelovanja bakterija mliječne kiseline. Kultura bakterije, čija se antibakterijska aktivnost ispituje, nacijepi se u obliku kapi (5 µL) na de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar hranjivu podlogu u dvije paralele i inkubira anaerobno na 37°C dok se ne razviju kolonije (18-24 h). Petrijeve zdjelice, na kojima su izrasle kolonije, se u jednoj paraleli preliju s 10 mL hranjivog „soft-agara“ (0,8% agara), koji sadrži 250 µL suspenzije test-mikroorganizma *Listeria monocytogenes* ATCC19111, a u drugoj paraleli s 10 mL Brain Heart Infusion (BHI) soft agra (s 0,7% agara), inokuliranog s 250 µL

suspenzije test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048. Inkubacija traje 24 sata pri 37°C. Nakon inkubacije se izmjere promjeri porasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID) te se izračuna efektivni inhibicijski odnos (EIR) (Coeuret i sur., 2004).

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

Ovisno o dobivenim vrijednostima, rezultati se interpretiraju prema slijedećem:

EIR < 0,5 → slaba inhibicija

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

EIR > 1,5 → jaka inhibicija

3.2.3. Priprava supernatanta kultura za određivanje antibakterijske aktivnosti

Prekonoćne kulture odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline se centrifugiraju pri 9000 o/min tijekom 5 minuta te se dobiveni supernatant koristi za ispitivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije iz jažica u agaru (3.2.4.).

3.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije iz jažica u agaru

Antimikrobno djelovanje odabranih sojeva BMK prema patogenim test-mikroorganizmima podrijetlom iz hrane (*Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC19111) ispitano je metodom difuzije u agar, na krutim hranjivim podlogama (Šušковиć i Kos, 2007). Otopljena hranjiva podloga Brain Heart Infusion (BHI) agar (1,5% agara) za *Staphylococcus aureus* 3048 i hranjivi agar (1,5% agara) za *Listeria monocytogenes* ATCC19111), ohlađena na 50°C, nacijepi se s 150 µL prekonoćno uzgojenih kultura test-mikroorganizama i izlije u Petrijeve zdjelice. Nakon skrtnjavanja podloge se izbuše „rupice“ u agaru pomoću bušača, promjera 8 mm, u koje se dodaje 50 µL pojedinih uzoraka bakterija mliječne kiseline (3.2.3.). Tako pripremljene Petrijeve ploče se stavljaju na 4°C tijekom 3 sata, s ciljem bolje difuzije supernatanta u podlogu prije početka rasta bakterijskih kultura, a zatim na inkubaciju u termostat na 37°C tijekom 24 sata (Brkić, 1995). Nakon toga slijedi mjerenje zona inhibicije.

3.2.5. Izolacija kromosomske DNA

Volumen od 1,5 ml odabranih prekonocnih kultura *Lb. plantarum* (D13, SF9C, SF15C) s najboljim antibakterijskim djelovanjem (3.2.2, 3.2.3., 3.2.4.) se centrifugira i ispiru u GTE puferu (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500 μ L GTE pufera, uz dodatak lizozima (8 mg/500 μ L) i RNA-ze (50 μ L/mL), i inkubiraju 30 minuta pri 37°C. Zatim se doda 250 μ L 2% SDS-a i vorteksira 1 min. Nakon toga se doda 100 μ L neutralnog fenol-kloroforma, vorteksira 30 sekundi i centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Supernatant, bez interfaze, se pomiješa s 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8), i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) slijedi centrifugiranje na 13 000 o/min tijekom 10 minuta. Talog se resuspendira u 300 μ L 0,3 M NaAc i 10 mM MgCl₂ i vorteksira. Nakon dodatka 700 μ L apsolutnog etanola (ohlađenog na -20°C), uzorak se inkubira preko noći pri -20°C. Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 14000 o/min tijekom 20 minuta. Talog se suspendira u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na -20°C) i ponovno centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Talog DNA se resuspendira u 50 μ L TE (10mM Tris (pH 7,8) i 1mM EDTA) pufera, a koncentracija DNA se izmjeri pomoću BioSpec Nano uređaja, pri čemu je kao slijepa proba korišten TE pufer.

3.2.6. PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) sa specifičnim početnicama za bakteriocin plantaricin

Umnažanje DNA molekule PCR metodom je provedeno u DNA-termobloku, Mastercycler personal, "Eppendorf". Kao DNA-kalup korištena je cjelokupna DNA, izolirana kao što je to opisano u poglavlju 3.2.5. Za sintezu željenog fragmenta DNA korištene su oligonukleotidne početnice konstruirane za gene, koji kodiraju za različite bakteriocine, prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Početnice korištene u PCR reakcijama za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocin-plantaricin

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	320 bp	Diep i sur., (1996); Remiger i sur., (1996)
<i>plnEF</i>	Plantaricin EF	GGCATAGTTAAAA TTCCCCC	CAGGTTGCCGCAA AAAAAG	428 bp	Anderssen i sur., (1998); Diep i sur., (1996)
<i>plnJ</i>	Plantaricin J	TAACGACGGATTG CTCTG	AATCAAGGAATTA TCACATTAGTC	475 bp	Anderssen i sur., (1998); Diep i sur., (1996)
<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	Stephens i sur., (1998)
<i>plnW</i>	Plantaricin W	TCACACGAAATAT TCCA	GGCAAGCGTAAG AAATAAATGAG	165 bp	Holo i sur., (2001)

Sastav reakcijske smjese volumena 50 μ L je prikazan u tablici 4. Kao negativna kontrola je korištena PCR reakcijska smjesa bez DNA kalupa. PCR reakcije su provedene prema uvjetima kako je opisano u literaturi navedenoj u tablici 3 uz svaku početnicu.

Nakon reakcije, 20 μ L reakcijske smjese je nanešeno na 1% agarozni gel i elektroforeza je provedena u kadici za elektroforezu pri naponu od 190 V. Nakon provedene elektroforeze, gel je 30 minuta inkubiran u otopini etidijevog bromida, koncentracije 0,5 μ g/mL te zatim osvijetljen ultraljubičastim svjetlom u transiluminatoru i snimljen pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije

Sastojci reakcijske smjese	Volumen
EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix)	25 μ L
Kalup (DNA)	2 μ L
Početnica 1	0,1 μ L
Početnica 2	0,1 μ L
dH ₂ O	22,8 μ L
UKUPAN VOLUMEN:	50 μL

3.2.7. Kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija s odabranim *Lb. plantarum* sojevima primjenom Caco-2 stanične linije

Ispitivanje kompetitivne ekskluzije *in vitro* provedeno je na Caco-2 staničnoj liniji (kontinuiranoj staničnoj liniji heterogenih ljudskih tumorskih stanica kolorektalnog epitela) prema Goh i sur. (2009). Stanice Caco-2 stanične linije uzgojene su u minimalnom esencijalnom mediju (eng. MEM-minimum essential medium) u T-boci volumena 25 cm³ i održavane su pri 37°C i 5%-tnoj atmosferi CO₂ u minimalnom esencijalnom mediju s dodatkom 10% (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (56°C tijekom 30 min). Stanice su čuvane u opisanim uvjetima, a svaka 2 dana im je dodan svježi medij. Za ispitivanje kompetitivne ekskluzije stanica bakterija mliječne kiseline, Caco-2 crijevne epitelne stanice su inokulirane u plastičnim pločicama s 24 jažice u koncentraciji od 1 · 10⁵ stanica/mL i inkubirane tjedan dana uz izmjenu medija svaka 2 dana. Prije primjene, Caco-2 stanice su isprane 3 puta fosfatnim puferom. Prekonočne kulture odabranih sojeva BMK su uzgojene anaerobno pri 37°C u MRS bujonu, a potom je provedeno centrifugiranje pri 4200 g tijekom 10 min s ciljem uklanjanja viška hranjive podloge da se spriječi mogući negativni učinak niskih pH vrijednosti ili izvanstaničnih proteina u supernatantu kulture. *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *S. aureus* 3048 se uzgoje u BHI bujonu pri 37°C i aerobnim uvjetima. Centrifugiranje je provedeno na isti način kao kod BMK. Biomasa stanica indikatorskih bakterija te BMK je resuspendirana u fiziološkoj otopini i izmjerena je optička gustoća tako priređene suspenzije pri A₆₂₀ u mikrotitarskoj pločici. Talog stanica je zatim resuspendiran u odgovarajućim volumenima medija kako bi se dobio OD=1.

Ispitan je utjecaj predinkubacije BMK na adheziju patogenih bakterija na Caco-2 stanice. Caco-2 epitelne stanice su isprane 3 puta u fosfatnom puferu (pH=7,4) te je u jažicu dodano 1 mL suspenzije bakterija mliječne kiseline. Stanice su inkubirane 30 min pri 37°C. Nakon inkubacije, Caco-2 stanice su isprane fosfatnim puferom te je u jažice dodano 1 mL suspenzije patogenih bakterija, nakon čega je nastavljena inkubacija pri 37°C. Jažice su nakon inkubacije isprane 3 puta s 1 mL PBS-a s ciljem uklanjanja bakterijskih stanica koje se nisu adhezirale te je provedena inkubacija 10 min u 0,05% (v/v) u otopini Triton X-100 koji odljepi Caco-2 crijevne epitelne stanice od podloge, a uz Caco-2 stanice odljepi i one stanice koje su se adhezirale na njih. Sadržaj svake jažice je prebačen u epicu i provedeno je centrifugiranje 5 min. Potom je talog stanica resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera u mikrotitarskim pločicama, a broj adheziranih stanica je određen indirektnom metodom, nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica na odgovarajuću podlogu u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon inkubacije od 48 h pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po mililitru uzorka. Za određivanje broja bakterija prije i nakon adhezije, korištene su selektivne podloge: ALOA agar za *L. monocytogenes* ATCC 19111 i Baird-Parker agar za *S. aureus* 3048. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta.

3.2.8. Razlikovanje odabranih izolata BMK s bakteriocinskom aktivnošću primjenom RAPD (eng. Random Amplified Polymorphic DNA) metode

DNA izolirana iz odabranih sojeva *Lb. plantarum* s potencijalnom bakteriocinskom aktivnošću je poslužila kao kalup za RAPD reakciju (Leboš Pavunc i sur., 2012) koja je provedena u DNA-termobloku, Mastercyclerpersonal, "Eppendorf". Reakcijska smjesa se sastojala od DNA, početnica 2A (5'-ACGAGGCAC-3') i 2B (5'-ACGCGCCCT-3') (Jarocki i sur., 2010), EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix - (2x Premix) (Takara, Japan) i vode (Takara, Japan). Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica korišten je uzorak bez DNA. Reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u tablici 5, nakon čega su dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 200 V tijekom 1 sata. Gel je obojan u etidijevom bromidu i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture.

Tablica 5. Uvjeti provođenja PCR reakcije s 2A i 2B početnicama za RAPD

Broj ponavljanja	T [°C]	vrijeme	Korak
1	94	5 min	Inicijalna denaturacija
40	94	30 s	Denaturacija
	36	30 s	Sparivanje
	72	2 min	Polimerizacija
1	72	10 min	završna elongacija

3.2.9. Razlikovanje odabranih izolata BMK s bakteriocinskom aktivnošću primjenom elektroforeze u denaturirajućem gradijentu - DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Nakon izolacije kromosomske DNA odabranih *Lb. plantarum* sojeva provedene prema standardnoj metodi opisano pod točkom 3.2.5., provedena je PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) reakcija za DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) s univerzalnim bakterijskim početnicama HDA1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') i HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') u uvjetima prikazanim u tablici 5. U reakcijskoj smjesi se uz DNA i početnice nalazio i EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix - (2x Premix) (Takara, Japan) i voda (Takara, Japan). Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica korišten je uzorak bez DNA. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD). Dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 200 V. Gel je obojan u etidijevom bromidu i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 6. Uvjeti provođenja PCR reakcije s univerzalnim HDA1 i HDA2 početnicama za DGGE

Broj ponavljanja	T (°C)	Vrijeme	Korak
1	95	3 min	inicijalna denaturacija
35	95	30 s	Denaturacija
	58	30 s	Sparivanje
	72	40 s	Polimerizacija
1	72	5 min	završna elongacija

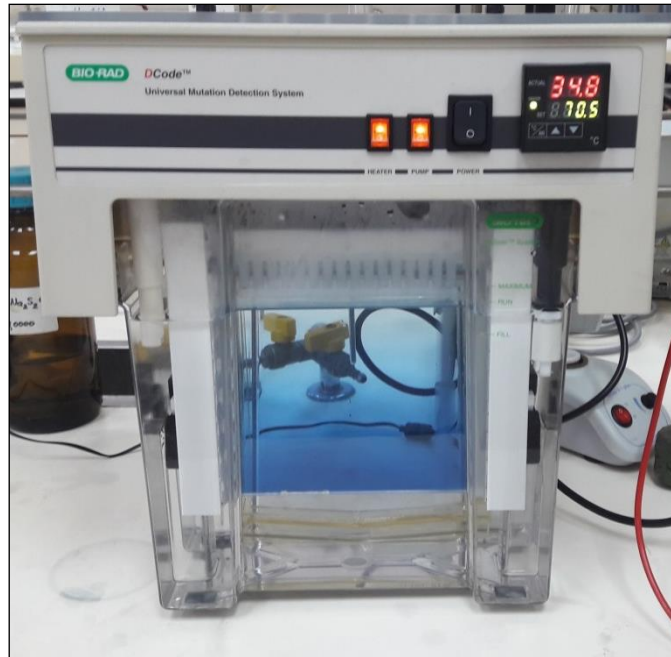
Nakon utvrđivanja prisutnosti PCR produkata provedena je DGGE elektroforeza na poliakrilamidnom gelu gradijenta denaturirajućeg agensa 30-70% koji je pripremljen miješanjem reagensa prema proračunu za različite gradijente kako je prikazano u tablici 7. Ukupni volumen 100%-tne i 0%-tne otopine je izračunat zbrajanjem potrebnog volumena tih otopina prema željenom gradijentu (postotku) kako je prikazano u tablici 8. Neposredno prije nanošenja gela u suspenziju je dodano 130 μL APS-a (stock 0,1 g/mL) i 5,8 μL TEMED-a (BioRad, SAD). U suspenziju gela višeg postotka dodana je plava boja Dcode „dye solution“ (100 μL na 5mL-300 μL) (BioRad, SAD) kako bi se te dvije suspenzije razlikovale. Kao uzorci su korišteni PCR produkti svakog soja, a kao standard združeni sojevi *L. brevis* SF9B i *L. plantarum* D13. Nanošenje uzoraka je započelo pri 58°C, a sama elektroforeza je započela pri 60°C. DGGE elektroforeza se prvih 10 minuta provodila pri 30 V kako bi se uzorci spustili na dno jažica, a nakon toga 1 sat pri 220 V (slika 6). Nakon završene elektroforeze gel je obojan u etidijevom bromida koncentracije 0,5 $\mu\text{g/mL}$ i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 7. Prikaz proračuna reagenasa potrebnih za dobivanje gela različitog gradijenta

PRIPREMA GELA ZA DGGE (volumena 34 mL)				
REAGENS	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	100 %	0 %
Urea (BioRad, SAD)		7 M	7,14 g	/
Formamid (BioRad, SAD)		40 %	6,8 mL	/
TAE (BioRad, SAD)	50x	1x	340 μL	34 μL
Akriamid/bisakrilamid (Sigma, SAD)	40 %	8 %	3,4 mL	3,4 mL
Voda			Nadopuniti do ukupnog volumena	
UKUPNI VOLUMEN			17 mL	17 mL

Tablica 8. Prikaz potrebnih volumena otopina za dobivanje željenog gradijenta gela (30 i 70 %)

Volumen 100 %	Volumen 0%	%	Ukupni volumen
5,1	11,9	30	17
11,9	5,1	70	17



Slika 6. Prikaz aparature za provođenje DGGE elektroforeze

4. REZULTATI I RASPRAVA:

4.1. Odabir sojeva sa bakteriocinskom aktivnosti, detekcija gena koji kodiraju za bakteriocine, te kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija

Bakterije roda *Lactobacillus* nalaze se u različitim ekološkim nišama. Osim što nastanjuju gastrointestinalni trakt, usnu šupljinu, urogenitalni trakt i kožu izolirane su i iz biljaka i tla, a u velikom broju su prisutne u fermentiranim mliječnim proizvodima. S obzirom da su najčešći uzročnici kvarenja hrane *L. monocytogenes* i *S. aureus*, a bakterije mliječne kiseline posjeduju različita antimikrobna svojstva, ispitan je njihov utjecaj na rast navedenih patogena. Korištenjem metode s dvostrukim slojem agara (tablica 9) i difuzije s rupama u agaru (tablica 10) dobiveni su podatci o inhibiciji rasta *L. monocytogenes* i *S. aureus*. Najuspješnije su rast patogena inhibirali sojevi vrste *L. plantarum*, D13, SF9C i SF15C, a inhibicija je bila podjednaka za oba patogena. *Lactobacillus plantarum* je dominantna bakterijska vrsta u povrću poput kupusa i salate. Komparativna istraživanja probiotika pokazuju da *L. plantarum* ima najširi spektar antimikrobnog djelovanja (Dinev i sur., 2017). Spektar antimikrobnog djelovanja ovisi o soju kao i o vrsti patogena (Arena i sur., 2016).

Tablica 9. Rezultati inhibicije rasta test-mikroorganizama *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC19111, izraženi kao promjeri porasle kulture BMK (CD), promjeri zone inhibicije (ID) i efektivni inhibicijski odnos (EIR), dobiveni metodom s dvostrukim slojem agara

Sojevi BMK	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111			<i>Staphylococcus aureus</i> 3048		
	CD	ID	EIR	CD	ID	EIR
<i>L. pentosus</i> D3 (dimljeni sir)	0,8 cm	1,5 cm	0,875	0,8 cm	2,2 cm	1,75
<i>L. plantarum</i> D4 (dimljeni sir)	0,8 cm	1,5 cm	0,875	0,8 cm	2,1 cm	1,625
<i>L. plantarum</i> D5 (dimljeni sir)	0,8 cm	2,0 cm	1,5	0,8 cm	2,3 cm	1,875
<i>L. plantarum</i> D7 (dimljeni sir)	0,8 cm	1,75 cm	1,1875	0,8 cm	2,2 cm	1,75
<i>Enterococcus durans</i> D8 (dimljeni sir)	0,8 cm	1,5 cm	0,875	0,8 cm	2,4 cm	2

<i>L. casei</i> D10 (dimljeni sir)	0,8 cm	1,55 cm	0,9375	0,8 cm	2,4 cm	2
<i>L. fermentum</i> D12 (dimljeni sir)	0,8 cm	1,85 cm	1,3125	0,8 cm	2,3 cm	1,875
<i>L. plantarum</i> D13 (dimljeni sir)	0,8 cm	2,2 cm	1,75	0,8 cm	2,5 cm	2,125
<i>L. plantarum</i> SF9C (kiseli kupus)	0,8 cm	2,4 cm	2	0,8 cm	2,1 cm	1,625
<i>L. plantarum</i> SF15C (kiseli kupus)	0,8 cm	2,3 cm	1,875	0,9 cm	2,3 cm	1,55
<i>L. plantarum</i> MM2 (majčino mlijeko)	0,8 cm	1,8 cm	1,25	0,8 cm	1,7 cm	1,125
<i>L. plantarum</i> MM4(majčino mlijeko)	0,8 cm	1,8 cm	1,25	0,8 cm	1,5 cm	0,875
<i>L. plantarum</i> MM23(majčino mlijeko)	0,8 cm	1,8 cm	1,25	0,8 cm	1,7 cm	1,125
<i>Enterococcus faecium</i> L3(silaža)	0,8 cm	1,2 cm	0,5	0,8 cm	2,2 cm	1,75
<i>Enterococcus faecium</i> A7(svježi sir)	0,8 cm	0 cm	0	0,8 cm	1,8 cm	1,25

Tablica 10. Promjeri zona inhibicije rasta test-mikroorganizama *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC19111 dobiveni sa supernatantima kultura bakterija mliječne kiseline metodom difuzije s rupama u agaru

Sojevi BMK	<i>Staphylococcus aureus</i> 3048	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19111
<i>Lactobacillus pentosus</i> D3 (dimljeni sir)	1,20 cm	1,30 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i> D4 (dimljeni sir)	1,50 cm	1,40 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i> D5 (dimljeni sir)	1,60 cm	1,40 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i> D7 (dimljeni sir)	1,60 cm	1,45 cm
<i>Enterococcus durans</i> D8 (dimljeni sir)	1,60 cm	1,40 cm
<i>Lactobacillus. casei</i> D10 (dimljeni sir)	1,55 cm	1,40 cm
<i>Lactobacillus fermentum</i> D12 (dimljeni sir)	1,30 cm	1,40 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i> D13 (dimljeni sir)	1,60 cm	1,60 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i> SF9C (kiseli kupus)	1,20 cm	1,20 cm

<i>Lactobacillus plantarum</i> SF15C(kiseli kupus)	1,30 cm	1,60 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i> MM2 (majčino mlijeko)	1,20 cm	1,30 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i> MM4 (majčino mlijeko)	1,20 cm	1,25 cm
<i>Lactobacillus plantarum</i> MM23 (majčino mlijeko)	1,20 cm	1,25 cm
<i>Enterococcus faecium</i> L3 (silaža)	1,60 cm	1,50 cm
<i>Enterococcus faecium</i> A7 (svježi sir)	1,10 cm	1,10 cm

Nakon što je BioSpec Nano uređajem određena koncentracija DNA odabranih sojeva (tablica 11), provedena je PCR reakcija kojom je utvrđena prisutnost bakteriocina (tablica 12). Gen za plantaracin A, EF i J detektiran je u odabranim sojevima. S obzirom da su sve kontrole negativne isključena je mogućnost kontaminacije uzorka i dimerizacije početnice čime se potvrđuje uspješnost testa.

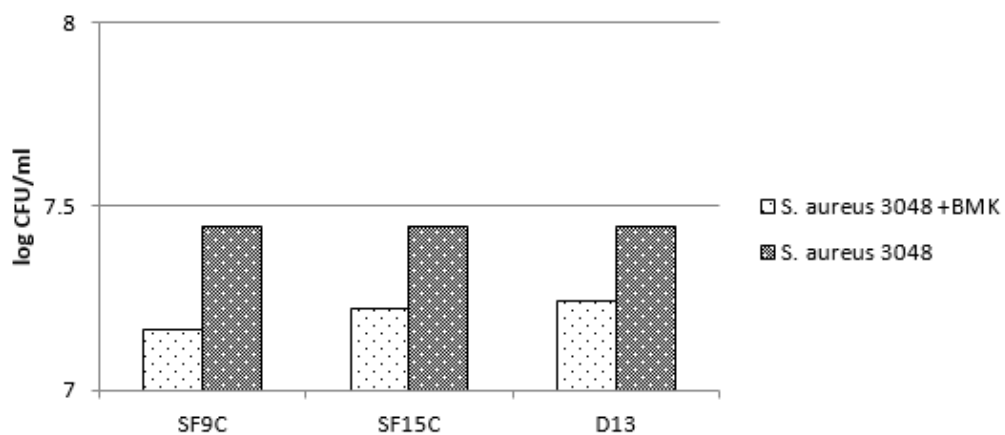
Tablica 11. Prikaz rezultata mjerenja koncentracije s BioSpec Nano uređajem

Soj	Koncentracija DNA (ng/ μ L)
<i>Lactobacillus plantarum</i> D13	157,49 ng/ μ L
<i>Lactobacillus plantarum</i> SF9C	38,89 ng/ μ L
<i>Lactobacillus plantarum</i> SF15C	66,20 ng/ μ L

Tablica 12. Usporedba rezultata dobivenih nakon provođenja PCR reakcija za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocine (Pln – plantaricin); + detektiran gen za bakteriocin; - nije detektiran gen za bakteriocin; / reakcija nije provedena

Soj:	Pln A	PlnEF	PlnJ	PlnNC8	PlnS	PlnW
<i>L. plantarum</i> D13	+	+	+	-	-	-
<i>L. plantarum</i> SF9C	+	+	+	-	-	-
<i>L. plantarum</i> SF15C	+	+	+	-	-	-
Kontrola	-	-	-	-	-	-

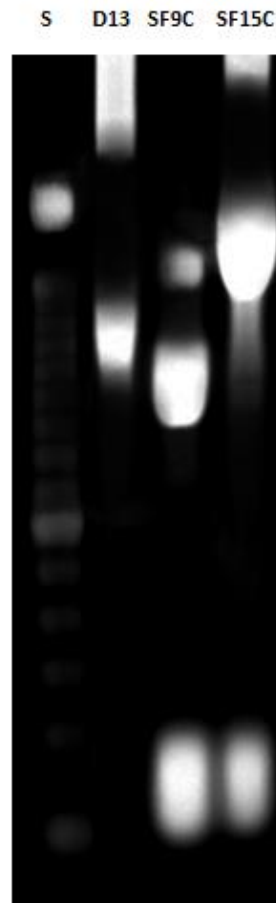
Zbog mogućnosti vezanja probiotičkih bakterija na epitelne stanice blokirana je adhezija patogena, a takav učinak rezultat je natjecanja probiotičke bakterije i patogena za receptor (Oelschlaeger, 2010). Istraživanja pokazuju da sposobnost adhezije pojedinog soja varira i da ne ovisi o vrsti i domaćinu te da neki *Lactobacillus* i *Lactococcus* sojevi izolirani iz mlijeka pokazuju sposobnost adhezije kao i oni izolirani iz crijeva (Todoriki i sur., 2001). Ispitana je kompetitivna ekskluzija potencijalno patogenih gram-pozitivnih bakterija *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048 sa sojevima producentima bakteriocina: *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus plantarum* SF15C. Rezultati prikazani na slici 7, pokazuju da svi ispitani sojevi producenti bakteriocina inhibiraju adheziju *S. aureus* 3048 na Caco-2 crijevne epitelne stanice. Ren i sur. (2012) u istraživanju adhezije različitih *Lactobacillus* sojeva na Caco-2 stanice utvrđuju da *L. plantarum* ima najveću sposobnost adhezije. Međutim, ispitivani sojevi s bakteriocinskom aktivnošću nisu imali utjecaja na adheziju *L. monocytogenes* ATCC 19111 na Caco-2 crijevne epitelne stanice (rezultat nije prikazan).



Slika 7. Kompetitivna ekskluzija *S. aureus* 3048 s predinkubiranim sojevima producentima bakteriocina (*L. plantarum* SF9C, *L. plantarum* SF15C i *L. plantarum* D13)

4.2. Razlikovanje odabranih sojeva BMK s bakteriocinskom aktivnošću primjenom RAPD i DGGE metode

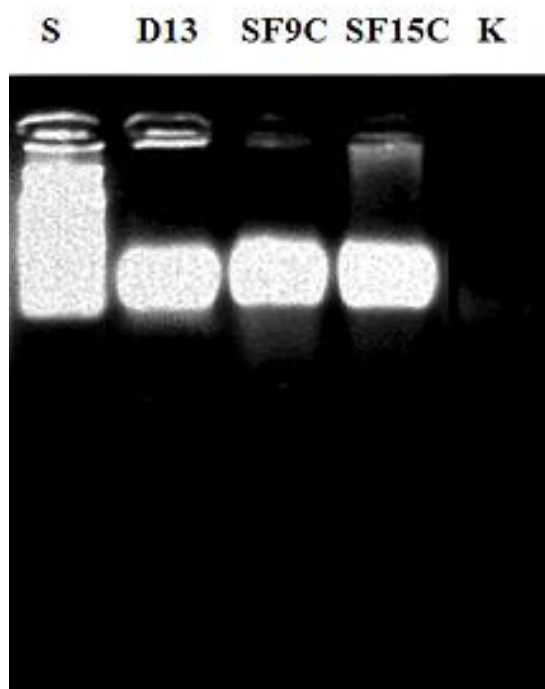
Provedeno je razlikovanje odabranih *Lb. plantarum* (D13, SF9C, SF15C) sojeva s najboljim antibakterijskim djelovanjem (3.2.2., 3.2.3. i 3.2.4.) primjenom RAPD metode (slika 8).



Slika 8. Elektroforeza produkata dobivenih RAPD metodom s 2A i 2B početnicama. D13-*Lactobacillus plantarum* D13, SF9C-*Lactobacillus plantarum* SF9C, SF15C-*Lactobacillus plantarum* SF15C.

RAPD metoda odnosno metoda nasumično umnožene polimorfne DNA koristi se za utvrđivanje srodnosti organizama. Nakon PCR reakcije i utvrđivanja uspješnosti procesa pomoću negativne kontrole rađena je elektroforeza u 1% agaroznom gelu. Iz gela je vidljivo da su odabrani sojevi srodni s obzirom da imaju vrpce na sličnim mjestima.

Provedeno je razlikovanje odabranih *Lb. plantarum* (D13, SF9C, SF15C) sojeva sa najboljim antibakterijskim djelovanjem (3.2.2., 3.2.3. i 3.2.4.) primjenom DGGE metode. Prije provođenja DGGE elektroforeze, provedena je provjera prisutnosti produkata PCR reakcije s univerzalnim HDA1/HDA2 početnicama. Rezultati na slici 9 potvrđuju prisutnost PCR produkata za sve ispitivane *Lactobacillus plantarum* sojeve. Kod negativne kontrole, koja ne sadrži DNA, na gelu nije vidljiva vrpca što je dokaz da dobivene DNA vrpce kod ispitivanih bakterijskih vrsta nisu produkt dimerizacije početnica HDA1/HDA2. Zatim su isti uzorci analizirani DGGE elektroforezom koja omogućava razlikovanje bakterija na razini vrste. DGGE elektroforeza je provedena na gelu gradijenta denaturirajućeg agensa 30-70% (slika 10). Kao standard su korišteni sojevi *L. brevis* SF9B (donja DNA vrpca) i *L. plantarum* D13 (gornja DNA vrpca).



Slika 9. Elektroforeza PCR produkata u agaroznom gelu, umnoženih specifičnim PCR HDA1/HDA2 početnicama: S-standard (*Lactobacillus plantarum* D13, SF9C-*L. plantarum* SF9C), SF15C-*L. plantarum* SF15C, K–negativna kontrola.



Slika 10. DNA fragmenti sojeva bakterija mliječne kiseline nakon provedene DGGE elektroforeze na 30-70% gelu: S-standard (*L. brevis* SF9B i *L. plantarum* D13), SF9C-*L. plantarum* SF9C, SF15C-*L. plantarum* SF15C, D13-*L. plantarum* D13

Nakon PCR reakcije i elektroforeze kojom je utvrđena uspješnost PCR reakcije napravljena je DGGE elektroforeza na gelu gradijenta denaturirajućeg agensa. S obzirom da nam DGGE metoda omogućuje razlikovanje bakterijskih vrsta unutar istog bakterijskog roda kao standard uzeti su *L. plantarum* i *L. brevis*. Iz slike vidljivo je da ispitivani sojevi pripadaju *L. plantarum* vrsti s obzirom da svi imaju na istom mjestu vrpce kao i kontrolni uzorak *L. plantarum* D13 dok ni jedan soj ne pokazuje vrpce na istom mjestu kao i *L. brevis* SF9B kontrolni uzorak.

5. ZAKLJUČCI

1. Od ispitivanih sojeva, primjenom metode s dvostrukim slojem agara i difuzije u agaru, najjače antimikrobno djelovanje prema patogenima *S. aureus* i *L. monocytogenes* dokazano je za sojeve *L. plantarum* D13, SF9C i SF15C.
2. PCR reakcijom dokazana je prisutnost gena koji kodiraju za planaracin A, EF i J kod sojeva *Lactobacillus plantarum* izoliranih iz dimljenog sira i kiselog kupusa. Nije dokazana prisutnost planaracina NC8, S i W.
3. Kompetitivnom ekskluzijom dokazano je da ispitivani sojevi utječu na adheziju *S. aureus* dok nemaju utjecaja na *L. monocytogenes*.

6. LITERATURA

Alagić, D., Smajlović, M., Članjak, E., Čaklović, K. (2015) *Staphylococcus aureus* – patogen prenosiv hranom, 1. izd., Veterinarski fakultet Sarajevo, Sarajevo.

Alvarez – Sierio, P., Montalbán-López, M., Dongdong, M., Kuipers, O. (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2939-2951.

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

Arena, M.P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., Fiocco, D. (2016) Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2016.00464

Arques, J., Rodriguez, E., Langa, S., Landete, J. M., Medina, M. (2015) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *Biomed. Res. Int.* **2015**, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/58418>

Bharti, V., Mehta, A., Singh, S., Jain, N., Ahirwal, L., Mehta, S. (2015) Bacterion: A novel approach for preservation of food. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**, 20-29.

Brkić B., (1995) Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline, Magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Byczkowski, J. Z., Gessner, T. (1988). Biological role of superoxide ion-radical. *Int. J. Biochem.* **20**, 569-580.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1-20.

Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J. P. (2004) *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J. Dairy Res.* **71**, 451-460.

Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2012) Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 95-105.

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

Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., Stoyanova, A. (2017) Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: A review. *Bulg. J. Vet. Med.* doi: 10.15547/bjvm.1084

Do Carmo de Freire Bastos, M., Lívio Varella Coelho, M., Cabral da Silva Santos, O. (2015) Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology.* **161**, 683-700.

Dobson, A, Cotter, P., Paul Ross, R., Hill, C. (2012) Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1-6.

Goh, Y. J., Azcarate-Peril, M. A., O'Flaherty, S., Durmaz, E., Valence, F., Jardin, J., Lortal, S., Klaenhammer, T. R. (2009) Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3093-3105.

Havelaar, A., Kirk, M., Torgerson, P., Gibb, H., Hald, T., Lake, R., Praet, N., Bellinger, D., de Silva, N., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F., Devleeschauwer, B. (2015) World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* **12**, doi: 10.1371/journal.pmed.1001923

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

Jarocki, P., Podleśny, M., Waśko, A., Siuda, A., Targoński, Z. (2010) Differentiation of Three *Lactobacillus rhamnosus* Strains (E/N, Oxy, and Pen) by SDS-PAGE and Two-Dimensional Electrophoresis of Surface-Associated Proteins. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20** (3) 558–562.

Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbiraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., Malakauskas, M., Maruška, A. (2016) Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 1323-1335.

Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I., Diep, D. (2010) The Abi proteins and their involvement in bacteriocin self-immunity. *J. Bacteriol.* **8**, 2068- 2076.

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

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

Oelschlaeger, T.A. (2010) Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57-62.

Özogul F., Hamed I. (2018) The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 1660-1670.

Papagianni, M. (2012) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, e201210003, <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201210003>

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., Penna, A. L. B. (2012) Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Eng. Rev.* **4**, 124-140.

Remiger A., Ehrmann M. A., Vogel R.F. (1996) Identification of bacteriocin genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). *Syst. Appl. Microbiol.* **19**, 28–34.

Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Li, X., Tian, M., Du, S., Guo, H., Liu, C., Zhu, N., Sun, D., Li, Y., Jin, N. (2012) Inhibition of *Staphylococcus aureus* adherence to Caco-2 cells by lactobacilli and cell surface properties that influence attachment. *Anaerobe.* **18**, 508-515.

Ricke, S. C. (2003) Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sci.* **82**, 632-639.

Ross, R. P., Morgan, S., Hill, C. (2002) Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* **79**, 3-16.

Şanlıbaba, P., Güçer, Y. (2015) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *J. Int. Sci. Publ. Agric. Food.* **3**, 451-457.

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

Šuškováć, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 296-307.

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

Šuškováć, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo.* **47**, 57-73.

Tambić – Andrašević, A. (2007) Otpornost bakterija na antibiotike – vodeći problem u 21. stoljeću. *Medicina 2007.* **43**, 7-14.

Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S., Toba, T. (2001) Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by Lactobacillus strains. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 154-159.

Von Wright, A., Axelsson, L. (2012) Lactic acid bacteria: An introduction. U: Lactic acid bacteria – microbiological and functional aspects, (Lahtinen, S., Salminen, S., Ouwehand, A., von Wright, A., ured.), Taylor & Francis, Boca Raton, str.6.

Zacharof, M. P., Lovitt, R. W. (2012) Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article. *APCBEE Proc.* **2**, 50-56.

Izjava o izvornosti

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

Valentina Obadić

Ime i prezime studenta