

# Bakteriocinska aktivnost bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

---

Horvat, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:621020>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Maja Horvat**  
7377/BT

**BAKTERIOCINSKA AKTIVNOST BAKTERIJA  
MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOG  
MLIJEKA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** Ovaj završni rad izrađen je u sklopu projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos.

**Mentor:** Prof. dr. sc. *Blaženka Kos*

**Zagreb, 2020.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Bakteriocinska aktivnost bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka**

*Maja Horvat, 7377/BT*

**Sažetak:** Mnogi sojevi bakterija mliječne kiseline proizvode antimikrobne metabolite kao što su organske kiseline, ali i antimikrobni peptidi koji se nazivaju bakteriocini s potencijalom primjene u terapijske svrhe i kao biokonzervansi. Stoga je cilj ovog završnog rada bio metodičkim pristupom provesti izolaciju bakterija mliječne kiseline iz majčinog mlijeka i utvrditi njihovu bakteriocidnu aktivnost. Sojevi koji pokazuju bakteriocidno djelovanje detektirani su pomoću PCR reakcije sa specifičnim početnicama, a prisutnost bakteriocidnih proteina potvrđena je agaroznom gel elektroforezom amplifikacijskih produkata dobivenih PCR metodom. Pažljivo odabrani sojevi, koji pokazuju bakteriocidno djelovanje, imaju potencijalno antimikrobno djelovanje protiv humanih patogena, što doprinosi ograničavanju upotrebe antibiotika, a bakteriocini koje proizvode imaju potencijal primjene kao biokonzervansi u svrhu zaštite hrane.

**Ključne riječi:** antibakterijska aktivnost, bakterije mliječne kiseline, bakteriocini

**Rad sadrži:** 37 stranica, 4 slika, 6 tablica, 115 literaturnih navoda, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23,  
10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Pomoć pri izradi:** mag. ing. Martina Banić

**Datum obrane:** srpanj, 2020.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor Thesis**

**University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology**

**Bacteriocin activity of lactic acid bacteria isolated from breast milk**

***Maja Horvat, 7377/BT***

**Abstract:** Many strains of lactic acid bacteria produce antimicrobial metabolites such as organic acids, but also antimicrobial peptides called bacteriocins with the potential for use for therapeutic purposes and as biopreservatives. Therefore, the aim of this final work was to use a methodical approach to isolate lactic acid bacteria from breast milk and to determine their bactericidal activity. Strains showing bactericidal activity were detected by PCR reaction with specific primers, and the presence of bactericidal proteins was confirmed by agarose gel electrophoresis of amplification products obtained by PCR method. Carefully selected strains, which show bactericidal activity, have potential antimicrobial activity against human pathogens, which contributes to limiting the use of antibiotics, and the bacteriocins they produce have the potential to be used as biopreservatives for food protection purposes.

**Keywords:** antibacterial activity, lactic acid bacteria, bacteriocins

**Thesis contains:** 37 pages, 4 figures, 6 tables, 115 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Technical support and assistance:** mag. ing. Martina Banić

**Defence date:** July, 2020.

## **SADRŽAJ**

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1 Općenito o bakterijama mliječne kiseline .....	2
2.2 Općenito o bakteriocinima.....	3
2.3 Klasifikacija bakteriocina .....	4
2.3.2 Mehanizam djelovanja .....	6
2.3.3 Sinergističko djelovanje bakteriocina.....	6
2.3.4 Biosinteza bakteriocina .....	7
2.3.5 Antimikrobni spektar .....	7
2.3.6 Toksičnost i nuspojave .....	8
2.3.7 Potencijalna primjena bakteriocina .....	8
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1 MATERIJALI.....	13
3.1.1 Mikroorganizmi .....	13
3.1.2 Hranjive podloge.....	14
3.1.3 Kemikalije .....	14
3.1.4 Aparatura i pribor.....	14
3.2 METODE RADA .....	15
3.2.1 Čuvanje i održavanje bakterijskih sojeva .....	15
3.2.2 Detekcija gena za bakteriocine polimeraznom lančanom reakcijom (engl. Polymerase chain reaction, PCR).....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	17
5. ZAKLJUČCI .....	24
6. LITERATURA.....	25

## 1. UVOD

Uporaba kemikalija u prehrambenim proizvodima može dovesti do promjene sastava, nutritivnih i organoleptičkih svojstava te takvi proizvodi mogu biti toksični za ljudsku uporabu. Zbog toga, sve je veća potražnja potrošača za hranom koja ne sadrži kemikalije. Uporaba prirodno proizvedenih spojeva kao što su biokonzervansi, odnosno molekula koje posjeduju antimikrobnu aktivnost ima velik značaj u prehrambenoj industriji (Vandana i sur., 2016).

Mnogi mikroorganizmi proizvode važne metabolite kao što su kiseline, alkoholi, ali i različiti antimikrobni peptidi koji se nazivaju bakteriocini. Bakteriocini su ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi ili složeni proteini koje izlučuju različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Brojni bakteriocini koriste se u borbi protiv ljudskih i životinjskih patogena te kao konzervansi u hrani zbog mogućnosti smanjenja mikrobioloških kvarenja i očuvanja hrane bez ometanja rasta ostalih bakterijskih populacija (Varish i sur., 2016).

U ovom završnom radu izolirani su sojevi bakterija mliječne kiseline (BMK) iz majčinog mlijeka. Sojevi koji imaju potencijalno bakteriocidno djelovanje detektirani su pomoću PCR reakcije sa specifičnim početnicama. Pažljivo odabrani sojevi, koji pokazuju bakteriocidno djelovanje, imaju potencijalno antimikrobno djelovanje u borbi protiv humanih patogena, što doprinosi ograničavanju upotrebe antibiotika, a bakteriocini koje proizvode imaju potencijal primjene kao biokonzervansi u svrhu zaštite hrane.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Općenito o bakterijama mliječne kiseline

BMK pripadaju skupini Gram-pozitivnih bakterija koje ne sporuliraju. Najčešće su okruglastog (koki) ili štapičastog (bacili) oblika i katalaza-negativne te se ubrajaju u anaerobne ili fakultativno anaerobne organizme (Kaban i Kaya, 2008). BMK su stabilne pri niskim pH vrijednostima, a njihova kultivacija je složena jer zahtjeva prisutnost posebnih nutritivnih sastojaka i specifične uvjete. Optimalan rast BMK postiže se pri pH 5,5 – 5,8, a hranjiva podloga mora sadržavati specifične aminokiseline, peptide, nukleotidne baze, vitamine, minerale, masne kiseline i ugljikohidrate (Khalid, 2011). Za identificiranje pojedinog soja BMK koriste se fenotipske metode, a u novije vrijeme sve više se koristi molekularna tehnika 16 rDNA sekvencioniranja i djelomično sekvencioniranje gena rDNA pomoću lančanih reakcija polimerizacije (Khalid, 2011). BMK sadrže nizak udio G + C baza, nepokretne su i stanična dioba se javlja u jednoj ravnini (König i Fröhlich, 2009).

BMK karakterizira proizvodnja mliječne kiseline kao glavnog produkta fermentacije, dok pojedine vrste uz mliječnu kiselinu sintetiziraju i bakteriocine, vodikov peroksid i diacetile, koji se mogu upotrijebiti kao inhibitori rasta nepoželjnih mikroorganizama (Alakomi i sur., 2000). Prema produktima koji nastaju fermentacijom ugljikohidrata, BMK dijelimo na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK iz šećera proizvode samo mliječnu kiselinu, dok heterofermentativne uz glavni produkt fermentacije šećera, mliječnu kiselinu, proizvode i octenu kiselinu, alkohole, ugljikov dioksid te bakteriocine (Mokoena i sur., 2016).

BMK se nalaze u raspadnom biljnom materijalu, voću, mliječnim proizvodima, fermentiranom mesu i ribi, žitaricama, repi, kiselom povrću, krumpiru, kiselom tijestu, silaži, fermentiranim pićima, sokovima te u tijelu ljudi i životinja. Kod ljudi nastanjuju oralnu šupljinu, ileum, debelo crijevo i dominantni su organizmi u vagini (Todorov, 2009; Djadouni i Kihal, 2012).

Klasifikacija BMK vrši se na temelju stanične morfologije, način fermentacije glukoze, raspona temperature rasta i fermentacije šećera (Quinto i sur., 2014). BMK pripadaju koljenu *Firmicutes*, razredu *Bacilli* i redu *Lactobacillales* (Quinto i sur., 2014). Rodovi BMK uključuju *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Aloiococcus*, *Carnobacteriub*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Khalid, 2011).

BMK se koriste u fermentaciji hrane jer poboljšavaju okus i teksturu fermentiranim prehrambenim proizvodima (Hati i sur., 2013). Neki izolati roda *Lactobacillus* s bakteriocinskom aktivnošću, koriste se za očuvanje hrane i suzbijanje patogenih mikroorganizama kod ljudi (Parada i sur., 2007). Također, neki autori navode da neke vrste BMK imaju sposobnost inhibicije rasta patogenih mikroorganizama, sposobnost razgradnje mikotoksina te probiotičku i antimikrobnu aktivnost (Todorov, 2009).

Neke BMK koriste se kao probiotici jer poboljšavaju zdravlje ljudi i životinje, a često se koriste u proizvodnji fermentirane hrane ili kao nutritivni dodaci koji sadrže žive bakterije koji pomažu u očuvanju i izgradnji crijevne mikroflore (Hati i sur., 2013). Da bi se neki organizam mogao smatrati probiotikom, on mora biti nepatogen, smatrati se sigurnim, biti tolerantan na nizak pH i visoku koncentraciju konjugiranih i nekonjugiranih žučnih soli, te ga imunski sustav ne smije prepoznati kao strano tijelo, odnosno, njegova prisutnost ne smije rezultirati proizvodnjom antitijela (Hoffman i sur. 2008). Također, probiotički organizmi ne smiju sadržavati gene za rezistenciju na antibiotike. FDA je osnovala regulatorno tijelo za proizvodnju probiotika te njihovo označavanje i sigurnost. Probiotici se mogu koristiti kao lijekovi ili biološki proizvodi, dijetalni dodaci, hrana ili prehrambeni sastojci i medicinska hrana (Hoffman i sur. 2008). U Europi, prisutnost probiotika u hrani nije regulirana, ali se reguliraju mikrobnim dodacima za hranu procjenom njihove sigurnosti na ljudima i životinjama (EFSA, 2007). FAO i WHO surađuju u uspostavljanju smjernica za probiotike u hrani (Pineiro i Stanton, 2007).

## **2.2 Općenito o bakteriocinima**

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi ili složeni peptidi koje sintetiziraju neki mikroorganizmi, uključujući BMK, a nastaju kao primarni metaboliti (Parada i sur., 2007; Zacharof i Lovitt, 2012). Bakteriocini se razlikuju prema spektru aktivnosti, načinu rada, djelovanju, molekulskoj masi, genetičkom podrijetlu i biokemijskim svojstvima (Parada i sur., 2007). Mjesto djelovanja bakteriocina je bakterijska citoplazmatska membrana. Bakteriocini ciljano napadaju membranske vezikule mijenjajući im naboj. Bakteriocini inhibiraju rast organizama koji se nalaze u njihovoj neposrednoj blizini, što ponekad uključuje i druge poželjne starter kulture, a može doći i do gubitka njihove aktivnosti prilikom inhibicije Gram-negativnih patogena. Istraživanja su potvrdila da uporaba heterofermetabilnih *Lactobacillus* vrsta u proizvodnji sira smanjuje udio tehnološki štetnih mikroorganizama koji negativno utječu na kvalitetu, sigurnost i rok trajanja proizvoda (Aljewicz i Cichosz, 2017). BMK i bakteriocini koje proizvode, mogu se koristiti kao biokonzervansi u raznim prehrambenim proizvodima i mogu biti učinkoviti u borbi protiv



ljudskih patogena (Parada i sur., 2007). FDA odobrila je upotrebu samo dva bakteriocina; nisina i pediocina (Parada i sur., 2007).

### **2.3 Klasifikacija bakteriocina**

Bakteriocini se klasificiraju na temelju njihove primarne strukture, molekulske težine, posttranslacijskih modifikacija i genetskih karakteristika. Ne postoji univerzalno usvojena klasifikacija, ali izvorno su priznata četiri razreda (Abee i sur., 1994). Ovaj sustav klasifikacije omogućuje razvrstavanje nerazvrstanih bakteriocina na temelju prisutnosti specifičnih aminokiselinskih motiva, a do danas na temelju ovog sustava razvrstano je više od 70% poznatih bakteriocina (Zouhir i sur., 2010)

#### **2.3.1.1 Bakteriocini klase I**

Bakteriocini klase I su mali peptidi koje nazivamo još i lantibiotici. Njihova molekularna masa je manja od 5 kDa i sadrže 19 – 37 aminokiselina u peptidnom lancu. Naziv lantibiotici dolazi zbog prisutnosti neuobičajenih aminokiselina lantionina i metil - lantionina koji se nalaze u primarnoj strukturi peptidnog lanca (Bierbaum i Sahl, 2009). Gen *lanC* kodira sintezu enzima LanC ciklaze koja katalizira formiranje lantionina i metil lantionina ciklizacijom cisteina u 2,3-dehidnoalanin i (Z)-2,3-dehidrobutirin (McAuliffe i sur., 2001). Ovi bakteriocini su posttranslacijski modificirani, toplinski stabilni i djeluju na kostur stanične stijenke peptidoglikana (González-Martínez i sur., 2003). Poznato je oko 60 lantibiotika, a 30% je izolirano iz BMK (Bierbaum i Sahl, 2009). Bakteriocine klase I dijelimo u dvije podklase:

Bakteriocini podklase Ia su pozitivno nabijeni i djeluju antimikrobno tako što stvaraju pore u staničnoj membrani. Najpoznatiji bakteriocin ove skupine je nisin (McAuliffe i sur., 2001; Deegan i sur., 2006).

Bakteriocinima podklase Ib pripadaju laktocin 481, citolizin i slinaricin. Globularnog su oblika te nisu nabijeni ili je neto naboj negativan. Njihovo djelovanje se očituje inhibicijom enzima koji sudjeluju u osnovnim životnim procesima bakterija (Deegan i sur., 2006).

#### **2.3.1.2 Bakteriocini klase II**

Bakteriocini klase II su toplinski stabilni peptidi, molekularne mase manje od 10 kDa. Njihova izoelektrična točka varira između 8,3 – 10,0 i karakterizira ih prisutnost hidrofilne N – terminalne skupine koja sadrži točno određen redoslijed aminokiselina TyrGly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys (Drider i sur., 2006). Bakteriocini klase II se dijele u tri podklase:

Bakteriocini podklase IIa su antilisterijski, a u njih se ubrajaju leukocin A, acidocin A (Ennahar i sur., 2000), mezentracin, pediocin PA-1 i sakacin P (Venema i sur. 1997). Oko 50 vrsta bakteriocina klase IIa izolirano je iz mesa, fermentiranog povrća, mliječnih proizvoda, dimljenog lososa i ljudskog gastrointestinalnog trakta (Zacharof i Lovitt, 2012)

Bakteriocini podklase IIb zahtijevaju sinergističku aktivnost dva različita peptida kako bi pokazali antimikrobno djelovanje. Primjer bakteriocina koji djeluju na ovaj način su plantaricin A i enterocin X (Zacharof i Lovitt, 2012). Ovi peptidi imaju malu ili nikakvu aktivnost testirani pojedinačno, a dodavanjem komplementarnog peptida njihova aktivnost se pojačava (Gong i sur., 2009). Pojedinačni peptidi sadrže amfifilne i hidrofobne regije i većinom su pozitivno nabijeni. Geni koji kodiraju dva različita peptida nalaze se pod kontrolom istog operona (Diep i sur., 2009).

Bakteriocini koji pripadaju skupini IIc su mali, toplinski stabilni peptidi koji se dijele u dvije skupine: tiobiotike i cistibiotike. Tiobiotici su bakteriocini s dva cisteinska ostatka, dok su cistiobiotici bakteriocini s jednim cisteinskim ostatkom. Reprezentativni primjeri ove skupine bakteriocina su laktokokcin A, divergicin A i acidocin B.

#### **2.3.1.3 Bakteriocini klase III**

Bakteriocini klase III su veliki peptidi čija molekularna masa iznosi više od 30 kDa i toplinski su nestabilni. Ovoj skupini pripadaju bakteriocini poput zoocina A, lizostafina, helveticina J i helveticina V. Bakteriocine ove skupine dijelimo na litičke i nelitičke (Joerger i Klaenhammer, 1986). Litički bakteriocini su endoplazmatski peptidi koji enzimski liziraju staničnu stijenkku bakterija. Osim litičkih, otkriveni su i nelitički bakteriocini kao što su helveticin J izoliran iz *Lactobacillus helveticus* 481, disgalakticin izoliran iz *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* W2580 i streptokokcin A-M57 (Joerger i Klaenhammer, 1986). Istražen je način djelovanja disgalakticina i zaključeno je da ovaj bakteriocin ometa transport ili metabolizam glukoze tako što se veže na fosfoenolpiruvat o kojem ovisi fosfotransferazni transportni put glukoze i manoze (Joerger i Klaenhammer, 1986).

#### **2.3.1.4 Bakteriocini klase IV ili složeni bakteriocini ili ciklički bakteriocini**

Bakteriocini klase IV su složeni bakteriocini koji u svojoj strukturi sadrže lipidne ili ugljikohidratne dijelove te su zbog toga osjetljivi na djelovanje glikolitičkih ili lipolitičkih enzima. Ovoj skupini pripadaju bakteriocini kao što su plantaricin S i leukonocin S (Lewus i Montville, 1991). Također, iz *Streptococcus uberis*, izolirana je nova ciklička supstanca slična bakteriocinu; uberolizin (Wirawan i sur., 2007).

### 2.3.2 Mehanizam djelovanja

Bakteriocini različitih klasa imaju različite mehanizme djelovanja protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Najčešće mijenjaju integritet stanične stijenke, inhibiraju sintezu proteina ili nukleinskih kiselina (Cascales i sur., 2007). Bakteriocini se vežu na komponente stanične stijenke kao što su lipidi specifičnim ili nespecifičnim vezanjem na receptor. Vezanje bakteriocina omogućuje stvaranje pora ili direktnu lizu stanica što rezultira staničnom smrću uslijed gubitka proton motorne sile bakterijskog sustava (Clardy i sur., 2006).

Bakteriocini klase I se vežu na specifične molekule, najčešće lipid II, koji je glavni transporter peptidoglikanskih podjedinica od citoplazme do stanične stijenke i na taj način sprječavaju preciznu sintezu stanične stijenke. Ugradnjom bakteriocina u staničnu stijenku dolazi do nastajanja pora nakon čega slijedi smrt stanice (Hsu i sur., 2004). Bakteriocin klase I nisin napada citoplazmatsku membranu Gram-negativnih bakterija, a učinkovitost mu pojačava dodatak etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) zbog svojstva vezanja metalnih iona u staničnoj stijenci. Bakteriocini podklase Ib razlikuju se po svojoj rigidnoj, globularnoj strukturi pa se njihov mehanizam djelovanja temelji na inhibiciji sinteze DNA/RNA/proteina ili stanične stijenke elektrostatskim vezanjem na membranu i/ili membranske komponente kao što je manoza fosfatazni sustav (Abee i sur., 1994; Deegan i sur., 2006).

Bakteriocini klase II zahvaljujući amfipatskoj spiralnoj strukturi, umetnuti u membranu ciljne molekule, permeabiliziraju i depolariziraju membranu uslijed propuštanja iona i/ili smanjenja koncentracije unutarstaničnog ATP-a (Bendali i sur., 2008). Mersacidin ubija i Gram-pozitivne bakterije inhibirajući sintezu stanične stijenke, a njegova *in vivo* aktivnost povećava se prisutnošću kalcijevih iona (Bottiger i sur., 2009). Bakteriocini klase III, bakteriolizini, hidroliziraju staničnu stijenku ciljne stanice (Johnsen et al., 2004). Tako npr. peticin ubija Gram-negativne bakterije *Yersinia* spp. i *Escherichia coli* razgradnjom stanične stijenke, dok lakticin 3147 ubija bakteriju *Listeria monocytogenes* inhibicijom sinteze stanične stijenke i formiranjem pora (Cascales i sur., 2007). Ovi primjeri pokazuju da svaka klasa bakteriocina ubija Gram-pozitivne i -negativne bakterije na različite načine (Cascales i sur., 2007).

### 2.3.3 Sinergističko djelovanje bakteriocina

U posljednje vrijeme, sinergističko djelovanje bakteriocina opisali su mnogi istraživači. Ettayebi i sur. (2000) istražili su sinergističko antibakterijsko djelovanje nisina Z i timola protiv *Listeria monocytogenes* i *Bacillus subtilis*. Nadalje, opisan je primjer sinergističkog

djelovanja laktina 3147 s polimiksinom B i polimiksinom E protiv *Cronobacter* i *E. coli* (Ramakrishnan i sur., 2012). Lebel i sur. (2013) opisali su sinergiju nisina i antibiotika (penicilin, amoksicilin, tetraciklin, streptomycin) u borbi protiv svinjskog patogena *Streptococcus suis* serotype 29, kao i nisina i cefriaksona, nisina i cefotaksima, nisina i ampicilina te nisina i EDTA protiv *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Singh i sur., 2013). Sinergističko djelovanje nisina i  $\beta$  – laktamskih antibiotika povećava permeabilizaciju i inhibiciju sinteze DNA/RNA/proteina (Naghmouchi i sur., 2013).

#### **2.3.4 Biosinteza bakteriocina**

Bakteriocini se sintetiziraju u inaktivnom obliku. Inaktivni bakteriocinski prekursori (probakteriocini) imaju C – terminalnu propeptidnu domenu i N – terminalnu ekstenziju (Nes i sur., 1996) koja se prepoznaje po glicinskim ostacima (Cintas i sur., 1997). Odcjepljivanjem N – terminalne skupine, bakteriocin postaje biološki aktivan peptid (Martin i sur., 2007). Bakteriocine karakterizira prisutnost samozaštitnog motiva u obliku dvostrukog glicina na C – terminalnom kraju koji pomaže peptidu da se transportira izvan stanice pomoću ABC transportnog sustava. Bakteriocinu 31 i enterocinu P nedostaje motiv dvostrukog glicina pa se oni transportiraju općim sekretornim putem (Ennahar i sur., 2000). Tijekom sinteze bakteriocina Gram-negativnih bakterija, promotor SOS sustava uključuje inducibilni *recA* gen. U promotorskoj regiji osim SOS sustava nalazi se i P kutija (Matsui i sur., 1993; Cascales i sur., 2007). Transkripcijski aktivator PrtN veže se na P kutiju i inducira ekspresiju gena (Matsui i sur., 1993). Gram-pozitivne bakterije sintetiziraju bakteriocine specifičnim biosintetskim putevima kao što je regulacija biosinteze nisina staničnom gustoćom (Moreno i sur. 1999).

#### **2.3.5 Antimikrobni spektar**

Zbog prisutnosti propusne barijere na staničnoj membrani, Gram-negativne bakterije osjetljive su i na antibiotike i na bakteriocine. Bakteriocini poput nisina izoliranog iz *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i pediocina izoliranog iz *Pediococcus pentosaceus*, aktivni su protiv Gram-negativnih bakterija. Termofilin izoliran iz *Streptococcus thermophilus* inhibira rast *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* (Torodov i Dicks, 2005). Bakteriocini koje proizvode bakterije *Bacillus spp.* inhibiraju Gram-pozitivne bakterije kao što je *Listeria monocytogenes* i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Torodov i Dicks, 2005). Bakteriocini ST28MS i ST26MS izolirani iz *Lactobacillus plantarum* osim *E. coli* i *Acinetobacter baumannii*, inhibiraju i neke Gram-pozitivne bakterije.

### 2.3.6 Toksičnost i nuspojave

Većina istraživanja navodi korisne učinke bakteriocina bez ikakvih nuspojava. Cotter i sur. (2013) ispitivali su terapijski učinak bakteriocina na životinjskim modelima. Istraživanje karcinoma glave i vrata pokazali su kako nisin inducira preferencijalnu apoptozu i zaustavlja stanični ciklus bez toksičnog učinka.

### 2.3.7 Potencijalna primjena bakteriocina

Inhibicijski učinak, specifično djelovanje, nerezistentnost i netoksični učinak bakteriocina zainteresirali su mnoge znanstvenike koji provode istraživanja s ciljem uvođenja bakteriocinskih lijekova (Cotter i sur., 2013).

#### 2.3.7.1 Liječenje bolničkih infekcija

Glavni uzročnici bolničkih infekcija su *Staphylococcus aureus*, enterokoki, pneumokoki, *A. baumannii*, *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus* spp. (Ghodhbane i sur., 2015). Infekcije uzrokovane sa *S. aureus*, enterokokima i pneumokokima je teško liječiti jer su navedeni patogeni razvili rezistenciju na 6 i više antibiotika. Bakteriocini nisin i lakticin 3147 inhibiraju različite patogene u jetri, slezeni i bubrezima. Također, nisin A i lakticin 3147 efikasno djeluju protiv MRSA i VSE. Aunpad i Na-Bangchang (2007) izolirali su *B. pumilus* u Tajlandu te je opaženo da ova bakterija stvara bakteriocin koja značajno inhibira MRSA i VRE. Planosporicin iz *Planomonospora* sp. DSM14920 djeluje antimikrobno protiv *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Streptococcus pyogenes* (Aunpad i Na-Bangchang, 2007). Istražuje se upotreba bakteriocina NAI – 107, mikrosporicina i mutacina B-Ny26 u borbi protiv patogena otpornih na lijekove (Jabés i sur., 2011).

#### 2.3.7.2 Liječenje infekcija respiratornog trakta

Mikroorganizmi kao što su *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida* i *Mycobacterium tuberculosis* su uzročnici bolesti respiratornog trakta poput upale pluća, otitisa, rinitisa i tuberkuloze (Pascual i sur., 2008; Ghobrial i sur., 2009). Bakteriocin nisin F potencijalno inhibira *S. aureus* prilikom čega ne pokazuje toksičnost za pluća, bronhije, traheju i krvotvorni sustav ispitanje životinje (De Kwaadsteniet i sur., 2009). Carroll i sur. (2010) istražili su potencijalnu inhibiciju *M. tuberculosis* H37Rv pomoću bakteriocina *in vitro* i *in vivo* i zaključili da bakteriocin lakticin 3147 potencijalno inhibira *M. kansasii* i *M. tuberculosis* H37Ra.

### 2.3.7.3 Liječenje kožnih bolesti

Nisin i neki drugi bakteriocini učinkoviti su za liječenje kožnih bolesti (Kang i sur., 2009; Manosroi i sur., 2010). Bakteriocini hiracin JM79 izoliran iz *Enterococcus hirae* DCH5 i laktociklin Q izoliran iz *Lactococcus* subsp. QU12 pokazali su inhibicijsko djelovanje protiv stafilokoka, enterokoka, laktobacila i *L. monocytogenes* (Sawa i sur., 2009).

### 2.3.7.4 Liječenje oralnih infekcija

Bakteriocin subtilozin A inhibira rast bakterije *Porphyromonas gingivalis* (Shelburne i sur., 2007). Laktocin 3147, Bilis K12 i bakteriocin soja *Lactobacillus paracasei* HL32 iznhibiraju rast *Porphyromonas gingivalis* te mnogih patogenih uzročnika oralnih infekcija.

### 2.3.7.5 Uspostavljanje crijevne ravnoteže

U posljednje vrijeme, koriste se mnogi bakteriocini i BMK koje ih sintetiziraju u svrhu zaštite crijeva i/ili kao nadopuna prirodne crijevne mikrobiote tijekom kemoterapija. Bakteriocin lakticin 3147 potencijalno inhibira *Clostridium difficile* (Lazzarini i sur., 2008). Turicin CD, bakteriocin izoliran iz *B. thuringiensis* DPC 6431 i ruminokokin izoliran iz *Ruminococcus gnavus* E1 inhibiraju rast kliničkih bakterija *Clostridium* spp. poput *C. difficile*, *C. histolyticum* NCIMB 503, *C. indolis* NCIMB 9731, *C. lituseburensense* NCIMB 10637, *C. perfringens* LMG 10468, *C. perfringens* LMG 11264 i *C. tyrobutyricum* NCIMB 8243 (Lazzarini i sur., 2008; Miyauchi i sur., 2013).

### 2.3.7.6 Liječenje vaginalnih infekcija

Milijuni žena reproduktivne dobi pate od infekcije bakterijama *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella bivia* i *Mobiluncus curtisi*. Konvencionalno se u njihovom liječenju koriste antibiotici poput klindamicina i metronidazola koji narušavaju korisnu mikrobiotu vagine. Bakateriocin laktocin 160 i subtilin A djeluju antibakterijski protiv *G. vaginalis* (Sutyak i sur., 2008). Bakteriocin izoliran iz *Lactobacillus fermentum* inhibira *E. coli* i *G. vaginalis* (Kaewnopparat i sur., 2013).

### 2.3.7.7 Kontracepcija

Osim antimikrobne aktivnosti, bakteriocini imaju i spermicidno djelovanje. Opisana je spermicidna aktivnost nisina, čija komercijalna uporaba nije dozvoljena zbog negativnog učinka na korisnu vaginalnu floru. Kao sigurni bakteriocini za uporabu kod ljudi i životinja pokazali su se subtilin i lakticin 3147 izolirani iz *B. subtilis*, a subtilin je pokazao velik potencijal za korištenje u komercijalne svrhe (Kaewnopparat i sur., 2013). Fermentacin HV6b izoliran iz *L. fermentum* HV6b (MTCC 10770) inhibira rast patogena *Bacteroides*, *G. vaginalis*,

*Mobiluncus*, te stafilokoka i streptokoka povezanih s bakterijskim vaginozama. Štoviše, fermenticin je pokazao mogućnost imobilizacije sperme i spermicidnu aktivnost što ga čini potencijalnim kandidatom za formulaciju antibakterijskih vaginaleta i kontracepcijskih proizvoda (Kaur i sur., 2013).

#### **2.3.7.8 Antivirusno djelovanje**

Istražen je antivirusni potencijal mnogih bakteriocina protiv virusa mišjeg norovirusa S99 (MNV), virusa gripe A/WSN/33 (H1N1), virusa Newcastleove bolesti, montana virusa i virusa mačjeg herpesa KS 285 (Lange-Starke i sur., 2014). Testirali su supernatant stanica soja *Lactobacillus curvatus* protiv virusa MNV i H1N1 i dokazano je antivirusno djelovanje protiv MNV (Lange-Starke i sur., 2014).

#### **2.3.7.9 Primjena bakteriocina u prehrambenoj industriji**

Bakteriocini se mogu koristiti kao konzervansi pojedinačno ili u kombinaciji s drugim metodama poput toplinske obrade, visokog tlaka ili modificiranog ambalažnog pakiranja (Abriouel i sur., 2010). Čiste ili miješane kulture BMK i bakteriocina koje proizvode koriste se protiv bakterija i patogena koji uzrokuju kvarenje hrane. Korištenje ovih kultura poboljšava kvalitetu i senzorska svojstva hrane. Kulture koje proizvode nisin koriste se za očuvanje i stabilizaciju fermentiranih mliječnih proizvoda, majoneze, namaza, vrhnja, proizvoda od sira, mesnih ili povrtnih pripravaka i sirutke (Nauth i sur., 2000)

Bakteriocini imaju široku primjenu u mliječnoj industriji tijekom fermentacije proizvoda. Hrana koja sadrži starter kulture koje proizvode bakteriocine je bolje zaštićena od patogenih mikroorganizama od hrane koja sadrži starter kulture koje ne proizvode bakteriocine. Sekundarne kulture koje proizvode bakteriocine pomažu u bržem sazrijevanju mliječnih proizvoda ubijanjem mikroba u primarnoj kulturi. Propionin PLG-1 izoliran iz *P. thoenii* P127 djeluje antimikrobno protiv propionskih bakterija, kao i mnogih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija uključujući *L. monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* i *Corynebacterium* sp. (Lyon i sur., 1993). Poželjno je korištenje pročišćenih i koncentriranih bakteriocina koji se dodaju hrani zbog njihove veće efikasnosti u usporedbi s izvornim kulturama koje imaju sposobnost biosinteze bakteriocina. Kulture koje mogu proizvoditi bakteriocine nisu poželjne tijekom proizvodnje zbog sporog rasta kulture ili proizvodnje bakteriocina u kasnijim fazama rasta (Faye i sur., 2000). Jogurt koji se proizvodi od sirovog mlijeka dodavanjem soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* koji proizvodi nisin i tradicionalnih kultura jogurta poput *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, rezultira produljenim rokom

skladištenja, sprječavanjem rasta bakterija koje uzrokuju kvarenje i kontrolom kiselosti (Yamauchi i sur., 1996). Nisin se dodaje i u sirni namaz kako bi spriječio nastajanje toksičnog produkta koji proizvodi *Clostridium botulinum* (Taylor, 1986). Za prevenciju rasta patogena u fermentiranim proizvodima koriste se i acidocin CH5 (Chumchalova, 2004), acidocin 1B (Kyoung-Sick i sur., 2007) i acidocin AA11 (Abo-Amer, 2007). Acidocin B izoliran iz bifidobakterija djeluje antimikrobno protiv *Colostridium* sp. i koristi se u fermentiranim proizvodima kao što je sir ili silaža (Brink i sur., 1994).

Pšenična tijesta koja se koriste za proizvodnju pekarskih proizvoda mogu biti kontaminirana bakterijama što uzrokuje oštećenje kruha, žilavost i proizvodnju enterotoksina (Smith i sur., 2004). Bakteriocini niže koncentracije efikasni su protiv vegetativnih stanica sojeva *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, i *B. pumilus*, dok je veća koncentracija bakteriocina potrebna za ubijanje endospora (Martinez-Viedma i sur., 2011). Bakteriocini djeluju antibakterijski protiv *S. aureus*, *B. cereus*, i *L. monocytogenes* u kremama za pečenje, desertima na bazi soje i želatinastim pudinzima (Martinez-Viedma i sur., 2009).

Rast nepoželjnih mikroorganizama rezultira pogoršanjem karakteristika alkoholnih pića. Bakteriocini koje proizvode prehrambene BMK sprječavaju pojavu bakterijskog kvarenja hrane, a kod vina omogućuju smanjenje sumpornog anhidrida. Nisin u kombinaciji s metabisulfitom utječe na smanjenje mikrobne populacije u crnom vinu i čuva vino tijekom starenja i skladištenja (Ruiz-Larrea i sur., 2010). Smjesa slada s nutritivnim suplementima i bakterijskom kulturom koja proizvodi nisin dovela je do produljenja roka trajanja bez utjecaja na aromu i okus piva (Nauth, 2007).

Bakteriocini različitih BMK pokazali su inhibicijski učinak na rast *L. monocytogenes* u mesu i mesnim proizvodima. Kouakou i sur. (2010) uspješno su odgodili ponovni razvitak stanica *L. monocytogenes* u umjetno kontaminiranom svinjskom mesu dodatkom dva soja *L. curvatus* (sakacin P) i *P. acidilactici* (pediocin Ach).

Provedeno je istraživanje u kojem se ispitala učinkovitost zaštite od patogenih bakterija i mogućnost produljenja roka trajanja slanah škamoa uporabom tri bakteriocina (nisin Z, karnocin UI49 i bavaricin A) koje proizvode BMK. Dodatkom bavaricina rok trajanja se produljio s 10 na 16 dana, dok se dodatkom nisina Z rok trajanja produljio na 31 dan (Einarsson i Lauzon, 1995).

Svježe narezano povrće, voće (Doyle i Erickson, 2008) i sjemenke (Pao i sur., 2005) mogu biti onečišćeni patogenim bakterijama. Primjena bakteriocina ili bakteriocina u



kombinaciji s kemijskim konzervansima pomaže u sprječavanju širenja patogenih mikroba. Pranje voća bakteriocinom AS-48 sprječava širenje *L. monocytogenes* inokulirane na površini svježeg voća ili površini narezanog voća (Molinos i sur., 2008). Termostabilan bovicin HC5 izoliran iz *S. bovis* HC5 može smanjiti toplinsku rezistenciju spora *Alicyclobacillus acidoterrestris*, glavne bakterije kvarenja u kiselim sokovima (de Carvalho i sur., 2008). Također, sam bakteriocin AS-48 ili u kombinaciji s različitim esencijalnim uljima ili njihovim bioaktivnim komponentama, biljnim ekstraktima, prirodnim ili sintetičkim antimikrobnim lijekovima inhibira *L. monocytogenes* i *Salmonella* zbog čega se produljuje rok trajanja ruske salate (Molinos i sur., 2009). Umaci od svježeg povrća mogu biti kontaminirani različitim patogenim mikroorganizmima što može uzrokovati trovanje hranom. Bakteriocin AS-48 inaktivira *Geobacillus stearothermophilus* u kokosovom mlijeku i kokosovoj vodi te *Bacillus licheniformis* LMG 19409 u svježem soku jabuka i komercijalnim jabučnim ciderima (Grande i sur., 2006).

Suhi prah lakticina 3147 djeluje antimikrobno i lagano se primjenjuje kao sastojak hrane u prehrambenim proizvodima kao što je mlijeko za dojenčad, juha u prahu i skuta (Ross i Hill, 2004).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 MATERIJALI

##### 3.1.1 Mikroorganizmi

U eksperimentima je korišteno 25 sojeva prikazanih u Tablici 1, koji su izolirani iz majčinog mlijeka, identificirani 16S rDNA sekvenciranjem (Macrogen, Nizozemska) i pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu..

**Tablica 1.** Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu

Oznaka bakterijskog soja	16S identifikacija
KR19	<i>Lactobacillus plantarum</i>
KR20	<i>Enterococcus faecium</i>
MC1	<i>Lactobacillus fermentum</i>
MC2	<i>Enterococcus faecalis</i>
MC5	<i>Staphylococcus epidermis</i>
MC13	<i>Enterococcus faecium</i>
MC19	<i>Lactobacillus plantarum</i>
AF2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
AF4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
AF5	<i>Staphylococcus epidermis</i>
AF12	<i>Enterococcus durans</i>
AF16	<i>Enterococcus faecium</i>
MB5	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>dentisani</i>
MB6	<i>Staphylococcus epidermis</i>
MB7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MB9	<i>Streptococcus</i> sp.
MB10	<i>Streptococcus salivarius</i>
MB11	<i>Streptococcus oralis</i>
MB12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
MB15	<i>Lactobacillus plantarum</i>
RS4	<i>Streptococcus oralis</i>
RS8	<i>Staphylococcus epidermis</i>
RS10	<i>Lactobacillus plantarum</i>

---

**RS17**

*Staphylococcus epidermidis*

**RS19**

*Streptococcus mitis*

---

### 3.1.2 Hranjive podloge

U radu su korištene slijedeće podloge:

Hranjive podloga za uzgoj BMK

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 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: istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

### 3.1.3 Kemikalije

- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- početnice „Invitrogen“, SAD
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan

### 3.1.4 Aparatura i pribor

- epruvete
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- ependorfice

- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorvice
- stalci za epruvete
- pinceta
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- Sonopuls mini20 sonifikator, „Bandelin“, Njemačka
- elektroforetske kadice, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT
- Petrijeve zdjelice

## **3.2 METODE RADA**

### **3.2.1 Čuvanje i održavanje bakterijskih sojeva**

Sojevi BMK su pohranjeni na -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije korištenja, sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju anaerobno pri 37 °C

### **3.2.2 Detekcija gena za bakteriocine polimeraznom lančanom reakcijom (engl. Polymerase chain reaction, PCR)**

DNA ekstrahirana iz bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka služi kao kalup za PCR reakciju čija je svrha detekcija gena za biosintezu bakteriocina pomoću specifičnih početnica navednih u Tablici 2. Sastav reakcijske smjese volumena 20 µL prikazan je u Tablici 3. PCR reakcija se odvija prema uvjetima navedenim u Tablicama 3, 4 i 5. Nakon završetka PCR reakcije, 18 µl PCR produkta se nanosi 2 % agarozni gel i elektroforeza se provodi u kadici za elektroforezu pri naponu od 100 V. Standard se sastoji od 0,25 µL λ DNA HindIII i 0,5 µL 100 bp DNA Ladder. Nakon završetka elektroforeze, gel se boji u etidijevom bromidu koncentracije 0,5 µg/mL i vizualizira ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture.

**Tablica 2.** Specifične početnice za gene uključene u biosintezu bakteriocina i pripadajući uvjeti PCR reakcije

<b>Ciljani gen</b>	<b>Početnice (5'-3')</b>	<b>Veličina PCR produkta (pb)</b>	<b>Referenca</b>
<i>plnJ</i>	TAACGACGGATTGCTCTG AATCAAGGAATTATCACATTAGTC	475	Diep i sur. (1996)
<i>plnA</i>	GTACAGTACTAATGGGAG CTTACGCCAATCTATACG	450	Diep i sur. (1996)
<i>plnW</i>	TCACACGAAATATTCCA GGCAAGCGTAAGAAATAAATGAG	165	Holo i sur. (2001)
<i>plnEF</i>	GGCATAGTTAAAATTCCCCC CAGGTTGCCGCAAAAAAAG	428	Diep i sur. (1996)
<i>plnS</i>	GCCTTACCAGCGTAATGCCC CTGGTGATGCAATCGTTAGTTT	320	Stephens i sur. (1998)
<i>plnNC8</i>	GGTCTGCGTATAAGCATCGC AAATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTCC	207	Maldonado i sur. (2004)
<i>entA</i>	GGTACCACTCATAGTGGAAA CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138	Özdemir i sur. (2011)
<i>entB</i>	CAAATGTAAAAGAATTAAGTACG AGAGTATACATTTGCTAACCC	201	De Vuyst i sur. (2003)

**Tablica 3.** Sastav reakcijske smjese za provođenje RAPD-PCR reakcije

<b>Sastojci reakcijske smjese</b>	<b>Volumen</b>
EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix)	10 µL
Kalup (DNA)	1 µL
Početnica 1	0,04 µL
Početnica 2	0,04 µL
dH <sub>2</sub> O	8,92 µL
<b>Ukupno</b>	<b>20 µL</b>

**Tablica 4.** Uvjeti provođenja PCR reakcije s početnicama za *plnA*, *plnJ*, *plnW* i *plnNC8*

broj ponavljanja	T [°C]	vrijeme
------------------	--------	---------

1	95	3 min
	95	30 s
30	55	1 min
	72	1 min
1	72	5 min

**Tablica 5.** Uvjeti provođenja PCR reakcije s početnicama za *plnS* i *plnE*

broj ponavljanja	T [°C]	vrijeme
1	95	3 min
	95	30 s
30	55	30 s
	72	1 min
1	72	5 min

**Tablica 6.** Uvjeti provođenja PCR reakcije s početnicama za *entA* i *entB*

broj ponavljanja	T [°C]	vrijeme
1	95	3 min
	95	30 s
30	56	30 s
	72	30 s
1	72	5 min

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Biosinteza bakteriocina poželjna je karakteristika BMK jer inhibiraju rast patogena i nepoželjnih mikroorganizama u fermentiranim namirnicama, kao i u gastrointestinalnom okruženju. Dodatno, može ih se smatrati alternativnom antimikrobnom strategijom u borbi protiv rastuće antibiotičke rezistencije (Šušković i sur., 2010; Butorac i sur. 2020). BMK žive u različitim kompetitivnim staništima te su stoga morale prilagoditi svoj metabolizam različitim promjenjivim i stresnim uvjetima okoliša (Rizello i sur., 2014). *Lactobacillus plantarum* je jedna od najbolje opisanih BMK, najčešće prisutna u prehrambenim proizvodima nastalim spontanom fermentacijom te kao komensalna bakterija crijevnog mikrobioma čovjeka. Većina regulatornih sustava vrste *L. plantarum* je usmjerena na

kompeticiju s drugim bakterijama i preživljavanje u različitim okolišnim uvjetima što podrazumijeva detekciju širokog spektra okolišnih signala i odgovor na njih kontrolom ekspresije različitih gena (Sturme i sur., 2007) i proizvodnjom različitih antimikrobnih spojeva poput vodikovog peroksida, organskih kiselina (posebno mliječne i octene), antiaflatoksinogenih metabolita i bakteriocina (Guimarães i sur., 2018).

Bakteriocinski *pln* lokus sadrži 5 operona: *plnEFI* i *plnJKLR*, koji kodiraju bakteriocine i imunosne proteine; *plnGHSTUV*, koji kodira ABC transportni sustav za izlučivanje peptida; *plnABCD*, koji kodira peptide za put transdukcije signala, te *plnMNOP*, koji sadrži gene nepoznatih funkcija. Peptid PlnA inducira transkripciju svih 5 navedenih *pln* operona koji su reprimirani pod normalnim uvjetima (Diep i sur., 2003; Diep i sur., 2009). Prema Fuqua i sur. (2001), na nakupljanje bakteriocina utječu okolišni uvjeti poput kemijskih spojeva, uvjeta skladištenja i prisutnosti guste mikrobne populacije (*engl.* Quorum). Među vrstama roda *Lactobacillus*, izoliranim iz majčinog mlijeka, višestruki pozitivni signali (za gene *plnJ*, *plnA* i *plnEF*) uočeni su kod sojeva *L. plantarum* KR19, MC19, MB7, MB15 i RS10, dok prisutnost gena *plnS*, *plnW* i *plnNC8* koji također kodiraju za plantaricine, nije uočena kod niti jednog *L. plantarum* soja. Geni koji kodiraju za plantaricin S i W su vrlo rijetki među sojevima vrste *L. plantarum* (Holo i sur., 2001; Sáenz i sur., 2009). *L. plantarum* ima jedan od najvećih genoma među BMK jer sadrži veliki broj gena dobivenih horizontalnim transferom gena većinom kroz pokretne elemente (profage, plazmide, transpozone i integrone) (Chevallier i sur., 1994; Kleerebezem i sur., 2003). *L. plantarum* često sadrži plazmide koji mogu sadržavati gene za rezistenciju na antibiotike, katabolizam laktoze, proizvodnju proteolitičkih enzima ali i bakteriocina (Van Kranenburg ., 2005).

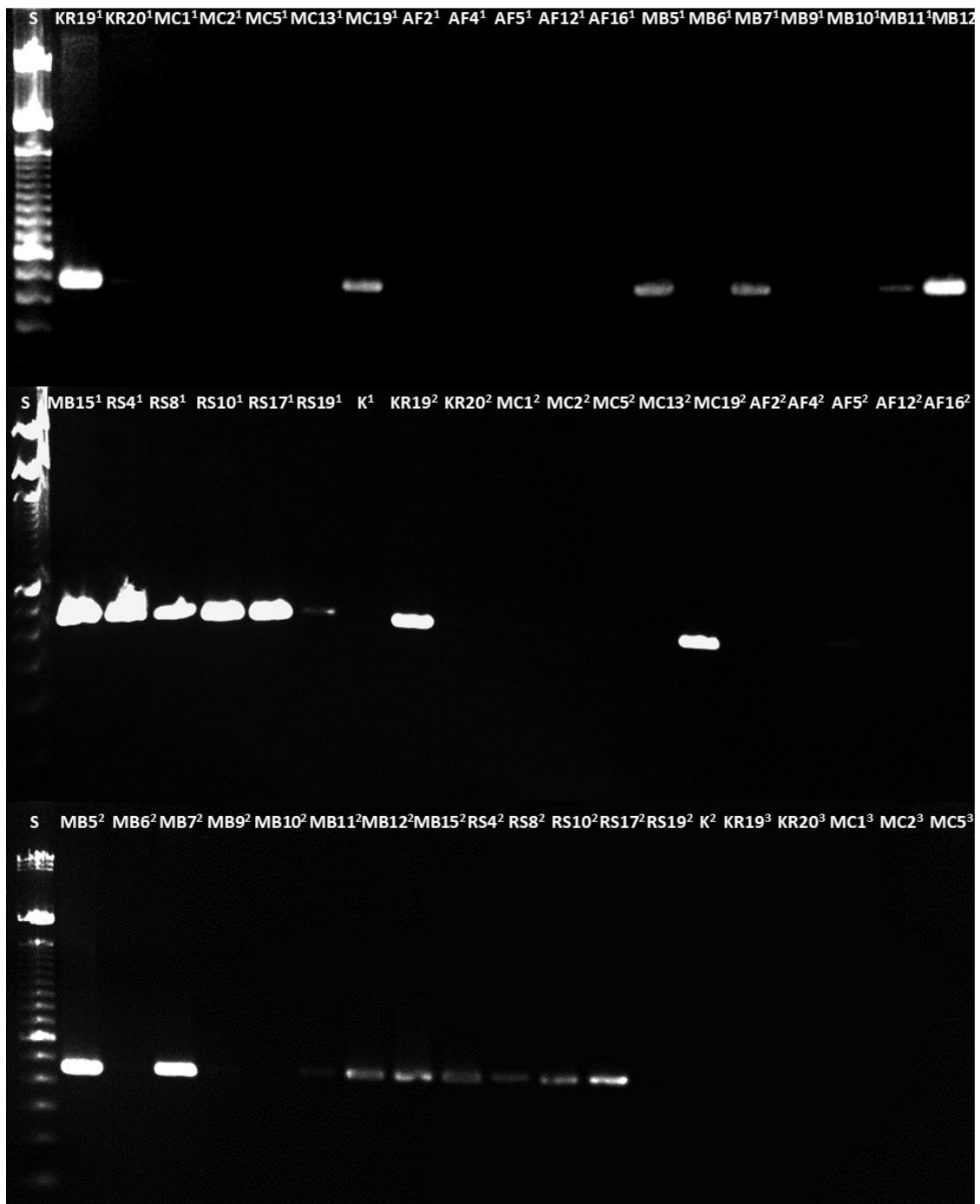
Obično BMK proizvode samo jedan bakteriocin ali neke proizvode i više te oni često pripadaju različitim klasama bakteriocina (Dimov i sur., 2005). Proizvodnja 3 i više bakteriocina je vrlo česta kod vrsta roda *Enterococcus* i *Streptococcus* (Park i sur., 2003). Enterokoki čine jedne od najzastupljenijih BMK crijevnog mikrobioma sisavaca. Najčešći producenti bakteriocina među enterokokima su vrste *E. faecium* i *E. faecalis* a navedeni bakteriocini, poput EntA i EntB, gotovo isključivo pripadaju drugoj skupini termostabilnih nelantibiotičkih bakteriocina (Nes i sur., 2007). Iako se većina bakteriocinskih operona nalazi na plazmidima, što omogućuje filogenetsko širenje bakteriocina unutar i između vrsta BMK, geni *entA* i *entB*, su kodirani na kromosomu (Dimov i sur., 2005). Među 5 sojeva roda *Enterococcus* izoliranih iz majčinog mlijeka, niti jedan ne sadrži gene za bakteriocine. Streptokoki su česti sudionici oralnog mikrobioma sisavaca koji najčešće proizvode lantibiotike. Jedan od najčešćih producenata bakteriocina među vrstama roda *Streptococcus*

je *S. oralis* subsp. *dentisani* koji djeluje kao probiotik protiv kariogenih bakterija kolonizacijom zubi, neutralizacijom kiselog pH arginolitičkim putem (Velsko i sur., 2018) i inhibicijom patogenih bakterija proizvodnjom bakteriocina (López-López i sur., 2017). Kod sojeva *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* MB5 te *S. oralis* RS4 uočena je prisutnost gena *plnA*, *plnJ* i *plnE*, dok su kod *S. oralis* MB11 uočene slabe vrpce kao potvrda prisutnosti gena *plnJ* i *plnA*. Soj *Streptococcus mitis* RS19 sadrži samo *plnJ* gen.

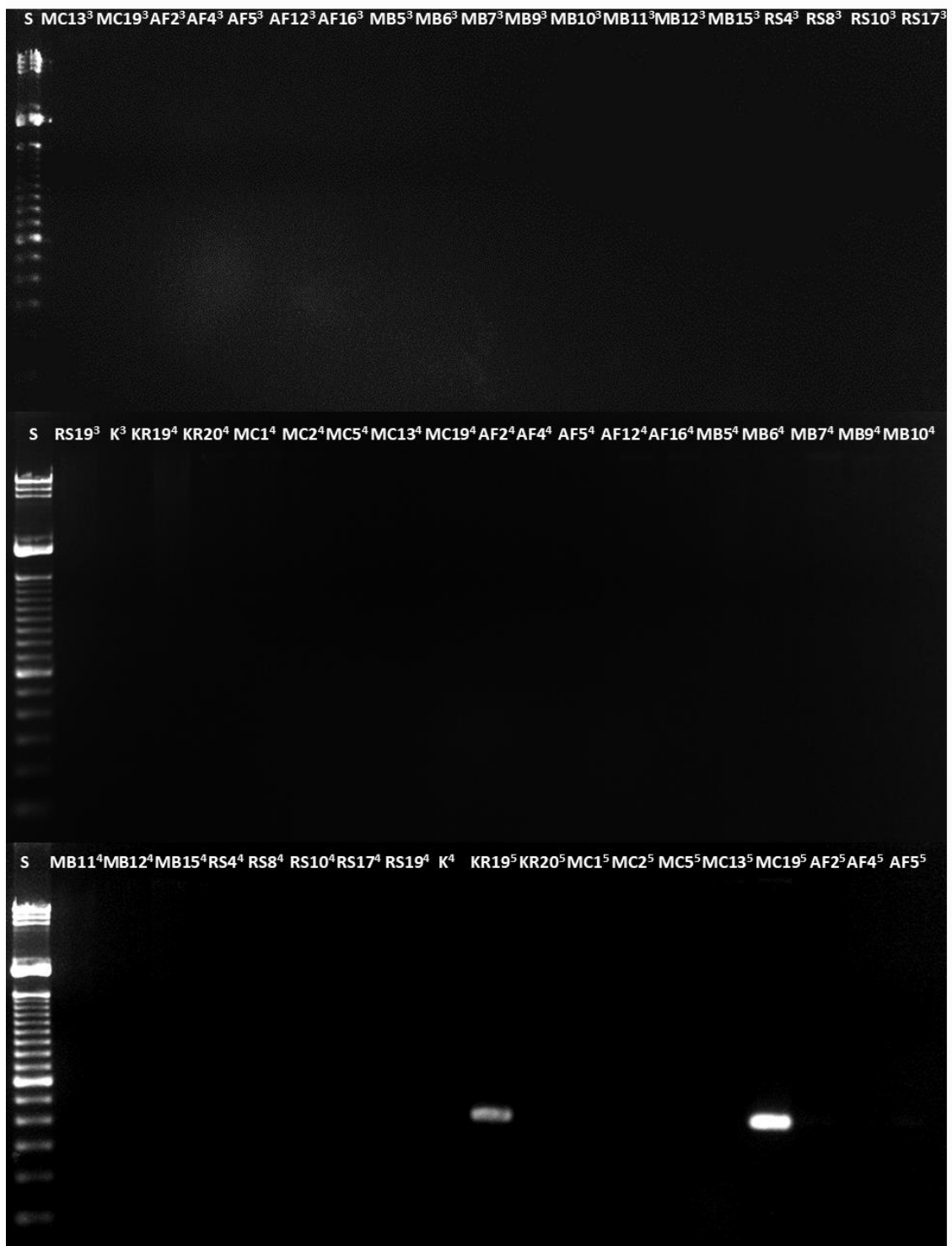
Iz majčinog mlijeka izolirano je 8 sojeva pripadnika vrste *Staphylococcus epidermis*, najčešće komensalne bakterije ljudske kože koji se razmatra kao potencijalni probiotički soj u liječenju akni (Claudel i sur., 2019). Među njima, soj MB12 je pokazao prisutnost čak 3 gena koji kodiraju za bakteriocine (*plnJ*, *plnA* i *plnEF*) dok su sojevi RS8 i RS17 pokazali prisutnost gena *plnJ* i *plnA*. Rezultati PCR analize podržavaju teoriju o horizontalnoj razmjeni gena koji kodiraju za bakteriocine među bakterijama u istom staništu.

Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal pojedinih ispitivanih sojeva BMK da proizvedu bakteriocine. Obzirom na mehanizam djelovanja bakteriocina koji obuhvaća antibakterijsku aktivnost i prema patogenim bakterijama i nepoželjnim bakterijama onečišćivačima različitih prehrambenih proizvoda, daljnja istraživanja bilo bi dobro usmjeriti u poticanje proizvodnje bakteriocina njihovom kokultivacijom s drugim sojevima BMK (Kos i sur. 2011.). Svakako su potrebna dodatna istraživanja kojima bi se utvrdio spektar djelovanja detektiranih bakteriocina te koje su mogućnosti njihove primjene.

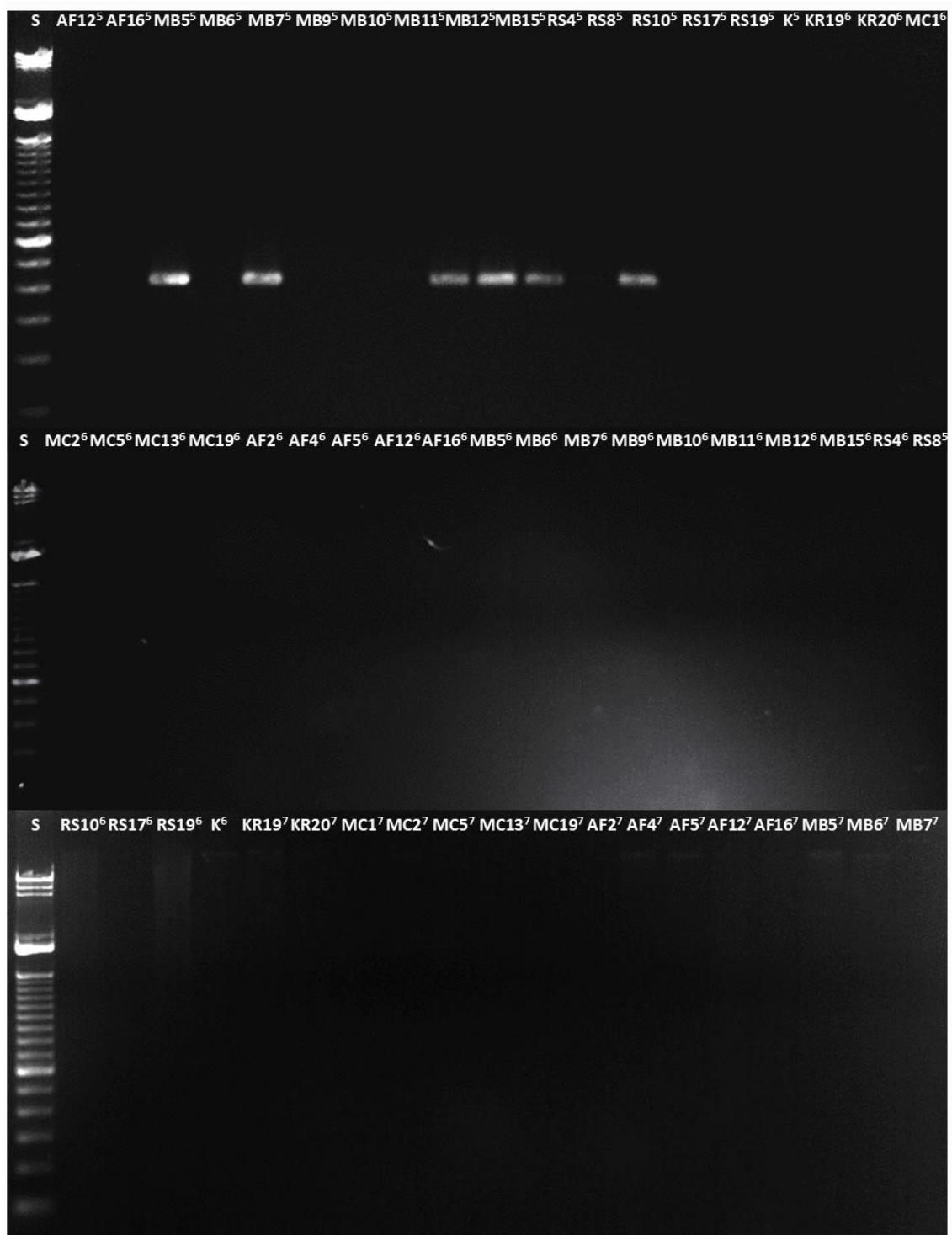




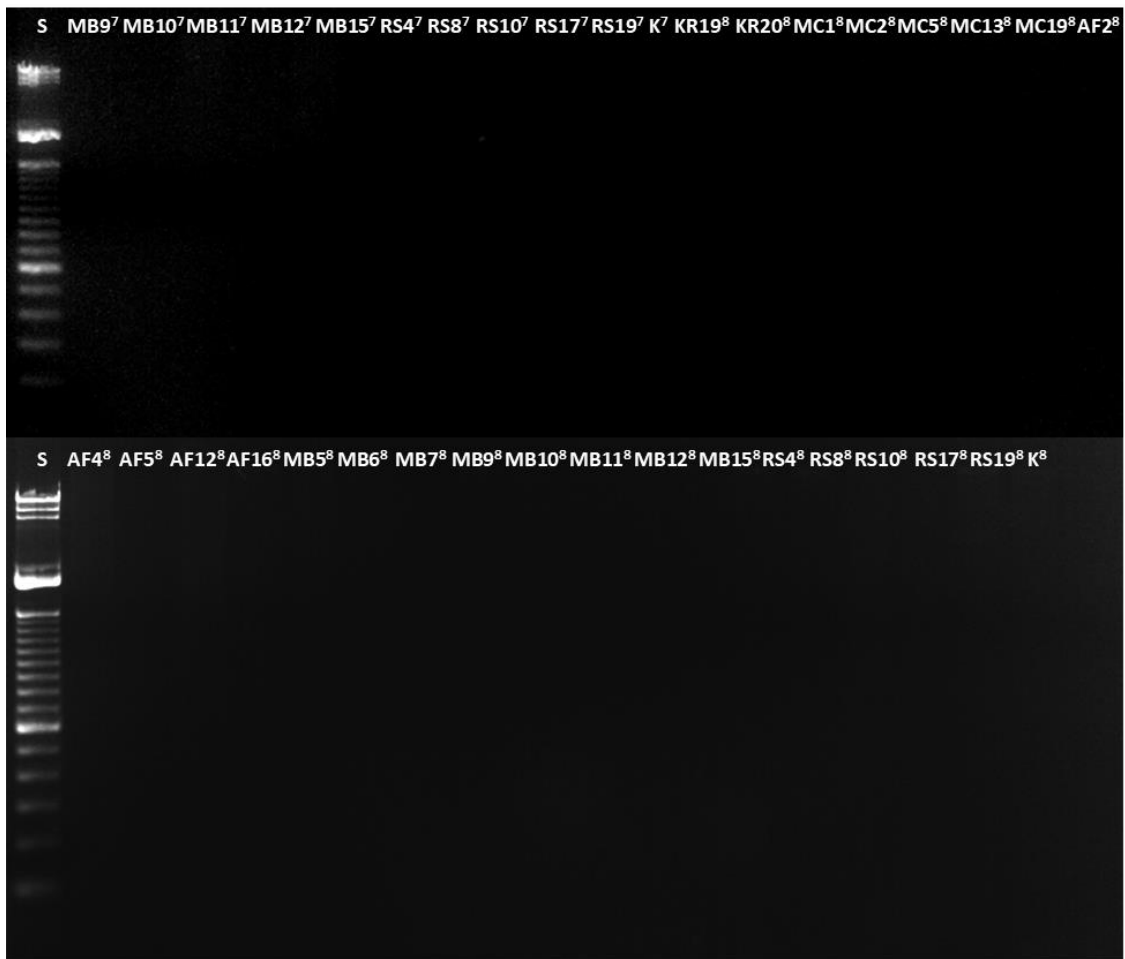
**Slika 1.** Agarozna gel elektroforeza amplifikacijskih produkata PCR metode s početnicama za plnJ (<sup>1</sup>), plnA (<sup>2</sup>) i plnW (<sup>3</sup>)



**Slika 2.** Agarozna gel elektroforeza amplifikacijskih produkata PCR metode s početnicama za pInW<sup>(3)</sup>, pInNC8<sup>(4)</sup> i pInE<sup>(5)</sup>



**Slika 3.** Agarozna gel elektroforeza amplifikacijskih produkata PCR metode s početnicama za plnE (<sup>5</sup>), plnS (<sup>6</sup>) i entA (<sup>7</sup>)



**Slika 4.** Agarozna gel elektroforeza amplifikacijskih produktov PCR metode s početnicama za entA <sup>(7)</sup> i entB <sup>(8)</sup>

## 5. ZAKLJUČCI

1. Prema dobivenim rezultatima agarozne gel elektroforeze PCR-produkata, pozitivan signal za prisutnost gena *plnJ* pokazuju sojevi KR19, MC19, MB5, MB7, MB11, MB12, MB5, RS4, RS8, RS10, RS19. Kod sojeva KR19, MC19, MB5, MB7, MB11, MB12, MB15, RS4, RS8, RS10, RS17 uočena je prisutnost gena *plnA*, dok je prisutnost gena *plnE* potvrđena kod sojeva KR19, MC19, MB5, MB7, MB12, MB15, RS4 i RS10. Niti jedan soj ne pokazuje pozitivan signal na prisutnost gena *plnW*, *plnNC8*, *plnS*, *entA* i *entB*.
2. Među bakterijskim sojevima roda *Lactobacillus*, izoliranim iz majčinog mlijeka, višestruki pozitivni signali (za gene *plnJ*, *plnA* i *plnEF*) kod sojeva *L. plantarum* KR19, MC19, MB7, MB15 i RS10 ukazuju na njihovo potencijalno bakteriocinsko djelovanje, dok prisutnost gena *plnS*, *plnW* i *plnNC8* nije potvrđena kod niti jednog ispitivanog *L. plantarum* soja.
3. Od 5 ispitanih sojeva roda *Enterococcus* izoliranih iz majčinog mlijeka, niti jedan ne sadrži gene za bakteriocine, odnosno niti jedan ne daje pozitivan signal na prisutnost gena *entA* i *entB*.
4. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdio spektar djelovanja detektiranih bakteriocina te koje su mogućnosti njihove primjene.

## 6. LITERATURA

Abee T., Klaenhammer T. R., Letellier L. (1994) Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 1006–13.

Abo-Amer A. E. (2007). Molecular characterization of antimicrobial compound produced by *Lactobacillus acidophilus* AA11. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **54**: 107–119.

Abriouel H., Lucas R., Omar N. B., Valdivia E., Galvez A. (2010) Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2**: 77–89.

Alakomi H.L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I.M. (2000) Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane, *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2001–2005.

Aljewicz M., Cichosz G. (2017) Influence of probiotic (*Lactobacillus acidophilus* NCFM, *L. paracasei* LPC37, and *L. rhamnosus* HN001) strains on starter cultures and secondary microbiota in Swiss-and Dutch-type cheeses. *Journal of Food Processing and Preservation* **41**: e13253.

Aunpad R, Na-Bangchang K. (2007) Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Current Microbiology* **55**: 308–13.

Bendali F., Gaillard-Martinie B., Hebraud M., Sadoun, D. (2008) Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-Listerial bacteriocin, an Algerian isolate. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **41**: 1784–1792

Bierbaum G., Sahl H. G. (2009) Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **10**: 2–1.

Bierbaum G., Sahl H. G. (2009) Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **10**: 2–18.

Bottiger T., Schneider T., Martínez B., Sahl H. G., Wiedemann I. (2009) Influence of Ca<sup>2+</sup> ions on the activity of lantibiotics containing a mersacidin-like lipid II binding motif. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 4427–34.

- Brink B., Minekus M., van der Vossen J. M. B. M., Leer R. J., Huis in't Veld J. H. J. (1994) Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Journal of Applied Microbiology* **77**: 140–148.
- Butorac K., Banić M., Novak J., Leboš Pavunc A., Uroić K., Durgo K., Oršolić O., Kukolj M., Radović S., Scalabrin S., Žučko J., Starčević A., Šušković J., Kos B. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microbial Cell Factories* **19**. doi: 10.1186/s12934-020-01365-6
- Carroll J., Draper L. A., O'Connor P. M., Coffey A., Hill C., Ross R. P., Cotter P., O'Mahony J. (2010) Comparison of the activities of the lantibiotics nisin and lactacin 3147 against clinically significant mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36**: 132–6.
- Cascales E., Buchanan S.K., Duché D., Kleanthous C., Lloubès R., Postle K., Riley M. Slatin S., Cavard D. (2007) Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**: 158–229.
- Chevallier B., Hubert J. C., Kammerer B. (1994) Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* **120**(1-2): 51-6.
- Chumchalova J., Stiles J., Josephsen J., Plockova M. (2004). Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 1082–1089.
- Cintas L. M., Casaus P., Havarstein L. S., Hernandez P. E., Nes I. F. (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4321–30.
- Clardy J., Fischbach M. A., Walsh C. T. (2006) New antibiotics from bacterial natural products, *Nature Biotechnology* **24**: 1541–50.
- Claudiel J. P., Auffret N., Leccia M. T., Poli F., Corvec S., Dréno B. (2019) *Staphylococcus epidermidis*: A Potential New Player in the Physiopathology of Acne? *Dermatology* **235**(4): 287-294.

Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. (2013) Bacteriocins—a viable alternative to antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 95–105.

Dabour N., Zihler A., Kheadr E., Lacroix C., Fliss I. (2009) *In vivo* study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **133**: 225–33.

de Carvalho A. A. T., Vanetti M. C. D., Mantovani H. C. (2008) Bovicin HC5 reduces thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic mango pulp. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 1685–1691.

De Kwaadsteniet M., Doeschate K.T., Dicks L.M.T. (2009) Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* **48**: 65–70.

De Kwaadsteniet M., van Reenen C., Dicks L. (2010) Evaluation of nisin F in the treatment of subcutaneous skin infections, as monitored by using a bioluminescent strain of *Staphylococcus aureus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2**: 61–5.

De Vuyst L., Moreno M. F., Revets H. (2003) Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology* **84**: 299–318.

Deegan L. H., Cotter P. D., Hill C., Ross P. (2006) Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* **16**: 1058–71.

Degnan F.H. (2008) The US Food and Drug Administration and Probiotics: Regulatory Categorization. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 133–136.

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

Diep D. B., Myhre R., Johnsborg O., Aakra A., Nes I. F. (2003) Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the *pln* operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. *Molecular Microbiology* **47**(2): 483–94.

Diep D. B., Straume D., Kjos M., Torres C., Nes I. F. (2009) An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides* **30**(8): 1562–74.



- Dimov S., Ivanova P., Harizanova N. (2005) Genetics of bacteriocins biosynthesis by lactic acid bacteria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **19**(2): 4-10.
- Djadouni F., Kihal M. (2012) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **55**: 435–443.
- Doyle M. P., Erickson M. C. (2008). Summer meeting 2007-the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 317–330.
- Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L.M., Prevost H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 564–82.
- EFSA (2007) Opinion of the scientific committee on introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA Journal* **587**: 1–16.
- Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 85–106.
- Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B. (2000) Synergistic effect of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* **183**: 191–5.
- Faye T., Langsrud T., Nes I. F., Holo H. (2000) Biochemical and genetic characterization of Propionicin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(10): 4230–4236.
- Fuqua C., Parsek M. R., Greenberg E. P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics* **35**: 439–468.
- Ghobrial O.G., Derendorf H., Hillman J.D. (2009) Pharmacodynamic activity of the lantibiotic MU1140. *International Journal of Antimicrobial Agents* **33**: 70–4.
- Ghodhbane H., Elaidi S., Sabatier J.M., Achour S., Benhmida J., Regaya I. (2015) Bacteriocins active against multi-resistant gram negative bacteria implicated in nosocomial infections. *Infectious Disorders - Drug Targets* **15**: 2–12.

Gong H. S., Meng X. C., Wang H. (2009) Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from 'Jiaoke', a traditional fermented cream from China. *Food Control* **21**: 89–96

González-Martínez B. E., Gómez-Treviño M., Jiménez-Salas Z. (2003) Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición* **4**: 1-9

Grande M. J., Lucas R., Abriouel H., Valdivia E., Omar N. B., Maqueda M., Martínez-Canamero M., Galvez A. (2006). Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocinAS-48. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 422–428.

Guimarães A., Santiago J. A., Teixeira, Venâncio A., Abrunhosa L. (2018) Anti-aflatoxic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology* **264**: 31–38.

Hati S., Mandal S., Prajapati J. B. (2013) Novel starters for value added fermented dairy products. *Current Research in Nutrition and Food Science* **1**: 83–91.

Hoffman F. A., Heimbach J. T., Sanders M. E., Hibberd P. L. (2008) Executive Summary: Scientific and Regulatory Challenges of Development of Probiotics as Foods and Drugs. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 53–57.

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**(3): 643-651.

Hsu S. T., Breukink E., Tischenko E., Lutters M. A., de Kruijff B., Kaptein R., Bonvin A. M., van Nuland N. A. (2004) The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**(10): 963–967.

Ingolf F., Nes I. F., Diep D. B., Holo H. (2007) Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology* **189**(4): 1189-1198.

Jabés D., Brunati C., Candiani G., Riva S., Romanó G., Donadio S. (2011) Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrugresistant Gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1671–6.

Jay J.M. (1996) Modern food microbiology. 5. Izd., Chapman and Hall.

- Joerger M. C., Klaenhammer T. R. (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology* **167**: 439–46.
- Johnsen L., Fimland G., Mantzilas D., Nissen-Meyer J. (2004) Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2647–2652.
- Kaban G., Kaya M. (2008) Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk). *Journal of Food Science* **73**: 385–388.
- Kaewnopparat S., Dangmanee N., Kaewnopparat N., Srichana T., Chulasiri M., Settharaksa S. (2013) *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe* **22**: 6–13.
- Kambouris M., Ostrer H., Duff G., Baranov V., Sibul H., Metspalu A., Goldman D., Martin N., Duffy D., Schmidtke J., Estivill X., O'Brien S. J., Dean M. (1998) Dating the origin of the CCR5-Δ32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *American Journal of Human Genetics* **62**(6): 1507-1515.
- Kang B., Seo J. G., Lee G. S., Kim J. H., Kim S., Han Y., Kang H., Kim H. O., Rhee J. H., Chung M. J., Park Y. M. (2009) Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *Journal of Microbiology* **47**: 101–9.
- Kaur B., Balgir P. P., Mittu B., Kumar B., Garg N. (2013) Biomedical applications of fermenticin HV6b isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. *BioMed Research International* **2013**. doi: 10.1155/2013/168438
- Khalid K. (2011) An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences* **1**: 1-13.
- Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O. P., Leer R., Turchini R., Peters S. A., Sandbrink H. M., Fiers M. W., Stiekema W., Lankhorst R. M., Bron P. A., Hoffer S. M., Groot M. N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W. M., Siezen R. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(4): 1990–1995.

- Kos B., Beganović J., Jurašić L., Švađumović M., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Šušković J. (2011) Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. *Mljekarstvo* **61**: 273-282.
- Kouakou P., Ghalfi H., Dortu C., Evrard P., Thonart, P. (2010) Combined use of bacteriocin-producing strains to control *Listeria monocytogenes* regrowth in raw pork meat. *International Journal of Food Science & Technology* **45**: 937–943.
- Kyoung-sick H., Kim Y., Kim S. H., Oh S. (2007) Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**: 774–783.
- Lange-Starke A., Petereit A., Truyen U., Braun P.G., Fehlhaber K., Albert T. (2014) Antiviral potential of selected starter cultures, bacteriocins and d,l-lactic acid. *Food and Environmental Virology* **6**: 42–7.
- Lazzarini A., Gastaldo L., Candiani G., Ciciliato I., Losi D., Marinelli .F, Selva E., Parenti F.(2008) Antibiotic 107891, its factors A1 and A2, pharmaceutically acceptable salts and compositions, and use thereof. *US Patent*
- Lebel G., Piché F., Frenette M., Gottschalk M., Grenier D. (2013) Antimicrobial activity of nisin against the swine pathogen *Streptococcus suis* and its synergistic interaction with antibiotics. *Peptides* **50**: 19–23.
- Lewus C. B., Montville T. J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **13**: 145–50.
- Lyon W. J., Sethi J. K., Glatz, B. A. (1993) Inhibition of psychrotrophic organisms by Propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. *Journal of Dairy Science* **76**(6): 1506–1513.
- Maldonado A., Ruiz-Barba J. L., Jiménez-Díaz R. (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 383-389.
- Manosroi A., Khanrin P., Lohcharoenkal W., Werner R. G., Götz F., Manosroi W., Mansroi J. (2010) Transdermal absorption enhancement through rat skin of gallidermin loaded in niosomes. *International Journal of Pharmaceutics* **392**: 304–10.

- Martin M., Gutierrez J., Criado R., Herranz C., Cintas L. M., Hernandez, P. E. (2007) Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 667–675.
- Martinez-Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas R., Valdivia E., Galvez, A. (2009) Assay of enterocin AS-48 for inhibition of foodborne pathogens in desserts. *Journal of Food Protection* **72**: 1654–1659.
- Martinez-Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas-Lopez R., Galvez, A. (2011) Inhibition of spoilage and toxinogenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Control* **22**(5): 756–761.
- Matsui H., Sano Y., Ishihara H., Shinomiya T. (1993) Regulation of pyocin genes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (prtN) and negative (prtR) regulatory genes. *Journal of Bacteriology* **175**: 1257–63.
- McAuliffe O., Ross R. P., Hill C. (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 285–308.
- Miyauchi E., O'Callaghan J., Buttó L. F., Hurley G., Melgar S., Tanabe S., Shanahan F., Nally K., O'Toole P. W. (2013) Mechanism of protection of transepithelial barrier function by *Lactobacillus salivarius*: strain dependence and attenuation by bacteriocin production. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **1**: 1029–41.
- Mokoena M. P., Mutanda T., Olaniran A.O. (2016) Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Food & Nutrition Research* **60**.
- Molinos A. C., Abriouel H., Omar N. B., Lucas R., Valdivia E., Galvez, A. (2008) Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *Journal of Food Protection* **71**: 2460–2467.
- Molinos A. C., Lucas R., Abriouel H., Omar N. B., Valdivia E., Galvez, A. (2009) Inhibition of *Salmonella enterica* cells in deli-type salad by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **1**:85–90.
- Moreno I., Lerayer A.S.L., Leitão M.F.F. (1999) Detection and characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains. *Revista de Microbiologia* **30**: 130–6.

- Naghmouchi K., Baah J., Hober D., Jouy E., Rubrecht C., Sané F., Drider D. (2013) Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 2719–25.
- Nauth R. K. (2007) Prevention of lactic acid bacteria spoilage of beer through use of bacteriocin-containing fermented wort. *U.S. Patent* **7**: 186-426.
- Nauth R. K., Brooks S. (2000) Stabilization of fermented dairy compositions using whey from nisin-producing cultures. *U.S. Patent* **6**: 136-351.
- Nes I. F., Diep D. B., Havarstein L. S., Brurberg M. B., Eijsink V., Holo H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 113–28.
- Özdemir G. B., Oryaşın E., Biyık H. H., Özteber M., Bozdoğan B. (2011) Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian Journal of Microbiology* **51**: 182-187.
- Parada J. L., Caron C. R., Medeiros A. B. P. Soccol C. R. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**: 521–542.
- Park S. H., Itoh K., Fujisawa T. (2003) Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *Journal of Applied Microbiology* **95**: 294-300.
- Pascual L., Daniele M., Giordano W., Pajaro M., Barberis I. (2008) Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology* **56**: 397–402.
- Pineiro M.; Stanton C. (2007) Probiotic bacteria: Legislative framework-requirements to evidence basis. *Journal of Nutrition* **137**: 850–853.
- Ramakrishnan V., Narayan B., Halami P. M. (2012) Combined effect of enterocin and lipase from *Enterococcus faecium* NCIM5363 against food borne pathogens: mode of action studies. *Current Microbiology* **65**: 4095–9.
- Rizzello C. G., Filannino P., Di Cagno R., Calasso M., Gobbetti M. (2014) Quorum-sensing regulation of constitutive plantaricin by *Lactobacillus plantarum* strains under a model system for vegetables and fruits. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(2): 777–787.

Ross R. P., Hill, C. (2004) Spray -dried bacteriocin powder with antimicrobial activity. *U. S. Patent 6*: 833.

Ruiz-Larrea F., Rojo-Bezares B., Saenz Y., Navarro L., Diez L., Portugal C. B., Fernandez R., Zarazaga M., Torres C. (2010) Bacteriocins for wine microbiological control and reduction of SO<sub>2</sub> level. *Bulletin De L Oiv Revue Internationale De Viticulture Oenologie Economie* **80**: 445-457.

Sáenz Y., Rojo-Bezares B., Navarro L., Díez L., Somalo S., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. (2009) Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Food Microbiology* **134**: 176–183.

Sawa N., Zendo T., Kiyofuji J., Fujita K., Himeno K., Nakayama J., Sonomoto K. ( 2009) Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1552–1558.

Shelburne C. E., An F. Y., Dholpe V., Ramamoorthy A., Lopatin D. E., Lantz M. S. (2007) The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 297–300.

Singh A. P., Prabha V., Rishi P. (2013) Value addition in the efficacy of conventional antibiotics by nisin against *Salmonella*. *PLoS ONE* **8**.

Smith J. P., Daifas D. P., El-Khoury W., Koukoutsis J., El-Khoury, A. (2004) Shelf life and safety concerns of bakery products-a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**: 19–55.

Sosunov V., Mischenko V., Eruslanov B., Svetoch E., Shakina Y., Stern N. (2007) Antimycobacterial activity of bacteriocins and their complexes with liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 919–925.

Steiner I., Errhalt P., Kubesch K., Hubner M., Holy M., Bauer M., et al. (2008) Pulmonary pharmacokinetics and safety of nebulized duramycin in healthy male volunteers. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **378**: 323–333.

Stephens J. C., Reich D. E., Goldstein D. B., Shin H. D., Smith M. W., Carrington M., Winkler C., Huttley G. A., Allikmets R., Schriml L., Gerrard B., Malasky M., Ramos M. D., Morlot S., Tzetis M., Oddoux C., Giovine F. S. D., Nasioulas G., Chandler D., Aseev M., Hanson M., Kalaydjieva L., Glavac D., Gasparini P., Kanavakis E., Claustres M., Kambouris M., Ostrer H.,

- Duff G., Baranov V., Sibul H., Metspalu A., Goldman D., Martin N., Duffy D., Schmidtke J., Estivill X., O'Brien S. J., Dean M. (1998) Dating the origin of the CCR5-Δ32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *American Journal of Human Genetics* **62**(6): 1507-1515.
- Sturme M. H. J., Francke C., Siezen R. J., de Vos W. M., Kleerebezem M. (2007) Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology* **53**(12): 3939-3947.
- Sutyak K. E., Wirawan R. E., Aroutcheva A. A., Chikindas M. L. (2008) Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 1067–74.
- Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanić K., Matošić S. (2010) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology* **48** (3): 296-307.
- Taylor S. L. (1986) Nisin as an antitubercular agent for food products. *U.S. Patent* **4**: 597.
- Todorov S.D. (2009) Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*—Production genetic organization. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 209–221.
- Torodov S. D., Dicks L. M. T. (2005) *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* **36**: 318–26.
- Vandana B., Parmjit S. P., Manab B. B., John F. K. (2016) Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **56**: 817-834.
- Varish A., Mohd S. K., Qazi Mohammad S. J., Mohammad A. A., Mohammad A. K., Mughees U.S. (2016) Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation, *International Journal of Antimicrobial Agents* **49**: 1–11.
- Venema K., Chikindas M.L., Seegers J.F.M.L., Haandrikman A.J., Leenhouts K.J., Venema G., Kok J. (1997) Rapid and efficient purification methods for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 305–9.
- Wirawan R. E., Swanson K. M., Kleffmann T., Jack R. W., Tagg J. R. (2007) Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology* **153**: 1619–1630.



Yamauchi Y., Ishii S., Toyoda S., Ahiko, K. (1996) Process for the manufacture of fermented milk. *U.S. Patent* **5**: 527.

Zacharof M. P. Lovitt R. W. (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review article. *APCBEE Procedia* **2**: 50–56.

Zouhir A., Hammami R., Fliss I., Hamida J. B. (2010) A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *Protein Journal* **29**: 432–439.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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

Maja Horvat

ime i prezime studenta