

Induciranje bakteriocinske aktivnosti bakterija mliječne kiseline u kokulturi

Marinić, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:873909>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Laura Marinić

6836/BT

**INDUCIRANJE BAKTERIOCINSKE AKTIVNOSTI
BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U KOKOLTURI**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: doc.dr.sc. Ksenija Uroić

Zagreb, 2017.

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. Ksenije Uroić, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009).

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

Induciranje bakteriocinske aktivnosti bakterija mliječne kiseline u kokulturi

Laura Marinić, 0058204211

Sažetak: Svojstvo bakterija mliječne kiseline da inhibiraju rast drugih mikroorganizama rezultat je nastajanja i djelovanja organskih kiselina, prvenstveno mliječne i octene kiseline te posljedično niske pH vrijednosti okoliša, a mogu nastati i drugi metaboliti s antimikrobnom aktivnošću, kao što su vodikov peroksid, etanol, diacetil, acetaldehid i bakteriocini. Od svih navedenih spojeva, poseban se naglasak stavlja na bakteriocine, specifične peptide s antimikrobnim djelovanjem prema srodnim bakterijskim vrstama. Stoga je u ovom završnom radu provedeno ispitivanje prisutnosti gena koji kodiraju za plantaricine, odnosno enterocine kod sojeva BMK *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactobacillus pentosus* D1, *Enterococcus durans* D8 i *Enterococcus faecium* L3. Za daljnja ispitivanja bakteriocinskog djelovanja odabran je probiotički soj *L. brevis* D6. Budući da je bakteriocinska aktivnost usmjerena samo prema Gram-pozitivnim bakterijama kakve su i BMK, kao test-mikroorganizmi u tim ispitivanjima odabrane su dvije Gram-pozitivne bakterije koje se često pojavljuju kao kontaminanti u hrani - *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Osim inhibitornog učinka probiotičkog soja *L. brevis* D6 na rast navedenih test-mikroorganizama, posebno je ispitana indukcija njegove bakteriocinogene aktivnosti uzgojem u kokultivaciji s istim test-mikroorganizmima.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, bakteriocini, kokultivacija

Rad sadrži: 30 stranica, 6 slika, 7 tablica, 42 literaturni navod

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: doc.dr.sc. Ksenija Uroić

Pomoć pri izradi: Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 18. rujna 2017.

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 Culture Technology

Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria

Laura Marinić, 0058204211

Abstract: The ability of lactic acid bacteria to inhibit the growth of other microorganisms is the result of the formation of organic acids, primarily lactic and acetic acid and consequently low pH of the environment, as well as of the production of other metabolites with antimicrobial activity, such as hydrogen peroxide, ethanol, diacetyl, acetaldehyde and bacteriocins. Of all the above mentioned compounds, special emphasis is placed on bacteriocins, specific peptides with antimicrobial activity against related bacterial species. Therefore, in this Bachelor thesis, the presence of genes coding for plantaricins and enterocins in LAB strains *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactobacillus pentosus* D1, *Enterococcus durans* D8 and *Enterococcus faecium* L3 was examined. For further investigations of bacteriocins, probiotic strain *L. brevis* D6 was selected. Since activity of bacteriocins is directed only to Gram-positive bacteria such as LAB, two Gram-positive bacteria which are most common food contaminants are selected as test microorganisms - *Staphylococcus aureus* 3048 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. In addition to the inhibitory effect of the probiotic strain *L. brevis* D6 on the growth of the above-mentioned test microorganisms, the induction of its bacteriocinogenic activity was studied by co-culturing with the same test microorganisms.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocins, co-culture

Thesis contains: 30 pages, 6 figures, 7 tables, 42 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Ksenija Uroić, Assistant Professor

Technical support and assistance: Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Defence date: 18th September 2017

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Uloga bakteriocina bakterija mliječne kiseline.....	2
2.2. Mehanizmi indukcije kroz komunikaciju mikrobnih stanica	3
2.3. Veza mikroorganizama induktora i produktivnih mikroorganizama.....	7
2.4. Molekularni mehanizmi kokulturno inducirane produkcije bakteriocina.....	7
2.5. Budućnost u istraživanju bakteriocina	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	12
3.1.2. Hranjive podloge	13
3.1.3. Kemikalije	14
3.1.4. Aparatura i pribor.....	14
3.2. METODE RADA	16
3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama	16
3.2.2. Izolacija DNA.....	16
3.2.3. PCR.....	16
3.2.4. Kokultivacija soja <i>Lactobacillus brevis</i> D6 uz test-mikroorganizme <i>Listera monocytogenes</i> ATCC 19111 i <i>Staphylococcus aureus</i> 3048	19
3.2.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara (“Agar-spot-test metoda”)	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Detekcija gena koji kodiraju za bakteriocine.....	21
4.2. Indukcija bakteriocinske aktivnosti kokultivacijom s test-mikroorganizmima.....	22
5. ZAKLJUČCI.....	25
6. LITERATURA.....	26

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) prirodno su prisutne u različitim staništima, prvenstveno u biljnim materijalima te kravljem mlijeku, pri čemu se u veoma bliskoj interakciji nalaze različite bakterijske vrste. Takav kompetitivni okoliš potiče proizvodnju antimikrobnih metabolita kod BMK. Naime, opće je poznato da mikroorganizmi imaju sposobnosti stvaranja antimikrobnih spojeva koji se inače ne nalaze u idealnim laboratorijskim uvjetima. Učestale tehnike otkrivanja antimikrobnih metabolita zahtijevaju izolaciju monokultura i individualno ispitivanje na ciljane mikroorganizme. Svojstvo BMK da inhibiraju rast drugih mikroorganizama rezultat je nastajanja i djelovanja organskih kiselina, prvenstveno mliječne i octene kiseline i posljedično niske pH vrijednosti okoliša, a mogu nastati i drugi metaboliti s antimikrobnom aktivnošću, kao što su vodikov peroksid, etanol, diacetil, acetaldehid i bakteriocini. Od svih navedenih supstanci, poseban se naglasak stavlja na bakteriocine, specifične peptide s antimikrobnim djelovanjem prema srodnim bakterijskim vrstama. Budući da je bakteriocinska aktivnost usmjerena samo prema Gram-pozitivnim bakterijama kakve su i bakterije mliječne kiseline, kao test-mikroorganizmi u ovom radu odabrane su dvije Gram-pozitivne bakterije koje se često pojavljuju kao kontaminanti u hrani - *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Dobri producenti bakteriocina svakako imaju kompetitivnu prednost u svom okolišu, što je za odabir probiotičkih i funkcionalnih starter kultura jedan od najvažnijih selekcijskih kriterija. Međutim, proizvodnja bakteriocina probiotičkih sojeva može ovisiti o mnogim okolišnim čimbenicima, kao što su pH, temperatura, uvjeti rasta te prisutnost drugih bakterijskih vrsta. Pritom je posebno primijećena stimulacija bakteriocinogene aktivnosti uzgojem soja producenta bakteriocina u kokulturi s bakterijskim vrstama s kojima je navedeni soj u kompeticiji (Rojo-Bezares et al., 2007; Kos i sur., 2011).

U ovom završnom radu provedeno je ispitivanje prisutnosti gena kod bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactobacillus pentosus* D1, *Enterococcus durans* D8 i *Enterococcus faecium* L3. Za daljnja ispitivanja bakteriocinske aktivnosti, odabran je soj *L. brevis* D6, čija su probiotička svojstva dokazana kroz niz istraživanja (Uroić i sur., 2016). Osim inhibitornog učinka tog probiotičkog soja na rast test-mikroorganizama *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, posebno je ispitana indukcija njegove bakteriocinske aktivnosti kokultivacijom sa navedenim test mikroorganizmima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Uloga bakteriocina bakterija mliječne kiseline

Uloga bakteriocina iz bakterija mliječne kiseline (BMK) u sigurnosti hrane godinama je u središtu pozornosti, obzirom da je zaključeno kako su oni sigurni, prirodni antimikrobni spojevi s primjenom u prehrani. Međutim, budući da bakteriocini imaju uzak spektar inhibitornog djelovanja te da postoji potencijal da se razvije otpornost na njihovo djelovanje, otkrivanje novih bakteriocina s posebnim karakteristikama i diferencijalnim spektrom velik je izazov u industrijskom istraživanju. U tom kontekstu, industrija ulaže velike napore i znatna sredstva u istraživanje i razvoj strategija otkrivanja novih prirodnih antimikrobnih spojeva.

Genotipsko obilje antimikrobnih spojeva u mikroorganizmima puno je veće nego što se vidi u njihovim fenotipima (Pettit, 2009). Iako višak nutrijenata potpomaže proizvodnju antimikrobnih spojeva od strane vrste toksične za druge vrste (Frank, 1994; Wloch-Salamon i sur., 2008), energija koju mikroba stanica treba uložiti za navedenu proizvodnju u idealnim laboratorijskim uvjetima, kada je izvučena iz svog prirodnog ekosustava, može biti potpuno drugačija nego kada se ista stanica nalazi u prisutnosti konkurenata. Na primjer, proizvodnja kolicina, bakteriocina koje proizvodi *Escherichia coli*, može se postupno smanjiti u sojevima koji rastu u ne-kompetitivnim okolinama (Vriezen i sur., 2009.) Indukcija ne-ribosomski stvorenih sekundarnih metabolita koristeći mješovite kulture već je nekoliko godina poznata na području prirodne proizvodnje antibiotika, kao na primjer u *Actinomyces* i posebice *Streptomyces* sp. Pregled važnosti kokultura u istraživanju već poznatih te otkrivanju novih antibiotika opisao je Pettit (2009).

S druge strane, istraživanje utjecaja kokultura na produkciju ribosomski sintetiziranih antimikrobnih spojeva tek je u začetku. Na primjer, istraživanja interakcije između kvasaca i sojeva *Lactococcus lactis* koji stvaraju nisin pokazale su da prisustvo stanica kvasca utječe na povećanu proizvodnju nisina. Na primjer, Liu i sur., (2006) pokazali su da je proizvodnja nisina od strane *L. lactis* subsp. *lactis* povećano za 85% kada je produktivni soj uzgajan u kokulturi sa *Saccharomyces cerevisiae* CL01, u usporedbi s kontrolom. Pritom je kvasac asimilirao uglavnom mliječnu kiselinu, ali i octenu kiselinu koju stvaraju bakteriocin-produktivne kulture u mediju baziranom na sirutki, uz pH blizu neutralnih vrijednosti. To je poboljšalo produkciju bakteriocina budući da je akumulacija mliječne kiseline bila limitirajući faktor u produkciji nisina. Slične rezultate ranije su dobili Shimizu i Mizuguchi (1999), kada je kvasac *Kluyveromyces marxianus* korišten za kontrolu pH vrijednosti u fermentaciji nisin-produktivne bakterije *L. lactis*. Kvasac je konzumirao laktat koji je stvarao *Lactococcus* soj i

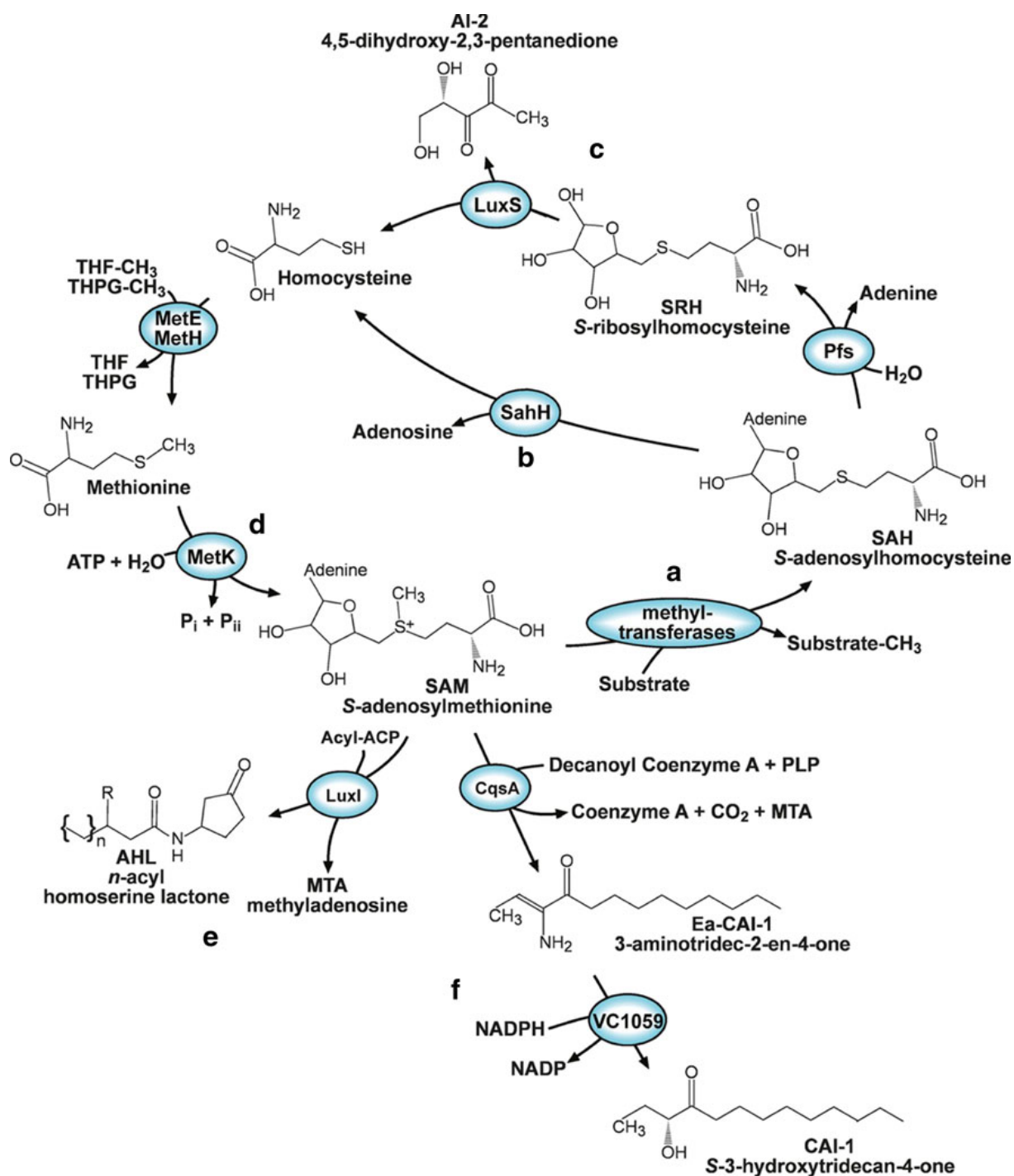
povećao produkciju nisina za 70% u usporedbi s alkalno-kontroliranom fermentacijom. Superiornost ovog sustava kontrole pH vrijednosti leži u činjenici da su ne samo pH, nego i vrijednosti laktata bile niske, što je potpomoglo proizvodnju bakteriocina. Za usporedbu, u fermentaciji uz upotrebu NaOH, pH je uglavnom uspješno kontroliran, ali laktat se skupljao u visokim količinama i tako inhibirao produkciju nisina. Osim ovih simbiotskih odnosa koji su utjecali na produkciju bakteriocina kroz jasne mehanizme, postoje i rezultati koji upućuju na indukciju inače pritajenih fenotipa bakteriocina. U tim slučajevima, uključeni su mehanizmi komunikacije među stanicama, budući da se čini da je indukcija povezana s određenim brojem stanica koji je graničan, tj. postoji „quorum“ kod kojeg se mikroorganizam ponaša kao induktor. Potrebno je još mnogo istraživanja kako bi se otkrili potencijalni mehanizmi produkciju bakteriocina u BMK koja je inducirana kokulturom, čime bi se omogućio razvoj novih strategija otkrivanja antimikrobnih spojeva i predložili budući smjerovi ispitivanja na ovom području.

2.2. Mehanizmi indukcije kroz komunikaciju mikrobnih stanica

Generalno se smatra da bakterije imaju mogućnost djelovati na višestanični način i stvarati interakcije među vrstama. Termin „quorum sensing“ stvoren je kako bi se opisala ponašanja gdje se regulacija posebnih gena u bakterijskoj populaciji može koordinirati, često pod uvjetom da je postignuta određena gustoća stanica. Quorum sensing (QS) nastaje direktnim kontaktom između stanica ili kroz male kurirske molekule koje stanice proizvode te međusobno razmjenjuju (Williams i sur., 2007.) Različite grupe QS molekula su identificirane u Gram-negativnim bakterijama, na primjer, acil homoserinski laktoni (AHL) često funkcioniraju kao signalne molekule. Sintetizirane su od strane LuxI tipova sintaza i često reagiraju s LuxR transkriptomskim regulatorima kako bi regulirale gene. U Gram-pozitivnim bakterijama, QS se stvara kroz male peptide kao dvo-komponentni regulatorni sustav koji se sastoji od histidin kinaze na koju se veže peptid i regulatora odgovora (Williams i sur., 2007.) Treća molekula koja se smatra uključenom u komunikaciju među vrstama je autoinduktor-2 molekula (AI-1). AI-2 je nusprodukt aktiviranog metilnog ciklusa kroz koji se S-adenosilmetionin (SAM) reciklira. Formira se katalizom S-ribosilhomocisteina (SRH) od strane LuxS enzima gdje je SRH produkt detoksifikacije S-adenosilhomocisteina (SAH), demetiliranog produkta SAM-a, od strane enzima Pfs (Slika 1). Na taj način, AI-2 bi se mogao klasificirati kao čisti metabolički produkt. Ipak, konačne uloge AI-2 u QS-u, kao što je razvoj motiliteta i biofilma, prepoznate su u nekoliko slučajeva i za različite bakterijske vrste koje su opisali Pereira i sur. (2013).

Modulacija izražavanja QS-a opisana je kod mnogih gena. Danas se ipak zna da se bakterijski fenotipi koji su važni za ljude i industriju hrane, kao virulencija, kvarenje hrane i proizvodnja antimikrobnih spojeva, reguliraju tim sustavima. Primjeri uključuju regulaciju fenotipa vezanih uz adheziju na domaćina i produkciju toksina kod *Staphylococcus aureus*; sekreciju faktora virulencije kao što su proteaze i formacija biofilma kod *Pseudomonas*; flagelarni motilitet, površinsku adheziju i produkciju toksina kod *E. coli* te produkciju enterotoksina i hemolizina u *Bacillus cereus* (Swift i sur., 2001; Antunes i sur., 2010; Rutherford i Bassler 2012).

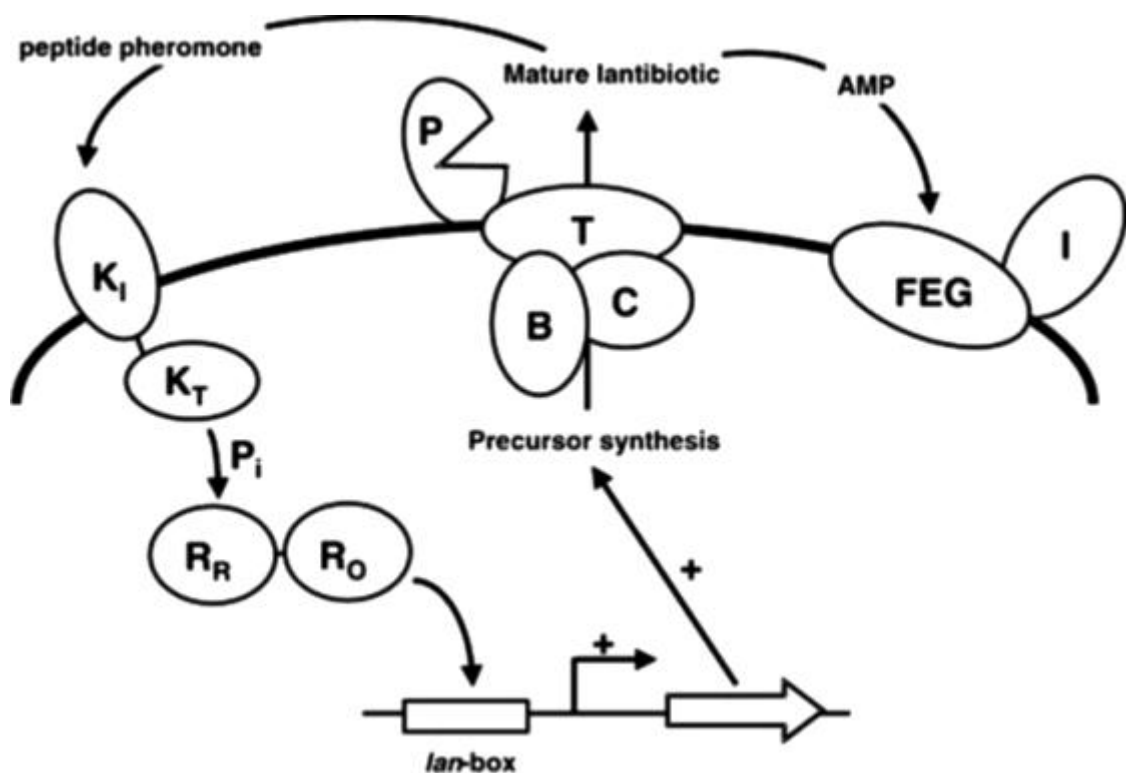
Proizvodnja bakteriocina od strane BMK, često se pokazalo, regulirana je QS mehanizmom. Komunikacija između stanica postiže se kroz male kurirske peptide koji se često nazivaju autoinduktorima (AI) ili peptidima autoinduktorima (AIP) (Quadri, 2002; Gobbetti i sur., 2007). QS produkcija bakteriocina prepoznata je u članovima dvaju najvećih klasa BMK bakteriocina, klasi I (lantibiotici) i klasi II (pediocinski) bakteriocina. Produkcija lantibiotika nisina A od strane *L. lactis* je dobro istražena. Dokazano je da taj peptid ima dvostruku ulogu, konferenciju antimikrobne aktivnosti te autoinduktorsku aktivnost (Kleerebezem, 2004). Regulacijski mehanizam povezan s proizvodnjom lantibiotika sadrži histidin kinazu, regulator odgovora i antimikrobni peptid u ulozi induktora, što se često naziva dvo-komponentni sustav regulacije (Slika 2).



Slika 1. Biosintetički put AI-2 (Pereir i sur., 2013).

Molekule bakteriocina koje se akumuliraju u staničnom okruženju vežu se za transmembransku histidin kinazu mikroorganizma producenta. Aktivacija histidin kinaze uzrokuje fosforilaciju regulatora odgovora i to inicira transkripciju bakteriocin relevantnih gena, tako da se veže za relevantnu promotorsku regiju DNA (Kleerbezem, 2004). Sličan mehanizam regulacije produkcije bakteriocina postoji u slučaju bakteriocina klase II. Regulacija produkcije bakteriocina vodi se od strane tro-komponentnog sustava regulacije

koji se sastoji od (i) peptida induktora (ii) transmembranske histidin kinaze i (iii) citosoličkog regulatora odgovora. U usporedbi s dvo-komponentnim sustavom regulacije opisanom u lantibioticima, peptid induktor uključen je kao induktor proizvodnje bakteriocina, za razliku od molekule bakteriocina u lantibiotskoj produkciji. Peptid induktor često se može transkribirati u jednom transkriptu s gena koji kodira za bakteriocin. Ekspresija i transport peptida induktora iz stanica odvija se polako. Kada koncentracija peptida dosegne određenu razinu (quorum) tada ga osjeti vanstanični dio histidin kinaze koji se aktivira od strane fosforilacije ostatka histidina aminokiseline. Transfosforilacija unutarstanično lociranog regulatora odgovora uzrokuje njegovo vezanje na specifične promotore koji su odgovorni za regulaciju ekspresije bakteriocina i faktora indukcije. Ekspresija bakteriocinskog gena manifestira se kroz povećanu antimikrobnu aktivnost u kulturi, dok ekspresija induksijskog faktora potiče produkciju novog bakteriocina (Drider i sur., 2006; Belguesmia i sur., 2011).



Slika 2. Regulacija biosinteze lantibiotika nisina i subtilina. Prekursor lantibiotik je posttranslatorski modificiran tijekom transporta iz stanice od strane multi-meričkog kompleksa NisBCT ili SpaBCT. Rascjep vodećeg peptida napravljen je od strane NisP u slučaju nisina, dok vanstanični enzim stvoren od strane *Bacillus subtilis* radi rascjep vodećeg peptida iz subtilina. Zreli peptid osjeti senzor kinaze K1/KT i vodi do fosforilacije i aktivacije

regulatora odgovora RR/RO, koji potom aktivira transkripciju nisina. Faktori FEG i I čuvaju imunostni sustav od djelovanja nisina i/ili subtilina (Kleerbezem, 2004.)

2.3. Veza mikroorganizama induktora i produktivnih mikroorganizama

Kokulture mogu imati efekt indukcije proizvodnje kod prethodno neaktivnog bakteriocin-kompetentnog soja (Rojo-Bezares i sur., 2007) ili mogu pojačati produkciju bakteriocina iznad osnovne razine (Man i sur., 2012). Ipak, neki rezultati pokazuju da je proizvodnja bakteriocina smanjena u kokulturama jednog ili dvaju sojeva koji proizvode bakteriocin (Domnguez-Manzano i Jimenez Diaz, 2013).

Sposobnost bakterije da inducira proizvodnju inhibitorne supstance slične bakteriocinu (eng. bacteriocin like inhibitory substance - BLIS) od strane drugog mikroorganizma, očito je specifična za pojedini soj te ne ovisi o njihovom međusobnom odnosu. Mikroorganizmi koji induciraju proizvodnju bakteriocina i mikroorganizmi koji stvaraju bakteriocin mogu biti filogenetski povezani ili udaljeni. Nadalje, mikroorganizmi koji induciraju mogu biti ili otporni ili osjetljivi na antimikrobni spoj koji se stvori (Maldonado i sur., 2004; Rojo-Bezares i sur., 2007; Tabasco i sur., 2009). Na primjer, produkcija plantaricina PLNC8 inducirana je samo kokulturom sa specifičnim sojevima koji pripadaju Gram-pozitivnim mikroorganizmima. Pedeset posto sojeva koji su testirani mogli su inducirati proizvodnju PLNC8, dok je samo 6% bilo osjetljivo na njegovu aktivnost (Maldonado i sur., 2004). Slično tome, 10 od 45 sojeva koji su testirani mogli su inducirati produkciju bakteriocina od strane *Lactobacillus plantarum* J23, dok je pritom njih 6 bilo osjetljivo na bakteriocin (Rojo-Bezares i sur., 2007).

2.4. Molekularni mehanizmi kokulturno inducirane produkcije bakteriocina

Provedena su mnoga istraživanja proizvodnje dvopeptidnog plantaricina NC8 od strane mikroorganizama induciranih uzgojem u kokulturi (Maldonado i sur., 2004). Radi se o mehanizmu autoindukcije koji nalikuje na tro-komponentni sustav regulacije klase II bakteriocina. Prisutnost živih ili topline ubijenih stanica induktora potiče ekspresiju gena koji kodiraju za nezrele peptide bakteriocina iz genoma *L. plantarum* NC8, uključujući dva peptida bakteriocina PLNC8 (PLNC8 alpha i PLNC8 beta) (Maldonado i sur., 2003), te gena koji kodiraju za faktor indukcije (PINC8IF), histidin kinazu (PINC8HK) i regulator odgovora (PinD). Taj tro-komponentni sustav reguliranja pokazao je sličnosti s onima proizvodnje plantaricina A kod *L. plantarum* C11, koji se sastoji od bakteriocina/peptida induktora PinA, histidin kinaze PinB i dva regulatora odgovora, PinC i PinD (Diep i sur., 1995). Dok su putativni geni za faktor indukcije i histidin kinazu u soju NC8 dijelili vrlo malo homologije s ekvivalentnim genima u C11, njihovi regulatori odgovora (PinD) dijelili su 98% homologije na

razini proteina. Nadalje, visoko konzervirana L i R direktna ponavljanja, pronađena su u promotorskim regijama i u PINC8IF i PinA indukcijskim faktorima, kao i u promotorskim regijama drugih bakteriocinskih operona nađenim u soju NC8 (Diep i sur., 1996). Budući da ove regije pokazuju važnost u regulaciji promotora proizvodnje bakteriocina od strane specifičnih regulatora odgovora PInD i PinC kod *L. plantarum* C11 (Diep i sur., 2001; Straume i sur., 2009), proizvodnja bakteriocina u slučaju kokultivacije *L. plantarum* NC8 također se smatrala posredovanom autoindukcijom, odnosno quorum mehanizmom kroz PinD regulator odgovora. Međutim, velika razlika između sojeva C11 i NC8 leži u PInC, drugom regulatoru odgovora kod soja C11 koji nije nađen u soju NC8. Povećana ekspresija pInD kod soja C11 smanjila je proizvodnju pLnA, naglašavajući različit odgovor koji isti regulator može dati ovisno o različitoj topologiji DNA u drugim mikroorganizmima, (Maldonado i sur., 2004). Kao što je i predviđano, tro-komponentni sustav regulacije u soju NC8 vjerojatno je integralni dio kokulturno inducirane proizvodnje bakteriocina. To je demonstrirano u mutiranom *L. plantarum* N8 soju gdje je tro-komponentni regulatorni operon odstranjen te je mogućnost da stvara bakteriocin od strane kokulturne indukcije spriječena (Maldonado-Barragan i sur., 2013).

Međutim, postoje dokazi da svaki pretpostavljeni indukcijski signal koji se proizvodi kokultivacijom mikroorganizma induktora s proizvođačem bakteriocina prepoznaje različiti receptor, a ne histidin kinazu koja je povezana s tro-komponentnim regulatornim sustavom produkcije bakteriocina. Iako je produkcija bakteriocina u *L. plantarum* NC8, *L. plantarum* NC8 te *L. plantarum* WCFS1 regulirana od strane dva različita, prethodno opisana tro-komponentna sustava (Sturme i sur., 2007), proizvodnja bakteriocina u dva soja može biti inducirana istim mikroorganizmom induktorom *L. lactis* IL1403 (Maldonado-Barragan i sur., 2013). Kao što je ranije spomenuto, detekcija vanstaničnog stimulusa za proizvodnju bakteriocina napravljena od strane histidin kinaze te je u slučaju PInB histidin kinaze dokazano da je N-terminalna transmembranska strukturalna domena kinaze ona koja je stvarala interakciju s peptidom induktorom (Johnsborg i sur., 2003). PInB generalno dijeli vrlo nisku homologiju na razini gena u istoj domeni s PINC8HK (Maldonado i sur., 2004) i stoga nije vjerojatno da je pretpostavljeni faktor indukcije koji proizvodi *L. lactis* IL1403 mogao biti u interakciji s dvije relativno nepovezane transmembranske domene tro-komponentnog sustava histidin kinaze. Stoga, možemo zamisliti da su ili različite molekule proizvedene od strane istog mikroorganizma induktora inducirale produkciju bakteriocina ili da su druge molekule, a ne histidin kinaze na bakteriocin-produktivnim sojevima bile signalni

primatelji i regulirali proizvodnju specifičnih regulatora odgovora koji su aktivirali regulatorne operone za produkciju bakteriocina (Maldonado-Barragan i sur., 2013).

U skladu s opisanim, raniji rad na *Lactobacillus acidophilus* La-5 i kokulturno induktivnim bakteriocinom, laktacinom B, navodi na činjenicu da je produkcija bakteriocina regulirana od strane drugog promotora, a ne onog opisanog u tro-komponentnom sustavu. Organizacija gena u laktacin B produkciji čini se da je podupirala tro-komponentni sustav koji uključuje laktacin B strukturalni gen, histidin kinazu i regulator odgovora (Dobson i sur., 2007; Tabasco i sur., 2009). Bakteriocinogeni fenotip bio je prisutan u kulturama uzgajanim u agaru, dok je bio odustan u tekućim monokulturama, osim ako je producent bio kokultiviran s mikroorganizmom induktorom. Dodavanje sintetički napravljenog indukcijskog faktora IP_1800, kodiranog u genomu soja producenta, uzrokovalo je povećanje u aktivnosti u kulturi supernatanta *L. acidophilus* La-5, potvrđujući da je bar jedan način reguliranja proizvodnje laktacina B kroz quorum sensing. Uz to, dodavanje IP_1800 u kulturu uzrokovalo je porast razine transkripcije laktacin B strukturalnog gena lbaB. Nije zabilježen znatan porast za druge gene u laktacinu B (Tabasco i sur., 2009).

Kokultivacija *L. acidophilus* La-5 s induktivnim mikroorganizmom *Streptococcus thermophilus* STY-31 uzrokovala je povećanje transkripcije lbaB, pri čemu je navedeni porast u razini transkripcije bio puno viši nego bilo kojeg drugog ispitanog laktacin B gena. Bazična razina transkripcije strukturalnog gena detektirana je u čistim *L. acidophilus* La-5 kulturama ili kokulturama s toplinom deaktiviranim induktivnim stanicama. Međutim, tijekom kokultivacije sa živim induktivnim stanicama *S. thermophilus* STY-31, porast u razini transkripcije detektiran je za lbaB, dok su geni koji kodiraju za autoindukcijski faktor IP_1800 i ABC transportni protein ABC_1796 također su pozitivno regulirani, iako na nižu razinu nego lbaB. Pozitivna regulacija lbaB manifestirala se porastom u bakteriocinskoj aktivnosti supernatanta kulture (Tabasco i sur., 2009).

Analiza transkripcije laktacin B operona pokazala je da su geni vezani za laktacin B, koji sudjeluju u dvo-komponentnom regulatornom sustavu i transportu bakteriocina iz stanice, transkribirane u jednom transkriptu. To je, međutim, kontradiktorno s činjenicom da u kokulturi s jednim sojem induktorom, porast lbaB transkripcije gena bio je viši nego u onih gena koji kodiraju za indukcijski faktor i ABC transporter. Prema tome, može se zaključiti da je lbaB gen dodatno reguliran od strane vlastitog promotora. Intrinzični determinator lociran u laktacin B operonu, identificiran kao potencijalni lbaB regulator, podupire ovu teoriju (Tabasco i sur., 2009). Man i sur. (2014) predložili su da autoinduktor-2 (AI-2) (Tarighi i

Taheri, 2010) ima ulogu indirektnog pokretača pojačane produkcije bakteriocina u *L. plantarum* KLDS1.0391. Soj je bio producent bakteriocina širokog spektra (Gong i sur., 2010.) i njegova proizvodnja ovisila je o ekspresiji pINC8HK-pInD gena. Proizvodnja bakteriocina bila je značajno pojačana kada je producent uzgajan u kokulturi s određenim bakteriocinogenim sojevima BMK, ali ne sa supernatantima bez stanica ili autoklaviranim kulturama (Man i sur., 2012). Statistički značajna pozitivna regulacija gena pINC8HK i pInD postignuta je kada je *L. plantarum* KLDS1.0391 kokultiviran s producentom bakteriocina *L. helveticus* KLDS1.0207 (Man i sur., 2014). Takva regulacija ekspresije gena rezultirala je fenotipom pojačane bakteriocinske aktivnosti, a to je pozitivno koreliralo s brojem stanica soja producenta i AI-2 aktivnosti u eksponencijalnoj fazi rasta. pINC8HK-pInD mutanti u kokulturi s mikroorganizmom induktorom pokazali su smanjenu AI-2 aktivnost. Nadalje, mutanti soja KLDS1.0391 onemogućili su proizvodnju bakteriocina u monokulturi i pokazali značajno smanjenu aktivnost kad su kokultivirani s induktivnim sojem. Na temelju tih rezultata, pretpostavljeno je da je kontakt među stanicama mikroorganizma induktora *L. helveticus* KLDS1.0207 i mikroorganizma producenta uzrokovao porast u gustoći stanica *L. helveticus* pomoću nepoznatog mehanizma. Taj porast gustoće stanica potpomogao je akumulaciju AI-2 autoinduktora koji je stvorio bakteriocinogeni soj. Postoji hipoteza da je nastali AI-2 autoinduktor imao ulogu okolišnog stimulatora tako da je vezao protein histidin kinazu pINC8HK, čime je inicirao već poznati regulacijski ciklus tro-komponentnog sustava kroz fosforilaciju regulatora odgovora i inicijaciju transkripcije produkcije bakteriocina i gena vezanih za samoindukciju (Man i sur., 2014).

2.5. Budućnost u istraživanju bakteriocina

Otkriće novih bakteriocina iz BMK visoke je važnosti za industriju hrane zbog problema koje uzrokuju kvarenje hrane uslijed kontaminacije Gram-pozitivnim, Gram-negativnim i gljivičnim patogenima. BMK i njihovi produkti su pouzdani i sigurni izvori bakteriocina zbog duge povijesti sigurne uporabe i pozitivne slike koja postoji o njima u javnosti. Kao i drugi mikroorganizmi, BMK su sveprisutne u okolišu i njihove aktivnosti ovise o kolektivnim postupcima koji se događaju kroz međustaničnu komunikaciju unutar i među vrstama. Proizvodnja bakteriocina od strane BMK je pozitivna karakteristika, kao i indukcija proizvodnje bakteriocina od strane kokultura. Međutim, unutarnji mehanizmi takve proizvodnje nisu još razjašnjeni. Industrijska primjena zahtijeva identifikaciju potencijalno korisnih molekula, kao i shvaćanje mehanizama njihovog izlučivanja te detekciju receptora u stanicama koje proizvode bakteriocine. Sistematična studija takve proizvodnje bila bi korisna za cjelokupni pregled promjena u globalnom izražavanju gena u bakteriocinogenim

bakterijama koje su inducirane uzgojem u kokulturi, kao i u monokulturama. Takav pristup mogao bi identificirati diferencijalno regulirane gene koji bi mogli biti odgovorni za određeni bakteriocinski fenotip. Takve studije metabolita pridonijele bi i identifikaciji potencijalno induktivnih spojeva, posebice u slučajevima ne-ribosomski sintetiziranih spojeva gdje je teško pronaći direktnu vezu između ekspresije gena i fenotipa. Na potencijalnu ulogu AI-2 odnedavno je stavljen velik fokus, ali vitalne informacije u vezi njegove upotrebe, posebice u proizvodnji induciranoj kokultivacijom, i dalje nedostaju. Faktori koji utječu na proizvodnju, transport i inkorporaciju AI-2 u stanice, još su predmet intenzivnih istraživanja. Dostupnost sintetički nastalog AI-2 iznimno je važna za provođenje eksperimenta i očekuje se da će uvelike pomoći u postizanju vrijednih zaključaka kako navode Chanos i Mygind (2016).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu su korišteni sojevi bakterija mliječne kiseline, prikazani u tablici 1 te test-mikroorganizmi, 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 1. Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu uz optimalne uvjete njihovog uzgoja.

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus brevis</i>	D6	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D13	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus pentosus</i>	D1	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Enterococcus durans</i>	D8	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	L3	MRS, 37°C, anaerobno

Tablica 2. Test-mikroorganizmi korišteni u ovom radu uz optimalne uvjete njihovog uzgoja.

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	BHI, 37°C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	BHI, 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 goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- BHI bujon je istog sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.

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.

3.1.3. Kemikalije

- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- izopropranol, „Kemika“, Hrvatska
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- proteinaza K, „Fermentas“, Kanada
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- početnice „Invitrogen“, SAD

3.1.4. Aparatura i pribor

- Petrijeve zdjelice
- Epruvete
- Erlenmayer tikvice
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- ependorfice
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml

- stalci za ependorforce
- stalci za epruvete
- pinceta
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- elektroforetske kadice, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT, Izrael
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama

Sojevi bakterije 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 BHI 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 1.

3.2.2. Izolacija DNA

Volumen od 1,5 ml prekonocnih kultura bakterija mliječne kiseline (navedene u tablici 1) se centrifugira i ispire u GTE puferu (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500 μl GTE pufera, uz dodatak lizozima (8 mg/500 μl) i RNA-ze (50 $\mu\text{l}/\text{ml}$), i inkubiraju 30 minuta pri 37°C . Zatim se doda 250 μl 2% SDS-a i vorteksira 1 min. Nakon toga se doda 100 μl 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 μl 0,3 M NaAc i 10 mM MgCl_2 i vorteksira. Nakon dodatka 700 μl 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 μl TE (10mM Tris (pH 7,8) i 1mM EDTA) pufera.

3.2.3. PCR

Umnožavanje DNA molekule PCR metodom je provedeno u DNA-termobloku, Mastercycler personal, "Eppendorf". Kao DNA-kalup korištena je cjelokupna DNA bakterijskih stanica izolirana kao što je to opisano u poglavlju 3.2.2. 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 bakteriocine

Ciljani gen	Bakteriocin	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Očekivana veličina PCR produkta	Literatura
<i>plnA</i>	Plantaricin A	GTACAGTACTAATGGGAG	CTTACGCCAATCTATACG	320 bp	Diep i sur., (1996); Remiger i sur., (1996)
<i>plnEF</i>	Plantaricin EF	GGCATAGTTAAAATTCCC CCC	CAGGTTGCCGCAAAAAA AG	428 bp	Anderssen i sur., (1998); Diep i sur., (1996)
<i>plnJ</i>	Plantaricin J	TAACGACGGATTGCTCT G	AATCAAGGAATTATCACAT TTAGTC	475 bp	Anderssen i sur., (1998); Diep i sur., (1996)
<i>plnNC8</i>	Plantaricin NC8	GGTCTGCGTATAAGCAT CGC	AAATTGAACATATGGGT GCTTTAAATTC	207 bp	Maldonado i sur., (2004)
<i>plnS</i>	Plantaricin S	GCCTTACCAGCGTAATG CCC	CTGGTGATGCAATCGTT AGTTT	320 bp	Stephens i sur., (1998)
<i>plnW</i>	Plantaricin W	TCACACGAAATATTCCA	GGCAAGCGTAAGAAATA AATGAG	165 bp	Holo i sur., (2001)
<i>entA</i>	Enterocin A	GGTACCACTCATAGTGG AAA	CCCTGGAATTGCTCCACC TAA	138 bp	Moreno i sur., 2003
<i>entB</i>	Enterocin B	CAAAATGTAAAAGAATTA AAGTACG	AGAGTATACATTTGCTAA CCC	201 bp	Moreno i sur., 2003

Sastav reakcijske smjese volumena 50 µl je prikazan u tablici 4. Kao negativna kontrola je korištena PCR reakcijska smjesa bez DNA kalupa. PCR reakcije su provedene prema uvjetima navedenim u tablicama 5 i 6.

Nakon reakcije, 20 µl 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 µg/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 µL
Kalup (DNA)	2 µL
Početnica Sprot 1	0,1 µL
Početnica Sprot 2	0,1 µL
dH ₂ O	22,8 µL
UKUPAN VOLUMEN:	50 µL

Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije za amplifikaciju početnica za enterocine (Foulquie i sur., 2003).

Uvjeti PCR reakcije	T [°C]	vrijeme
Početna denaturacija	95	3 min
30 ciklusa:		
Denaturacija	95	30 sek
Sparivanje početnica	56	30 sek
Produljivanje lanca DNA	72	30 sek
Završno produljivanje lanca DNA	72	5 min

Tablica 6. Uvjeti PCR reakcije za amplifikaciju početnica za plantaricine (Rojo-Bezares i sur., 2007).

Uvjeti PCR reakcije	T [°C]	vrijeme
Početna denaturacija	95	3 min
30 ciklusa:		
Denaturacija	95	30 sek
Sparivanje početnica	60	1 min
Produljivanje lanca DNA	72	1 min
Završno produljivanje lanca DNA	72	5 min

3.2.4. Kokultivacija soja *Lactobacillus brevis* D6 uz test-mikroorganizme *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048

Proveden je združeni uzgoj *Lactobacillus brevis* D6 s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *S. aureus* 3048, u svrhu provjere utjecaja kokultivacije na bakteriocinsku aktivnost soja producenta bakteriocina prema metodi Kos i sur., (2008). Nakon prekonocnog uzgoja bakterijske stanice su isprane dva puta s fiziološkom otopinom. Inokulirano je 10^7 CFU/ml soja producenta bakteriocina dok su test-mikroorganizmi inokulirani u broju 10^3 i 10^4 CFU/ml. Združeni uzgoj je proveden u 50 ml BHI bujona na način da su test-mikroorganizmi dodani 2 sata nakon probiotičkog soja. Proveden je i uzgoj svih ispitivanih sojeva zasebno u BHI bujonu pri istim uvjetima. Inkubacija je provedena aerobno 48 h pri 37°C. Tijekom prvih 10 sati uzimani su uzorci svaka 2 sata, jer se stanice tada nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, te su također uzeti uzorci nakon 22, 24 i 48 h inkubacije, u stacionarnoj fazi rasta. Nakon uzimanja svakog uzorka izmjerena je pH vrijednost podloge. Broj živih stanica u uzorcima određivan je na MRS selektivnoj podlozi za laktobacile, Baird-Parker podlozi za *S. aureus* 3048 i ChromoBio® Listeria podlozi za *L. monocytogenes*. MRS ploče su inkubirane anaerobno, dok su Baird-Parker i ChromoBio® Listeria agar ploče inkubirane aerobno 24 sata pri 37°C te je nakon inkubacije određivan broj bakterijskih stanica izražen kao log CFU/ml.

3.2.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara ("Agar-spot-test metoda")

Tijekom kokultivacije također je provedeno ispitivanje bakteriocinske aktivnosti prema test-mikroorganizmima koji su korišteni za indukciju sinteze bakteriocina, primjenom metode s dvostrukim slojem agara. Ispitivanje bakteriocinske aktivnosti je provedeno nakon 4, 6, 8, 10, 22, 24 i 48 sati inkubacije, pri čemu su uzorci nacijepljeni na MRS agar. Ploče su inkubirane anaerobno preko noći pri 37°C. Ploče nacijepljene s uzorcima nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *S. aureus* 3048 su prelivene s 10 ml BHI soft agara (0,7%) koji je prethodno inokuliran s istim test-mikroorganizmom i s 10 ml BHI soft agara (0,7%) koji je prethodno inokuliran s test-mikroorganizmom *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, pojedinačno. Ploče nacijepljene s uzorcima nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *L. monocytogenes* ATCC 19111 su prelivene s 10 ml BHI soft agra (0,7%) koji je prethodno inokuliran s istim test-mikroorganizmom i s 10 ml BHI soft agara (0,7%) koji je prethodno

inokuliran s test-mikroorganizmom *Staphylococcus aureus* 3048, pojedinačno. Ploče su inkubirane aerobno preko noći pri 37°C. Nakon inkubacije izmjereni su promjeri porasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID) te se izračunao efektivni inhibicijski odnos (EIR) prema sljedećem izrazu (Coeuret i sur., 2004):

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

$\text{EIR} < 0,5$ – slaba inhibicija

$0,5 < \text{EIR} < 1,5$ – srednja inhibicija

$\text{EIR} > 1,5$ – jaka inhibicija

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Detekcija gena koji kodiraju za bakteriocine

U literaturi su bakteriocini bakterijske vrste *Lactobacillus plantarum*, nazvani plantaricini, jedni od najbolje opisanih, tako da se najveći broj početnica za detekciju gena za bakteriocine odnosi upravo na plantaricine, dok su dvije početnice odabrane za detekciju gena za enterocine, bakteriocine koje proizvode neki sojevi iz roda *Enterococcus*.

Prema dobivenim rezultatima PCR reakcija za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocine vidljivo je da niti u jednoj negativnoj kontroli ne dolazi do dimerizacije upotrebljenih početnica, pa DNA vrpce dobivene sa specifičnim početnicama za detekciju gena za bakteriocine ukazuje na pozitivan rezultat PCR reakcije. Primjenom specifičnih početnica za detekciju gena koji kodiraju za enetrocine, nakon provođenja PCR reakcije sa izoliranom DNA sojeva *Enterococcus durans* D8 i *Enterococcus faecium* L3 nije detektiran produkt PCR reakcije na gelu. Nasuprot tome, primjenom specifičnih početnica za detekciju gena koji kodiraju za plantaricine dobiveni su PCR produkti s izoliranom DNA svih ispitivanih sojeva *L. plantarum* (tablica 7).

Tablica 7. 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

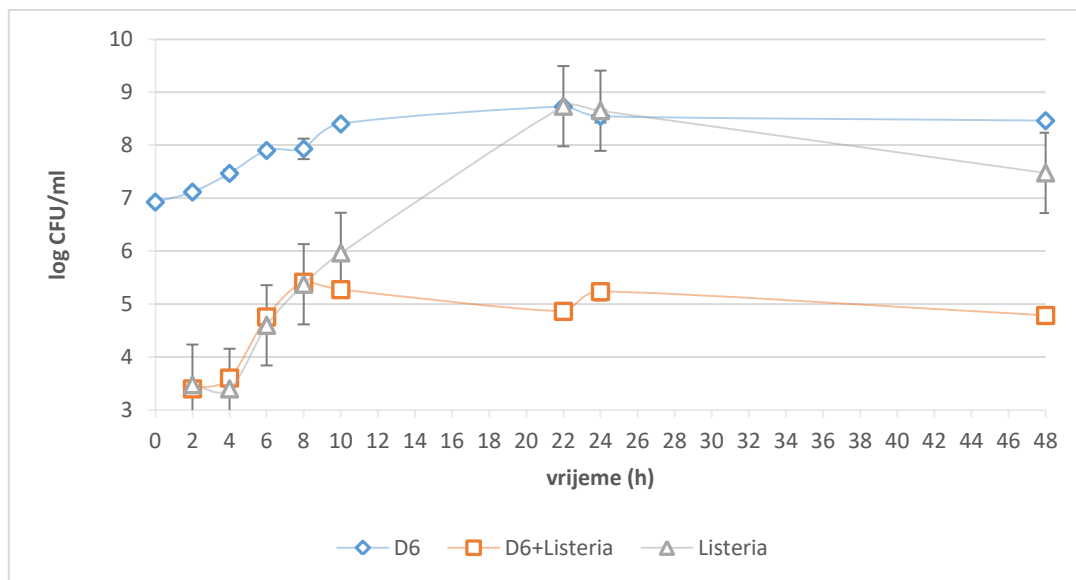
Soj:	enterocin A	enterocin B	pln A	plnEF	plnJ	plnNC8	plnS	plnW
<i>L. brevis</i> D6	/	/	+	+	+	-	-	-
<i>L. plantarum</i> D13	/	/	+	+	+	-	-	-
<i>L. pentosus</i> D1	/	/	+	+	+	-	-	-
<i>E. durans</i> D8	-	-	/	/	/	/	/	/
<i>E. faecium</i> L3	-	-	/	/	/	/	/	/
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2. Indukcija bakteriocinske aktivnosti kokultivacijom s test-mikroorganizmima

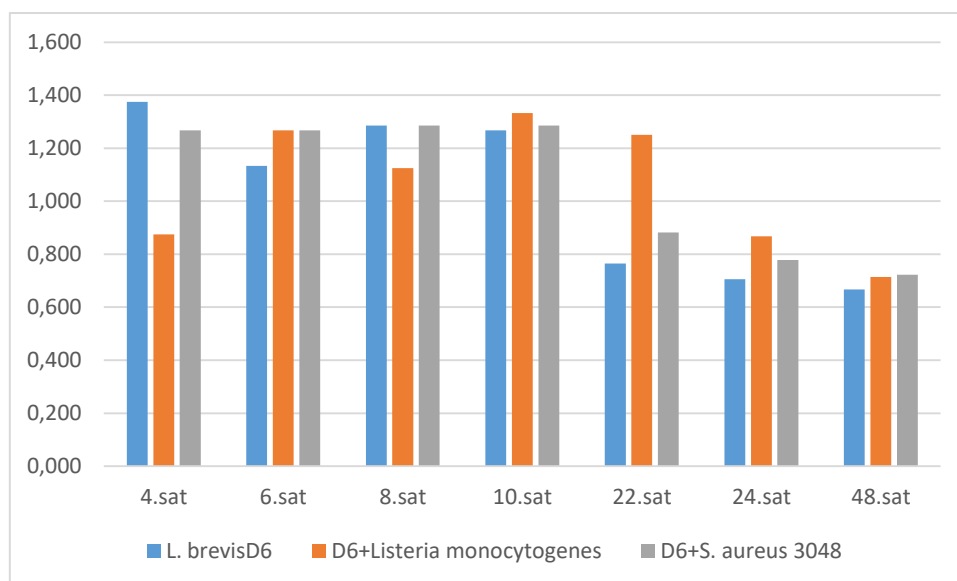
Proveden je združeni uzgoj *Lactobacillus plantarum* D6, s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC19111 i *S. aureus* 3048, u svrhu provjere utjecaja kokultivacije na bakteriocinsku aktivnost soja producenta bakteriocina. Tijekom kokultivacije *L. plantarum* D6 s navedenim test-mikroorganizmima provjeravana je stimulacija bakteriocinske aktivnosti ispitivanjem inhibicijskog učinka soja producenta bakteriocina nakon 4, 6, 8, 10, 22, 24 i 48 sati kokultivacije s test-mikroorganizmom metodom s dvostrukim sojem agara.

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je rast test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC19111 bio inhibiran nakon 10 sati uzgoja sa *Lactobacillus plantarum* D6, pri čemu je inhibitorski učinak dodanog probiotičkog soja zadržan do kraja praćenja rasta ispitivanog test-mikroorganizma (Slika 3). Naime, bakteriostatsko djelovanje bakteriocina se zadržalo i nakon 48 sati uzgoja, kad je broj živih stanica *L. monocytogenes* ATCC19111 bio za gotovo 3 log jedinice niži nego u kontroli (monokulturi *L. monocytogenes* ATCC19111).

Rezultati određivanja efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 s *Lactobacillus brevis* D6, bez prethodne kokultivacije te nakon kokultivacije navedenog probiotičkog soja s test-mikroorganizmima *Listeria monocytogenes* ATCC 1911, odnosno *Staphylococcus aureus* 3048, pokazuju da se najveći inhibitorski učinak rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 nakon 22 sata uzgoja postigne kokultivacijom probiotičkog soja sa test mikroorganizmom *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (Slika 4). Sličan učinak s malo manjom razlikom određen je i u 24. satu, dok se u 48. satu inhibicijsko djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC19111 soja *L. plantarum* D6 u navedenim kokulturama i istog soja u monokulturi ne razlikuje.



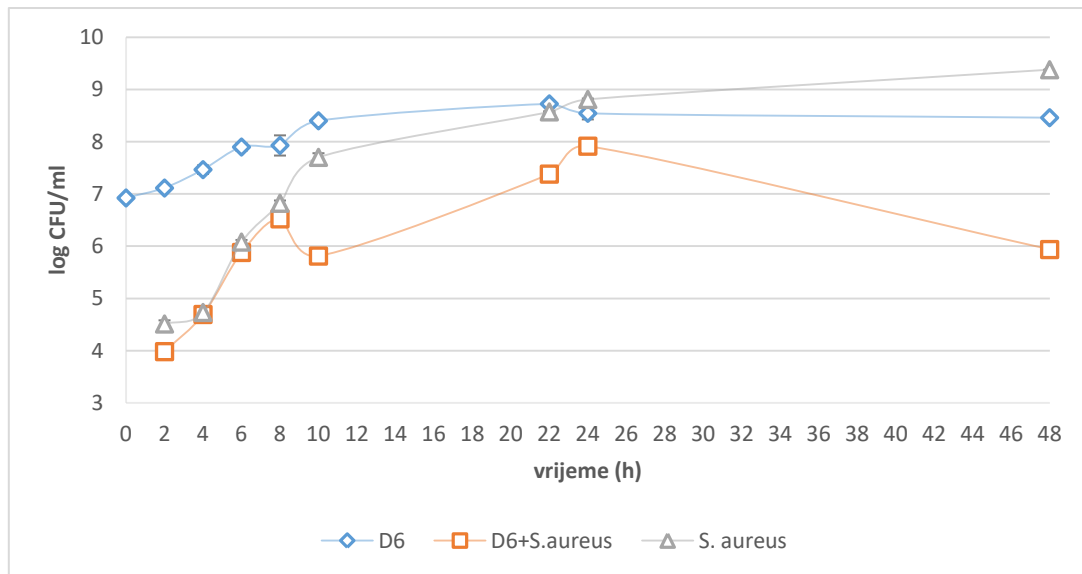
Slika 3. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *L. brevis* D6 (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta *L. brevis* D6 (plava linija) i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (siva linija) u monokulturi. Rast *L. brevis* D6 u kokultivaciji s test-mikroorganizmom *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 odgovara rastu u monokulturi.



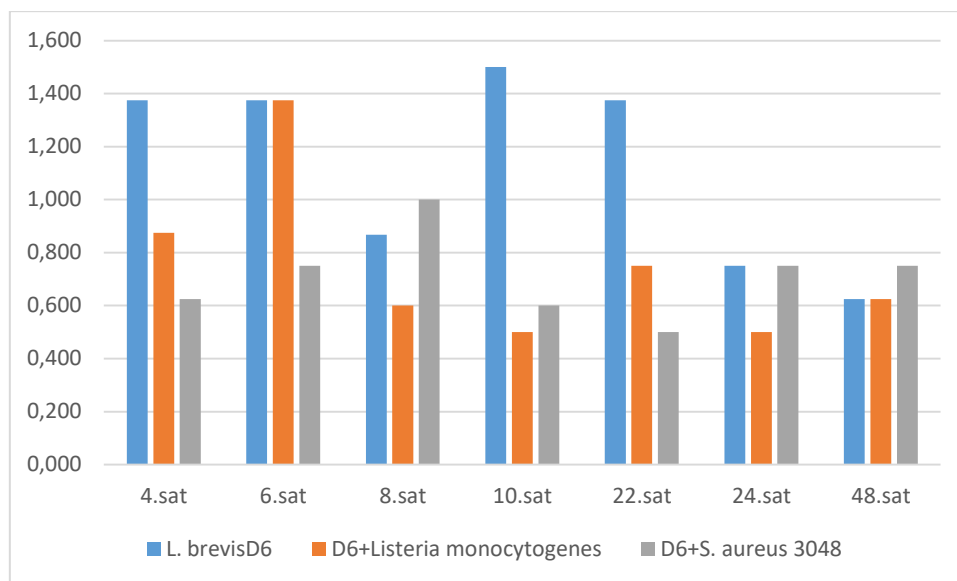
Slika 4. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 s *Lactobacillus brevis* D6 bez prethodne kokultivacije (■) te nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (■) i nakon kultivacije s test-mikroorganizmom *Staphylococcus aureus* 3048 (■).

Inhibicija rasta test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048 zabilježena je također u 10. satu uzgoja sa *Lactobacillus plantarum* D6, pri čemu je inhibitorni učinak dodanog probiotičkog soja bio posebno izražen u 10. te 48. satu provođenja eksperimenta (Slika 5). Nakon 48 sati uzgoja je broj živih stanica *S. aureus* 3048 bio za gotovo 3,5 log jedinice niži nego u kontroli (monokulturi *S. aureus* 3048).

Usporedbom efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048 s *Lactobacillus brevis* D6, bez prethodne kokultivacije te nakon kokultivacije navedenog probiotičkog soja s test-mikroorganizmima *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, odnosno *Staphylococcus aureus* 3048, nije utvrđen stimulirajući učinak uzgoja kokultivaciji na bakteriocinsko djelovanje ispitivanog probiotičkog soja na rast navedenog test-mikroorganizma (Slika6).



Slika 5. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *L. brevis* D6 (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta *L. brevis* D6 (plava linija) i *S. aureus* 3048 (siva linija) u monokulturi. Rast *L. brevis* D6 u kokultivaciji s test-mikroorganizmom *S. aureus* 3048 odgovara rastu u monokulturi.



Slika 6. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048 s *Lactobacillus brevis* D6 bez prethodne kokultivacije (▪) te nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (◻) i nakon kultivacije s test-mikroorganizmom *Staphylococcus aureus* 3048 (◻).

5. ZAKLJUČCI

1. Primjenom početnica za detekciju gena koji kodiraju za plantaricine dobiveni su pozitivni signali kod svih bakterijskih vrsta *Lactobacillus plantarum*. Primjenom početnica za detekciju gena koji kodiraju za enterocine nije dobiven pozitivan signal s DNA izoliranom iz dva soja vrste *Enterococcus faecium*.
2. Dodatak soja *L. brevis* D6 inhibira rast test-mikroorganizama *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048, što se pripisuje bakteriocinskom djelovanju tog probiotičkog soja.
3. Kokultivacija probiotičkog soja *L. brevis* D6 sa test-mikroorganizmom *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 stimulira bakteriocinsko djelovanje navedenog probiotičkog soja te time i njegov inhibitorni učinak na rast istog test-mikroorganizma.

6. LITERATURA

Anderssen EL., Diep BD, Nes IF, Eijsink VG, Nissen-Meyer J (1998) Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2269–2272.

Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Finlay BB (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156:2271–2282. doi: 10.1099/mic.0.038794-0

Belguesmia Y, Naghmouchi K, Chihib N-E, Drider D (2011) Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. In: Drider D, Rebuffat S (eds) Prokaryotic antimicrobial peptides. *Springer*, pp 171–195

Chanos P, Mygind T (2016) Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**:4297–4308

Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP (2004) In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of Dairy Research* **71**: 451–460.

Diep DB, Håvarstein LS, Nes IF (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology* **178**: 4472–4483.

Diep DB, Håvarstein LS, Nes IF (1995) A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol Microbiol* 18:631–639

Dobson AE, Sanozky-Dawes RB, Klaenhammer TR (2007) Identification of an operon and inducing peptide involved in the production of lactacin B by *Lactobacillus acidophilus*. *J Appl Microbiol* 103:1766–1778. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03417.x

Domínguez-Manzano J, Jiménez-Díaz R (2013) Suppression of bacteriocin production in mixed-species cultures of lactic acid bacteria. *Food Control* **30**:474–479. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.014

Drider D, Fimland G, Héchard Y, McMullen LM, Prévost H (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:564–582. doi:10.1128/MMBR.00016-05

Foulquie Moreno MR, Callewaert R, Devreese B, Van Beeuwen J, De Vuyst L (2003) Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 214-229.

Frank SA (1994) Spatial polymorphism of bacteriocins and other allelopathic traits. *Evol Ecol* **8**:369–386. doi:10.1007/BF01238189

Gobbetti M, De Angelis M, Di Cagno R, Minervini F, Limitone A, De Angelis M (2007) Cell-cell communication in food related bacteria. *Int J Food Microbiol* **120**:34–45. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007. 06.012

Gong HS, Meng XC, Wang H (2010) Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from BJiao ke[^], a traditional fermented cream from China. *Food Control* **21**:89–96. doi:10.1016/j.foodcont.2009. 04.005

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

Johnsborg O, Diep DB, Nes IF (2003) Structural analysis of the peptide pheromone receptor PlnB, a histidine protein kinase from *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* **185**:6913–6920. doi:10.1128/ JB.185.23.6913

Kleerebezem M (2004) Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* **25**: 1405–1414.

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

Liu C, Hu B, Liu Y, Chen S (2006) Stimulation of nisin production from whey by a mixed culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol* **131**:751–761. doi:10.1385/ ABAB:131:1:751

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

- Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Lucena-Padrós H, RuizBarba JL (2013) Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. *Food Microbiol* **33**:40–47. doi:10.1016/j.fm.2012.08.009
- Man L-L, Meng X-C, Zhao R-H (2012) Induction of plantaricin MG under co-culture with certain lactic acid bacterial strains and identification of LuxS mediated quorum sensing system in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391. *Food Control* **23**:462–469. doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.015
- Man L-L, Meng X-C, Zhao R-H (2012) Induction of plantaricin MG under co-culture with certain lactic acid bacterial strains and identification of LuxS mediated quorum sensing system in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391. *Food Control* **23**:462–469. doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.015
- Man L-L, Meng X-C, Zhao R-H, Xiang D-J (2014) The role of pINC8HK-plnD genes in bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391. *Int Dairy J* **34**:267–274. doi:10.1016/j.idairyj.2013.08.009
- Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB (2013) AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **37**:156–181. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00345.x
- Pettit RK (2009) Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* **83**:19–25. doi:10.1007/s00253-009-1916-9
- Quadri LEN (2002) Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**:133–145
- Remiger A, Ehrmann MA, Vogel RF (1996) Identification of bacteriocin genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). *Systematic and Applied Microbiology* **19**: 28–34.
- Rojo-Bezares B, Saenz Y, Navarrol L, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F (2007) Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology* **24**: 482-491.
- Ruiz-Barba JL, Caballero-Guerrero B, Maldonado-Barragán A, JiménezDíaz R (2010) Coculture with specific bacteria enhances survival of *Lactobacillus plantarum* NC8, an autoinducer-regulated bacteriocin producer, in olive fermentations. *Food Microbiol* **27**:413–417. doi: 10.1016/j.fm.2009.10.002

- Rutherford ST, Bassler BL (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med*. doi:10.1101/cshperspect.a012427
- Shimizu H, Mizuguchi T (1999) Nisin production by a mixed-culture system Consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Environ Microbiol* 65:3134–3141
- Stephens S, Floriano B, Cathcart DP, Bayley SA., Witt VF, Jiménez-Díaz R, Warner PJ, Ruiz-Barba JL (1998) Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1871–1877.
- Straume D, Johansen RF, Bjørås M, Nes IF, Diep DB (2009) DNA binding kinetics of two response regulators, PlnC and PlnD, from the Appl Microbiol Biotechnol (2016) **100**:4297–4308 4307 bacteriocin regulon of *Lactobacillus plantarum* C11. *BMC Biochem*. doi:10.1186/1471-2091-10-17
- Sturme MHJ, Francke C, Siezen RJ, de Vos WM, Kleerebezem M (2007) Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology* **153**:3939–3947. doi:10.1099/mic.0.2007/012831-0
- Swift S, Allan Downie J, Whitehead NA, Barnard AML, Salmond GPC, Williams P, Downie JA (2001) Quorum sensing as a populationdensity-dependent determinant of bacterial physiology. *Adv Microb Physiol* **45**:199–270. doi:10.1016/S0065-2911(01)45005-3
- Tabasco R, García-Cayuela T, Peláez C, Requena T (2009) *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int J Food Microbiol* **132**:109–116. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.004
- Tarighi S, Taheri P (2010) Different aspects of bacterial communication signals. *World J Microbiol Biotechnol* **27**:1267–1280. doi:10.1007/s11274-010-0575-4
- Uroić, K, Beganović, J, Hynönen, U Pietilä, TE, Leboš Pavunc, A, Kant, R, Kos, B, Palva, A, Šušković, J (2016) The role of S-layer in adhesive and immunological properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* **69**: 623-632.
- Vriezen JAC, Valliere M, Riley MA (2009) The evolution of reduced microbial killing. *Genome Biol Evol* **1**:400–408. doi:10.1093/gbe/ evp042

Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* **362**:1119–1134. doi:10.1098/rstb.2007.2039

Wloch-Salamon DM, Gerla D, Hoekstra RF, de Visser JAGM (2008) Effect of dispersal and nutrient availability on the competitive ability of toxin-producing yeast. *Proc Biol Sci* **275**:535–541. doi:10.1098/rspb.2007.1461

Izjava o izvornosti

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

Laura Maričić

Ime i prezime studenta