

# Utjecaj visoke temperature i proteinaze K na antibakterijsku aktivnost *Lactobacillus* sojeva

---

**Vučko, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski 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:159:133095>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Lucija Vučko

1338/MB

**Utjecaj visoke temperature i  
proteinaze K na antibakterijsku  
aktivnost *Lactobacillus* sojeva**

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

Ovaj diplomski 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.

Srdačno zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Blaženki Kos, na velikoj i stručnoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada, ali isto tako i na nesebičnoj pomoći i savjetima prilikom pripreme diplomskog rada.

Veliko hvala asistentici Katarini Butorac, mag. ing., na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada i na svim korisnim savjetima koji su mi uvelike pomogli pri pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem se svim profesorima i asistentima u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na predivnom odnosu prema studentima te na tome što su nam svojim primjerom i ljubavlju prema našoj struci dali dodatnu motivaciju za razvijanje karijere u području biotehnologije.

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima na motivaciji i podršci tijekom studiranja.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### UTJECAJ VISOKE TEMPERATURE I PROTEINAZE K NA ANTIBAKTERIJSKU AKTIVNOST *Lactobacillus* SOJEVA

Lucija Vučko, 1338/MB

**Sažetak:** Cilj diplomskog rada bio je ispitati utjecaj visoke temperature i proteinaze K na antibakterijsku aktivnost, kao i ekspresiju S-proteina autohtonih sojeva *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B. Na temelju provedenih metoda za određivanje antimikrobne aktivnosti, oba ispitivana *Lactobacillus* soja pokazala su srednje do jako antibakterijsko djelovanje prema odabranim test-mikroorganizmima, potencijalnim onečišćivačima hrane. Međutim, dobiveni rezultati nakon izlaganja supernatanta kulture soja *Lb. plantarum* SF9C visokoj temperaturi i enzimu proteinaza K pokazuju kako djelovanjem visoke temperature i proteinaze K dolazi do smanjenja antibakterijske aktivnosti prema ispitivanim test-mikroorganizmima, što je uzrokovano inaktivacijom proizvedenog bakteriocina plantaricina. Nadalje, potvrđena je ekspresija S-proteina kod soja *Lb. brevis* SF9B te odsutnost S-proteina kod soja *Lb. plantarum* SF9C. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako bi svojstvo proizvodnje bakteriocina soja *Lb. plantarum* SF9C i S-proteina soja *Lb. brevis* SF9B moglo omogućiti njihovu potencijalnu združenu primjenu kao probiotičkih sojeva s pojačanim probiotičkim učinkom njihovih specifičnih biomolekula.

**Ključne riječi:** antimikrobno djelovanje, bakterije mliječne kiseline, bakteriocini, S-proteini

**Rad sadrži:** 48 stranica, 11 slika, 5 tablica, 95 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Pomoć pri izradi:** mag. ing. Katarina Butorac

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. Prof. dr. sc. Blaženka Kos
3. Prof. dr. sc. Ksenija Markov
4. Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjena)

**Datum obrane:** 1. srpnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### EFFECTS OF HIGH TEMPERATURE AND PROTEINASE K ON ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Lactobacillus* STRAINS

*Lucija Vučko, 1338/MB*

**Abstract:** The aim of the master thesis was to examine the effects of high temperature and proteinase K on the antibacterial activity as well as the S-layer protein expression of the *Lactobacillus plantarum* SF9C and *Lactobacillus brevis* SF9B strains. Based on the conducted methods for the determination of antimicrobial activity, both tested *Lactobacillus* strains showed moderate to strong antibacterial activity against selected test-microorganisms, potential food contaminants. However, the results obtained after exposure of the culture supernatant of strain *Lb. plantarum* SF9C to high temperature and the enzyme proteinase K showed that it caused a decrease in its antibacterial activity against the test-microorganisms, which was caused by an inactivation of the produced bacteriocin plantaricin. Furthermore, S-protein expression was confirmed in *Lb. brevis* SF9B strain, as well as the absence in *Lb. plantarum* SF9C strain. Based on the obtained results, it can be concluded that the ability of bacteriocin production of strain *Lb. plantarum* SF9C and the S-layer protein expression of strain *Lb. brevis* SF9B could enable their potential combined use as probiotic strains with enhanced probiotic effect of their specific biomolecules.

**Keywords:** antimicrobial activity, lactic acid bacteria, bacteriocins, S-layer proteins

**Thesis contains:** 48 pages, 11 figures, 5 tables, 95 references

**Original in:** Croatian Graduate

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

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

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

**Reviewers:**

1. Prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. Prof. dr. sc. Blaženka Kos
3. Prof. dr. sc. Ksenija Markov
4. Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (substitute)

**Thesis defended:** 1 st July 2020



<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE .....	3
2.1.1. Trenutna primjena i potencijalne primjene u budućnosti .....	7
2.2. PROBIOTICI.....	8
2.3. BAKTERIOCINI.....	12
2.3.1. Klasifikacija bakteriocina te njihova struktura .....	12
2.3.2. Mehanizam djelovanja bakteriocina i njihova uloga .....	17
2.3.3. Potencijalne primjene bakteriocina .....	19
2.4. S-PROTEINI .....	20
2.4.1. Morfološka i biokemijska struktura S-proteina .....	20
2.4.2. Mehanizam djelovanja S-proteina i njegova uloga .....	23
2.4.3. Potencijalne primjene S-proteina .....	24
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	26
3.1. MATERIJALI .....	26
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	26
3.1.2. Hranjive podloge .....	26
3.1.3. Kemikalije .....	27
3.1.4. Aparatura i pribor .....	27
3.2. METODE .....	28
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama .....	28
3.2.2. Metoda difuzije s rupama u agaru (engl. agar well-diffusion method) .....	28
3.2.3. Metoda s dvostrukim slojem agara (engl. agar spot-test method).....	29
3.2.4. Određivanje utjecaja visoke temperature i enzima na bakteriocinsku aktivnost soja producenta .....	30
3.2.5. Ispitivanje prisutnosti S-proteina na površini stanica <i>Lactobacillus</i> sojeva .....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	31
4.1. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI ODABRANIH <i>Lactobacillus</i> SOJEVA	31
4.2. ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI BAKTERIOCINA U <i>Lactobacillus</i> SOJEVIMA I UTJECAJA VISOKE TEMPERATURE I ENZIMA NA BAKTERIOCINSKU AKTIVNOST.....	34
4.3. ISPITIVANJE PRISUTNOSTI S-PROTEINA NA POVRŠINI STANICA <i>Lactobacillus</i> SOJEVA .....	37
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	39
<b>6. LITERATURA</b> .....	40

# 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) pripadaju skupini Gram-pozitivnih bakterija koje su sveprisutne i rasprostranjene u prirodi. Obitavaju na različitim staništima koja obiluju hranjivim tvarima, kao što su pojedini prehrambeni proizvodi, hrana za životinje, biljke, tlo, ali isto tako obitavaju i kod životinja i ljudi (Endo i sur., 2019; Duar i sur., 2017; Axelsson, 2004).

Imaju složene prehrambene potrebe i ovise o prisutnosti ugljikohidrata koje mogu fermentirati kako bi si omogućili aktivni rast. Kao krajnji produkt njihove fermentacije proizvode obilne količine mliječne kiseline, bilo homofermentativnim ili heterofermentativnim putem (Mora-Villalobos i sur., 2020; Wright i Axelsson, 2012; Narhus i Axelsson, 2003). Zbog njihovog prilagodljivog metabolizma i njihove sposobnosti sinteze širokog spektra korisnih metabolita, osim već poznate mliječne kiseline, BMK se u velikoj mjeri koriste u biotehnologiji te u prehrambenim i terapijskim proizvodima. Neke od primjena BMK uključuju njihovu upotrebu kao proizvođača bakteriocina te kao probiotika i starter kultura. Također su svoju primjenu pronašli i kao biokonzervansi protiv kvarenja hrane i patogenih mikroorganizama te kao agensi protiv plijesni i njihovih mikotoksina za koje je ustanovljeno da imaju štetno djelovanje na zdravlje čovjeka (Mora-Villalobos i sur., 2020; Sadiq i sur., 2019; Duar i sur., 2017).

Razlog njihove široke primjene i velike koristi je to što su brojne vrste BMK uvrštene u GRAS popis (engl. Generally recognized as safe), odnosno, Američka uprava za hranu i lijekove i Europska agencija za sigurnost hrane su ih nakon procjene sigurnosti svrstale u GRAS popis (Mora-Villalobos i sur., 2020).

Mnoge BMK prirodno proizvode antimikrobne peptide poput bakteriocina koji su pokazali visoku specifičnost i antibakterijsko djelovanje u *in vivo* uvjetima. Bakteriocini su proteinski spojevi s baktericidnim djelovanjem prema srodnim vrstama (uzak spektar) ili rodovima (širok spektar djelovanja). Biosinteza bakteriocina poželjna je karakteristika jer služi kao važan mehanizam isključenja patogena i nepoželjnih mikroorganizama u fermentiranim namirnicama, kao i u gastrointestinalnom okruženju. Smatraju se kao potencijalna alternativa za borbu protiv rastuće antibiotičke rezistencije (Börner i sur., 2019; Mathur i sur., 2017; Šušćković i sur., 2010).

Nadalje, BMK se često koriste za isporuku biomolekula mukoznim tkivima. Za ovaj zadatak obično se koriste pojedine vrste roda *Lactobacillus* za koje je poznato da imaju

površinske proteine nazvane „proteini S-sloja“ ili „S-proteini (engl. surface (S)-layer proteins). S-proteini su dvodimenzionalni kristalni nizovi ponavljajućih proteinskih podjedinica koji tvore vanjski omotač ovojnica prokariotskih stanica, koje mogu proizvesti samo neki sojevi pojedinih vrsta bakterija i arheja, te se smatraju rijetkim i poželjnim svojstvom *Lactobacillus* sojeva koji ih proizvode i tako doprinose njihovim probiotičkim svojstvima (Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016). Periodičnost i brojnost S-proteina učinili su ih sredstvom brojnih biotehnoloških primjena (Klotz, 2018; Beganović i sur., 2014).

Stoga je cilj ovog rada ispitati utjecaj visoke temperature i enzima na bakteriocinsku aktivnost soja producenta *Lactobacillus plantarum* SF9C, primjenom metode za određivanje antimikrobne aktivnosti na krutim podlogama, dok je za ispitivanje prisutnosti S-proteina soja producenta *Lactobacillus brevis* SF9B primijenjena SDS-PAGE metoda u uzorcima priređenim nakon ekstrakcije površinskih staničnih proteina. Antibakterijsko djelovanje oba ispitivana *Lactobacillus* soja istraženo je prema odabranim test-mikroorganizmima, potencijalnim onečišćivačima hrane, metodama difuzije s rupama u agaru i metodom s dvostrukim slojem agara.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

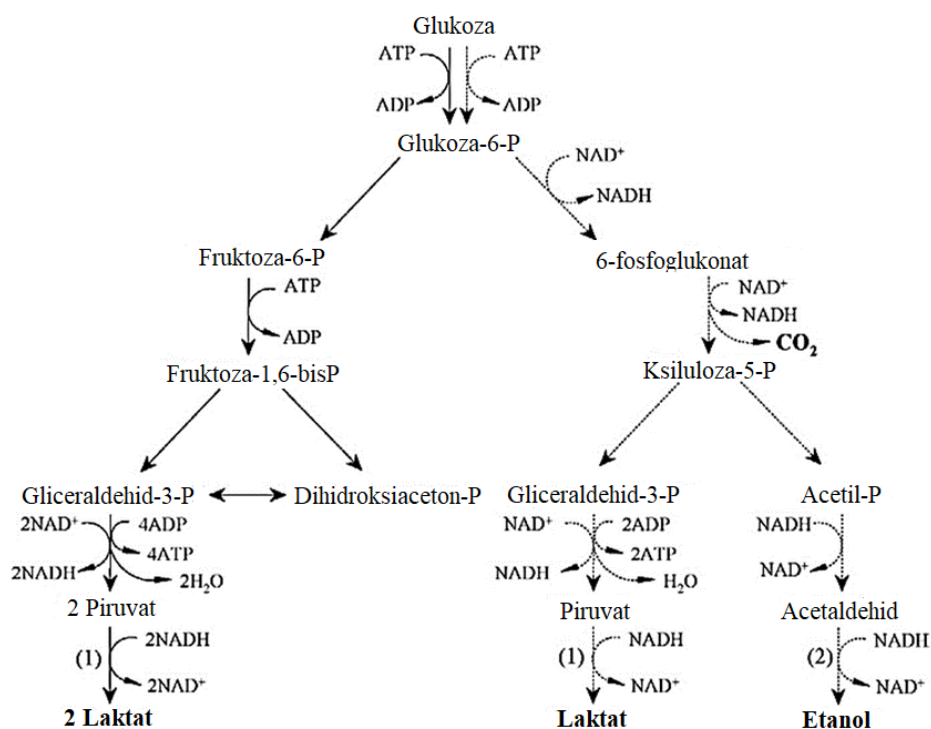
Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine skupinu Gram-pozitivnih bakterija koje međusobno povezuje niz morfoloških, metaboličkih i fizioloških karakteristika (Axelsson, 2004). Generalno bi se bakterije koje spadaju u skupinu BMK mogle okarakterizirati kao Gram-pozitivne bakterije koje su katalaza-negativne, ne formiraju spore te nemaju citokrome (Endo i sur., 2019). Morfološki gledano, BMK mogu biti koki (kuglaste), bacili (štapičaste) ili kokobacili. U pravilu je za njih karakteristično stvaranje lanaca, s izuzetkom rodova koji stvaraju tetrade *Aerococcus*, *Pediococcus* i *Tetragenococcus* (Narhus i Axelsson, 2003). Na slici 1 prikazan je primjer BMK čiji morfološki oblik je štapičasti. Nadalje, BMK su anaerobne bakterije koje unatoč tome toleriraju niske koncentracije kisika. Sukladno tome, često ih se karakterizira kao mikroaerofilnim mikroorganizmima (Arena i sur., 2017; Carr i sur., 2012), tj. organizmima koje mogu rasti u uvjetima smanjene koncentracije kisika (Struna, 2020).

Obično im nedostaje veći dio TCA (Krebsovog) ciklusa i Kinon/ubikinon biosintetskog sustava, što znači da ne mogu provoditi stanično disanje. Zbog toga kisik obično nije nužan za njihov rast te više preferiraju anaerobne uvjete nego aerobne uvjete za rast (Endo i sur., 2019). Bakterije mliječne kiseline striktno su fermentativne, odnosno njihovi enzimi kataliziraju isključivo reakcije fermentacije. Nadalje, BMK toleriraju kisele uvjete, tj. kiselu okolinu, što je usko povezano s činjenicom da su producenti mliječne kiseline koja nastaje kao glavni krajnji produkt fermentacije šećera (Šušković i sur., 2010).



**Slika 1.** Mikroskopski prikaz bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus sporogenes* (Anonymous, 2020)

S obzirom na nedostatak funkcionalnog respiratornog sustava, bakterije mliječne kiseline energiju dobivaju preko fosforilacije na razini supstrata putem dva metabolička puta za fermentaciju heksoze, tj. putem homofermentativnog i heterofermentativnog puta. Kao što je prikazano na slici 2, homofermentativni metabolički put bazira se na glikolizi te se putem njega većinskim dijelom proizvodi mliječna kiselina. Suprotno tome, u heterofermentativnom metaboličkom putu na slici 2, poznatom i kao pentoza-fosfatnom putu, karakteristična je proizvodnja CO<sub>2</sub> i etanola ili acetata, uz proizvodnju same mliječne kiseline (Mora-Villalobos i sur., 2020; Wright i Axelsson, 2012).



**Slika 2.** Shematski prikaz homofermentativnog (lijevo) i heterofermentativnog (desno) metaboličkog puta u bakterijama mliječne kiseline (Mora-Villalobos i sur., 2020).

Prema taksonomskoj klasifikaciji BMK pripadaju koljenu Firmicutes, razredu Bacilli i redu Lactobacillales. Red Lactobacillales uključuje šest porodica, tj. Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae i Streptococcaceae, više od trideset rodova i više od tristo vrsta, pri čemu taj broj i dalje raste s obzirom na to da se i dalje otkrivaju nove vrste (Ruiz Rodríguez i sur., 2019; Ghaffar i sur., 2014; Wright i Axelsson, 2012). Rod *Bifidobacterium* (porodica Bifidobacteriaceae) također se svrstava u skupinu BMK iako on pripada koljenu Actinobacteria (Mora-Villalobos i sur., 2020; Narhus i Axelsson, 2003).

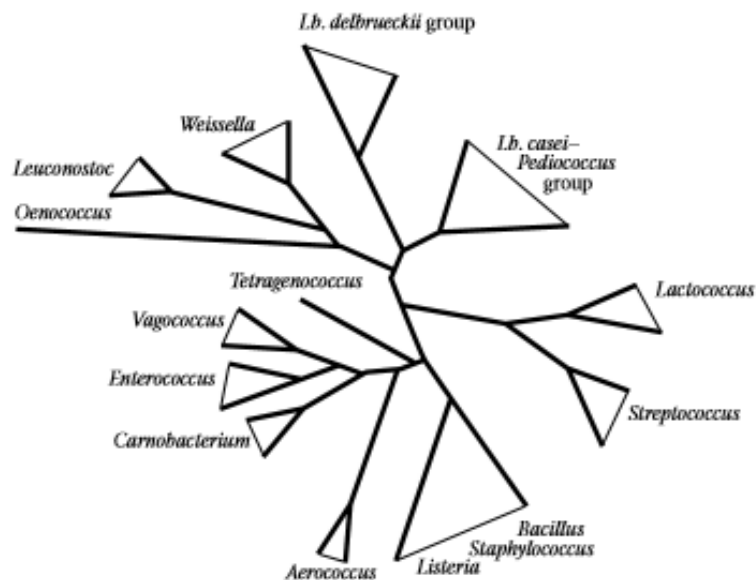
Identifikacija BMK bazira se na kriterijima koje je Orla-Jensen donio 1919. god., koji uključuju morfologiju, način fermentacije glukoze, raspon temperature rasta i obrasce korištenja šećera, uz dodatak filogenetske analize bazirane na sekvenci gena 16S ribosomalne RNA (Mora-Villalobos i sur., 2020; Endo i sur., 2019; Wright i Axelsson, 2012). Kriteriji koje je koristio Orla-Jensen, poput stanične morfologije, načina fermentacije glukoze, temperaturnog raspona rasta i načina iskorištavanja šećera, još uvijek su vrlo važni za klasifikaciju BMK. Međutim, uspostavljanje modernijih taksonomskih alata, posebno molekularno-bioloških metoda, značajno je povećalo broj od četiri rodova BMK koje je Orla-Jensen inicijalno okarakterizirao (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*). U tablici 1. prikazane su glavne karakteristike pojedinih rodova unutar glavnih šest porodica bakterija mliječnih kiselina (Wright i Axelsson, 2012).

**Tablica 1.** Prikaz glavnih karakteristika pojedinih rodova unutar glavnih šest porodica BMK (Wright i Axelsson, 2012).

Porodica	Rod	Karakteristike								
		Oblik	CO <sub>2</sub> iz glukoze	Rast pri 10 °C	Rast pri 45 °C	Rast u 6,5 % NaCl	Rast u 18 % NaCl	Rast pri pH 4,4	Rast pri pH 9,6	Izomer mliječne kiseline
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	kuglasti (tetrade)	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	štapićasti	-	+	-	NO	-	NO	-	L
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	kuglasti	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	kuglasti (tetrade)		+	-	+	+	P	+	
	<i>Vagococcus</i>	kuglasti		+	-	-	-		-	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	štapićasti	P	P	P	P	-	P	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	kuglasti (tetrade)	-	P	P	P	-	+	-	L, DL
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	kuglasti	+	+	-	P	-	P	-	D
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	P	-	P	-	D
	<i>Weissella</i>		+	+	-	P	-	P	-	D, DL
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	kuglasti	-	+	-	-	-	P	-	L
	<i>Streptococcus</i>		-	-	P	-	-	-	-	L

**Napomena:**  
**P** - promjenjivo  
**NO** - nije određeno

Filogenetski se BMK mogu klasterirati na temelju molekularno-bioloških kriterija, kao što je sekvencioniranje rRNA. Primjer filogenetskog stabla koji razlikuje bakterije mliječne kiseline s obzirom na druge bakterijske grupe u koljenu Firmicutes prikazan je na slici 3. Naime, sudeći prema tome precizno bakterija mliječne kiseline bili su zemljani organizmi nalik razredu Bacilli, koji su potom izgubili nekoliko gena i njima pridružene fiziološke funkcije, pri čemu su se prilagodili nutritivno bogatim ekološkim nišama (Wright i Axelsson, 2012).



**Slika 3.** Shematski prikaz filogenetskog stabla BMK bez korijena, koje uključuje pojedine aerobne i fakultativno anaerobne bakterije koljena Firmicutes, pri čemu su evolucijske udaljenosti na slici procijenjene (Wright i Axelsson, 2012).

Sekvencioniranje cijelog genoma uobičajeni je alat za identifikaciju bakterija mliječnih kiselina u laboratoriju. Identifikacija se obično provodi filogenetskom analizom zasnovanom na genskim sekvencama 16S rRNA. S obzirom na to da je kod nekih vrsta BMK prisutna visoka razina homologije između njihovih DNA sekvenci, pojedini *housekeeping* geni koriste se kao alternativni biljezi za točnu identifikaciju takvih BMK skupina. Uz prethodno navedeno, identifikacije koje se temelje na homologiji nizova cijelog genoma, poput npr., *all nucleotide identity* (ANI) i *in silico* DNA-DNA hibridizacija (DDH), postaju uobičajene posljednjih godina (Mora-Villalobos i sur., 2020; Endo i sur., 2019). Identifikacija vrsta pomoću sekvencioniranja pruža bitne informacije koje omogućavaju uređivanje genoma zdravstveno ispravnih BMK, pomoću primjerice CRISPR alata (Mora-Villalobos i sur., 2020; Börner i sur., 2019; Van Pijkeren i Barrangou, 2017).

Staništa na kojima BMK obitavaju uglavnom su bogata hranjivim tvarima. Neka od njih su razni prehrambeni proizvodi poput mlijeka, mesa, pića i povrća, no isto tako su prisutni i u prirodnoj mikrobioti usne šupljine, gastrointestinalnog te urogenitalnog sustava sisavaca (Arena i sur. 2017; Axelsson, 2004). BMK su također uočene na fermentiranoj hrani, silaži, površinama biljaka i kompostu. Zbog velike raznolikosti, uvjeti uzgoja BMK variraju. Bakterijama mliječne kiseline potrebne su bogate hranjive tvari za rast, poput ugljikohidrata, aminokiselina, vitamina, minerala, a ponekad i masnih kiselina i peptida. BMK obično u prirodi nastanjuju druge mikrobe, uključujući plijesni, kvasce, aerobne i anaerobne mikroorganizme (Endo i sur., 2019).

#### 2.1.1. Trenutna primjena i potencijalne primjene u budućnosti

Bakterije mliječne kiseline tradicionalno se povezuju s fermentacijom prehrambenih proizvoda i stočne hrane te u pravilu imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje, pri čemu su neki sojevi okarakterizirani kao sojevi koji promoviraju zdravlje, odnosno probiotici (Mora-Villalobos i sur., 2020; Wright i Axelsson, 2012). Fermentacija hrane i pića provodi se tisućama godina (10000 pr. Kr.), pri čemu se primarno koristila kako bi se produljio vijek trajanja hrane (Börner i sur., 2019).

BMK zbog njihovog svestranog metabolizma imaju široku primjenu. Međutim najviše se koriste kao starter kulture, probiotici i u proizvodnji pojedinih spojeva poput nutraceutika, tj. funkcionalne hrane (Ruiz Rodríguez i sur., 2019). Posebno su vrste *Lactobacillus* privukle pažnju kao probiotici koji se koriste kao adjuvanti ili kao profilaksa protiv mnogih različitih bolesti (Mays i Nair, 2018).

Najnoviji trendovi upotrebe BMK u prehrambenim proizvodima uključuju prethodno provođenje metoda genetičkog inženjerstva na BMK (Börner i sur., 2019). Neke od primjena takvih genetički modificiranih sojeva su za poboljšanje nutritivne vrijednosti hrane, npr. na način da se koriste za proizvodnju vitamina (Hati i sur., 2019; Börner i sur., 2019). Zatim njihovo korištenje za poboljšanje organoleptičke kvalitete hrane te korištenje za proizvodnju proizvoda koji bi potencijalno mogli imati tehničku primjenu, poput polisaharida (Börner i sur., 2019, Zeidan i sur., 2017). Nadalje, genetički modificirane BMK mikrobnom fermentacijom šećera dobivenih iz biomase mogu proizvesti širok spektar proizvoda koji bi potencijalno mogli zamijeniti prirodne resurse poput plastike, najlona, otapala, goriva, farmaceutskih proizvoda te



prehrambenih i kozmetičkih sastojaka (Börner i sur., 2019; Mazzoli i sur., 2014; Gaspar i sur., 2013).

Jedna od najperspektivnijih novih primjena BMK je njihova medicinska primjena u terapiji, prevenciji i dijagnozi (Börner i sur., 2019; Mays i Nair, 2018). Posebno dobiva pozornost njihova upotreba kao sredstva za dostavu lijekova i cjepiva. BMK su posebno prikladne jer su već općepriznata sredstva za poboljšanje zdravlja te su sigurne za prehranu ljudi (Börner i sur., 2019). Istraživanja usmjerena prema korištenju BMK kao bioterapeutika uglavnom su usredotočena na bolesti koje su povezane s gastrointestinalnim traktom, pri čemu se sojevi BMK koriste kao oralni vektori koji povećavaju njihovu sposobnost preživljavanja u želučanoj kiselini i prijanjanja na crijevni epitel (Börner i sur., 2019; Carvalho i sur., 2017; Hwang i sur., 2016). Nadalje, potencijalne primjene dotičnih metoda uključuju razvoj terapijskih probiotika i sojeva koji su otporni na viruse (Mora-Villalobos i sur., 2020).

Mnoge BMK prirodno proizvode antimikrobne peptide poput bakteriocina koji su pokazali visoku specifičnost i moć u *in vivo* uvjetima. Smatraju se kao potencijalna alternativa za borbu protiv rastuće antibiotske rezistencije, a imaju i primjenu u očuvanju hrane i probiotika (Börner i sur., 2019; Mathur i sur., 2017). Drugo atraktivno polje je upotreba BMK za dijagnozu na način da se koriste kao biosenzori unutar ili izvan tijela (Börner i sur., 2019; Lubkowitz i sur., 2018).

Međutim, neki rodovi BMK, poput *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Carnobacterium* također sadrže vrste ili sojeve koji su prepoznati kao ljudski ili animalni patogeni. Zbog toga je potrebno temeljito razumijevanje taksonomije, metabolizma i molekularne biologije bakterija mliječnih kiselina kako bi se mogli u potpunosti iskoristiti tehnološki i prehrambeni aspekti, kao i zdravstveno-promovirajući aspekti BMK, uz izbjegavanje potencijalnih rizika (Wright i Axelsson, 2012).

## 2.2. PROBIOTICI

Probiotici se mogu definirati kao pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi ili životinja blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikrobiote (Šušković i sur., 1997).

Od Metchnikoff-ovog djelovanja 1908., vjeruje se da uravnotežena crijevna mikrobiota, u kojoj važnu ulogu imaju i BMK, ima blagotvoran učinak na zdravlje domaćina (Mackowiak,

2013; Narhus i Axelsson, 2003). U svijetu posljednjih dva desetljeća sve više raste interes za razvoj prehrambenih proizvoda koji sadrže sojeve BMK koji su izolirani iz ljudskog gastrointestinalnog trakta, tj. za probiotičke proizvode. Međutim, sve više studija posljednjih godina sugerira da bi se uskoro probioticima mogli krenuti smatrati sojevi koji bi se izolirali iz fermentiranih proizvoda životinjskog podrijetla. Naime, tradicionalni fermentirani proizvodi bogati su izvor mikroorganizama te se smatra da bi neki od njih mogli pokazati probiotička svojstva (Zielińska Kolożyn-Krajewska, 2018; Narhus i Axelsson, 2003).

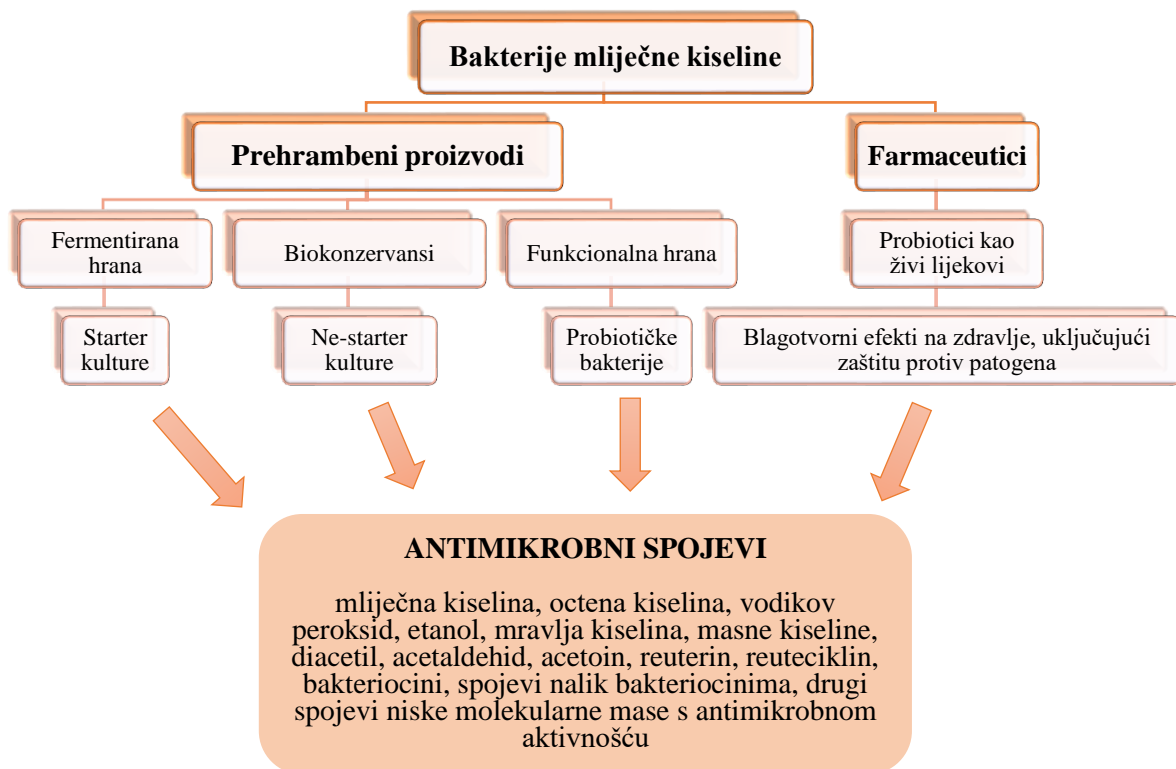
Probiotici su definirani kao živi mikroorganizmi koji, kada se daju u odgovarajućim količinama, pružaju zdravstvenu korist domaćinu (Mora-Villalobos i sur., 2020; Fijan, 2014). Zdravstvene koristi uglavnom su dokazane za specifične probiotičke sojeve sljedećih rodova: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Bacillus* (Preciado, 2016; Fijan, 2014). Većina komercijalno dostupnih probiotičkih vrsta pripada u rodove *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium*. Ostali rodovi poput *Roseburia* spp., *Akkermansia* spp., *Propionibacterium* spp. i *Faecalibacterium* spp. pokazuju obećavajuće karakteristike te su u fazi evaluacije (Sanders i sur., 2019).

Prilikom odabira probiotičkih sojeva BMK moraju se poštovati određeni kriteriji odabira kako bi se omogućilo preživljenje probiotičkih sojeva prilikom prolaza kroz gastrointestinalni trakt koji bi pritom poželjno kolonizirali tokom dovoljno dugog perioda potrebnog za postizanje željenog blagotvornog učinka (Šušković i sur., 2010). Evaluacija probiotika temelji se na sposobnosti soja da opstane u uvjetima u gastrointestinalnom traktu, među kojima najveće prepreke predstavljaju niska pH vrijednost i lizozimi (Mora-Villalobos i sur., 2020; García-Ruiz i sur., 2014). Ostale karakteristike soja poput otpornosti na žuč, osjetljivosti na antibiotike i sposobnost prianjanja na crijevnu sluznicu, stanice ljudskog epitela ili druge stanične linije također se koriste za analizu novih izolata probiotičkih sojeva (Mora-Villalobos i sur., 2020, Dlamini i sur., 2019, García-Ruiz i sur., 2014).

Probiotici se obično dodaju hrani kao dodaci i pružaju pogodnosti za potrošače, kao što su održavanje zdrave crijevne mikrobiote, niže razine kolesterola i regulacija imunološkog odgovora (Aleixandre-Tudó i sur., 2019; Kumar i sur., 2015). Oni se uglavnom koriste za liječenje probavnih poremećaja i bolesti probavnog sustava, kao i kožnih bolesti, bolesti usne šupljine, urinarnog trakta i dišnog sustava (Mora-Villalobos i sur., 2020).

Potpuna karakterizacija antimikrobnih tvari koje proizvode probiotičke bakterije mliječne kiseline također postaje važno područje istraživanja kao rezultat sve važnije primjene

u industriji, prehrani i terapiji (Evivie i sur., 2017). U uobičajenim okolišnim uvjetima, probiotici proizvode metabolite s antimikrobnim djelovanjem poput egzopolisaharida, bakteriocina, organskih kiselina i biosurfaktanata (Mora-Villalobos i sur., 2020; Evivie i sur., 2017). Industrijski potencijal antimikrobnih spojeva koje proizvode bakterije mliječne kiseline prikazan je na slici 4 (Šušković i sur., 2010). Osim toga, ovi mikroorganizmi koriste mehanizam aglomeracije koji olakšava izlučivanje patogena iz probavnog sustava. (Mora-Villalobos i sur., 2020; Evivie i sur., 2017). Prema tome, antagonističko djelovanje prema patogenim bakterijama također je poželjna osobina prilikom procjene probiotičkih svojstava pojedinih sojeva (Mora-Villalobos i sur., 2020).



**Slika 4.** Industrijski potencijal antimikrobnih spojeva koje proizvode BMK (Šušković i sur., 2010).

Nadalje, probiotici mogu poboljšati imunološki odgovor na način da potiču izlučivanje antitijela iz stanice domaćina. Povećani imunološki odgovor može se procijeniti pomoću kokulture probiotika i stanica imunološkog sustava. Time se omogućava otkrivanje i kvantifikacija glikoproteina citokina, koji posreduju pri djelovanju jedne stanice na drugu te ih izlučuju stanice kao odgovor na određeni podražaj, tj. na upalni proces (Mora-Villalobos i sur.,

2020; Gad i sur., 2011; Parvizi i sur., 2005; Narhus i Axelsson, 2003). Putem *in vivo* studija, pokazalo se da daju obećavajuće rezultate prema bolestima povezanim s imunološkim sustavom, poput upalne bolesti crijeva (Alard i sur., 2018), sindroma iritabilnog crijeva (Dale i sur., 2019) i simptoma uzrokovanih alergijama (Mora-Villalobos i sur., 2020; Yang i sur., 2013).

Postoji povećan interes za razumijevanje načina na koji probiotici stupaju u interakciju s domaćinom. Kao što je prethodno spomenuto, mnoga istraživanja potvrdila su sljedeće probiotičke učinke BMK: modulacija imunološkog odgovora, proizvodnja organskih kiselina i drugih antimikrobnih spojeva, interakcija s mikrobiotom domaćina, poboljšanje integriteta crijevnih barijera i proizvodnja sekundarnih metabolita koji su korisni za domaćina. Međutim, veoma je važno provesti vrlo detaljnu evaluaciju potencijalnih probiotičkih mikroorganizama kako bi se dobila potvrda njihovog blagotvornog djelovanja na ljudsko zdravlje te kako bi se pokazala njihova ispravna uporaba (Mora-Villalobos i sur., 2020; Sanders i sur., 2019).

Važno je napomenuti da većina informacija vezanih uz karakterizaciju probiotika proizlazi iz *in vitro* ispitivanja staničnih kultura ili *in vivo* ispitivanja pomoću modela, a dobiveni pozitivni rezultati omogućuju njihovo korištenje u industriji (Sanders i sur., 2019). Posljednjih godina sve je veće zanimanje za karakterizaciju novih izolata BMK iz različitih izvora sa svrhom korištenja kao probiotika ili za druge primjene. Međutim, paralelno s naporima na izolaciji i karakterizaciji, identifikacija na razini vrste, a u nekim slučajevima i na nivou soja, neophodna je u komercijalne svrhe (Mora-Villalobos i sur., 2020; Puebla-Barragan i sur., 2019).

Većina metoda identifikacije temelji se na DNA sekvenci konzervirane regije 16S rRNA gena te se to u pravilu koristi za definiranje filogenije izolata. Međutim, prilikom proučavanja nekoliko sojeva, mogu se upotrijebiti i drugi molekularni alati za diferencijaciju i selekciju izolata, npr. Rep-PCR DNA fingerprinting, pulsirajuća gel-elektroforeza (PFGE), gel-elektroforeza u denaturirajućem gradijentu (DGGE), nasumična amplifikacija polimorfne DNA (RAPD) te u novije vrijeme, sekvencioniranje cijelog genoma (Mora-Villalobos i sur., 2020).

Probiotički mikroorganizmi su potencijalna terapijska sredstva za crijevne infekcije i dodaci za liječenje antibioticima koji smanjuju njihove nuspojave, a koje je američka Agencija za hranu i lijekove (engl. FDA – Food and Drug Administration) nazvala „živi bioterapijski pripravci“, dok ih europska industrija naziva „farmabiotici“ (Preciado, 2016; De Bortoli i sur., 2007). Povećan interes prema korištenju tih mikroorganizama za liječenje određenih bolesti ili

njihovih popratnih simptoma potakli su provođenje brojnih opsežnih istraživanja (Mora-Villalobos i sur., 2020).

Antimikrobne tvari koje proizvode probiotičke bakterije mliječne kiseline mogu se podijeliti u dvije glavne skupine, tj. na spojeve niske molekularne mase ( $M_r < 1000$  Da) i na spojeve visoke molekularne mase ( $M_r > 1000$  Da), pri čemu bakteriocini spadaju u skupinu spojeva visoke molekularne mase (Šušković i sur., 2010).

## 2.3. BAKTERIOCINI

### 2.3.1. Klasifikacija bakteriocina te njihova struktura

Bakteriocini su bioaktivni antimikrobni peptidi ili proteini koji se nakon sinteze na ribosomu izvanstanično oslobađaju (Preciado i sur., 2016). Prvi put su opisani 1925. godine, ali je interes za njihovu proizvodnju i moguće primjene u medicinskim područjima porastao tek nedavno (Chikindas i sur., 2017; Preciado i sur., 2016).

Bakteriocini se mogu proizvesti u ranim ili kasnim fazama ciklusa rasta mikroorganizama proizvođača (Preciado i sur., 2016). Proizvode ih mnoge Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, kao i neke arheje. Međutim, većinu bakteriocina proizvodi koljeno Firmicutes, zatim koljeno Bacteroidetes, a preostali postotak pripada koljenima Actinobacteria i Proteobacteria (Tap i sur., 2009). Konkretno, u koljenu Firmicutes najveći su interes pobudili bakteriocini dobiveni iz Gram-pozitivnih bakterija mliječne kiseline, bakterija koje se obično koriste u fermentaciji hrane i koje su dobro zastupljene u ljudskom gastrointestinalnom, respiratornom i genitalnom traktu (Lopetuso i sur., 2019; Douillard i de Vos, 2014). Na sintezu bakteriocina koja se odvija na ribosomima utječu okolišni čimbenici poput temperature, pH vrijednosti i sastava medija za uzgoj (Lopetuso i sur., 2019).

Bakteriocini se prema Zacharofu i Lovittu klasificiraju u tri klase. Prvu klasu sačinjavaju spojevi koji se zovu lantibiotici. Lantibiotici su mali i toplinski stabilni peptidi, molekulske mase 5 kDa, koji sadrže karakteristične policikličke tioeterske aminokiseline lantionin i/ili metillantionin. Glavni predstavnik ove skupine je nisin. Drugu klasu čine bakteriocini koji ne sadrže lantionin. Ti bakteriocini također imaju malu molekulsku masu od 10 kDa, relativno su toplinski stabilni te sadrže membranski aktivne peptide. Treću klasu sačinjavaju složeni bakteriocini. Ova skupina uključuje bakteriocine koji imaju visoku molekulsku masu od 30 kDa

te se sastoji od toplinski labilnih proteina (Zacharof i Lovitt, 2012). Neki autori također predlažu i četvrtu klasu bakteriocina kojima su za aktivnost u strukturi potrebni spojevi koji nisu proteini, već lipidi ili ugljikohidrati (Preciado i sur., 2016; Da Silva Sabo i sur., 2014; Šušković i sur., 2010).

**Tablica 2.** Bakteriocini koje proizvode Gram-pozitivne bakterije (Preciado i sur., 2016).

Klasa	Subklasa	Bakteriocin	Mikroorganizam producent	Primjena
Klasa I	IA	Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremonis</i>	Inhibicija <i>Listeria monocytogenes</i> i <i>Staphylococcus aureus</i> u cheddar siru
	IA	Nukacin	<i>Staphylococcus simulans</i>	Prevenција govedeg mastitisa
Klasa II	IIa	Carnobakteriocin X	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> C2	Antimikrobna aktivnost prema <i>L. monocytogenes</i>
	IIb	Enterocin X	<i>Enterococcus faecium</i>	Antimikrobna aktivnost prema <i>L. monocytogenes</i>
	IIc	Carnociklin A	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307	Antimikrobna aktivnost prema Gram-pozitivnoj <i>Listeria</i> spp.
	II d	Aureocin	<i>Staphylococcus aureus</i>	Prevenција i kontrola govedeg mastitisa
Klasa III	IIIa	Lizostafin	<i>Staphylococcus simulans</i> subsp. <i>Staphylolyticus</i>	Prevenција i kontrola ljudskih i životinjskih infekcija uzrokovanih <i>S. aureus</i>
Klasa IV	-	Enterocin X	<i>Enterococcus faecalis</i>	Biokonzervans za hranu
	-	Enterocina	<i>Enterococcus faecium</i>	Inhibicija <i>Micrococcus luteus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Escherichia coli</i>

S obzirom na to da su u ovom radu proučavani sojevi bakterija mliječne kiseline koji spadaju u grupu Gram-pozitivnih bakterija, u tablici 2. prikazani su neki od primjera bakteriocina za pojedine sojeve Gram-pozitivnih bakterija (Preciado i sur., 2016).

Proizvodnja bakteriocina u Gram-pozitivnim bakterijama detaljno je proučavana te se bakteriocini koje proizvode Gram-pozitivne bakterije sastoje od manje od šezdeset aminokiselina (Perez i sur., 2014; Yang i sur., 2014). Glavni proizvođači bakteriocina su rodovi *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leptosphaeria*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Preciado i sur., 2016). Gram-pozitivne bakterije uključuju i druge rodove proizvođača bakteriocina koji imaju biotehnošku važnost, kao što su *Aerococcus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium* i *Bifidobacterium* (Preciado i sur., 2016; Swetwivathana i Visessanguan, 2015).

Bakteriocini se prema Cotter i sur. mogu svrstati u dvije klase, tj. u one koji su podvrgnuti posttranslacijskoj modifikaciji i one koji uglavnom ostaju nemodificirani (Borgogna i Yeoman, 2017, Cotter i sur., 2013).

Međutim, konkretno bakterije mliječne kiseline uglavnom proizvode dvije klase bakteriocina. Klasa I uključuje modificirane peptide poznate kao „bakteriocini koji sadrže lantionin“, pri čemu je najpoznatiji primjer nisin.

Klasa II uključuje „bakteriocine koji ne sadrže lantionin“ te su oni s obzirom na njihovu veličinu podijeljeni u četiri podklase (a, b, c, d).

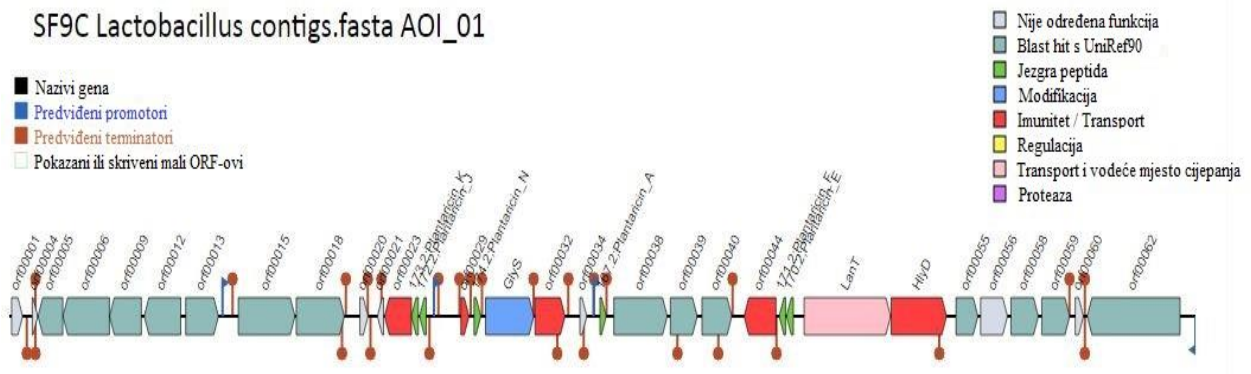
Podklasa a, unutar koje su značajni pediocin PA-1 i sakacin A, aktivna je protiv *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Pediococcus* i *Leuconostoc*.

Podklasu b, koju čine plantaricini E,F i J,K, čine dva antimikrobna peptida koja djeluju samo u kombinaciji, tj. E s F i J s K (Lopetuso i sur., 2019). Jedan od mogućih sojeva producenta plantaricina je soj *Lactobacillus plantarum* SF9C koji je jedan od *Lactobacillus* sojeva čija bakteriocinska aktivnost se proučavala u ovom radu. Na slici 5 dan je prikaz genske mape soja *Lactobacillus plantarum* SF9C koja sadrži genski klaster koji kodira za sintezu plantaricina, a na slici 6 prikazane su trodimenzionalna struktura i sastav  $\alpha$ -uzvojnica dvaju plantaricina, PlnJK i PlnEF (Butorac i sur., 2020).

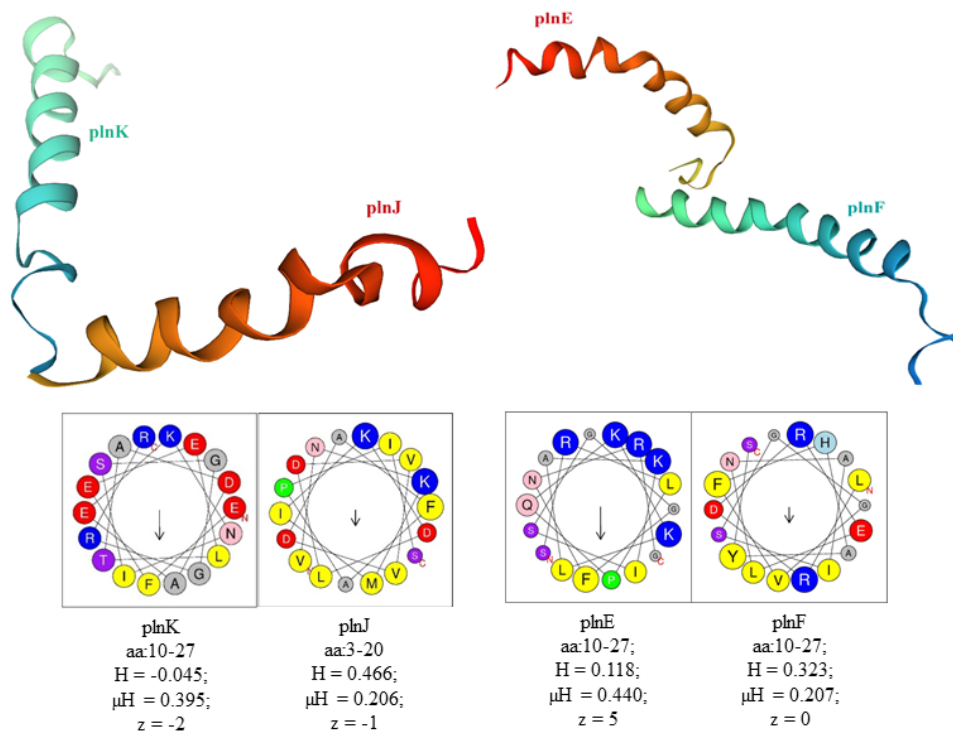
Nadalje, podklasu c unutar klase II predstavljaju kružni bakteriocini, dok se podklasa d sastoji od linearnih bakteriocina s nepoznatom ulogom (Lopetuso i sur., 2019).

Unatoč raznolikosti antimikrobnih peptida koje proizvode BMK, u prodaji su samo nisin i pediocin, koji se uglavnom koriste kao aditivi u hrani, posebno u mliječnim proizvodima (Mora-Villalobos i sur., 2020).

### SF9C *Lactobacillus contigs.fasta* AOI\_01



**Slika 5.** Shematski prikaz genskog klastera plantaricina u soju *Lactobacillus plantarum* SF9C (Butorac i sur., 2020).



**Slika 6.** Prikaz 3D strukture plantaricina *Lactobacillus plantarum* SF9C te prikaz svojstva  $\alpha$ -uzvojnica (Butorac i sur., 2020).

Nisin je jedinstveni bakteriocin kojeg su Europska Unija (E234), Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organisation) i Američka uprava za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration) odobrili kao siguran konzervans hrane te se koristi kao



konzervans hrane u više od 50 zemalja (Pisano i sur., 2015). Producent nisina je bakterija *Lactococcus lactis* (Chikindas i sur., 2017; Pisano i sur., 2015). Nisin se sastoji od 34 aminokiseline te je jedan od najviše proučenih bakteriocina. Do sada je poznato pet njegovih varijanti: nisin A, Z, Q, U i F (Preciado i sur., 2016; Pisano i sur., 2015).

Različite vrste bakteriocina opisane su s obzirom na njihovu veličinu, mehanizme inhibicije, ciljne stanice, spektar djelovanja, interakcije s imunološkim sustavom i biokemijske značajke (Hegarty i sur., 2016). Bakteriocini daju bakterijama konkurentsku prednost u njihovoj okolini kako bi smanjili kompetenciju za resurse te predstavljaju važnu sastavnicu njihovog kemijskog obrambenog sustava (Preciado i sur., 2016).

Bakteriocini se obično sintetiziraju kao inaktivni peptidi koji u strukturi imaju N-terminalnu vodeću sekvencu. Tijekom eksponencijalne faze rasta se u takvom inaktivnom obliku kao prekursori prenose na staničnu površinu te potom enzimskim djelovanjem dolazi do stvaranja njihovih aktivnih oblika. Kod bakteriocina klase II, također se koriste dodatni proteini za olakšavanje njihove translokacije kroz membranu i cijepanje peptidnog dodatka. Kontrolni sustav u proizvodnji bakteriocina sastoji se od tri komponente: peptida koji inducira proizvodnju (pheromone-activating factor), transmembranske histidin kinaze (feromonski receptor) i regulatora odgovora. Kod bakteriocina klase III, N-terminalni dio homologan je endopeptidazi koja je uključena u sintezu stanične stijenke, dok je dio C-terminalni dio odgovoran za prepoznavanje ciljne stanice (Preciado i sur., 2016; Balciunas i sur., 2013).

Iako bi se bakteriocini prema pojedinim svojim svojstvima mogli kategorizirati kao antibiotici, oni to nisu. Jedna od razlika između bakteriocina i antibiotika je u tome što bakteriocini u pravilu usmjeravaju svoju aktivnost na bakterijske sojeve srodnih vrsta, posebno na sojeve iste vrste. Međutim, s druge strane, antibiotici imaju širi spektar djelovanja, pa čak i ako je njegovo djelovanje ograničeno, nije opaženo preferencijalno djelovanje na usko povezane sojeve (Preciado i sur., 2016; Zacharof i Lovitt, 2012). Nadalje, sinteza bakteriocina odvija se na ribosomu, dok se antibiotici sintetiziraju enzimskim putevima koji se odvijaju u više koraka (Duhan i sur., 2013). Uz to, bakteriocini obično imaju nisku molekulsku masu, tj. oni se u pravilu podvrgavaju posttranslacijskoj modifikaciji te ih mogu lako razgraditi proteolitički enzimi, posebno proteaze gastrointestinalnog trakta sisavaca, što ih čini sigurnima za prehranu ljudi. Primjena bioloških proizvoda kao bakteriocina za inhibiranje ili uklanjanje patogenih mikroorganizama je metoda od velikog interesa za prehrambenu industriju čiji je konačni cilj dobivanje sigurnije hrane za potrošače (Preciado i sur., 2016; Da Silva Sabo i sur., 2014).

### 2.3.2. Mehanizam djelovanja bakteriocina i njihova uloga

Bakteriocine proizvode mnoge bakterije te imaju svojstvo inhibiranja rasta drugih bakterija, a posebno se ističu po tome što pokazuju veliki potencijal antimikrobnog djelovanja prema sojevima koji su otporni na antibiotike (Preciado i sur., 2016).

Dugo vremena se smatralo da je amenzalistička aktivnost bakteriocina ograničena na srodne mikroorganizme koji nisu producenti bakteriocina zbog specifičnih antitoksinskih mehanizama. Međutim, nekoliko je studija identificiralo bakteriocine koji imaju i uski i široki spektar djelovanja na patogene, često bez negativnog utjecaja na komenzalnu populaciju (Borgogna i Yeoman, 2017; Cotter i sur., 2013).

Opći mehanizam inhibitornog djelovanja bakteriocina uključuje to da bakteriocin prepoznaje opći ili specifični receptor na osjetljivoj stanici, što mu omogućava da se približi staničnoj membrani kako bi ublažio membransku interakciju i uzrokovao stvaranje pora (Preciado i sur., 2016; Macwana i Muriana, 2012).

Proizvodnja bakteriocina u Gram-pozitivnim bakterijama detaljno je proučavana te se bakteriocini koje proizvode Gram-pozitivne bakterije proizvode u *in vitro* kontroliranim uvjetima (pH vrijednost, vrijeme i temperatura) koji osiguravaju sigurnost krajnjeg proizvoda (Bastos i sur., 2015). Mehanizmi djelovanja bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija široko su poznati, tj. poznato je da se ti peptidi i proteini vežu na specifične receptore na stanicama i tvore pore u membrani, stvarajući membranu stanica permeabilnom i samim time dovode do uništenja bakterije (Preciado i sur., 2016; Hassan i sur., 2012; Šušković i sur., 2010). Identificirano je samo nekoliko receptora, među kojima je lipid II koji je ciljno mjesto za lantibiotike, poput nisina (Preciado i sur., 2016; Hassan i sur., 2012). Konkretno, lipid II je prekursor u sintezi stanične stijenke bakterija te vezanjem bakteriocina na njega dolazi do sprječavanja sinteze stanične stijenke te posljedično i do uništenja bakterije (Šušković i sur., 2010).

Zabilježena je velika raznolikost bakteriocina kod većine bakterijskih vrsta, a isto tako postoje slučajevi kod kojih jedna bakterijska vrsta može proizvesti različite vrste bakteriocina (Cintas i sur., 2001). Bakteriocine koji su se do sad najviše proučavali proizvode bakterije mliječne kiseline jer se upotreba tih bakterija i njihovih metaboličkih produkata smatra sigurnima, tj. potvrđena je GRAS (engl. generally recognized as safe) statusom (Preciado i sur., 2016; Zacharof i Lovitt, 2012). BMK su uključene u fermentaciju i očuvanje hrane, a njihovo svojstvo poboljšanja higijenske kvalitete hrane inhibiranjem konkurentne mikrobiote,

uključujući patogene, čini ih idealnima za upotrebu kao biokonzervansi (Preciado i sur., 2016, Šušković i sur., 2010). Nadalje bakteriocini su neaktivni i netoksični za eukariotske stanice, ne uzrokuju promjene na crijevnoj mikrobioti jer su inaktivirani probavnim proteazama zbog svoje proteinske prirode te su stabilni pri različitim pH vrijednostima i temperaturama koje se koriste u preradi hrane. Također imaju širok antimikrobni spektar te mogu djelovati sinergistički s drugim bakteriocinima, pa čak i s antibioticima (Preciado i sur., 2016; Galvez i sur., 2014).

Kao što je već navedeno, bakteriocini koje proizvode bakterije mliječne kiseline mogu biti širokog ili uskog spektra djelovanja, ali općenito je njihova aktivnost usmjerena prema srodnim Gram-pozitivnim vrstama s niskim udjelom GC parova baza, pri čemu su same stanice producenta imune na vlastite bakteriocine. Njihov spektar antibakterijskog djelovanja uključuje organizme koji uzrokuju kvarenje hrane i patogene povezane s pokvarenom hranom kao što su *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* (Šušković i sur., 2010). Konkretno, kod bakteriocina koje proizvode bakterije roda *Lactobacillus* pokazalo se da bakteriocini koji imaju uski spektar djelovanja inhibiraju rast usko povezanih vrsta *Lactobacillus*. Suprotno tome za bakteriocine širokog spektra pokazalo se da inhibiraju raznoliku skupinu bakterija, uključujući *E. coli* i *G. vaginalis*. (Borgogna i Yeoman, 2017).

Većina bakteriocina koje proizvode bakterije mliječne kiseline imaju sposobnost inhibicije rasta patogena, ali isto tako i zaštite samog producenta te imaju ulogu u peptidnom signaliziranju (Hegarty, 2016). Mehanički mogu djelovati kao agensi za stvaranje pora, mogu remetiti stabilnost membrana ili ometati procese stanične diobe (Lopetuso i sur., 2019; Chikindas i sur., 2017; Šušković i sur., 2010). Štoviše, bakteriocini posjeduju antivirna, spermicidna i antikancerogena svojstva te bi time potencijalno mogli pojačati već postojeće pozitivne učinke probiotičkih bakterija (Lopetuso i sur., 2019; Chikindas i sur., 2017). Nadalje, učinkovitost bakteriocina potaknula je njihovu upotrebu za inhibiranje patogena tijekom biotehnoloških procesa (Hassan i sur., 2012).

Negativna strana uporabe bakteriocina kao biokonzervansa u hrani je moguća pojava prirodne ili stečene bakteriocinske rezistencije bakterijskih patogena. Zabilježena je prirodna otpornost na bakteriocine klase IIa u 1–8% ispitivanih sojeva divljeg tipa. Konkretno, pokazalo se da upotreba nepročišćenih proteinskih ekstrakta bakteriocina iz stanica može promicati otpornost mikroorganizama na te molekule. Zbog toga je tijekom razvoja novih antibiotika poželjno koristiti pročišćene bakteriocine u sigurnom nosaču ili pomoćnom materijalu, koji ih štiti od enzima (Preciado i sur., 2016).

### 2.3.3. Potencijalne primjene bakteriocina

Bakteriocini pokazuju veliki potencijal za primjenu u liječenju zaraznih bolesti (Cotter i sur., 2013; Beshkova i Frengova, 2012). Veliki je broj zaraznih bolesti koje je teško liječiti tradicionalnim antibioticima, uglavnom zbog otpornosti sojeva na antibiotike i horizontalnog prijenosa gena među bakterijskim sojevima. Bakteriocini su dobra opcija protiv patogena koji su rezistentni na lijekove, kao što su *P. aeruginosa*, *E. coli*, meticilin rezistentni *Streptococcus aureus* (MRSA), penicilin rezistentni *Streptococcus pneumoniae* i *M. tuberculosis*, jer ovi antimikrobni peptidi imaju visoku specifičnost i potentnost, tj. djeluju u pikomolarnoj i nanomolarnoj koncentraciji (Preciado i sur., 2016; Cotter i sur., 2013, Hassan i sur., 2012). Bakteriocini kao izvor novih antibiotika imaju prednost zbog njihove raznolikosti, specifičnih ciljnih mjesta, a također se smatraju sigurnima u prehrambene svrhe. Nadalje, imaju sposobnost sinergistički djelovati s antibioticima te imaju smanjenu toksičnost u stanicama. Međutim, ovisno o njihovoj veličini, mogu biti osjetljivi na proteolitičke enzime, a neki mogu postati toksični za stanice sisavaca, što je nedostatak (Preciado i sur., 2016; Allen i sur., 2014).

Nekoliko studija pokazuje da bakteriocini predstavljaju veliki potencijal u kliničkom području kao terapijska sredstva jer bi se potencijalno mogli koristiti kao zamjena za antimikrobna sredstva ili u kombiniranoj terapiji s tradicionalnim antibioticima. Naime, to je zbog njihove visoke inhibitorne aktivnosti prema patogenim mikroorganizmima te zbog njihove stabilnosti (Preciado i sur., 2016; Amer i sur., 2014; Hassan i sur., 2012). Neke *in vivo* studije na životinjskim modelima poput miševa pokazale su bi bakteriocini potencijalno mogli biti terapijsko sredstvo protiv često ponavljajućih infekcija *M. tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* i *S. pneumoniae* (Preciado i sur., 2016; Hassan i sur., 2012).

Izravna upotreba mikroorganizama koji proizvode bakteriocin, kao što su *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. i nepatogena *E. coli* može biti učinkovitija za suzbijanje bakterijskih infekcija od upotrebe čistih bakteriocina. Međutim, potrebno je poduzeti posebne mjere za kontrolu primjene bakteriocina kako bi se spriječio razvoj otpornosti zbog horizontalnog prijenosa gena te kako bi se promicala uporaba bakteriocinskih koktela (Preciado i sur., 2016; Yang i sur., 2014; Allen i sur., 2014; Hassan i sur., 2012).

Postoje i druge važne primjene bakteriocina, poput liječenja raka. Pokazano je da bakteriocini kolicin A i E1 inhibiraju rast fibroblasta u stanicama tumora. Također, potvrđena je učinkovitost nisina u povećanju apoptoze u stanicama karcinoma. Osim toga, smatra se da

producenti bakteriocinskih probiotskih dodataka mogu spriječiti nastanak raka, tj. djelovati profilaktično (Yang i sur., 2014).

## 2.4. S-PROTEINI

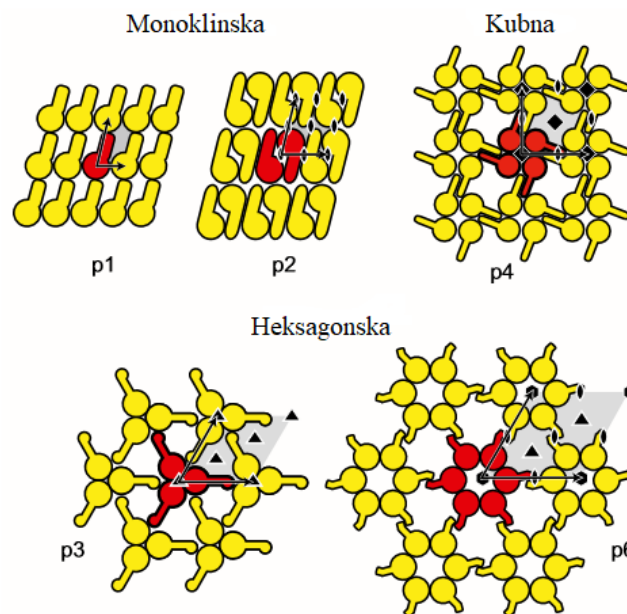
S-proteini su parakristalne dvodimenzionalne strukture građene od pravilnih nizova proteina ili glikoproteina (Banić i sur., 2018; Gerbino i sur., 2015). Prekrivaju staničnu površinu mnogih prokariotskih organizama, točnije dio površine koji je najudaljeniji od centra (Schuster i Sleytr, 2020). S-proteini su strukturno uređeni kao monomolekularni kristalni površinski slojevi zbog čega se često nazivaju „proteini S-sloja“ (engl. S-layer proteins). Nalaze se kod pojedinih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te kod arheja u svim fazama rasta (Schuster i Sleytr, 2020; Gerbino i sur., 2015).

Prokariotski mikroorganizmi su se tijekom evolucije, s obzirom na njihova specifična i često opasna staništa, prilagodili okolišu na način da su formirali različite strukture staničnih stijenki (Claus i sur., 2005). Čvrsta proteinska ovojnica, nazvana S-sloj, smatra se najstarijom biološkom membranom koja je sveprisutna i očuvana kod većine bakterijskih vrsta i arheja (Beveridge i sur. 1990) te također i na površini stanične stijenke cijanobakterija (Šmarda i sur. 2002). S obzirom na to da biomasa prokariotskih organizama nadmašuje eukariotsku biomasu, a S-proteini čine oko 10% staničnih proteina, S-proteini predstavljaju jedan od najbrojnijih biopolimera na zemlji (Schuster i Sleytr, 2020; Sleytr i sur., 2014).

### 2.4.1. Morfološka i biokemijska struktura S-proteina

S-proteini se u pravilu sastoje od jedne vrste (gliko)proteina koji ima intrinzično svojstvo mogućnosti sastavljanja u visoko uređene dvodimenzionalne kristalne strukture (Claus i sur., 2005) te samim time S-proteini predstavljaju najjednostavnije biološke (gliko)proteinske membrane razvijene tijekom evolucije (Sleytr i sur., 2014). Molekularna masa S-proteina u rasponu je od 40 000 do 230 000 Da te mogu formirati jednostavnu kosu monoklinsku (p1, p2), kubnu (p4) ili heksagonsku rešetku simetrije (p3, p6), s osnovnom strukturnom jedinicom dimenzija u rasponu 3–30 nm (Schuster i Sleytr, 2020). Međutim, kod nekih bakterija i arheja mogu biti prisutne dvije preklopljene kristalne rešetke S-sloja, sastavljene od različitih vrsta podjedinica (Sleytr i sur., 2014; Sleytr i sur., 2001). Kod većine arheja S-sloj ima heksagonalnu

simetriju rešetki, dok su kod bakterija češće prisutne kose i tetragonske rešetke (Claus i sur., 2005).



**Slika 7.** Shematski prikaz različitih tipova rešetki S-sloja, njihovih osnovnih vektora i jedinične ćelije (zasjenjena sivom bojom) (Sleytr i sur., 2014).

Na slici 7 shematski su prikazani različiti tipovi rešetki proteina S-sloja s obzirom na moguću dvodimenzionalnu strukturu. Proteini koji čine jednu morfološku jedinicu rešetke prikazani su crvenom bojom, pri čemu je njihov izgled odabran proizvoljno (Schuster i Sleytr, 2020; Sleytr i sur., 2014). Jedna morfološka jedinica sastoji se od jedne, dvije, tri, četiri ili šest identičnih podjedinica (Schuster i Sleytr, 2020). S obzirom na to da su S-proteini obično sastavljeni od jedne vrste molekula koja ima sposobnost sastavljanja zatvorenih pravilnih nizova na staničnoj površini, za njihovo sastavljanje troši se malo slobodne energije. *In vivo* studije morfogeneze S-proteina pokazale su da se pri visokim stopama rasta sintetizira oko 500 podjedinica u sekundi koje se zatim moraju premjestiti na staničnu površinu i uklopiti u postojeću rešetku S-sloja (Sleytr i sur., 2014).

S-sloj može biti, ovisno o pojedinačnom sastavu stanične stijenke pojedinog mikroorganizma, nekovalentno vezan na citoplazmatsku membranu, vanjsku membranu, peptidoglikan (murein), pseudomurein ili na sekundarne komponente stanične stijenke (Sleytr i sur., 2001). Proteini S-sloja sadrže oko 40–60 mol % hidrofobnih aminokiselina i 25 mol % nabijenih aminokiselina (Sára i Sleytr, 2000). Većina S-proteina slabo je kisela, međutim neki

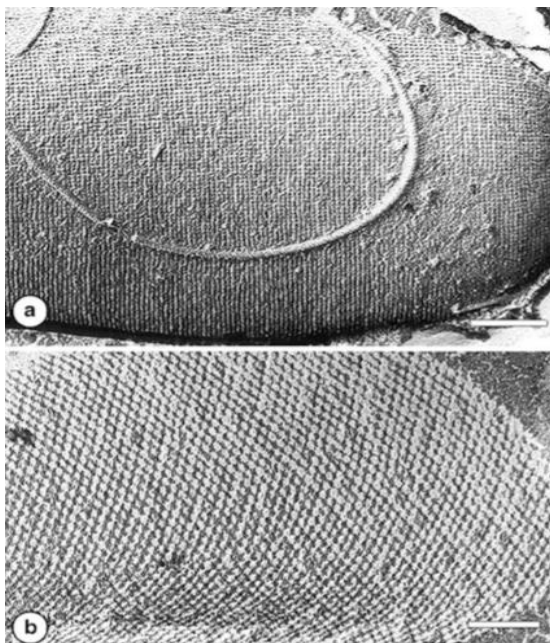
su bazični, npr. oni iz *Methanothermus fervidus*, *Methanothermus sociabilis*, *Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, i *Lactobacilli* s izoelektričnim točkama između pH 8,0 i 10,0. Aminokiseline S-proteina organizirane su tako da oko 40 % S-proteina sadrži  $\beta$ -nabrane ploče, a 10 - 20 % je u obliku  $\alpha$ -heliksa. Njihove molekularne mase kreću se u rasponu od 40 do 200 kDa (Claus i sur., 2005).

Bakterijski S-proteini se na površinu izlučuju ili univerzalnim općim putem (SEC) ili preko ABC transporterata. Većina prokariotskih S-proteina ima tipičnu vodeću peptidnu sekvencu građenu od 30 aminokiselina s pozitivno nabijenim N-terminalnim krajem, hidrofobnom jezgrom i C-terminalnim krajem koji sadrži mjesto prepoznavanja za cijepanje, pri čemu je cijepanje katalizirano specifičnim signalnim peptidazama (Claus i sur., 2005).

Kod S-proteina nekih vrsta karakteristično je da u svojoj strukturi sadrže homologne domene koje imaju specifične funkcije. Većina halobakterijskih S-proteina usidrena je u citoplazmatskoj membrani preko transmembranske domene koja se nalazi na C-terminalnom kraju. Međutim, S-proteinski sloj Gram-pozitivnih bakterija fiksiran je svojim N-terminalnim ili C-terminalnim krajem na peptidoglikan ili na sekundarne polimere stanične stijenke, poput teihoične kiseline, teihonske kiseline, lipoteihoične kiseline ili lipoglikana (Claus i sur., 2005). To vezanje u pravilu je posredovano SLH (engl. S-layer homologous) domenama koje su pronađene u nekim *Bacillaceae*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermotoga maritima* i Gram-negativnim bakterijama *Synechocystis* sp. i *Thermus thermophilus* (Archibald i sur. 1993), međutim nemaju svi S-proteini SLH domene (Claus i sur., 2005). Isto tako, istraživanjima je pokazano da su N-terminalne sekvence S-proteina koje slijede tzv. *docking* regije neophodne za postupak samostalnog organiziranja koji je uočen kod S-proteina bakterija *Bacillus* i *Geobacillus*, dok suprotno tome oko 200 aminokiselina može biti pocijepano na C-terminalnom kraju bez negativnog učinka u tom pogledu (Jarosch i sur. 2001; Ilk i sur. 2002).

Udaljenost između centara morfoloških jedinica varira između 2,5 i 35 nm, dok je debljina sloja između 5,0 i 25 nm kod bakterija i do 70 nm u arhejama. Zbog svoje kristalne naravi, rešetke S-sloja sadrže pore identične veličine i morfologije, pri čemu se veličine obično kreću između 2 i 8 nm (Sleytr i sur., 2001). Većina S-proteina pokazuje manje valovit vanjski dio u odnosu na njegov unutarnji dio. Štoviše, S-proteini su visoko anizotropne strukture s obzirom na neto naboj i hidrofobnost unutarnje i vanjske površine (Schuster i Sleytr, 2020; Pum i sur., 1989). Također, zbog kristalnog karaktera S-proteina, funkcionalne skupine (npr. karboksilna, amino, hidroksilna skupina) ponavljaju se s periodičnošću proteinske rešetke (Schuster i Sleytr, 2020). Ova stroga modularna konstrukcija rešetke S-sloja osnova je za

mnoge obećavajuće primjene S-proteina u nanobiotehnologiji (Claus i sur., 2005; Schuster i Sleytr, 2020).



**Slika 8.** Elektronska mikroskopska slika pripravaka cijelih stanica organizama, dobivena freeze-etching metodom (a) *Lysinibacillus sphaericus* CCM 2177, (b) *Thermoplasma thermohidrosulfuricus* (Schuster i Sleytr, 2020).

Na slici 8 prikazana je mikroskopska slika cijelih stanica mikroorganizama, dobivena elektronskim mikroskopom freeze-etching metodom, pri čemu slika 8.a prikazuje organizam kod kojeg je prisutna kvadratna rešetka S-proteina, a slika 8.b organizam s heksagonalno uređenim kvadratnim rešetkama S-proteina (Schuster i Sleytr, 2020).

#### 2.4.2. Mehanizam djelovanja S-proteina i njegova uloga

S-proteini su metabolički proizvodi koji mogu organizmima osigurati selektivnu prednost u poprilično raznolikim staništima. Iako se prikupila znatna količina znanja o njihovoj strukturi, procesu sastavljanja, kemiji i genetici, relativno je malo dostupnih podataka o njihovim specifičnim biološkim funkcijama (Sleytr i sur., 2014; Hynönen i Palva, 2013). S-proteini su kod većine mikroorganizama najudaljeniji sloj od njihovog središta te su samim time u izravnom kontaktu s bakterijskim okolišem. Sukladno tome, zaslužni su za mnoge korisne karakteristike površine bakterija, poput svojstva da se vežu na različite supstrate,



mucine i eukariotske stanice te da omogućavaju agregaciju i koagregaciju s kvascima i drugim bakterijama (Gerbino i sur., 2015).

S-proteini mogu biti uključeni u određivanje oblika stanice i stanične diobe, ali isto tako mogu djelovati i kao zaštitni omotači, faktori virulencije u patogenim organizmima, molekularna sita, zamke za molekule i ione, promotori za staničnu adheziju, prevlake koje sprječavaju obrastanje (Sleytr i sur., 2014) te kao nosači za druge proteine ili glikoproteine (Banić i sur., 2018; Klotz i sur., 2017; Hynönen i Palva, 2013).

S-proteini imaju značajnu ulogu kao adhezivi koji stupaju u interakciju s različitim dijelovima crijevnog tkiva te kao imunomodulatori i zaštitne molekule u stresnim uvjetima okoliša (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016; Beganović i sur., 2011a). Štoviše, S-proteini se mogu koristiti kao nosači antigena ili drugih važnih molekula te su stoga dobri kandidati za zdravstvene primjene (Banić i sur., 2018; Hynönen i Palva, 2013).

Konkretno, već je uvelike poznat doprinos probiotičkih sojeva funkciji mukozne barijere, procesima koagregacije s patogenima i kompetitivnim isključivanjem, kao i modulaciji imunološkog odgovora, smanjenju luminalne pH vrijednosti i izlučivanju određenih spojeva poput bakteriocina. Međutim, prijanjanje probiotičkih sojeva na sluznicu smatra se glavnim preduvjetom za njihov opstanak i uspostavljanje funkcije u gastrointestinalnom traktu, u kojemu se očekuju njihovo blagotvorno djelovanje na zdravlje (Beganović i sur., 2011b). Sukladno tome, sposobnost privremenog koloniziranja crijevnog epitela omogućuje probioticima da duže iskazuju svoje korisne učinke (Beganović i sur., 2011b; Servin i Coconnier, 2003). Molekule smještene na površini poput lipoteihoične kiseline, lektin nalik molekula i proteina identificirani su kao adhezivni spojevi koji na specifičan način stupaju u interakciju s receptorima u crijevnom tkivu (Beganović i sur., 2011b).

#### 2.4.3. Potencijalne primjene S-proteina

S-proteini zahvaljujući svojim karakteristikama pokazuju širok raspon potencijalne primjene. Jedna od mogućih primjena je upotreba S-proteina kao izoporozne ultrafiltracijske membrane, odnosno kao membrane za selektivno propuštanje tvari kroz njihove pore jednakih veličina (Sleytr, 2014). U istraživanjima Sleytr i Sára ultrafiltracijske membrane S-sloja proizvedene su nanošenjem fragmenata S-sloja kao koherentnog sloja na mikrofiltrirajuće membrane. Međutim, mehanička i kemijska stabilnost njihove kompozitne strukture dobila se

zatim intramolekulskim umrežavanjem (engl. cross-linking) te se pokazalo da su kemijska i toplinska otpornost ovih membrana usporedive s poliamidnim membranama (Sleytr, 2014).

Svojstva S-sloja mogu se također iskoristiti na način da se koristi kao matrica za funkcionalne molekule i nanočestice. Eksperimenti kemijske modifikacije i označavanja otkrili su da rešetke S-sloja imaju veliku gustoću funkcionalnih skupina na vanjskoj površini. Međutim, s obzirom na to da su podjedinice jedna s drugom i sa slojem ovojnice stanice koji je ispod njih povezane nekovalentnim interakcijama, stabilan matriks za imobilizaciju može se dobiti samo umrežavanjem s glutardialdehidom ili drugim intra- i intermolekularnim cross-linkerima. Za imobilizaciju stranih, funkcionalnih molekula kao što su enzimi, ligandi, antigeni ili antitijela, potrebno je prethodno aktivirati slobodne karboksilne kiseline u S-proteinskom sloju, tj. provesti specifične kemijske reakcije. Dotična svojstva S-sloja mogla bi poslužiti kao jedan od ključnih faktora formiranja novih dijagnostičkih metoda u medicini (Sleytr i sur., 2014).

S obzirom na to da molekule na površini stanica domaćina često djeluju kao medijatori za određene interakcije s patogenom, očekuje se da bi S-proteini patogenih sojeva trebali imati važnu ulogu u virulenciji (Gerbino i sur., 2015; Sleytr i sur., 2014). Zbog toga se proteini S-sloja smatraju glavnim kandidatima za razvoj cjepiva. Trenutni eksperimenti usredotočeni su na uporabu proteina S-sloja kao atenuiranih patogena, kao nosača antigena/haptena, kao pomoćna sredstava ili kao dio vezikula za cijepljenje (Klotz i sur, 2018.; Sleytr i sur., 2014).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korištene su bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus* izolirane iz kiselog kupusa i test-mikroorganizmi prikazani u tablici 3. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Tablica 3.** Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka	Uvjeti čuvanja
<i>Lactobacillus plantarum</i>	SF9C	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	SF9B	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Escherichia coli</i>	3104	HB, 37°C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	HB, 37°C, aerobno
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	HB, 37°C, aerobno
<i>Bacillus cereus</i>	TM2	HB, 37°C, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	HB, 37°C, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	K-144	HB, 37°C, aerobno
<i>Salmonella</i> ent. s. <i>Typhimurium</i>	FP1	HB, 37°C, aerobno

##### 3.1.2. Hranjive 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; kvašičev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 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

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

### 3.1.3. Kemikalije

- akrilamid/bisakrilamid 30 % (w/v), „Sigma-Aldrich“, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Bio-Rad“, SAD
- etanol, 70% „Kemika“, Hrvatska
- fiziološka otopina
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- izopropranol, „Kemika“, Hrvatska
- proteinaza K, „Invitrogen“, SAD
- reducirajući reagens
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin), „Bio-Rad“, SAD
- Tris-HCl pufer pH 6,8
- Tris-HCl pufer pH 8,8

### 3.1.4. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- bušać
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- elektroforetska kadica, „Cleaver Scientific Ltd“, Velika Britanija
- ependorfe
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD

- mikrobiološka ušica
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio- Rad“, SAD
- Petrijeve zdjelice
- Pinceta
- staklene epruvete
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Sutjeska“
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80 °C u hranjivom bujonu s 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenima u tablici 3.

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

Antimikrobno djelovanje odabranih sojeva BMK prema test-mikroorganizmima (*Escherichia coli* 3104, *Listeria monocytogenes* ATCC19111, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Bacillus cereus* TM2, *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144 i *Salmonella* ent. s. *Typhimurium* FP1) ispitano je metodom difuzije u agar, na krutim hranjivim podlogama prema Šušković i Kos, 2007.

Metoda se provela na način da su prekonocne bakterijske kulture patogenih test-mikroorganizama (150 µL) nacijepljene u 12 mL hranjivog agra (Biolife, Italija) (1,5 % agara) koji je prethodno otopljen i ohlađen na 50°C. Tako inokulirane podloge su zatim izliven u Petrijeve zdjelice. Nakon što su se hranjive podloge skrutnule, sterilnim bušaćem promjera 8 mm izbušene su „rupe“ u agaru te su sterilnom mikrobiološkom ušicom uklonjeni agarni diskovi, a u nastalu rupu je nanešeno 50 µL supernatanta kulture ispitivane BMK. Odabrani sojevi BMK, *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus plantarum* SF9C, kojima je ispitana antimikrobna aktivnost, prethodno su uzgojeni u anaerobnim uvjetima preko noći pri 37°C, nakon čega je provedeno centrifugiranje prekonocnih kultura 5 min pri 9000 o/min.

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

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

Antimikrobno djelovanje odabranih izolata BMK, *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus plantarum* SF9C, prema patogenim test-mikroorganizmima podrijetlom iz hrane (*Escherichia coli* 3104, *Listeria monocytogenes* ATCC19111, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Bacillus cereus* TM2, *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144 i *Salmonella* ent. s. *Typhimurium* FP1) ispitano je metodom s dvostrukim slojem agara prema Kos i sur., 2011.

Metoda se provela tako da su primarno prekonocne bakterijske kulture odabranih sojeva BMK, *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus plantarum* SF9C, nacijepljene po 5 µL na de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Biolife, Italija) u dvije paralele i stavljene na anaerobnu inkubaciju preko noći pri 37°C. Preko poraslih kolonija BMK preliveno je 10 mL hranjivog agra (s 0,8 % agara), prethodno otopljenog i ohlađenog na 50°C, inokuliranog sa 150 µL suspenzije odgovarajućeg test-mikroorganizma. Aerobna inkubacija trajala je 24 sata pri 37°C, nakon koje je slijedilo mjerenje bistrih zona inhibicije. Izmjereni su promjeri porasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID) te je izračunat efektivni inhibicijski odnos (EIR) prema slijedećem izrazu:

$$EIR = \frac{(ID - CD)}{CD}$$

Ovisno o dobivenim vrijednostima, rezultati se interpretiraju prema sljedećem:

**EIR** < 0,5 → slaba inhibicija

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

**EIR** > 1,5 → jaka inhibicija

#### 3.2.4. Određivanje utjecaja visoke temperature i enzima na bakteriocinsku aktivnost soja producenta

S ciljem provjere utjecaja visoke temperature i enzima kao što je proteinaza K, na bakteriocinsku aktivnost soja *Lactobacillus plantarum* SF9C, supernatant prekonodne kulture tretiran je proteinazom K (Invitrogen, SAD) u koncentraciji 1 mg/mL tijekom 2 h pri 37°C i zagrijavanjem do 100°C tijekom 30 min (Elayaraja i sur., 2014).

Nakon provedenih tretmana, antimikrobno djelovanje supernatanta kultura ispitano je metodom difuzije s rupama u agaru, kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Korišteno je istih sedam test-mikroorganizama kao i u prethodnim eksperimentima. Kao kontrola je poslužio neobrađeni supernatant kulture *Lactobacillus plantarum* SF9C.

#### 3.2.5. Ispitivanje prisutnosti S-proteina na površini stanica *Lactobacillus* sojeva

Prekonodne bakterijske kulture *Lactobacillus* sojeva centrifugiraju se pri 3500 o/min tijekom 15 minuta i dva puta isperu sterilnom fiziološkom otopinom. Slijedi resuspendiranje stanica u reducirajućem reagensu uz kuhanje tijekom 3 minute nakon čega je provedeno centrifugiranje pri 9000 o/min tijekom 5 minuta. 20 µl dobivenog uzorka i nanešeno je na gel za SDS-PAGE pomoću Hamiltonove igle nakon čega je provedena elektroforeza tijekom pri 200 V.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI ODABRANIH *Lactobacillus* SOJEVA

Metodom s dvostrukim slojem agara, opisanom u 3.2.3. poglavlju, provedeno je ispitivanje antimikrobne aktivnosti odabranih *Lactobacillus* sojeva, odnosno, ispitivanje njihove inhibitorne aktivnosti prema odabranim patogenim test-mikroorganizmima, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4 i na slici 9.

Na temelju dobivenih rezultata, prikazanih u tablici 4, može se uočiti kako soj *Lactobacillus plantarum* SF9C i soj *Lactobacillus brevis* SF9B pokazuju srednje do jako inhibitorno djelovanje prema patogenim test-mikroorganizmima.

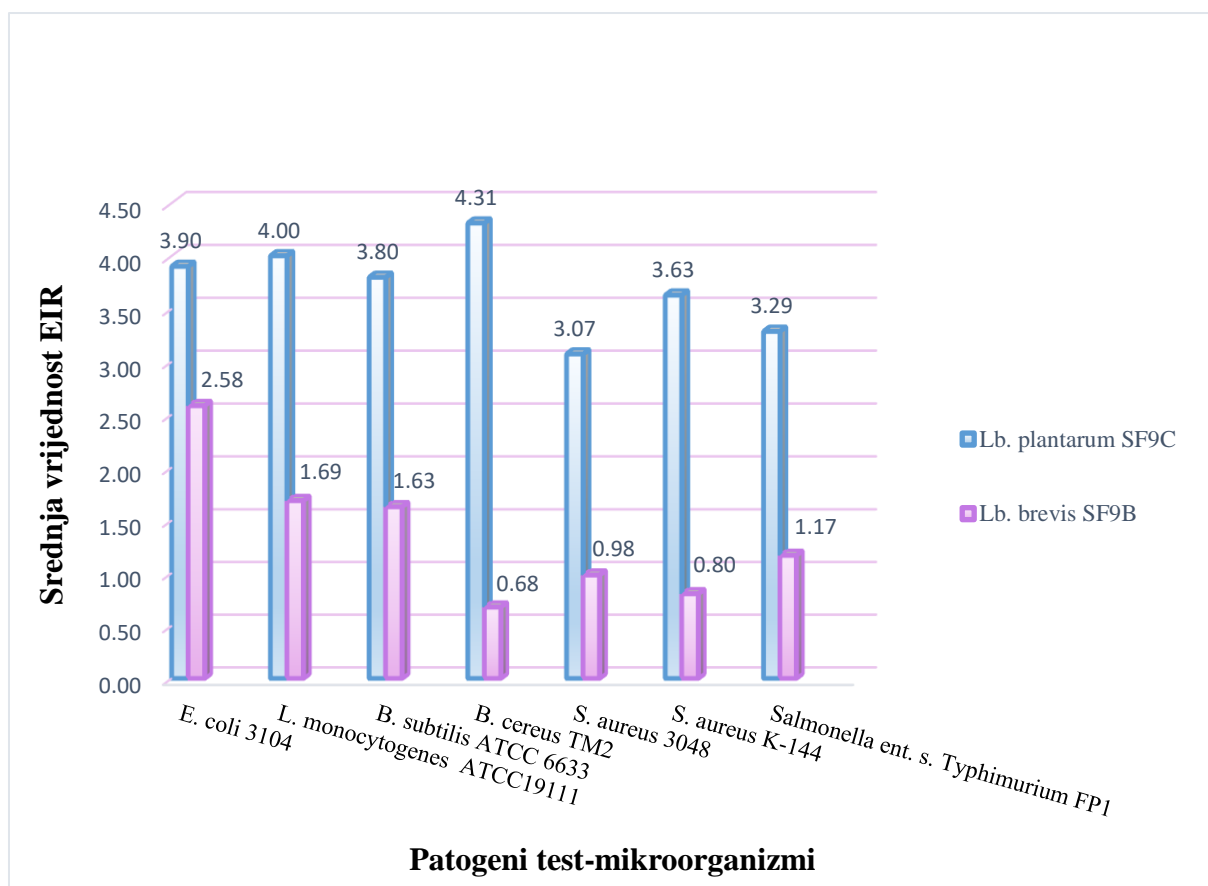
Soj *Lactobacillus plantarum* SF9C prema svih sedam patogenih test-mikroorganizama pokazuje jako inhibitorno djelovanje, odnosno omogućuje jaku inhibiciju njihovog rasta. To se objašnjava izračunatom vrijednošću efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) pomoću kojeg se određuje inhibitorno djelovanje pojedinog mikroorganizma te ukoliko je vrijednost  $EIR > 1,5$  riječ je o mikroorganizmu koji pokazuje jako inhibitorno djelovanje (kao što je opisano u 3.2.3. poglavlju). EIR vrijednosti su kod soja *Lactobacillus plantarum* SF9C u rasponu od 3,07 do 4,31 na temelju čega se može zaključiti kako je navedeni soj pokazao najjače inhibitorno djelovanje prema patogenim test-mikroorganizmima. Najveću razinu inhibicije pokazuje prema *Bacillus cereus* TM2 ( $EIR = 4,31$ ), a najmanju prema *Staphylococcus aureus* 3048 ( $EIR = 3,07$ ) (tablica 4 i slika 9).

Nadalje, soj *Lactobacillus brevis* SF9B prema tri patogena test-mikroorganizma pokazuje jako inhibitorno djelovanje ( $EIR > 1,5$ ), a prema preostalim četiri pokazuje srednje inhibitorno djelovanje ( $0,5 < EIR < 1,5$ ). EIR vrijednosti su kod navedenog soja u rasponu od 0,68 do 2,55. Najjače inhibitorno djelovanje pokazuje prema *Escherichia coli* 3104 ( $EIR = 2,58$ ), a najmanje prema *Bacillus cereus* TM2 ( $EIR = 0,68$ ) (tablica 4 i slika 9).



**Tablica 4.** Rezultati antibakterijske aktivnosti *Lb. plantarum* SF9C i *Lb. brevis* SF9B dobiveni metodom s dvostrukim slojem agara

Patogeni test- mikroorganizmi	Bakterije mliječne kiseline					
	<i>Lb. plantarum</i> SF9C			<i>Lb. brevis</i> SF9B		
	ID [cm]	CD [cm]	EIR	ID [cm]	CD [cm]	EIR
<i>E. coli</i> 3104	3,05	0,65	3,69	3,00	0,80	2,75
	3,50	0,70	4,00	2,40	0,75	2,20
	3,50	0,70	4,00	2,85	0,75	2,80
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19111	3,40	0,70	3,86	2,40	0,75	2,20
	3,60	0,70	4,14	1,70	0,70	1,43
	3,50	0,70	4,00	1,70	0,70	1,43
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	3,40	0,70	3,86	1,75	0,70	1,50
	3,35	0,75	3,47	1,90	0,70	1,71
	3,80	0,75	4,07	2,00	0,75	1,67
<i>B. cereus</i> TM2	4,50	0,75	5,00	0,90	0,65	0,38
	3,30	0,70	3,71	1,45	0,70	1,07
	3,65	0,70	4,21	1,10	0,70	0,57
<i>S. aureus</i> 3048	2,70	0,70	2,86	1,40	0,65	1,15
	2,90	0,70	3,14	1,35	0,70	0,93
	2,95	0,70	3,21	1,30	0,70	0,86
<i>S. aureus</i> K-144	3,30	0,70	3,71	1,10	0,65	0,69
	3,20	0,70	3,57	1,30	0,70	0,86
	3,45	0,75	3,60	1,30	0,70	0,86
<i>Salmonella ent.</i> <i>s. Typhimurium</i> FP1	3,00	0,75	3,00	1,60	0,70	1,29
	3,10	0,70	3,43	1,45	0,70	1,07
	3,10	0,70	3,43	1,50	0,70	1,14



**Slika 9.** Grafički prikaz inhibitornog djelovanja sojeva *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B prema patogenim test-mikroorganizmima

Na slici 9 grafički je prikazana jačina inhibitornog djelovanja sojeva *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B prema patogenim test-mikroorganizmima, pri čemu je jačina inhibitornog djelovanja u korelaciji s izračunatom EIR vrijednosti. Može se uočiti kako je jačina inhibitornog djelovanja kod soja *Lactobacillus plantarum* SF9C (plavi stupci), u pravilu dvostruko ili trostruko veća nego kod soja *Lactobacillus brevis* SF9B (ljubičasti stupci). Iznimke su soj *Escherichia coli* 3104 gdje je inhibitorna vrijednost oba soja relativno visoka te *Bacillus cereus* TM2 gdje je inhibitorna aktivnost soja *Lactobacillus plantarum* SF9C šest puta veća nego aktivnost soja *Lactobacillus brevis* SF9B.

Dobiveni rezultati antibakterijskog djelovanja ispitivanih sojeva *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B potječu od antimikrobnih spojeva koje proizvode BMK, a prvenstveno od proizvedene mliječne kiseline. Međutim, uz navedenu organsku kiselinu s antimikrobnim djelovanjem bakterije mliječne kiseline mogu proizvesti i druge

antimikrobne spojeve kao što su: octena kiselina, vodikov peroksid, etanol, mravlja kiselina, masne kiseline, diacetil, acetaldehid, acetoin, reuterin, reuteciklin, bakteriocini, spojevi slični bakteriocinima i drugi spojevi niske molekularne mase s antimikrobnom aktivnošću (Šušković i sur., 2010; Cotter i sur., 2013). Stoga su sljedeća istraživanja bila usmjerena na detekciju potencijalne bakteriocinske aktivnosti ispitivanih *Lactobacillus* sojeva.

#### 4.2. ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI BAKTERIOCINA U *Lactobacillus* SOJEVIMA I UTJECAJA VISOKE TEMPERATURE I ENZIMA NA BAKTERIOCINSKU AKTIVNOST

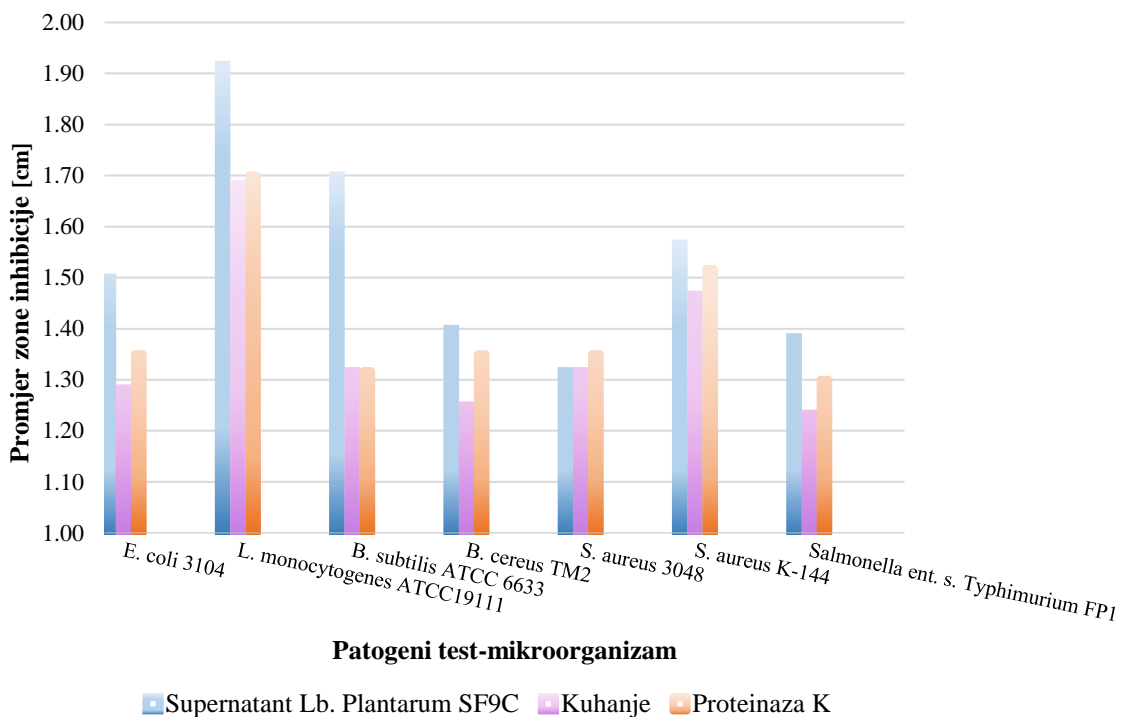
Metodom difuzije s rupama u agaru, opisane u poglavlju 3.2.2., provedeno je određivanje inhibitornog djelovanja supernatanta odabranih *Lactobacillus* sojeva prema patogenim test-mikroorganizmima te je na taj način indirektno provedeno određivanje prisutnosti bakteriocina u pojedinom soju. Nastavno na to, provedeno je i određivanje utjecaja visoke temperature i enzima na samu aktivnost bakteriocina, pri čemu su rezultati provedenih mjerenja prikazani u tablici 5.

S obzirom na to da su se za provođenje metode koristili uzorci supernatanata kultura ispitivanih sojeva *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B, pretpostavka je bila da će do inhibicije rasta patogenih mikroorganizama doći samo ukoliko određeni soj proizvodi antimikrobne spojeve ekstracelularno, tj. izlučuje ih u hranjivu podlogu tijekom svog rasta. Naime, bakteriocini se, kao što je opisano u teorijskom dijelu ovog rada, izlučuju izvan stanica pa bi samim time trebali biti prisutni u supernatantu soja BMK koji je producent istih. Međutim, i mliječna kiselina, kao primarni proizvod metabolizma bakterija mliječne kiseline, također se izlučuje izvan stanice. Zato je za provjeru bakteriocinske aktivnosti bilo potrebno provesti zagrijavanje ispitivanih supernatanata kultura na visokoj temperaturi i tretiranje ispitivanih supernatanata kultura enzimom proteinaza K, što su postupci koji dovode do denaturacije proteina, tj. peptida s antimikrobnim djelovanjem kao što su bakteriocini, a posljedično i do inaktivacije njihovog antimikrobnog djelovanja (Alvarez-Sieiro i sur. 2016; Acedo i sur. 2018).

**Tablica 5.** Rezultati antibakterijske aktivnosti *Lb. plantarum* SF9C i *Lb. brevis* SF9B dobiveni metodom difuzije s rupama u agaru, pri čemu je: d – promjer zone inhibicije

Patogeni test- mikroorganizmi	Bakterije mliječne kiseline			
	<i>Lb. plantarum</i> SF9C			<i>Lb. brevis</i> SF9B
	SF9C d [cm]	Kuhanje d[cm]	Proteinaza K d [cm]	SF9B d [cm]
<i>E. coli</i> 3104	1,45	1,30	1,35	0,00
	1,55	1,30	1,35	0,00
	1,50	1,25	1,35	0,00
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19111	1,90	1,70	1,70	0,00
	1,90	1,70	1,70	0,00
	1,95	1,65	1,70	0,00
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1,70	1,35	1,30	0,00
	1,70	1,30	1,30	0,00
	1,70	1,30	1,35	0,00
<i>B. cereus</i> TM2	1,40	1,25	1,40	0,00
	1,40	1,25	1,30	0,00
	1,40	1,25	1,35	0,00
<i>S. aureus</i> 3048	1,30	1,30	1,35	0,00
	1,35	1,30	1,30	0,00
	1,30	1,35	1,40	0,00
<i>S. aureus</i> K-144	1,60	1,40	1,55	0,00
	1,50	1,50	1,50	0,00
	1,60	1,50	1,50	0,00
<i>Salmonella ent.</i> <i>s. Typhimurium</i> FP1	1,35	1,20	1,30	0,00
	1,40	1,25	1,30	0,00
	1,40	1,25	1,30	0,00

Na temelju dobivenih rezultata prikazanih u tablici 5, može se zaključiti kako je soj *Lactobacillus plantarum* SF9C producent bakteriocina, a da suprotno tome soj *Lactobacillus brevis* SF9B nije. Odnosno, promjeri inhibitornog djelovanja prema patogenim mikroorganizmima su za soj *Lactobacillus plantarum* SF9C u rasponu 1,32-1,92 cm, dok za soj *Lactobacillus brevis* SF9B iznose 0 cm. Soj *Lactobacillus plantarum* SF9C je prema prethodno provedenim istraživanjima producent bakteriocina, konkretno plantaricina, za razliku od soja *Lactobacillus brevis* SF9B za kojeg je u prethodnim istraživanjima ustanovljeno da posjeduje samo gene za imunitet na bakteriocine (Butorac i sur., 2020).



**Slika 10.** Grafički prikaz promjene inhibitorynog djelovanja plantaricina iz *Lactobacillus plantarum* SF9C ovisno o povišenju temperature i hidrolitičkoj aktivnosti enzima proteinaza K

Provjera prisutnosti bakteriocina kod soja *Lactobacillus plantarum* SF9C provedena je analizom kojom je ispitano u kojoj mjeri povišena temperatura i djelovanje proteinaza utječu na inhibitornu aktivnost ispitivanog soja prema patogenim test-mikroorganizmima.

Na temelju dobivenih rezultata koji su u grafičkom obliku prikazani na slici 10 može se zaključiti kako povišena temperatura i dodatak enzima proteinaza K utječu na smanjenje promjera inhibicije, što ukazuje na inhibitornu aktivnost plantaricina soja *Lactobacillus plantarum* SF9C. Međutim, na temelju dobivenih podataka može se uočiti kako je plantaricin otporniji na djelovanje enzima nego što je na povišenje temperature jer je smanjenje promjera inhibicije nakon izlaganja enzimu proteinaza K manje nego što je nakon izlaganja plantaricina visokoj temperaturi. Iznimka prethodno navedene tvrdnje je u slučaju inhibitorynog djelovanja prema soju *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kod kojeg je smanjenje inhibitorynog djelovanja plantaricina bilo jednako i nakon izlaganja visokoj temperaturi i nakon izlaganja enzimu. Isto tako, kod izlaganja plantaricina patogenom test-mikroorganizmu *Staphylococcus aureus* 3048

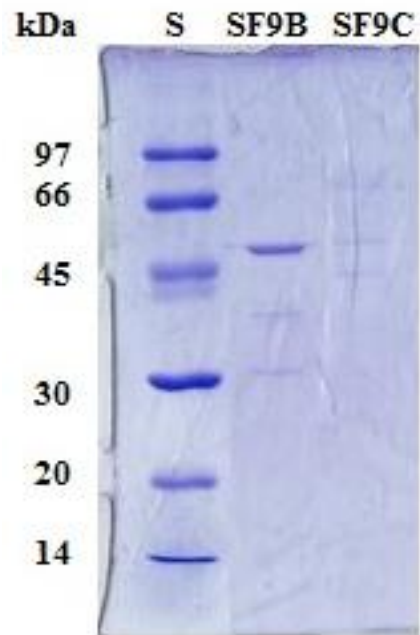
pokazalo se da je inhibitorna aktivnost najveća kod plantaricina koji je podvrgnut djelovanju enzima proteinaza K. Dotičan rezultat mogao bi se objasniti pogreškom u rukovanju, bilo da je riječ o korištenju krivog volumena enzima, samog plantaricina ili test-mikroorganizma.

Zaključno, izlaganjem supernatanta kulture povišenoj temperaturi i enzimu proteinaza K dolazi do smanjenja inhibitornog djelovanja prema patogenim test-mikroorganizmima, te se može zaključiti kako inhibitorno djelovanje soja *Lactobacillus plantarum* SF9C ne potječe samo od proizvedene mliječne kiseline, nego i od proizvedenog bakteriocina. Stoga bi se ovaj soj mogao primijeniti kao funkcionalna starter kultura za proizvodnju fermentirane hrane s dodatnim doprinosom sigurnosti i očuvanju hrane od kontaminacije potencijalnim nepoželjnim mikroorganizmima i inhibiranjem konkurentne prirodno prisutne mikrobiote (Preciado i sur., 2016; Šušković i sur., 2010). Osim toga, bakteriocini ne uzrokuju promjene crijevne mikrobiote nakon konzumacije tako proizvedene fermentirane hrane jer ih inaktiviraju probavni enzimi (proteaze). Također mogu djelovati sinergistički s drugim bakteriocinima tijekom proizvodnje fermentirane hrane (Preciado i sur., 2016; Galvez i sur., 2014).

#### 4.3. ISPITIVANJE PRISUTNOSTI S-PROTEINA NA POVRŠINI STANICA *Lactobacillus* SOJEVA

S-proteini i njihova važna uloga opisani su u 2.4. poglavlju ovog rada. Poznato je da soj *Lactobacillus brevis* SF9B ima eksprimirane S-proteine na površini svojih stanica (Uroić i sur., 2016; Butorac i sur., 2020) te se ovim eksperimentom htjela provjeriti ekspresija S-proteina kod soja *Lactobacillus plantarum* SF9C.

Kao što je spomenuto u teorijskom dijelu ovog rada, molekularna masa S-proteina u rasponu je od 40 do 230 kDa te se provođenjem SDS-PAGE gel-elektroforeze nastojala odrediti i molekulska masa S-proteina ispitivanog soja *Lb. brevis* SF9B. Na slici 11 jasno je vidljiva proteinska vrpca veličine oko 45 kDa kod soja *Lb. brevis* SF9B koja označava prisutnost S-proteina, dok kod soja *Lactobacillus plantarum* SF9C nije vidljiva proteinska vrpca što je u skladu s literaturnim podacima (Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016).



**Slika 11.** Prikaz gela dobivenog SDS-PAGE gel-elektroforezom, pri čemu je: S – standard, SF9B – površinski proteini *Lb. brevis* SF9B te SF9C – površinski proteini *Lb. plantarum* SF9C.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih eksperimenata i pritom dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Ispitivani sojevi *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B pokazuju srednje do jako inhibitorno djelovanje prema odabranim test-mikroorganizmima.
2. Izlaganje supernatanta kulture soja *Lactobacillus plantarum* SF9C visokoj temperaturi utječe na smanjenje njegove inhibitorne aktivnosti prema patogenim test-mikroorganizmima jer dolazi do denaturacije bakteriocina i posljedično do gubitka njegove antibakterijske aktivnosti. Preostalo antimikrobno djelovanje supernatanta kulture *Lactobacillus plantarum* SF9C potječe od proizvedene mliječne kiseline.
3. Djelovanjem proteinaze K dolazi do gubitka inhibicijske aktivnosti bakteriocina plantaricina soja *Lactobacillus plantarum* SF9C prema patogenim test-mikroorganizmima jer proteinaza K hidrolizira amidne veze unutar peptidnog lanca, pa tako i amidne veze unutar molekule plantaricina.
4. Potvrđena je prisutnost S-proteina kod soja *Lactobacillus brevis* SF9B te odsutnost S-proteina kod soja *Lactobacillus plantarum* SF9C.
5. Svojstvo proizvodnje bakteriocina soja *Lactobacillus plantarum* SF9C i S-proteina soja *Lactobacillus brevis* SF9B daje prednost njihovoj združenoj primjeni kao probiotičkih sojeva s pojačanim probiotičkim učinkom specifičnih biomolekula koje proizvode.



## 6. LITERATURA

Acedo, J.Z., Chiorean, S. Vederas, J.C., van Belkum, M.J. (2018) The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**(6), 805-828.

Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Breton, J., Kuylle, S., Pot, B., Holowacz, S., Grangette, C. (2018) New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining in vitro and in vivo approaches. *Benef. Microbes* **9**(2), 317–331.

Aleixandre-Tudó, J.L., Castelló-Cogollos, L., Aleixandre, J.L., Aleixandre-Benavent, R. (2019) Tendencias and Challenges in Worldwide Scientific Research on Probiotics. *Probiotics Antimicrob. Proteins*

Allen, H.K., Trachsel, J., Looft, T., Casey, T.A. (2014) Finding alternatives to antibiotics. *Ann. NY Acad. Sci.* **1323**, 91-100.

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

Amer, E.I., Mossallam, S.F., Mahrous, H. (2014) Therapeutic enhancement of newly derived bacteriocins against *Giardia lamblia*. *Exp. Parasitol.* **146**, 52-63.

Anonymous (2020) Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus sporogenes*), <<https://www.indiamart.com/>>. Pristupljeno 18. travnja 2020.

Archibald, A.R., Hancock, I.C. i Harwood, C.R. (1993) Cell wall structure, synthesis and turnover. U: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria (Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. i Losick, R., ured.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., str. 381–410.

Arena, M.P., Capozzi, V., Spano, G., Fiocco, D. (2017) The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 2641–2657.

Axelsson, L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. U: Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, 3. izd., (Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str. 1-66.

- Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., de Melo Franco, B.D.G., Converti, A., de Souza Oliveira, R.P. (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control* **32**(1), 134-142.
- Banić, M., Uroić, K., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Zorić, K., Durgo, K., Petković, H., Jamnik, P., Kazazić, S., Kazazić, K., Radović, S., Scalabrin, S., Hynönen, U., Šušković, J., Kos, B. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT - Food Sci. Technol.* **93**, 257-267.
- Beganović, J., Uroić, K., Leboš Pavunc, A., Kos, B., Šušković, J. (2014) Role of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus* strains, oral presentation. The 2nd International Symposium “VERA JOHANIDES” Biotechnology in Croatia by 2020; Annual 2013 of the Croatian Academy of Engineering, Zagreb, str. 73-90.
- Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Durgo, K., Oršolić, O., Kukulj, 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. *Microb. Cell Fact.* **19**.
- Bastos, M.C.F., Coelho, M.L.V., Santos, O.C.S. (2015) Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology* **161**, 683-700.
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanić, K., Šušković, J. (2011a) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Leeuwenhoek.* **100**, 43-53.
- Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Gjuračić, K., Špoljarec, M., Šušković, J., Kos, B. (2011b) Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *J. Food Sci.* **76**(2), 124–129.
- Beshkova, D., Frengova, G. (2012) Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng. Life Sci.* **12**(4), 419-432.
- Beveridge, T.J., Southam, G., Jericho, M.H., Blackford, B.L. (1990) High resolution topography of the S-layer sheath of the archaeobacterium *Methanospirillum hungatei* provided by scanning tunneling microscopy. *J. Bacteriol.* **172**, 6589–6595.

- Borgogna, J.-L. C., Yeoman, C. J. (2017) The Application of Molecular Methods Towards an Understanding of the Role of the Vaginal Microbiome in Health and Disease. *Methods Microbiol.* **44**, 37–91.
- Borner, R.A., Kandasamy, V., Axelsen, A.M., Nielsen, A.T., Bosma, E.F. (2019) Genome editing of lactic acid bacteria: Opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FE MS Microbiol. Lett.* **366**, 30-41.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 281–370.
- Carvalho, R. D. D. O., do Carmo, F. L. R., de Oliveira Junior, A., Langella, P., Chatel, J.-M., Bermúdez-Humarán, L. G., ... de Azevedo, M. S. (2017) Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. *Front. Microbiol.* **8**, 1–13.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernandez, P.E. (2001) Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* **7**(4), 281-305.
- Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M. (2017) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **49**, 23–28.
- Claus, H., Akça, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J-P., Harris, J R., Schlott, B., König, H. (2005) Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Can. J. Microbiol.* **51** (9), 731-743.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2013) Bacteriocins – A viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**(2), 95–105.
- Dale, H. F., Rasmussen, S. H., Asiller, Ö. Ö., Lied, G. A. (2019) Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients* **11**(9), 2048.
- Da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J.M.D., de Souza Oliveira, R.P. (2014) Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **64**, 527-536.
- De Bortoli, N., Leonard, G., Ciancia, E., Merlo, A., Bellini, M., Costa, F. i sur. (2007) *Helicobacter pylori* eradication: a randomized, prospective study of triple therapy versus triple therapy plus lactoferrin and probiotics. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 951-966.

- Dlamini, Z.C., Langa, R.L.S., Aiyegoro, O.A., Okoh, A.I. (2019) Safety Evaluation and Colonisation Abilities of Four Lactic Acid Bacteria as Future Probiotic. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **11**, 397-402.
- Douillard, F.P., de Vos, W.M. (2014) Functional genomics of lactic acid bacteria: From food to health. *Microb. Cell Fact.* **13** (1), S8
- Duar, R.M., Lin, X.B., Zheng, J., Martino, M.E., Grenier, T., Pérez-Munoz, M.E., Leulier, F., Ganzle, M., Walter, J. (2017) Lifestyle sin transition: Evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, S27–S48.
- Duhan, J.S., Nehra, K., Gahlawat, S.K., Saharan, P., Duhan, S. (2013) Bacteriocins from lactic acid bacteria. U: Biotechnology. Prospects and applications (Salar, R.K., Gahlawat, S.K., Swach, P., Duhan, J.S., ured.) Springer, New Delhi, str. 127-141.
- Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., Balasubramanian, T. (2014) Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **4**, 305-311.
- Endo, A., Tanizawa, Y., Arita, M. (2019) Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Environmental Samples. U: Lactic Acid Bacteria. Methods in Molecular Biology, 1888. izd., (Kanauchi, M., ured.), Humana Press, New York, 3-13.
- Evivie, S.E., Huo, G.-C., Igene, J.O., Bian, X. (2017) Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food Nutr. Res.* **61**(1), 1318034.
- Fijan, S. (2014) Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **11**(5), 4745-4767.
- Gad, M., Ravn, P., Soborg, D.A., Lund-Jensen, K., Ouwehand, A.C., Jensen, S.S. (2011) Regulation of the IL-10/IL-12 axis in human dendritic cells with probiotic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**, 93-107.
- Galvez, A., Grande Burgos, M.J., Lucas Lopez, R., Perez Pulido, R. (2014) Food Biopreservation, Springer, London, str. 15-22.
- García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernandez, A. Requena, T., Bartolome, B. MorenoArribas, M.V. (2014) Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiol.* **44**, 220-225.

- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., Neves, A. R. (2013) From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* **31**(6), 764–788.
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Seradell, M.A. i Gómez-Zavaglin, A. (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**(12), 1877–1887.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N., Mehmood, S. (2014) Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **7**, 222-229.
- Parvizi, P., Gisavi, H., Chambers, J.R., Sharif, S. (2005) Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 1387-1392.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., Lotfipour, F. (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 723-736.
- Hati, S., Patel, M., Mishra, B.K., Das, S. (2019) Short-chain fatty acid and vitamin production potentials of *Lactobacillus* isolated from fermented foods of Khasi Tribes, Meghalaya, India. *Ann. Microbiol.* **69**, 1191–1199.
- Hegarty, J.W., Guinane, C.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. (2016) Bacteriocin production: A relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Res.* **5**, 2587.
- Hwang, I.Y., Koh, E., Kim, H.R., Yew, W.S., Chang, M.W. (2016) Reprogrammable microbial cell-based therapeutics against antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist. Updat.* **27**, 59–71.
- Hynönen, U., Palva, A. (2013). *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225–5243.
- Ilk, N., Völlenkne, C., Egelseer, E.M., Breitwieser, A., Sleytr, U.B., Sára, M. (2002) Molecular characterization of the S-layer gene, *sbpA*, of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 and production of a functional S-layer fusion protein with the ability to recrystallize in a defined orientation while presenting the fused allergen. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3251–3260.
- Jarosch, M., Egelseer, E.M., Huber, C., Moll, D., Mattanovich, D., Sleytr, U.B., Sára, M. (2001) Analysis of the structure–function relationship of the S-layer protein SbsC of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 by producing truncated forms. *Microbiology* **147**, 1353–1363.

- Klotz, C., O’Flaherty, S., Goh, Y. J., Barrangou, R. (2017) Investigating the effect of growth phase on the surface-layer associated proteome of *Lactobacillus acidophilus* using quantitative proteomics. *Front. Microbiol.* **8**, 2174.
- Klotz C., Barrangou R. (2018) Engineering Components of the *Lactobacillus* S-Layer for Biotherapeutic Applications. *Front. Microbiol.* **9**, 2264.
- 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.
- Kumar, H., Salminen, S., Verhagen, H., Rowland, I., Heimbach, J., Banares, S., Young, T., Nomoto, K., Lalonde, M. (2015) Novel probiotics and prebiotics: Road to market. *Curr. Opin. Biotechnol.* **32**, 99-103.
- Lopetuso, L., Giorgio, M., Saviano, A., Scaldaferrri, F., Gasbarrini, A., Cammarota, G. (2019) Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* **20**(1), 183.
- Lubkowitz, D., Ho, C. L., Hwang, I. Y., Yew, W. S., Lee, Y. S., Chang, M. W. (2018) Reprogramming Probiotic *Lactobacillus reuteri* as a Biosensor for Staphylococcus aureus Derived AIP-I Detection. *ACS Synth. Biol.* **7**(5), 1229–1237.
- Mackowiak, P. A. (2013) Recycling Metchnikoff: Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. *Front. Public Health* **1**(52), 1-3.
- Macwana, S., Muriana, P.M. (2012) Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanisms of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods* **88**(1), 7-13.
- Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2017) Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front. Microbiol.* **8**, 1205.
- Mays, Z.J., Nair, N.U. (2018) Synthetic biology in probiotic lactic acid bacteria: At the frontier of living therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **53**, 224-231.
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A., Pessione, E. (2014) Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol. Adv.* **32**(7), 1216–1236.

- Mora-Villalobos, J.A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J.P. (2020) Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation* **6**, 1-23.
- Narhus, J. A., Axelsson, L. (2003) Lactic Acid Bacteria, U: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2. izd., (Caballero, B., ured.), Academic Press, Baltimore, 3465-3472.
- Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell. Fact.* **13**(1), 1-13.
- Pisano, M.B., Fadda, M.E., Melis, R., Ciusa, M.L., Viale, S., Deplano, M. i sur. (2015) Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food Control* **51**, 511-518.
- Preciado, G. M., Michel, M. M., Villarreal-Morales, S. L., Flores-Gallegos, A. C., Aguirre-Joya, J., Morlett-Chávez, J., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R. (2016) Bacteriocins and Its Use for Multidrug-Resistant Bacteria Control. U: Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches (Rodríguez-Herrera, R., ured.), Academic Press, Elsevier, London, 329–349.
- Puebla-Barragan, S., Reid, G. (2019) Forty-five-year evolution of probiotic therapy. *Microb. Cell.* **6**, 184-196.
- Pum D., Sara M., Sleytr, U.B. (1989) Structure, surface charge, and self-assembly of the S-layer lattice from *Bacillus coagulans* E38-66. *J Bacteriol.* **171**(10), 5296–5303.
- Ruiz Rodríguez, L.G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E.M., Mozzi, F. (2019) Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina. *Front. Microbiol.* **10**(1091), 1-26.
- Sadiq, F.A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2019) Lactic Acid Bacteria as Antigungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **18**, 1403-1436.
- Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2019) Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 605-616.
- Sára, M. i Sleytr, U.B. (2000) S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 859–868.

Schuster B., Sleytr U.B. (2020) Nanotechnology with S-layer Proteins. U: Protein Nanotechnology. Methods in Molecular Biology, 2073. izd., (Gerrard J., Domigan L., ured.), Humana, New York, str. 195-218.

Servin A. L., Coconnier M. H. (2003) Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**(5), 741–754.

Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B. (2001) Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog. Surf. Sci.* **68**, 231–278.

Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M. i Pum, D. (2014) S-layers: Principles and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**(5), 823–864.

Sleytr, U.B., Pum, D, Schuster, B., Sára, M. (2001) Molecular nanotechnology and nanobiotechnology with two-dimensional protein crystals (S-layers). U: Nano-Surface Chemistry (Rosoff, M., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 333–389.

Struna (2020) Mikroaerofilne bakterije. Struna – Hrvatsko strukovno nazivlje, <<http://struna.ihjj.hr/naziv/mikroaerofilne-bakterije/17258/>>. Pristupljeno 10. travnja 2020.

Swetwivathana, A., Visessanguan, W. (2015) Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Sci.* **109**, 101-105.

Šmarda, J., Šmajš, S., Komrska, J., and Krzyžánek, V. (2002) S-layer on cell walls of cyanobacteria. *Micron.* **33**, 257–277.

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

Šuškovčić, J., Brkić, B. Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**(1), 57-73.

Šuškovčić, 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 Technol. Biotechnol.* **48** (3), 296-307.



- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.P., Ugarte, E., Munoz-Tamayo, R., Paslier, D.L., Nalin, R. i sur. (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* **11**, 2574–2584.
- Uroić, K., Beganović, J., Hynönen, U., Pietilä, T. E., 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.
- Uroić, K., Nikolić, M., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Lukić, J., ... Šušković, J. (2014) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh sort cheese and Serbian white pickled cheese. *Food Technol. Biotechnol.* **52**(2), 232–241.
- Van Pijkeren, J.-P., Barrangou, R. (2017) Genome Editing of Food-Grade Lactobacilli To Develop Therapeutic Probiotics. *Microbiol. Spectr.* **5**, 1-16.
- Wright, A. i Axelsson, L. (2012) Lactic Acid Bacteria: An Introduction. U: Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, 4. izd., (Lahtinen, S., Salminen, S., Ouwehand, A., Wright, A., ured.), CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, 1-17.
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C.T., Fang, J.Y. (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* **5**(241), 1-10.
- Yang, G., Liu, Z. Q., Yang, P. C. (2013) Treatment of allergic rhinitis with probiotics: an alternative approach. *N. Am. J. Med. Sci.* **5**(8), 465–468.
- Zacharof, M.P., Lovitt, R.W. (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review. *APCBEE Proc.* **2**, 50-56.
- Zielińska, D., Kolożyn-Krajewska, D. (2018) Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *BioMed Res. Int.* **2018**, 1–15.
- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G., Neves, A. R. (2017) Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**(1), S168–S200.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

L. Vučko

Ime i prezime studenta