

Specifična svojstva *Enterococcus faecium* sojeva iz mikrobioma fermentirane hrane

Jakopić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:922268>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ana Jakopić
0058216240**

**SPECIFIČNA SVOJSTVA *ENTEROCOCCUS FAECIUM*
SOJEVA IZ MIKROBIOMA FERMENTIRANE HRANE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Specifična svojstva *Enterococcus faecium* sojeva iz mikrobioma fermentirane hrane

Ana Jakopić, 0058216240

Sažetak:

Mikrobiota fermentirane hrane, kao značajni dio bakterijske populacije, sadrži bakterije mliječne kiseline (BMK) iz roda *Enterococcus* koji se istražuju kao starter kulture. Prilikom selekcije funkcionalnih starter kultura iz roda *Enterococcus* izazov je razlikovati komensalne od oportunističkih sojeva. Upravo, cilj ovog rada je procijeniti sigurnost primjene *Enterococcus faecium* sojeva za daljnja istraživanja primjene kao funkcionalnih starter kultura. Ustanovljeno je da analizirani *E. faecium* sojevi ne sintetiziraju enzim želatinazu i citolizin, te je ispitano svojstvo *E. faecium* sojeva da formiraju biofilm na abiotičkoj površini. Sposobnost formiranja biofilma na polistiren se razlikuje s obzirom na soj i ovisi o koncentraciji dostupnih nutrijenata. Analizirani *E. faecium* sojevi se mogu prirediti kao osušeni aktivni pripravci budući da su pokazali visok stupanj preživljavanja sušenja liofilizacijom. Sojevi *E. faecium* A7 i ZG 3-16 sadrže gen za enterocin A. *E. faecium* ZG 5-20 i ZG 7-10 sadrže i gen za enterocin B koji ima sinergističko djelovanje s enterocinom A, što proširuje spektar antimikrobnog djelovanja i potencijal primjene kao biokonzervansa. Iz rezultata proizlazi da se analizirani *E. faecium* sojevi mogu odabrati za daljnja istraživanja primjene kao funkcionalne starter kulture.

Ključne riječi: *Enterococcus faecium*, starter kulture, mikrobiota hrane, sigurnost primjene, biofilm

Rad sadrži: 32 stranice, 6 slika, 10 tablica, 43 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac

Datum obrane: srpanj, 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Specific properties of *Enterococcus faecium* strains from the microbiome of fermented foods

Ana Jakopić, 0058216240

Abstract:

The microbiome of fermented foods is characterised by the high abundance of lactic acid bacteria (LAB) from the *Enterococcus* genus. During the screening of the *Enterococcus* as functional starter cultures, the challenge is to distinguish commensal from opportunistic strains. The aim of this work is to assess the safety of the use of *Enterococcus* strains from food microbiome for further research on their use as functional starter cultures. The analyzed strains of *Enterococcus faecium* do not synthesize gelatinase and cytolysin. The ability of *E. faecium* strains to form biofilm was also determined. The ability to form a biofilm varied depending on the tested strain and available nutrients. *E. faecium* strains can be prepared as freeze-dried preparations since they survived the lyophilisation at high bacterial counts. *E. faecium* A7 and ZG 3-16 strains contain the gene for enterocin A. *E. faecium* ZG 5-20 and ZG 7-10, in addition to *entA* also contain also *entB* which has a synergistic effect with enterocin A which expands the spectrum of antimicrobial action and their importance as bioconservans. The obtained results suggest that the analysed *E. faecium* strains can be selected for further research on their application as functional starter cultures.

Keywords: *Enterococcus faecium*, starter cultures, food microbiome, safety, biofilm

Thesis contains: 32 pages, 6 figures, 10 tables, 43 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Jasna Novak, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD

Thesis defended: July, 2022.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1.	BAKTERIJE IZ RODA <i>ENTEROCOCCUS</i>	2
2.2.	<i>ENTEROCOCCUS</i> SOJEVI – OPORTUNISTIČKI PATOGENI ILI KOMENSALNE BAKTERIJE.....	3
2.3.	<i>ENTEROCOCCUS</i> SOJEVI KAO PROBIOTIČKE BAKTERIJE.....	5
2.4.	<i>ENTEROCOCCUS</i> SOJEVI U HRANI	6
2.5.	ENTEROCINI.....	7
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1.	MATERIJALI.....	9
3.1.1.	RADNI MIKROORGANIZMI	9
3.1.2.	HRANJIVE PODLOGE	9
3.1.3.	KEMIKALIJE	10
3.1.4.	APARATURA I PRIBOR.....	10
3.2.	METODE	12
3.2.1.	ODRŽAVANJE I ČUVANJE MIKROORGANIZAMA	12
3.2.2.	ŽELATINA HIDROLIZIRAJUĆI TEST.....	12
3.2.3.	FORMIRANJE BIOFILMA NA POLISTIRENU	12
3.2.4.	LIOFILIZACIJA.....	13
3.2.5.	IZOLACIJA DNA	13
3.2.6.	PCR REAKCIJA.....	14
3.2.7.	GEL ELEKTROFOREZA	14
3.2.8.	STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA	15
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	16
5.	ZAKLJUČCI	26
6.	POPIS LITERATURE.....	27

1. UVOD

Bakterije iz roda *Enterococcus* su Gram-pozitivne, fakultativno anaerobne, nesporogene bakterije mliječne kiseline (Graham i sur., 2020). Ovalne su morfologije, a mogu formirati kratke lance i parove ili se pojavljuju kao pojedinačne stanice (Murray, 1990). Rastu u rasponu temperatura od 10 °C do 45 °C i preživljavaju tijekom 30 minuta pri temperaturi od 60 °C. Optimalna temperatura rasta većine *Enterococcus* sojeva je pri 37 °C (Devriese i Pot, 1995). *Enterococcus* sojevi uglavnom nisu pokretni, kemoorganotrofni su, imaju fermentativni metabolizam te su većinom katalaza negativni, dok pojedini sojevi proizvode pseudokatalazu (Devriese i Pot, 1995). Bakterije iz roda *Enterococcus* dio su bakterijske populacije intestinalne mikrobiote, a mogu biti prisutne u mikrobioti usne šupljine i urogenitalnog trakta. *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* su vrste koje su najčešće izolirane iz ljudi (Krawczyk i sur., 2021).

E. faecalis i *E. faecium* mogu rasti u širokom rasponu pH (4,6-9,9), pri čemu je rast pri pH 7,5 optimalan. Također rastu u prisutnosti 40 % (w/v) žučnih soli. *E. faecalis* može rasti u 6,5 % NaCl i ima kationsku homeostazu za koju se smatra da doprinosi otpornosti na pH, sol, metale i isušivanje (Fisher i Phillips, 2009).

Ispituje se i primjena pojedinih *Enterococcus* sojeva kao probiotika i starter kultura za fermentaciju sireva i mesa. Pojedini sojevi mogu biti patogeni ili kontaminanti koji uzrokuju kvarenje hrane (Graham i sur., 2020). U novije vrijeme identificirani su *Enterococcus* sojevi kao oportunistički patogeni, što proizlazi iz povećanja antibiotske rezistencije kao i otkrića virulentnih determinanti u nekim vrstama (Chajacka-Wierzchowska i sur., 2017). Stoga je presudno kod probira korisnih sojeva *Enterococcus* roda precizno definirati sojeve koji su potencijalni patogeni, te ih isključiti iz daljnje analize.

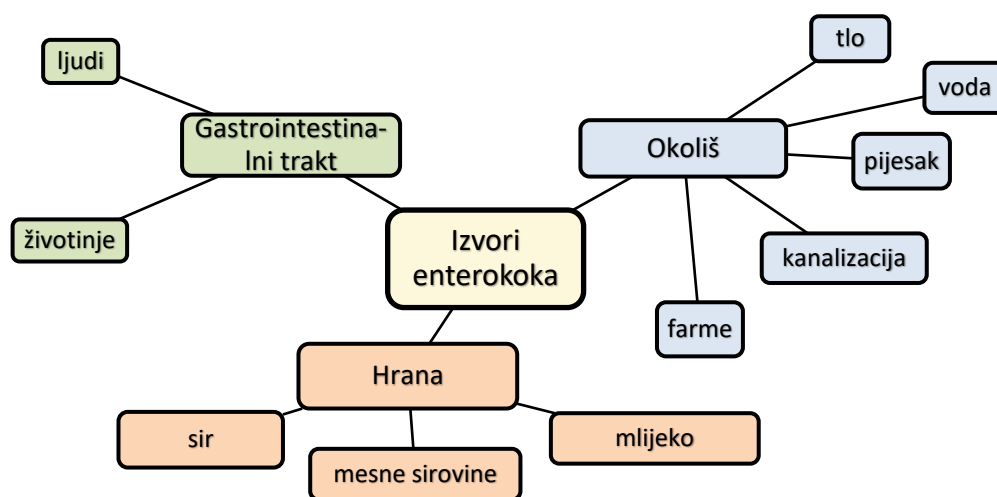
Cilj ovog rada je ispitati sigurnost primjene pojedinih sojeva mikrobne populacije *Enterococcus faecium* iz mikrobioma hrane kako bi se definiralo jesu li odabrani sojevi kandidati za daljnja istraživanja primjene za biotehnošku proizvodnju kao funkcionalne starter kulture ili probiotički sojevi. S obzirom da je sinteza bakteriocina značajna s aspekta primjene funkcionalnih starter kultura kao biokonzervansa, dodatni cilj je analizirati prisutnost gena koji kodiraju za enterocine, te s aspekta dugotrajnog čuvanja kultura mikroorganizama *E. faecium* provjeriti prihvatljivost liofilizacije kao metode izbora za pripremu suhih aktivnih pripravaka bakterijskih stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE IZ RODA *ENTEROCOCCUS*

Bakterije iz roda *Enterococcus* pripadaju porodici *Enterococcaceae* i prirodno su prisutni u mikrobioti čovjeka, a koloniziraju gastrointestinalni trakt, oralnu šupljinu i urogenitalni trakt (Murray, 1990). Prvotno su se bakterije iz roda *Enterococcus* smatrale pripadnicima roda *Streptococcus* fekalnog podrijetla, no 16S rRNA analizom genoma ustanovljen je novi rod bakterija mliječne kiseline, *Enterococcus* (Hardie i Whiley, 1997). Trenutno se, prema taksonomiji, u rod *Enterococcus* ubraja 58 sojeva (Graham i sur., 2020). U genomu sadrže nizak udio GC parova baza, i to između 34 % do 45 %, a veličina genoma iznosi od 2,3 Mb do 5,4 Mb (García-Solache i Rice, 2019).

Pretpostavlja se da su primarna staništa bakterija iz roda *Enterococcus* crijeva toplokrvnih životinja i da se potom uvode u sekundarne izvore ispuštanjem iz gastrointestinalnog trakta (Byappanahalli i sur., 2012). *Enterococcus* sojevi izolirani su iz niza okolišnih izvora kao što su zemlja, pijesak, vegetacija, slatka i površinska voda te kanalizacija (slika 1) (Graham i sur., 2020).



Slika 1. Uobičajeni izvori enterokoka (prema Graham i sur., 2020)

Neki *Enterococcus* sojevi su komensalni, stimuliraju imunološki sustav i imaju znatan utjecaj na održavanje intestinalne homeostaze pa se primjenjuju kao probiotici i starter kulture, ali mogu se ponašati i kao patogeni koji su odgovorni za kontaminaciju hrane, a budući da su virulentni i rezistentni na mnoge lijekove, predstavljaju epidemiju prijetnju u bolničkom okruženju (Krawczyk i sur., 2021). Bakterije *Enterococcus* roda su otporne na razne

antibiotike, uključujući cefalosporine, sulfonamide, polusintetske peniciline i β -laktamske antibiotike. *E. faecalis* je otporan i na streptogramine, dok ostali sojevi pokazuju nisku razinu rezistencije na aminoglikozide i vankomicin (Graham i sur., 2020). Geni *vanA* i *vanB* koji se smatraju najvažnijim kod stjecanja otpornosti na vankomicin i najčešće se opažaju kod *E. faecalis* i *E. faecium* mogu se prenositi horizontalno i vertikalno (Graham i sur., 2020).

Enterococcus sojevi kao što su *E. faecium* M-74 i *E. durans* KLDS posjeduju sposobnost snižavanja razine kolesterola tako što proizvode hidrolazu koja katalizira proces dekonjugacije žučne kiseline i pomaže pri ugradnji kolesterola u staničnu stijenu bakterije ili pomaže u precipitaciji ako je okolina kisela (Krawczyk i sur., 2021).

Bakterije roda *Enterococcus* mogu uzrokovati kvarenje hrane, a proizvode i termostabilne amine kao što su tiramin, histamin, feniletilalanin, kadaverin i putrescin koji mogu uzrokovati alergijske reakcije ili trovanje (Krawczyk i sur., 2021).

2.2. ENTEROCOCCUS SOJEVI – OPORTUNISTIČKI PATOGENI ILI KOMENSALNE BAKTERIJE

Enterococcus sojevi kao komensalne bakterije sudjeluju u metabolizmu hranjivih tvari (ugljikohidrata, lipida i proteina) kako bi održali pH okoliša u kojem žive, sintetiziraju metabolite koji su važni za normalno funkcioniranje, sprječavaju vezanje i širenje truležnih bakterija te imaju utjecaj na ljudski imunski sustav tj. humoralni i stanični imunitet (Wan i sur., 2015). Budući da su prisutni u značajnom broju u mikrobioti čovjeka, moguće je da imaju znatnu ulogu u probavnom traktu (Krawczyk i sur., 2021). Bakterije iz roda *Enterococcus* zajedno sa bakterijama iz roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* te *E. coli* koloniziraju probavni trakt većine zdrave dojenčadi prvih 7-10 dana nakon rođenja (Ružičkova i sur., 2020; Gewolb i sur., 1999). Razne vrste enterokoka stječu se i u odrasloj dobi unošenjem hrane kao što su svinjetina, perad i sirevi (Krawczyk i sur., 2021).

Bakterije iz roda *Enterococcus* su oportunistički patogeni koji izvan svojih uobičajenih komensalnih staništa mogu biti uzrok raznih infekcija kao što su infekcija urinarnog trakta, sepsa i endokarditis pri čemu su dojenčad i osobe s dijabetesom osobito u riziku (Krawczyk i sur., 2021), a morbiditet zdravih osoba uzrokovan infekcijom enterokokom je nizak (Graham i sur., 2020). Iako su se bakterije iz roda *Enterococcus* koristile stoljećima budući da se *Enterococcus* sojevi nisu smatrali izrazito virulentnim, u novije vrijeme su se istaknule kao jedan od glavnih uzročnika bolničkih infekcija u cijelom svijetu (Ogier i Serror, 2008). *Enterococcus* sojevi odgovorni za ove infekcije su često rezistentni na mnoge antibiotike te su

postali poznati po svojoj sposobnosti stjecanja i širenja rezistencije na antibiotike (McBride i sur., 2007).

Desetak je sojeva *Enterococcus* identificiranih u uzorcima inficiranih ljudi, a među njima dominiraju *E. faecalis* (80-90 %) i *E. faecium* (5-15 %) koji se često povezuju sa vrlo ozbiljnim komplikacijama i bolničkim infekcijama (Guzman i sur., 2016). *E. faecalis* i *E. faecium* potencijalni su patogeni zbog svoje sposobnosti prilagođavanja i opstanka u novim okolišnim uvjetima, a djeluju na način da prolaze kroz intaktni epitel sluznice i ulaze u tkiva domaćina te se zatim prenose u mezenterični limfni čvor otkuda ulaze u krvožilni sustav (Krawczyk i sur., 2021).

Enterococcus sojevi sadrže čimbenike virulencije kao što su enterokokni polisaharidi, agregacijske supstancije i slično (Tablica 1.) koji pogoduju kolonizaciji i agregaciji u ekstracelularni matriks, dok gen *gelE* pospješuje migraciju bakterija (Krawczyk i sur., 2021).

Tablica 1. Faktori virulencije bakterija iz roda *Enterococcus* (prema Graham i sur., 2020)

Enterokokni faktori virulencije	Geni	Pretpostavljena uloga	Izvor
Agregacijska supstancija	<i>agg</i>	Prianjanje na stanice domaćina, stanična agregacija i konjugacija	Chajecka-Wierzchowska i sur. (2017)
Enterokokalni površinski protein	<i>esp</i>	Adhezija i kolonizacija	Koort i sur. (2004)
Endokarditis specifičan antigen	<i>efaA_{fs}</i> , <i>efaA_{fm}</i>	Adhezin stanične stijenke izražen u serumu	Chajecka-Wierzchowska i sur. (2017)
Citolizin	<i>cylR₁</i> , <i>cylR₂</i> , <i>cylL_L</i> , <i>cylL_S</i> , <i>cylM</i> , <i>cylB</i> , <i>cylA</i> , <i>cylI</i>	Hemolitička aktivnost, liza stanica	Eaton i Gasson (2001); Van Tyne i sur. (2013)
Želatinaza	<i>gelE</i>	Hidrolizira želatinu, kolagen, hemoglobin i kazein	Chajecka-Wierzchowska i sur. (2017); Gutiez i sur. (2014)

Tablica 1. Faktori virulencije bakterija iz roda *Enterococcus* (prema Graham i sur., 2020) - nastavak

Hijaluronidaza	<i>hyl</i>	Sudjeluje u	
		uništavanju mukopolisaharida vezivnog tkiva i hrskavice	Chajecka-Wierzchowska i sur. (2017)
Spolni feromoni	<i>cob, cad, ccf, cpd</i>	Olakšati	
		konjugaciju, kemotaktično za ljudske neutrofile	Bhardwaj i sur. (2008)

Faktori virulencije otkriveni su kako u kliničkim sojevima tako i u sojevima izoliranim iz hrane, no u njima se geni za želatinazu, hijaluronidazu i citolizin detektiraju puno rjeđe (Krawczyk i sur., 2021).

Smatra se da želatinaza, najčešće pronađena u *E. faecalis*, ima ulogu u virulenciji i povećanju patogenosti u mišjem modelu (Chajecka-Wierzchowska i sur. 2017), no nije dokazano da je sam *gelE* izravno odgovoran za infekciju (Graham i sur., 2020).

2.3. *ENTEROCOCCUS* SOJEVI KAO PROBIOTIČKE BAKTERIJE

Probiotici su živi mikroorganizmi identificirani na razini soja koji, kada se primjenjuju u odgovarajućoj količini, imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina (Gibson i sur., 2017). Bakterije iz roda *Enterococcus* se, budući da prirodno nastanjuju ljudski i životinjski gastrointestinalni trakt te u njemu doprinose probavi, razmatraju za potencijalnu primjenu kao probiotici (Bhardwaj i sur., 2008). Nekolicina *Enterococcus* sojeva, među kojima dominiraju *E. faecalis* i *E. faecium*, sintetizira enterocine što je jedna od poželjnih karakteristika pri odabiru probiotičkih sojeva budući da djeluju protiv Gram-pozitivnih patogena koji se prenose hranom, kao što je *Listeria monocytogenes* (Hanchi i sur., 2018). Primjena *Enterococcus* sojeva u liječenju bolesti kao što su kronične i ponavljajuće infekcije gornjih dišnih puteva, lezije kože ili kronične bolesti povezane sa sinusima prvi put je opisana 1950-ih, dok je prva probiotička terapija koja je podrazumijevala primjenu *E. faecalis* nakon antibiotske terapije opisana 1955. (Krawczyk i sur., 2021). Bakterije iz roda *Enterococcus* nemaju GRAS status budući da nedostaje informacija o sigurnoj primjeni, stoga se samo nekolicina sojeva, koji su dokazano

sigurni za primjenu, koristi u liječenju raznih bolesti u ljudi i životinja (Hanchi i sur., 2018). Probiotički sojevi *Enterococcus* roda obično nisu dio starter ili pomoćnih kultura, već se koriste kao dodaci prehrani u obliku farmaceutskih proizvoda (Graham i sur., 2020). Probiotički enterokoki primijenjeni su u ljudi u liječenju sindroma iritabilnog crijeva i dijareje uz opažanje hipokolesterolemijских i imunostimulirajućih učinaka, a u životinja kao što su svinje, goveda i perad primijenjeni su za kompetitivnu ekskluziju gastrointestinalnih patogena te za imunostimulaciju (Graham i sur., 2020). Trenutno se probiotički pripravci koji sadrže *E. faecalis*, a ponekad i *E. coli* i bakterije iz roda *Lactobacillus* preporučuju u liječenju infekcije urinarnog trakta, sinusitisa, bronhitisa te obične prehlade (Krawczyk i sur., 2021).

E. faecalis (DSM 16431), koji se prodaje kao preparat Symbioflor 1 (SymbioPharm, Herborn, Njemačka) i preporučuje se kod akutnog i ponavljajućeg bronhitisa i sinusitisa, ne posjeduje nikakve patogene značajke kao ni gene za rezistenciju na antibiotike (Krawczyk i sur., 2021). Ne sadrži citolizin, želatinazu, hijaluronidazu ni površinske proteine enterokoka. Navedeni enterokokalni faktori virulencije se koriste kao markeri u procjeni smiju li se sojevi koristiti u probioticima ili prehrambenim proizvodima (Domann i sur., 2007). Symbioflor 1 se koristi i za prevenciju i terapiju dijareje u svinja, peradi i kućnih ljubimaca (Franz i sur., 2011). *Enterococcus* sojevi se kao zamjena za antibiotike koriste i kao dodatak krmivima (Araújo i Ferreira, 2013). Nekolicina sojeva *Enterococcus* roda pokazuje antikancerogeno i hipokolesterolemijско djelovanje kao i sposobnost regulacije imunološkog sustava (Hanchi i sur., 2018).

Probiotički sojevi *Enterococcus* roda mogu degradirati proteine do peptida i aminokiselina, razgraditi citrate i proizvesti aromatske supstancije s lipolitičkim i proteolitičkim svojstvima, a zahvaljujući svojim sposobnostima da provode proteolizu, lipolizu i metabolizam citrata i piruvata koriste se kao starter kulture u mliječnim proizvodima (Giraffa, 2003; Giraffa, 2002).

Uz *E. faecalis*, kao probiotici se koriste *E. lactis*, *E. hirae*, *E. durans*, i *E. faecium* (Krawczyk i sur., 2021). Iako je *E. faecium* među sojevima koji se mogu primjenjivati kao probiotici, njegove brojne varijante poznate su po tome što sadrže određene faktore virulencije, među kojima su i geni za rezistenciju na antibiotike (Araújo i Ferreira, 2013).

2.4. ENTEROCOCCUS SOJEVI U HRANI

Prisutnost bakterija iz roda *Enterococcus* u hrani, osobito onoj animalnog podrijetla, povezuje se sa njihovom prisutnošću u gastrointestinalnom traktu, pri čemu izolacija *E. faecalis* i *E. faecium* iz hrane ukazuje na lošu higijenu i primarnu kontaminaciju fecesom (Graham i

sur., 2020.). Moguće je i da se bakterije prenose u hranu indirektno putem kontaminirane vode ili s površine životinje, što ukazuje na to da njihova prisutnost u hrani možda nije povezana s fekalnom kontaminacijom te se kao rezultat njihove sveprisutne pojave mogu smatrati normalnim komponentama mikrobiote hrane životinjskog podrijetla (Giraffa, 2003; Giraffa, 2002).

Bakterije iz roda *Enterococcus* prisutne su i u hrani biljnog podrijetla kao što su voće i povrće, no izvor u njima još nije jasno definiran, dok se njihova prisutnost kao i primjena u mlijeku i mliječnim proizvodima često spominje (Graham i sur., 2020).

Unatoč tome što se neki *Enterococcus* sojevi smatraju oportunističkim patogenima, imaju dugu povijest sigurne upotrebe u hrani te neporecive prednosti koje su povezane s njihovom upotrebom i to osobito u mlijeku i mliječnim proizvodima (Graham i sur., 2020). Bakterije iz roda *Enterococcus* pronađene su u neobrađenom mlijeku, siru i mesu kao i u biljnim proizvodima te se njihova prisutnost u određenim namirnicama smatra poželjnom (Krawczyk i sur., 2021). Rod *Enterococcus* uključuje širok raspon sojeva pogodnih za upotrebu kao starter kultura u kojima pozitivno utječu na razvoj organoleptičkih svojstava fermentirane hrane, uključujući meso, mliječne i biljne proizvode (Franz i sur., 2011). Primjenjuju se uglavnom u proizvodnji hrane u mediteranskim zemljama pri čemu poboljšavaju aromu, teksturu i okus fermentiranih mliječnih proizvoda (Krawczyk i sur., 2021). *Enterococcus* sojevi imaju slabu proteolitičku aktivnost i moć zakiseljavanja pa se zbog toga smatraju manje važnim kao primarne starter kulture u mliječnim fermentacijama kao što je proizvodnja sira, a korisnije je kada se koriste kao pomoćne kulture za druge svrhe osim stvaranja kiseline, što je glavna odgovornost starter kultura (Giraffa 2003). *Enterococcus* sojevi proizvode acetaldehid, acetoin, diacetil, 2,3-butandiol i enterocine čime inhibiraju proliferaciju truležnih bakterija te se stoga mogu koristiti kao konzervansi (Krawczyk i sur., 2021). Budući da su otporni na tretmane toplinom kao što su kuhanje, pasterizacija i fermentacija, mogu se koristiti kao higijenski indikatori u proizvodnji hrane (Krawczyk i sur., 2021).

2.5. ENTEROCINI

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani, ekstracelularni peptidi s antibakterijskim djelovanjem obično protiv bliskih sojeva (De Vuyst i Vandamme 1994). Bakteriocini inhibiraju rast ciljnih mikroorganizama različitim mehanizmima koji se mogu generalno podijeliti na mehanizme koji primarno djeluju na staničnu ovojnici i mehanizme koji primarno djeluju u stanici koja utječe na ekspresiju gena i proizvodnju proteina (Negash i Tsehai, 2020).

Bakteriocini Gram-pozitivnih bakterija dijele se u četiri klase. U bakteriocine I klase ubrajaju se lantibiotici, u bakteriocine II klase mali toplinski stabilni nelantibiotici, kojima pripadaju i enterocini, u bakteriocine III klase veliki termolabilni nelantibiotici, a u klasu IV ciklički peptidi (Kos, 2022). Interakcija pozitivno nabijenih aminokiselina bakteriocina II klase i negativno nabijene fosfolipidne molekule na staničnoj membrani presudna je za baktericidno djelovanje bakteriocina (Zhang i sur., 2022).

Brojne bakterije iz roda *Enterococcus*, a većinom *E. faecalis* i *E. faecium*, proizvode bakteriocine, tj. enterocine. To uključuje enterocine A, B, P, ON-157 koje proizvodi *E. faecium* i L50 koje proizvodi *E. faecalis* (Wassenaar i sur., 2017). Oni posjeduju široko antimikrobno djelovanje, inhibirajući razmnožavanje bakterija kao što su *Staphylococcus spp.*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp.*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Vibrio cholera* (Krawczyk i sur., 2021). *E. faecalis* KT11, izoliran iz sira Kargı Tulum, proizvodi bakteriocin s antimikrobnim djelovanjem prema Gram-pozitivnim *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis* i Gram-negativnim *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* i *E. aerogenes* bakterijama i inhibira rast bakterija rezistentnih na meticilin i/ili vankomicin (Abanoz i Kunduhoglu, 2018).

Enterocini A i B su bakteriocini koji djeluju sinergistički i imaju samostalan obrazac djelovanja protiv raznih bakterija (Khan i sur., 2010). Enterocini se kao dodaci koriste u mliječnim proizvodima, mesu, ribi i proizvodima biljnog podrijetla, a trenutno se razmatraju za terapiju kožnih infekcija i bolesti gastrointestinalnog trakta uzrokovanih patogenima koji su rezistentni na brojne lijekove (Krawczyk i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Enterococcus faecium bakterije izolirane iz mikrobiote sira koje su korištene u ovom radu prikazane su u Tablici 2. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 2. Sojevi *E. faecium* korišteni za izradu ovog rada

BAKTERIJSKI SOJ	OZNAKA SOJA
<i>Enterococcus faecium</i>	L3
<i>Enterococcus faecium</i>	A7
<i>Enterococcus faecium</i>	ZG 3-16
<i>Enterococcus faecium</i>	ZG 5-20
<i>Enterococcus faecium</i>	ZG 7-10
<i>Enterococcus faecium</i>	BGGO 5-36
<i>Enterococcus faecium</i>	BGAL 2-53
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 9430

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

- a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline
 - MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
 - MRS bujon istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) podloga za želatina hidrolizirajući test

- sastav (g/L destilirane vode): pepton 5,0; kvašćev ekstrakt 3,0; želatina 120,0; pH vrijednost podloge iznosi 6,8, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta

c) Columbia krvni agar

- sastav (g/L destilirane vode): peptokompleks 10,0; triptozna 10,0; pepton 3,0; kukuruzni škrob 1,0; natrijev klorid 5,0; agar 12,0, te (mL/L destilirane vode): defibrinirane ovčje krvi 50,0. pH vrijednost podloge iznosi 7,3

3.1.3. Kemikalije

- obrano mlijeko u prahu „Sigma-Aldrich“, Švicarska
- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol 96%, „Kemika“, Hrvatska
- agaroza, „Invitrogen“, SAD
- 50x TAE pufer, „Bio-Rad“, Njemačka
- kristal violet, PBF, Hrvatska
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- početnice, „Invitrogen“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- početnice, „Invitrogen“, SAD
- GoTaq G2 Hot Start polimeraza, „Promega“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix, „Takara Bio.“, Japan
- Diamond Nucleic Acid Dye, „Promega“, SAD

3.1.4. Aparatura i pribor

- automatske pipete (1000, 200, 20 i 2,5 μ l), „Eppendorf“, SAD

- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vortex V1 plus, „Biosan“, Latvija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete, „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice „Golias“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- centrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- zamrzivač (-80°C) CryoCube F101h, „Eppendorf“, SAD
- Erlemeyerove tikvice, „Technische Glaswerke Ilmenau“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- plastične tubice od 1,5 i 2 ml, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- kivete za centrifugiranje 15 mL, „Falcon“, Engleska
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za tubice, „neoLab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, Engleska
- mikrobiološke ušice, „Syntesys“, Italija
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- kit za izolaciju DNA, „Promega“, SAD
- ABI 2720 PCR uređaj, „Applied Biosystems“, SAD

- Uvidoc HD6, „Uvitec“, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. 24 sata prije eksperimenta *E. faecium* sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u anaerobnim uvjetima.

3.2.2. Test hidrolize želatine

Prekonoćne kulture *E. faecium* sojeva se inokuliraju na želatinoznu podlogu te se inkubiraju 48 h pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon 48 h provodi se inkubacija u ledu 15-30 min. Kao pozitivna kontrola korišteni su *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*.

3.2.3. Proizvodnja citolizina

10 μL prekonoćne kulture sojeva *E. faecium* se inokulira u četiri paralele na Columbia krvni agar. Slijedi inkubacija 24 h pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ako su nakon inkubacije vidljive prozirne zone oko bakterijskih kolonija radi se o β -hemolizi, ako su vidljive zelene zone radi se o α -hemolizi, a ako nema zona oko bakterijskih kolonija pretpostavlja se da nema hemolitičke aktivnosti.

3.2.4. Analiza formiranja biofilma na polistirenu

Prekonoćne kulture sojeva *E. faecium* se razrijede u omjeru 1:10 i 1:100 te se po 200 μL suspenzije nanese na sterilnu mikrotitarsku ploču. Ploča se inkubira 14 h pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po završetku inkubacije plitice se isprazne, a ploča se suši naopako 15 minuta. Sadržaj u pliticama se potom oboji sa 100 μL 1 % (m/v) kristal violet bojom koju je potrebno držati 15 minuta. Boja se ispiri s 200 μL 70 % (v/v) etanola, a zatim se u mikropliticama pomoću čitača mikrotitarskih ploča mjeri OD_{620} . Sposobnost formiranja biofilma određuje se na sljedeći način, prema Extremina i sur. (2011):

$$\text{OD} < \text{ODc} \rightarrow \text{ne tvori biofilm}$$

$$\text{ODc} < \text{OD} < 2 * \text{ODc} \rightarrow \text{slabo stvara biofilm}$$

$$2 * \text{ODc} < \text{OD} < 4 * \text{ODc} \rightarrow \text{dobro stvara biofilm}$$

$$4 * \text{ODc} < \text{OD} \rightarrow \text{izrazito dobro stvara biofilm}$$

ODc se računa prema formuli:

$$ODc = ODnc + 3 * SDnc$$

pri čemu je OD srednja vrijednost OD₆₂₀ za određeni soj, ODnc srednja vrijednost OD₆₂₀ negativne kontrole te SDnc standardna devijacija negativne kontrole. Kao negativna kontrola korištena je neinokulirana MRS podloga.

3.2.5. Liofilizacija bakterijskih stanica

10 mL prekonoćne kulture bakterija se centrifugira na 4200 o/min tijekom 10 minuta te se odlije supernatant. Talog se ispere sa 2 mL fiziološke otopine te se ponovno centrifugira pri istim uvjetima, nakon čega se odlije supernatant, a stanice se resuspendiraju u 1 mL 10 % obranog mlijeka. Uzorcima se neizravnom metodom odredi početni broj stanica tako da se 100 µL uzorka razrijedi sa 900 µL fiziološke otopine te se prirede daljnja decimalna razrjeđenja. Preostalih 900 µL uzorka se prebaci u penicilinku i smrzne na -80 °C preko noći. Smrznuti uzorci se u penicilinkama unose u liofilizator. Po završetku liofilizacije uzorci se resuspendiraju u 900 µL fiziološke otopine te se odredi konačan broj stanica na prethodno opisan način.

3.2.6. Izolacija DNA

Izolacija DNA provodi se pomoću Promega Genomic Wizard kita. 5 mL prekonoćne kulture sojeva *E. faecium* se prebaci u kivete za centrifugiranje te se centrifugira na 4200 o/min i ukloni se supernatant. Talog se resuspendira s 480 µL 50 mM EDTA, a zatim se doda 120 µL 10 mg/mL otopine lizozima. Suspenzije se inkubiraju 30-60 minuta u vodenoj kupelji pri 37 °C. Potom se uzorci centrifugiraju na 14000 g tijekom 2 minute. Supernatant se uklanja, a talog se resuspendira sa 600 µL otopine za liziranje jezgre. Slijedi inkubacija u vodenoj kupelji 5 minuta pri 80 °C. U uzorke ohlađene na sobnu temperaturu se dodaje 3 µL otopine RNAze te se potom uzorci inkubiraju pri 37 °C 15-60 minuta. Staničnom lizatu se dodaje 200 µL otopine za taloženje proteina te se vorteksira 20 sekundi. Uzorci se inkubiraju na ledu 5 minuta, a zatim se centrifugiraju 3 min na 14000 g. Supernatant se prebacuje u mikroeprevetu sa 600 µL izopropanola te se lagano izmiješa. Potom se centrifugira 2 min na 14000 g, supernatant se odlije i doda 600 µL 70 % etanola. Ponovno se centrifugira 2 min na 14000 g, etanol se ukloni, a mikroepreveta osuši na zraku. U mikroeprevetu se doda 100 µL otopine za rehidraciju DNA. DNA se rehidrira inkubacijom preko noći na sobnoj temperaturi. Koncentracija DNA se mjeri na BiospecNano uređaju, a uzorci se mogu čuvati pri 2-8 °C.

3.2.7. PCR reakcija za detekciju enterocina

PCR reakcijska smjesa se priprema tako da se u mikropruvetu stavi 11,4 μL deionizirane vode, 12,5 μL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix otopine i 1 μL DNA uzorka te se dodaje po 0,05 μL primera EntA F i EntA R, tj. EntB F i EntB R. Slijepa proba sadrži sve prethodno navedene komponente bez DNA uzorka. Kao negativna kontrola korišten je *Lactobacillus plantarum*. PCR programi se razlikuju za enterocine A i B, a prikazani su u Tablici 3. i Tablici 4.

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije za umnažanje *entA*

BROJ PONAVLJANJA	T (°C)	VRIJEME
1	95	5 min
30	95	30 s
	58	30 s
	72	30 s
1	72	5 min

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije za umnažanje *entB*

BROJ PONAVLJANJA	T (°C)	VRIJEME
1	95	5 min
30	95	30 s
	56	30 s
	72	30 s
1	72	5 min

3.2.8. DNA gel elektroforeza

DNA gel elektroforeza se provodi u agaroznom gelu. Gel se pripremi tako da se u 100 ml TAE pufera (1x) doda 1 g agaroze te se otapa u mikrovalnoj dok se otopina ne izbistri. Potom se otopina ulije u kalup za gel sa umetnutim češljčićima. Nakon što gel postane čvrst, prenese se u kadicu za elektroforezu, češljčić se ukloni te se ulije TAE (1x) pufer tako da prekrije cijeli gel. TAE (1x) pufer se priprema u tikvici od 1 L u koju se doda 20 mL TAE pufera (50x) i nadopuni

destiliranom vodom do oznake. PCR produkti (17 μ L) i standardi (2,75 μ L) se nanese u jašice, a kadica se priključi na struju i namjesti na 100 mA ili oko 200 V. Kada uzorci prođu polovicu gela, elektroforeza se zaustavlja, a gel se prebacuje u otopinu za bojanje. Gel se zatim snima na UV transiluminatoru pri 254 nm.

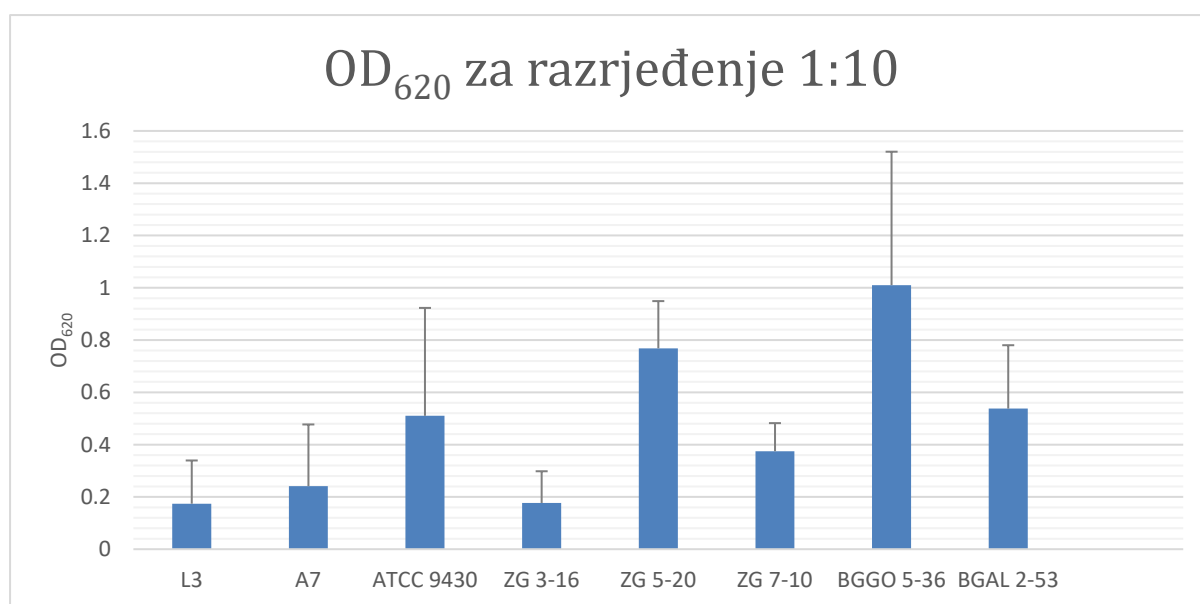
3.2.9. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka provedena je koristeći Excel. Formiranje biofilma na polistirenu, liofilizacija i želatina hidrolizirajući test ponovljeni su tri puta. Za formiranje biofilma određene su srednje vrijednosti i standardna devijacija OD₆₂₀, a za liofilizaciju su određene srednje vrijednosti i standardna devijacija CFU/ml te log(CFU/ml).

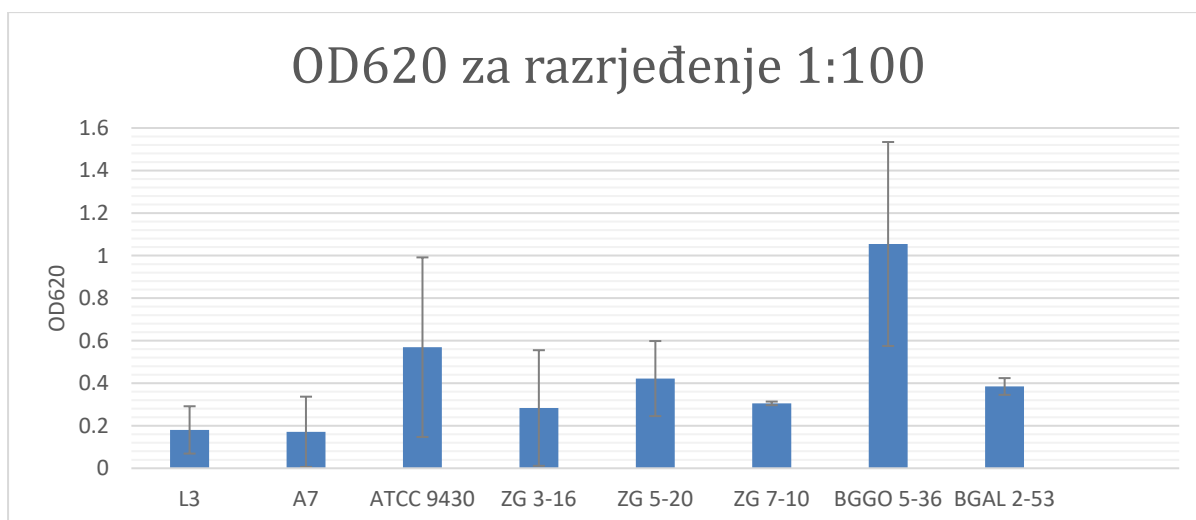
4. REZULTATI I RASPRAVA

Starter kultura definira se kao pripravak živih mikroorganizama koji se primjenjuje u fermentaciji, u cilju proizvodnje fermentiranog proizvoda s kontroliranim fermentacijskim procesom (Medina-Pradasi sur., 2017). Tradicionalni izbor bakterija mliječne kiseline kao starter kultura temelji se na mnogim tehnološkim kriterijima uključujući brzu potrošnju šećera, brzinu zakiseljavanja, homofermentativni metabolizam, pH, otpornost na bakteriofage i proizvodnju bakteriocina (Medina-Pradasi sur., 2017). Probiotici kao dodaci prehrani većinom su namijenjeni za oralnu primjenu, a da bi se neki soj mogao smatrati probiotikom, mora u dovoljnom broju preživjeti sve nepovoljne uvjete u gastrointestinalnom traktu (Naissinger da Silva i sur., 2021).

Prianjanje i proizvodnja biofilma *E. faecalis* i *E. faecium* sojeva dokazani su na različitim materijalima te se utvrdilo da se ovi sojevi vežu na razne medicinske uređaje kao što su intravaskularni i urinalni kateteri, stentovi i silikonski uređaji za gastrostomiju, što je povezano sa njihovom sposobnošću stvaranja biofilma (Mohamed i Huang, 2007). Formiranje biofilma probiotičkih bakterija može imati i prednosti, primjerice prilikom prekrivanja epitelnih receptora biofilm sprječava kolonizaciju drugih nepoželjnih bakterija (Cebrián i sur., 2012). U ovom radu ispitano je svojstvo bakterijskih stanica *E. faecium* da se adheziraju na jažice mikrotitarske ploče od polistirena. Rezultati formiranja biofilma na polistirenu obrađeni su na način opisan prema Extremina i sur. (2011) i prikazani su na slici 2a i 2b.



Slika 2a. Sposobnost formiranja biofilma na polistirenu sojeva *E. faecium* (razrjeđenje 1:10)



Slika 2b. Sposobnost formiranja biofilma na polistirenu sojeva *E. faecium* (razrjeđenje 1:100)

Karakterizacija sojeva s obzirom na svojstvo formiranja biofilma temeljem određenih vrijednosti prikazana je u Tablici 5.

Tablica 5. Karakterizacija svojstva formiranja biofilma na polistirenu sojeva *E. faecium*

SOJ	RAZRJEĐENJE	REZULTATI OD620	SPOSOBNOST STVARANJA BIOFILMA
A7	1:10	0,2411±0,2361	-
	1:100	0,1714±0,1653	-
L3	1:10	0,1741±0,1602	-
	1:100	0,1803±0,1113	-
ZG 3-16	1:10	0,1769±0,1213	-
	1:100	0,2833±0,2719	+
ZG 7-10	1:10	0,3748±0,1075	-
	1:100	0,3052±0,0085	+
BGAL 2-53	1:10	0,5378±0,2425	-
	1:100	0,3846±0,0394	+
ZG 5-20	1:10	0,3169±0,1971	-
	1:100	0,4218±0,1765	+

- = ne stvara biofilm, + = slabo stvara biofilm, ++ = dobro stvara biofilm, +++ = izrazito dobro stvara biofilma

Tablica 5. Karakterizacija svojstva formiranja biofilma na polistirenu sojeva *E. faecium* - nastavak

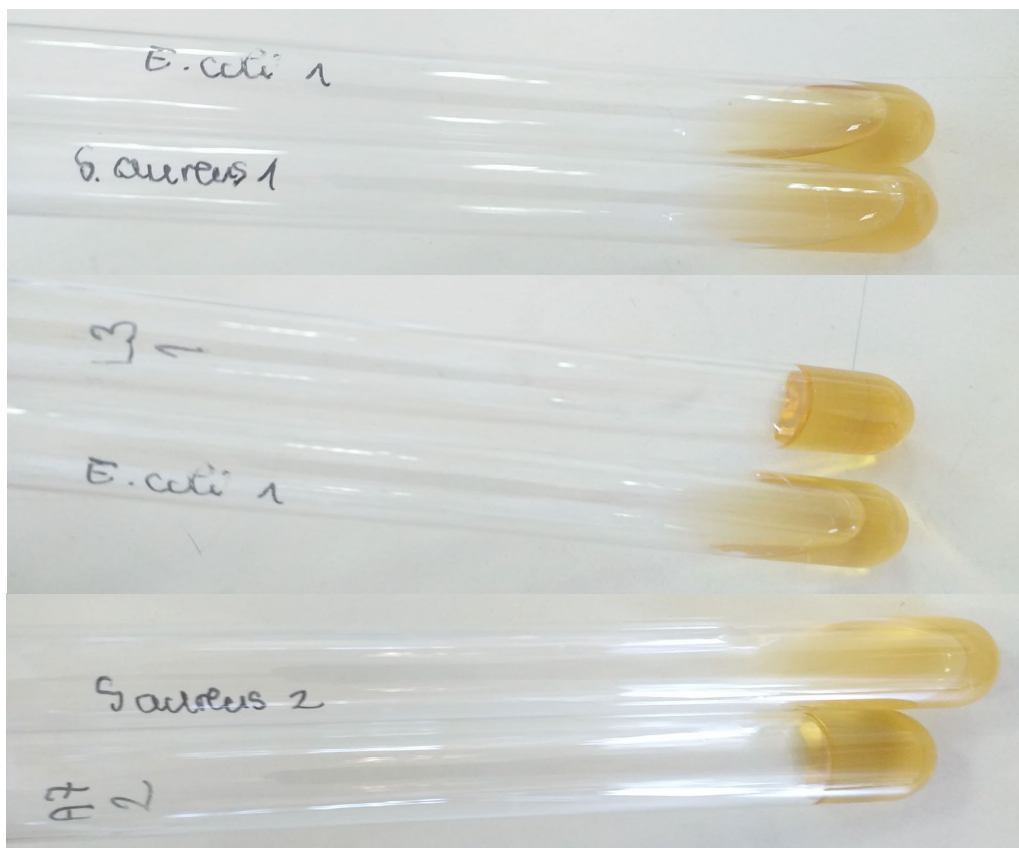
ATCC 9430	1:10	0,5103±0,4127	-
	1:100	0,5694±0,4222	++
BGGO 5-36	1:10	1,0101±0,5104	+
	1:100	1,0546±0,4795	++

- = ne stvara biofilm, + = slabo stvara biofilm, ++ = dobro stvara biofilm, +++ = izrazito dobro stvara biofilma

Prema rezultatima sojevi *E. faecium* L3 i *E. faecium* A7 uopće ne tvore biofilm na polistirenu, dok *E. faecium* BGGO 5-36 u usporedbi s preostalim sojevima ima najveću sposobnost stvaranja biofilma. Kod sojeva *E. faecium* ATCC 9430, *E. faecium* ZG 3-16, *E. faecium* ZG 5-20, *E. faecium* ZG 7-10 i *E. faecium* BGAL 2-53 opaženo je da u prvom decimalnom razrjeđenju bakterijske kulture ne tvore biofilm, dok u drugom tvore. Prema Deng i sur. (2020) mikroorganizmi uzgojeni s dovoljnom količinom hranjivih tvari proizveli su veću količinu biomase i deblji biofilm, iz čega se može zaključiti da je u prvom decimalnom razrjeđenju koncentracija bakterija bila previsoka te nije bilo dovoljno hranjivih tvari kako bi bakterijske kulture proizvele biofilm. Deng i sur. (2020) također zaključuju da ključnu ulogu u stvaranju biofilma ima i quorum sensing koji može rezultirati zajedničkom promjenom ekspresije bakterijskih gena (npr. ekspresije čimbenika virulencije) i ponašanja bakterija (npr. stvaranje biofilma). Stvaranje biofilma u patogenih bakterija smatra se nepoželjnim, ali prema Deng i sur. (2020) stvaranje probiotičkog biofilma povoljna je pojava za domaćina koja potiče kolonizaciju i dulje preživljavanje korisnih bakterija u sluznici crijeva, čime se onemogućuje kolonizacija patogenih bakterija. Sposobnost formiranja biofilma je kod probiotičkih sojeva različita i to se svojstvo ne može pripisati vrsti, te je ključno kod probiotičkih bakterija svako svojstvo ispitati za svaki soj posebno.

Želatinaza je ekstracelularna cink metaloproteaza sposobna hidrolizirati želatinu, elastin, kolagen i hemoglobin. *gelE* kodira za želatinazu, a nalazi se na operonu zajedno sa *sprE* genom koji kodira serinsku proteazu (Graham i sur., 2020). Glavna uloga želatinaze i serinske proteaze je osigurati hranjive tvari bakterijama razgradnjom tkiva domaćina, a osim toga sudjeluju i u stvaranju biofilma (Krawczyk i sur., 2021). Gen *gelE* pronađen je u brojnim *Enterococcus* sojevima izoliranim iz različitih ekosustava i to u sojevima koji obično nisu povezani s infekcijom kao što su *E. hirae* i *E. durans*, što ukazuje na to da želatinaza nije isključivo povezana s virulencijom roda *Enterococcus* (Graham i sur., 2020).

Želatina hidrolizirajući test se koristi za određivanje sposobnosti mikroorganizma da proizvede ekstracelularne proteolitičke enzime tj. želatinaze. Ukoliko mikroorganizam proizvodi želatinazu, doći će do likvefakcije želatinozne podloge, a ako ne proizvodi želatinazu podloga će ostati kruta (vlastita fotografija, slika 3). Utvrđeno je da niti jedan od testiranih *E. faecium* sojeva nema sposobnost hidrolize želatine tj. da ne proizvodi želatinazu (tablica 6).



Slika 3. Rezultat želatina hidrolizirajućeg testa za sojeve *E. faecium* L3 i *E. faecium* A7 te sojeve koji ekspimiraju želatinazu *E. coli* i *S. aureus* (vlastita fotografija)

Tablica 6. Određivanje aktivnosti hidrolize želatine pomoću *E. faecium* sojeva

BAKTERIJSKI SOJ	HIDROLIZA ŽELATINE
<i>E. faecium</i> L3	-
<i>E. faecium</i> A7	-
<i>E. faecium</i> ATCC 9430	-
<i>E. faecium</i> ZG 3-16	-
<i>E. faecium</i> ZG 5-20	-

- = soj ne hidrolizira želatinu, + = soj hidrolizira želatinu

Tablica 6. Određivanje aktivnosti hidrolize želatine pomoću *E. faecium* sojeva - nastavak

<i>E. faecium</i> ZG 7-10	-
<i>E. faecium</i> BGGO 5-36	-
<i>E. faecium</i> BGAL 2-53	-
<i>E. coli</i>	+
<i>S. aureus</i>	+

- = soj ne hidrolizira želatinu, + = soj hidrolizira želatinu

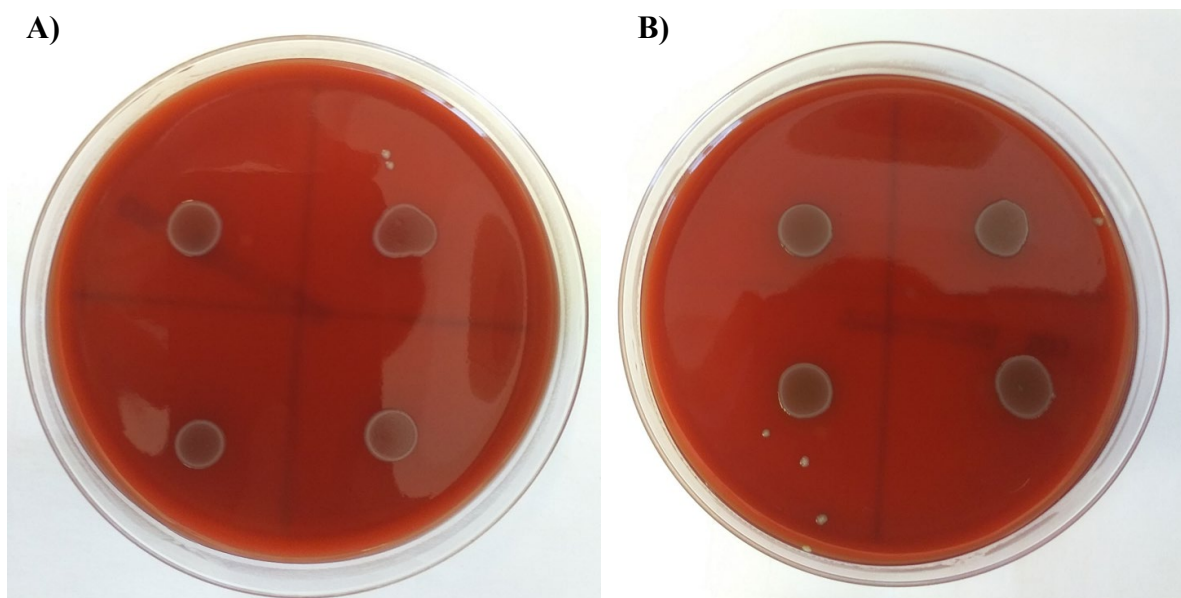
Citolizin je dvopeptidni litički toksin kojeg proizvode neki sojevi *E. faecalis*. Djeluje protiv raznih vrsta stanica uključujući eukariotske stanice kao što su ljudski, goveđi i konjski eritrociti, retinalne stanice, leukociti i ljudske epitelne stanice crijeva. Geni koji kodiraju za citolizin smješteni su na pokretnim elementima i pronalaze se samo u određenom podskupu sojeva *Enterococcus* roda. Budući da citolizin ne posjeduju svi *Enterococcus* sojevi, može se zaključiti da proizvodnja citolizina nije korisna u svim ekosustavima, ali moguće je i da mobilni elementi koji nose ovu osobinu nisu u potpunosti prodrli u rod *Enterococcus* (Cox i sur., 2005).

Fenotip povezan s ekspresijom gena za citolizin određen je sposobnošću hidrolize membrane eritrocita. Test se smatra pozitivnim ako su oko bakterijskih kolonija poraslih na krvnom agaru vidljive prozirne zone (Olvera-García i sur., 2018), ukoliko prozirne zone izostanu, test je negativan (slika 4). Niti jedan od testiranih *E. faecium* sojeva nije pokazao sposobnost hidrolize membrane eritrocita iz čega se može pretpostaviti da ne sadrže gen za citolizin (tablica 7).

Tablica 7. Analiza *E. faecium* da hidrolizaju membrane eritrocita

BAKTERIJSKI SOJ	SPOSOBNOST HIDROLIZE
<i>E. faecium</i> L3	-
<i>E. faecium</i> A7	-
<i>E. faecium</i> ZG 3-16	-
<i>E. faecium</i> ZG 5-20	-
<i>E. faecium</i> ZG 7-10	-

- = nema sposobnost hidrolize membrane eritrocita, + = ima sposobnost hidrolize membrane eritrocita



Slika 4. Porasle bakterijske kolonije sojeva **A)** *E. faecium* ZG 7-10 i **B)** *E. faecium* ZG 5-20 na Columbia krvnom agaru za analizu sposobnosti bakterijskih stanica da hidroliziraju membrane eritrocita (vlastita fotografija)

Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem je proces stabilizacije u kojem se tvar ili namirnica najprije zamrzne, a zatim se količina otapala smanjuje postupkom sublimacije (primarno sušenje), a zatim i desorpcijom (sekundarno sušenje) do vrijednosti koja neće više podržavati rast živih organizama ili kemijske reakcije (Jenings, 1990). Liofilizirane stanice mogu se rehidratirati nakon čega su ponovo metabolički aktivne. Lioprotektori se koriste kako bi zaštitili membranu stanice pri zamrzavanju i sušenju, a kao lioprotektori mogu se koristiti šećeri i proteini iz mlijeka, serum, saharoza, dekstran i dr. (Morgan i sur., 2006). Preživljavanje liofilizacije ispitano je za sojeve *E. faecium* ATCC 9430, *E. faecium* ZG 3-16, *E. faecium* ZG 5-20 i *E. faecium* ZG 7-10 metodom opisanom u poglavlju 3.2.4, koristeći obrano mlijeko kao lioprotektor, a dobiveni rezultati su prikazani u Tablici 8. i Tablici 9. te su na slici 5 prikazane liofilizirane kulture (vlastita fotografija).



Slika 5. Uzorci liofiliziranih pripravaka bakterijskih kultura *E. faecium* (vlastita fotografija)

Tablica 8. Broj poraslih kolonija izražen kao CFU/ml prije i nakon liofilizacije

SOJ	CFU/mL PRIJE LIOFILIZACIJE	CFU/mL NAKON LIOFILIZACIJE
ZG 3-16	$5,66 * 10^9$	$1,15 * 10^{10}$
ATCC 9430	$8,68 * 10^9$	$8,97 * 10^9$
ZG 5-20	$5,50 * 10^9$	$5,31 * 10^9$
ZG 7-10	$1,01 * 10^{10}$	$4,66 * 10^9$

Tablica 9. Logaritamske vrijednosti CFU/ml prije i nakon liofilizacije i njihova razlika

SOJ	log(CFU/mL) PRIJE LIOFILIZACIJE	log(CFU/mL) NAKON LIOFILIZACIJE	Δ log(CFU/mL)
ZG 3-16	$9,75 \pm 0,20$	$10,06 \pm 0,41$	$0,31 \pm 0,28$
ATCC 9430	$9,94 \pm 0,05$	$9,95 \pm 0,10$	$0,01 \pm 0,15$
ZG 5-20	$9,74 \pm 0,09$	$9,75 \pm 0,10$	$-0,02 \pm 0,03$
ZG 7-10	$10,00 \pm 0,26$	$9,67 \pm 0,28$	$-0,34 \pm 0,17$

Svi analizirani sojevi *E. faecium* uspješno podnose ekstremne uvjete postupka liofilizacije te preživljavaju u visokom broju metabolički aktivnih stanica (Tablica 8.). Usporedbom broja poraslih bakterijskih kolonija ispitivanih sojeva, soj *E. faecium* ZG 3-16

pokazuje najveću sposobnost preživljavanja liofilizacije, dok razlika u broju preživjelih stanica za *E. faecium* ZG 7-10 iznosi $\Delta\log(\text{CFU/mL}) = -0,34 \pm 0,17$, što je ujedno i najmanja razlika, a kod sojeva *E. faecium* ATCC 9430 i *E. faecium* ZG 5-20 je broj vijabilnih stanica prije i nakon liofilizacije podjednak (tablica 9.).

Cilj ovog rada je i preliminarno ispitati sadrže li pojedini *Enterococcus* sojevi gene koji kodiraju za enterocine, *entA* i *entB*. Naime, njihovo djelovanje *in situ* je sinergističko što proširuje spektar antimikrobnog djelovanja (Khan i sur., 2010). U tu svrhu provedena je izolacija ukupne DNA te su određene koncentracije prikazane u Tablici 10. DNA je izolirana u visokim koncentracijama te je prihvatljiva za provođenje PCR reakcije s početnicama za enterocine A i B.

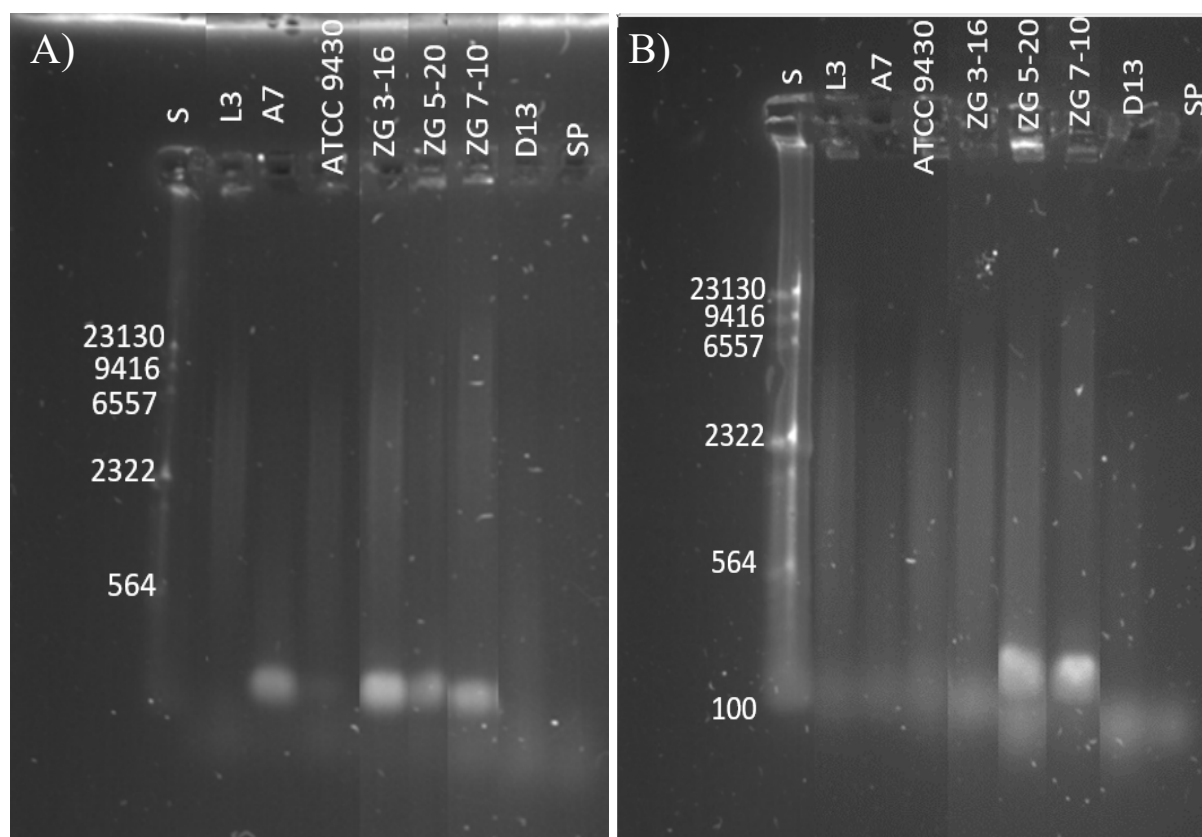
Tablica 10. Koncentracija DNA izolirana iz određenih *Enterococcus* sojeva

SOJ	KONCENTRACIJA DNA
L3	584,00
A7	257,06
ATCC 9430	578,49
ZG 3-16	201,73
ZG 5-20	917,2
ZG 7-10	571,20

Enterocini posjeduju veliki potencijal za primjenu u mliječnoj industriji budući da pokazuju poželjne osobine kao što su jaki antilisterijski učinci, proizvodnja i stabilnost u mlijeku pri 30 do 37 °C, kompatibilnost s drugim starter kulturama, osobito bakterijama mliječne kiseline, i stabilnost u širokom rasponu pH vrijednosti. Postoje dvije glavne primjene bakteriocina, a to su uključivanje antibakterijskog peptida kao prehrambenog aditiva ili izravno uključivanje sojeva koji proizvode bakteriocine u prehrambeni sustav kao starter ili antimikrobnih kultura. Ako neki *Enterococcus* soj proizvodi enterocin sa širokim spektrom inhibicije, ali uz to sadrži i potencijalne patogene osobine, sigurniji i praktičniji pristup uključuje primjenu pročišćenog peptida kao prehrambenog aditiva. (Graham i sur., 2020)

Kako bi odredili sintetiziraju li odabrani sojevi enterocine, prvo je provedena PCR reakcija prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.6., a zatim se provela i horizontalna gel

elektroforeza (slika 6).



S = standard, SP = slijepa proba, D13 = *Lb. plantarum* (kontrolni soj)

Slika 6. DNA gel elektroforeza **A)** PCR produkata s početnicama za enterocin A i **B)** PCR produkata s početnicama za enterocin B

Prema rezultatima gel elektroforeze na slici 6 A) PCR produkt amplificiran iz DNA sojeva *E. faecium* A7, *E. faecium* ZG 3-16, *E. faecium* ZG 5-20 i *E. faecium* ZG 7-10 je fragment DNA koji odgovara vrpci prema kojoj je veličina amplicona 138 pb karakterističnoj za enterocin A, što upućuje na mogućnost da navedeni sojevi sintetiziraju enterocin A. Na slici 6 B) kod sojeva *E. faecium* ZG 5-20 i *E. faecium* ZG 7-10 vidljiva je vrpca prema kojoj je veličina amplicona 201 pb koja je karakteristična za enterocin B. *E. faecium* ZG 5-20 i *E. faecium* ZG 7-10 sintetiziraju enterocin A i enterocin B koji djeluju sinergistički te uslijed toga posjeduju najširi spektar antimikrobnog djelovanja među analiziranim sojevima.

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da su analizirani sojevi sigurni za primjenu kao starter kulture u fermentaciji s aspekta stvaranja želatinaze i hemolitičke aktivnosti, te svojstva

da ne formiraju biofilm na abiotičkoj površini polistirena, a osim toga uspješno preživljavaju postupak liofilizacije i imaju potencijal ekspimiranja enterocina A i enterocina B što može doprinjeti kontroli nepoželjne bakterijske populacije tijekom fermentacije hrane.

5. ZAKLJUČCI

1. Budući da prema rezultatima ovog rada, niti jedan soj *E. faecium* ne iskazuje želatinaznu ni hemolitičku aktivnost, analizirani sojevi sigurni su unutar tog aspekta i mogu se primijeniti kao starter kulture u fermentaciji.
2. Sposobnost formiranja biofilma na polistirenu se razlikuje obzirom na soj, te se *E. faecium* BGGO 5-36 pokazao kao učinkovit producent biofilma, što će se dodatno istražiti.
3. Priprema suhих aktivnih pripravaka bakterijskih stanica liofilizacijom je učinkovita budući da su analizirani *E. faecium* sojevi pokazali visok stupanj preživljavanja tijekom postupka.
4. Sojevi *E. faecium* A7 i *E. faecium* ZG 3-16 sintetiziraju enterocin A , dok *E. faecium* ZG 5-20 i *E. faecium* ZG 7-10 dodatno sintetiziraju i enterocin B, koji ima sinergističko djelovanje s enetrocinom A, što proširuje spektar antimikrobnog djelovanja i njihov značaj kao biokonzervansa.

6. POPIS LITERATURE

Abanoz HS, Kunduhoglu B (2018) Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* kt11 against some pathogens and antibiotic-resistant Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Anim. Resour.* **38(5)**, 1064–1079. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e40>

Abriouel H, Omar N, Molinos A, López R, Grande M, Martínez-Viedma i sur. (2008) Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, **123(1-2)**, str. 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.067>

Araújo T, Ferreira C (2013) The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56(3)**, str. 457-466. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300014>

Bhardwaj A, Malik R, Chauhan P (2008) Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian Journal of Microbiology*, **48(3)**, str. 317-325. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0041-2>

Byappanahalli M, Nevers M, Korajkic A, Staley Z, Harwood V (2012) Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76(4)**, str. 685-706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>

Cebrián R, Baños A, Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M (2012) Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*, **30(1)**, str. 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>

Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Łaniewska-Trokenheim Ł (2017) Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT*, **75**, str. 670-676. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.026>

Cox C, Coburn P, Gilmore M (2005) Enterococcal Cytolysin: A Novel Two Component Peptide System that Serves as a Bacterial Defense Against Eukaryotic and Prokaryotic Cells. *Current Protein & Peptide Science*, **6(1)**, str. 77-84. <http://dx.doi.org/10.2174/1389203053027557>

Deng Z, Luo X, Liu J, Wang H (2020) Quorum Sensing, Biofilm, and Intestinal Mucosal Barrier: Involvement the Role of Probiotic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **25**, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.538077>

De Vuyst L, Vandamme E (1994) Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic & Professional, London, str. 91-142.

Devriese L, Pot B (1995) The genus *Enterococcus*. The Genera of Lactic Acid Bacteria, 2 izdanje, lackie Academic & Professional, An Imprint of Chapman & Hall, London, str. 327-367.

Domann E, Hain T, Ghai R, Billion A, Kuenne C, Zimmermann K, Chakraborty T (2007) Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *International Journal of Medical Microbiology*, **297(7-8)**, str. 533-539. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.02.008>

Extremina C, Costa L, Aguiar A, Peixe L, Fonseca A (2011) Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *Journal of Microbiological Methods*, **84(2)**, str. 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.007>

Fisher K, Phillips C (2009) The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, **155(6)**, str. 1749-1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>

Franz C, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A (2011) Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, **151(2)**, str. 125-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>

García-Solache M, Rice L (2019) The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its

Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, **32(2)**. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>

Gewolb I, Schwalbe R, Taciak V, Harrison T, Panigrahi P (1999) Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, **80(3)**, str. 167-173. <http://dx.doi.org/10.1136/fn.80.3.F167>

Gibson G, Hutkins R, Sanders M, Prescott S, Reimer R, Salminen S i sur. (2017) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **14(8)**, str. 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Giraffa G (2002) Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, **26(2)**, str. 163-171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x>

Giraffa G (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, **88(2-3)**, str. 215-222. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1)

Graham K, Rea R, Simpson P, Stack H (2017) Development of a rapid, one-step screening method for the isolation of presumptive proteolytic enterococci. *Journal of Microbiological Methods*, **132**, str. 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.016>

Graham K, Stack H, Rea R (2020) Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **60(22)**, str. 3836-3861. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1709800>

Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJL (2016) Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? *Frontiers in Microbiology*, **7**, 788. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00788>

Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R (2018) The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Frontiers in Microbiology*, **9**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>

Hardie J, Whiley R (1997) Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, **83**, str. 1-11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x>

Jennings T (1999) *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*, 1. izd., CRC Press.

Khan H, Flint S, Yu P, (2010) Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **141(1-2)**, str. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.005>

Kos B, predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akademska godina 2021./2022., https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5858968/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2021_4.pdf, pristupljeno 25.05.2022.

Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006) How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, **6(1)**, str. 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-130>

Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M and Michalik M 2021 The Many Faces of *Enterococcus* spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen *Microorganisms*, **9(9)**, str. 1900. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9091900>

McBride S, Fischetti V, LeBlanc D, Moellering R, Gilmore M (2007) Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE*, **2(7)**, str. 582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000582>

Medina-Pradas E, Pérez-Díaz I, Garrido-Fernández A, Arroyo-López F (2017) Review of Vegetable Fermentations With Particular Emphasis on Processing Modifications, Microbial Ecology, and Spoilage. *The Microbiological Quality of Food*, Woodhead Publishing, str. 211-236.

Mohamed J, Huang D (2007) Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, **56(12)**, str. 1581-1588. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47331-0>

Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods* **66(2)**, str. 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>

Murray B (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, **3(1)**, str. 46-65. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.1.46>

Naissinger da Silva M, Lago Tagliapietra B, do Amaral Flores V, Pereira dos Santos Richards NS (2021) In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Current Research in Food Science* **4**, str. 320-325. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.006>

Negash A, Tsehai B (2020) Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, **2020**, str. 1-7. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>

Ogier J, Serror P (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, **126(3)**, str. 291-301. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.017>

Olvera-García M, Sanchez-Flores A, Quirasco Baruch M (2018) Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102(5)**, str. 2251-2267. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8765-3>

Růžičková M, Vítězová M, Kushkevych I (2020) The characterization of *Enterococcus* genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. *Open Medicine*, **15**, str. 211-224. <https://doi.org/10.1515/med-2020-0032>

Wan L, Chen Z, Shah N, El-Nezami H (2015) Modulation of Intestinal Epithelial Defense Responses by Probiotic Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56(16)**, str. 2628-2641. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.905450>

Wassenaar TM, Marzorati M, Beimfohr C, Siegl A, Zimmermann K (2017) Survival of Probiotic *E. coli* and *Ent. faecalis* in the Human Host after Oral Intake: Results from in Vitro and in Vivo Studies. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, **2**, str. 1–5. <https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.02.555592>

Zhang T, Zhang Y, Li L, Jiang X, Chen Z, Zhao F, Yi Y (2022) Biosynthesis and Production of Class II Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *Fermentation*, **8(5)**, str. 217. <https://doi.org/10.3390/fermentation8050217>

Izjava o izvornosti

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

Vlastoručni potpis