

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2018.

Petra Gaberšek

787/MB

INDUCIRANJE
BAKTERIOCINSKE AKTIVNOSTI
BAKTERIJSKOG SOJA
Lactobacillus plantarum SF15C

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

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jagodi Šušković i prof. dr. sc. Blaženki Kos na divnom pristupu prema studentima, te trudu da na zanimljiv i motivirajuć način nam približe nastavni sadržaj.

Veliko hvala doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc i mag. ing. Katarini Zorić na susretljivosti, stručnoj pomoći i divnoj atmosferi prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala mojim prijateljima koji su me podržavali tijekom studiranja.

Veliko hvala mojim roditeljima što su mi omogućili studiranje.

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

INDUCIRANJE BAKTERIOCINSKE AKTIVNOSTI BAKTERIJSKOG SOJA *Lactobacillus plantarum* SF15C

Petra Gaberšek, 787/MB

Sažetak: Bakterije mliječne kiseline (BMK) pokazuju širok spektar antimikrobne aktivnosti. Posebni naglasak stavlja se na bakteriocine, peptide s antimikrobnim djelovanjem prema srodnim bakterijskim vrstama soja producenta i Gram-pozitivnim mikroorganizmima, koji uzrokuju kvarenje hrane i zdravstvene tegobe kod ljudi i životinja. U ovom diplomskom radu ispitivana je prisutnost gena koji kodiraju za plantaricine kod soja *Lactobacillus plantarum* SF15C. Isto tako ispitan je inhibitorni učinak bakterijskog soja *Lb. plantarum* SF15C, uzgojenog sa i bez žučnih soli, na rast test-mikroorganizma *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048, nakon kokultivacije s istim test-mikroorganizmima. Tijekom kokultivacije također je provedeno ispitivanje bakteriocinske aktivnosti prema istim test-mikroorganizmima koji su korišteni za indukciju sinteze bakteriocina, primjenom metode s dvostrukim slojem agara.

Gljučne riječi: bakterije mliječne kiseline, antimikrobno djelovanje, bakteriocini, kokultivacija

Rad sadrži: 40 stranica, 17 slika, 6 tablica, 55 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. Jagoda Šušković*

Pomoć pri izradi: *doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc i Katarina Zorić, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: 5.4.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic
And Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

INDUCTION OF THE BACTERIOCIN ACTIVITY IN BACTERIAL STRAIN *Lactobacillus plantarum* SF15C

Petra Gaberšek, 787/MB

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) show a wide spectrum of antimicrobial activity. Particular accent is on bacteriocins, peptides with antimicrobial activity against related bacterial strains and Gram-positive microorganisms that cause food degradation and health problems in humans and animals. In this graduate thesis, presence of genes, which are coding for plantaricin in the *Lactobacillus plantarum* SF15C was investigated. In addition, inhibitory effect of bacterial strain *Lb. plantarum* SF15C, grown with and without bile salts, on the growth of test organisms *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 and *Staphylococcus aureus* 3048, after coculture with the same test microorganisms was tested. During the coculture, a bacterial activity was also tested for the same test microorganisms used to induce bacteriocin synthesis using a double-layer agar method.

Keywords: lactic acid bacteria, antimicrobial activity, bacteriocins, coculture

Thesis contains: 40 pages, 17 figures, 6 tables, 55 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Jagoda Šušković, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD. Andreja Leboš Pavunc and Katarina Zorić, mag. ing. biotech.*

Reviewers:

1. *PhD. Blaženka Kos, Full professor*
2. *PhD. Jagoda Šušković, Full professor*
3. *PhD. Jadranka Frece, Full professor*
4. *PhD. Ksenija Markov, Full professor (substitute)*

Thesis defended: 5.4.2018.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIOCINSKA AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1. Mikroorganizmi producenti.....	2
2.1.2. Podjela bakteriocina	4
2.2. MEHANIZAM DJELOVANJA I PRIMJENA BAKTERIOCINA	6
2.2.1. Biosinteza bakteriocina	6
2.2.2. Regulacija biosinteze.....	8
2.3. PRIMJENA BAKTERIOCINA.....	10
2.3.1. Korištenje bakteriocina u 21. stoljeću	11
2.3.2. Antimikrobna aktivnost u pakiranju hrane i nanotehnologija.....	12
2.3.3. Bakteriocini na tržištu.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	14
3.1. MATERIJALI.....	14
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	14
3.1.2. Hranjive podloge	14
3.1.3. Kemikalije	15
3.1.4. Aparatura i pribor	16
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama	17
3.2.2. Izolacija DNA.....	18
3.2.3. PCR (Polymerase chain reaction).....	18
3.2.4. Određivanje molekulske mase bakteriocina nakon taloženja s trikloroocetnom kiselinom primjenom tricin-SDS-PAGE.....	20
3.2.5. Kokultivacija soja <i>Lactobacillus plantarum</i> SF15C, nakon uzgoja sa i bez žučnih soli, uz test-mikroorganizme <i>Listera monocytogenes</i> ATCC 19111 i <i>Staphylococcus aureus</i> 3048.....	22
3.2.6. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara (“Agar-spot-test metoda”)	23
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA BAKTERIOCINE I ODREĐIVANJE MOLEKULSKE MASE BAKTERIOCINA	24
4.2. INDUKCIJA BAKTERIOCINSKE AKTIVNOSTI KOKULTIVACIJOM S TEST-MIKROORGANIZMIMA	25
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA	35

1. UVOD

Jedan od najvećih izazova današnje industrije hrane je da se zadovolje rastuće potrebe potrošača za hranom spremnom za neposrednu upotrebu, koja je svježeg okusa, minimalno prerađena i tretirana kemijskim konzervansima. Uporaba bakteriocina u prehrambenoj industriji može pomoći da se smanji dodavanje kemijskih konzervansa kao i intenzitet toplinskih tretmana, što rezultira hranom koja je očuvana i bogatija organoleptičkim i nutritivnim svojstvima.

Bakterije mliječne kiseline (BMK) nalaze se prirodno u mliječnim proizvodima, fermentiranom mesu i ribi, povrću, a pojedini sojevi se koriste kao probiotici jer pozitivno djeluju zdravlje potrošača. BMK sintetiziraju različite antimikrobne spojeve kao što su mliječna i octena kiselina, diacetil, etanol, vodikov peroksid, reuterin, acetaldehid, aceton, ugljični dioksid i bakteriocine. Navedeni prirodni spojevi inhibiraju nepoželjne i patogene mikroorganizme, čime se produžuje rok trajanja prehrambenih proizvoda, povećava njihova sigurnost i smanjuje uporaba antibiotika. Na biosintezu bakteriocina utječe niz čimbenika, primjerice pH vrijednost medija, temperatura, faza rasta mikroorganizma producenta, no smatra se da je prisutnost mikroorganizma koji je osjetljiv na bakteriocinsko djelovanje presudan čimbenik.

U ovom diplomskom radu ispitana je bakteriocinska aktivnost bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* SF15C prema Gram-pozitivnim bakterijama koje su poznate kao kontaminanti u hrani, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048. Proveden je združeni uzgoj *Lb. plantarum* SF15C s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *St. aureus* 3048, u svrhu provjere utjecaja kokultivacije na bakteriocinsku aktivnost soja producenta. Uz kokultivaciju provjeren je i utjecaj uzgoja sojeva producenata bakteriocina uz dodatak žučnih soli na proizvodnju bakteriocina kao jednog od stresnih okolišnih čimbenika za bakterije mliječne kiseline. Metodom s dvostrukim slojem agara ispitan je inhibicijski učinak soja producenta bakteriocina na rast test-mikroorganizma koji su korišteni za indukciju sinteze bakteriocina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIOCINSKA AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

U današnje vrijeme je istraživanje novih načina čuvanje hrane u velikom porastu. To je uzrokovano pojavom novih patogena i širenjem antibiotske rezistencije već postojećih bakterija. Isto tako je povećana svijest potrošača o štetnim kemijskim konzervansima te se traže proizvodi koji su minimalno procesirani. Potencijal bakteriocina i njegova primjena u reduciranju kvarenja hrane, s jedne strane i očuvanju autohtonih bakterija hrane, s druge strane, je dugo poznata.

Bolesti koje se prenose hranom su široko rasprostranjene i jedne su od glavnih problema javnog zdravstva. Zdravstvene opasnosti su povezane s patogenim mikroorganizmima, kao što su *Salmonella enteritidis* i *Eschericia coli* koje izazivaju 75% bolesti uzrokovane hranom. Korištenje kemijskih konzervansa u prehrambenim proizvodima inhibira rast nepoželjnih mikroorganizama, ali veliki nedostatak takvih konzervansa je promjena organoleptičkih svojstava hrane i njenog sastava, koji može biti toksičan za potrošače. Upotreba prirodno proizvedenih spojeva, kao što su biokonzervansi, je važno u prehrambenoj industriji naročito u gotovim proizvodima koji su spremni za konzumiranje (Bali i sur., 2016). Bakteriocini su proteinske supstancije (peptidi) s antimikrobnim djelovanjem prema srodnim bakterijskim vrstama soja producenta. U prirodi djeluju bakteriostatski (inhibiraju rast i razvoj bakterija) ili baktericidno (ubijaju bakterije). Neki od važnih parametara primjene bakteriocina u hrani su njihova netoksičnost, stabilnost, inhibicija širokog spektra mikroorganizama te razumijevanje njihovih biokemijskih i genetičkih svojstva (Parada i sur., 2007). Bakteriocini se mogu koristiti za one proizvode čija se sterilizacija ne može izvršiti toplinskom obradom. Bakteriocini koje proizvode bakterije mliječne kiseline iz rodova *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* i *Lactobacillus* su od posebnog značaja jer te bakterije imaju GRAS (Generally Regarded As Safe) status i obično se koriste za proizvodnju fermentirane hrane (Ahmed i sur., 2010; Parada i sur., 2007).

2.1.1. Mikroorganizmi producenti

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine specifičnu skupinu srodnih, nesporogenih, acidotolerantnih, Gram-pozitivnih bakterija, uglavnom katalaza-negativnih štapića i koka, koje

rastu u mikroaerofilnim ili samo anaerobnim uvjetima i proizvode mliječnu kiselinu kao glavni proizvod metabolizma ugljikohidrata.

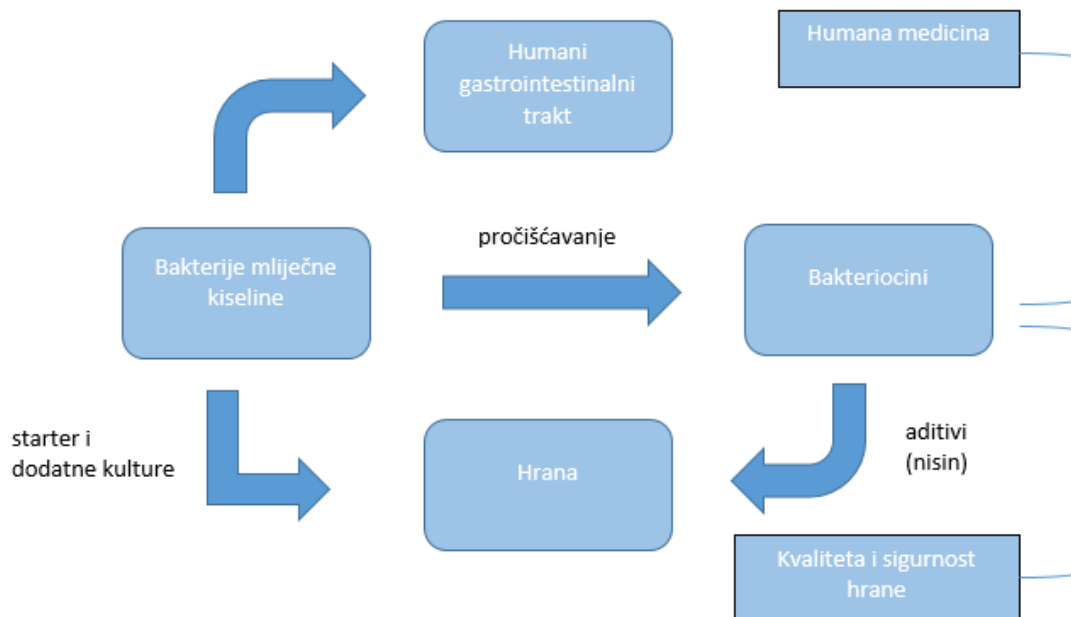
Rodovi *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus* se tradicionalne koriste kao starter kulture za fermentaciju hrane i pića zbog njihovog doprinosa razvoju okusa, arome, teksture i nutritivne vrijednosti, zatim brzom proizvodnji mliječne kiseline i acidifikaciji prehrambenog proizvoda te usporavanja kvarenja namirnica (De Vuyst i Vandamme, 1994). Vrste iz roda *Lactobacillus* kao što su *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri* te *Bifidobacterium bifidum* i *Enterococcus faecium* mogu kolonizirati gastrointestinalni trakt i imaju korisnu ulogu u održavanju ravnoteže crijevne mikrobiote (De Vuyst i Vandamme, 1994).

Najvažniji prehrambeni i terapijski učinci bakterija mliječne kiseline (Gurr, 1987; Fernandes i sur., 1987) :

- poboljšanje prehrambene kvalitete hrane, npr. lizin obogaćuje fermentirane žitarice
- proizvodnja vitamina (folna kiselina) i enzima (laktaza)
- stabilizacija intestinalne mikroflore, isključujući kolonizaciju patogenih bakterija kao što su *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* i enteropatogenih sojeva *E. coli*
- zaštita od infekcija crijeva i urinarnog trakta proizvodnjom antibakterijskih tvari i/ili aktivacijom sustava laktoperoksidaze. Tri su komponente tog sustava– laktoperoksidaza (enzim koji se prirodno nalazi u mlijeku), tijocijanat (također se nalazi u mlijeku) i H₂O₂ kojeg proizvode neke vrste bakterija mliječne kiseline. U prisutnosti H₂O₂ i tijocijanata laktoperoksidaza pretvara tijocijanat u međuproizvode koji inhibiraju rast bakterija
- redukcija razine kolesterola u krvnom serumu njegovom asimilacijom, hidrolizom žučnih soli i modulacijom omjera HDL (loš kolesterol) i LDL-a (dobar kolesterol)
- smanjen rizik od raka debelog crijeva – detoksikacija kancerogenih spojeva i otrovnih tvari
- nespecifična stimulacija imunološkog sustava da proizvodi makrofage – svojstvo supresora tumora.

Bakterije mliječne kiseline pokazuju širok spektar antimikrobnih aktivnosti. Proizvode mliječnu i octenu kiselinu, etanol, mravlju kiselinu, masne kiseline, vodikov peroksid, diacetil,

reuterin, reuterciklin (De Vuyst i Vandamme, 1994). Velik broj sojeva sintetizira bakteriocine, koji pokazuju antibakterijsku aktivnost, i druge antimikrobne peptide koji doprinose očuvanju i sigurnosti hrane. Zbog navedenih karakteristika bakterija mliječne kiseline se često koristi u prehrambenoj industriji kao biokonzervansi te kao probiotici koji imaju pozitivni zdravstveni utjecaj na humani gastrointestinalni trakt (slika 1).



Slika 1. Prikaz moguće primjene bakteriocina bakterija mliječne kiseline (De Vuyst i Leroy, 2007)

2.1.2. Podjela bakteriocina

S obzirom na genetičke i biokemijske karakteristike bakteriocine se mogu podijeliti u tri razreda (tablica 1) (Drider i sur., 2006):

RAZRED 1: Lantibiotici – mali (<5 kDa) i termostabilni peptidi. S obzirom na strukturu podijeljeni su u podrazrede – Ia podrazred uključuje izdužene fleksibilne pozitivno nabijene peptide, dok Ib obuhvaća globularne negativno nabijene ili peptide bez naboja (Klaenhammer, 1993).

RAZRED 2: Nelantibiotici – mali (<10 kDa), minimalno modificirani i toplinski stabilni peptidi (Drider i sur., 2006). To je najveći razred bakteriocina koji je podijeljen u 3 podrazreda. Ila podrazred spadaju peptidi slični pediocinu koji imaju N-terminalnu sekvencu

–Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys. Iib bakteriocini sadrže dva peptida i podrazred Iic uključuje cirkularne strukture bakteriocina.

RAZRED 3: veliki i toplinski labilni bakteriocini s molekulskom masom većom od 30 kDa (Joerger i Klaenhammer, 1990).

Tablica 1. Podjela bakteriocina (Drider i sur., 2006)

Klasifikacija	Karakteristike	Podjela	Primjeri
Razred 1-lantibiotici	Lantionin ili protein sadrži β -lantionin	Ia (linearne molekule) Ib (globularne molekule)	Nisin, subtilin, epidermin Mersacidin
Razred 2	Mali termostabilni peptidi	IIa (pediocin slični bakteriocini) IIb (dva peptida) Iic (cirkularne molekule)	Pediocin, enterocin, sakacin Plantaricin, laktacin F Laktokocin
Razred 3	Veliki termolabilni peptidi		Helveticin J, milericin B

Lantibiotici

Glavni predstavnik lantibiotika je nisin kojeg proizvodi bakterija *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, a sastoji se od 34 aminokiselinska ostatka. Postoje dvije varijante, nisin A i nisin Z koji se strukturno razlikuju u samo jednoj aminokiselini, ali imaju sličnu aktivnost (Mulders i sur., 1991). Nisin je stabilan u otopini pH=2,0, te se može pohraniti dulje vrijeme na temperaturi 2-7°C, dok je pri pH=7 neaktivan na sobnoj temperaturi (Delves-Broughton, 1990). Toksikološka istraživanja su pokazala da nisin nema toksičan učinak na ljude, pri čemu procijenjena letalna doza od 50% (LD₅₀) iznosi 6950 mg/kg kada se uzima oralno (Jozala i sur., 2007). Nisin se koristi u prehrambenoj industriji u siru, jajima, umacima i konzerviranoj hrani. Pokazuje antimikrobno djelovanje prema patogenima *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, sporogenim vrstama iz rodova *Bacillus* i *Clostridium*, te prema nekim BMK vrstama (Rilla i sur., 2004). Jedan od načina djelovanja bakteriocina je sprječavanje sinteze stanične stijenke i stvaranje pora što dovodi do smrti stanice (Hsu i sur., 2004). Nisin je jedini bakteriocin odobren za komercijalnu uporabu od strane Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (WHO).

Nelantibiotici

Podrazred IIa sastoji se od bakteriocina koji pokazuju visoku specifičnost prema bakteriji *Listeria monocytogenes*. Bakteriocini sadrže 37-48 aminokiselinskih ostataka, pri čemu N-terminalni kraj proteina ima konformaciju β – nabrane ploče, a C – terminalni kraj zauzima α – helix strukturu (Fimland i sur., 2005). Bakterija *Pediococcus acidilactici* proizvodi pediocin PA-1 i to je najbolje okarakteriziran bakteriocin ove skupine. Bakteriocini slični pediocinu imaju Tyr-Gly-Asn-Gly-Val/Leu aminokiselinsku sekvencu blizu N-terminalnog kraja i dva cisteina formiraju disulfidnu vezu.

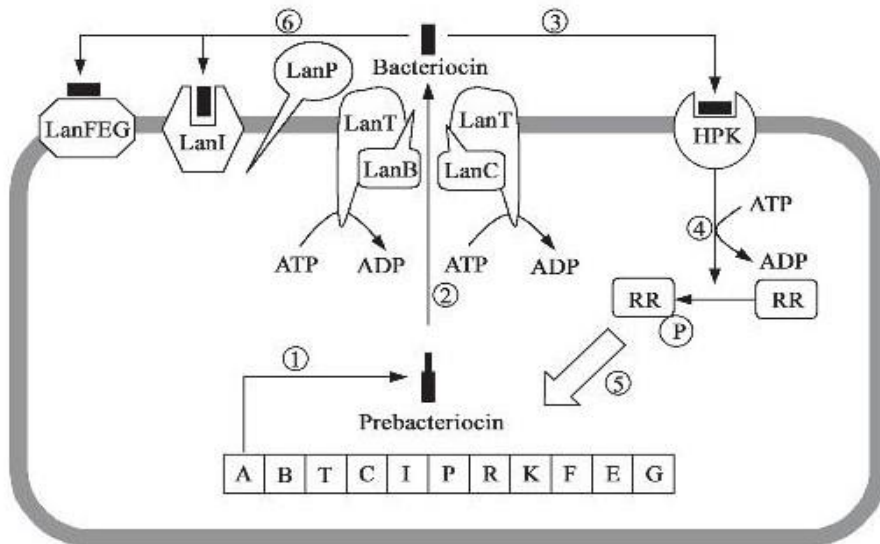
2.2. MEHANIZAM DJELOVANJA I PRIMJENA BAKTERIOCINA

2.2.1. Biosinteza bakteriocina

Geni koji kodiraju za bakteriocine obično su organizirani u operonske klastere (McAuliffe i sur., 2001; Sahl i Bierbaum 1998; Nes i sur., 1996). Operon koji kodira za lantibiotike sadrži gene LanA – sinteza prepeptida, LanB, C/ LanM – enzimi za modifikacijske reakcije, LanP – proteaza odgovorna za uklanjanje lider peptida, ABC (ATP- binding cassette), LanT – transportni proteini, LanR/K – regulatorni proteini, LanI/ FEG – proteini uključeni u imunost domaćina prema djelovanju bakteriocina. Ove informacije su prikupljene iz genetske analize nekoliko lantibiotika: epidermin, nisin, subtilin, laktin 481 i mersacidin. Većina bakteriocina sintetizirana je kao neaktivni prepeptid koji sadrži N- terminalni vodeći peptid koji je vezan na C – terminalni propeptid. Biosintetički put lantibiotika sastoji se od stvaranje prepeptida, modifikacijske reakcije, proteolitičko cijepanje vodećeg peptida i translokacije modificiranog prepeptida ili aktivnog propeptida preko citoplazmine membrane (slika 2). S obzirom na biosintetski put, identificirane su I i II kategorije lantibiotika (McAuliffe i sur., 2001; Guder i sur., 2000; Sahl i Bierbaum 1998).

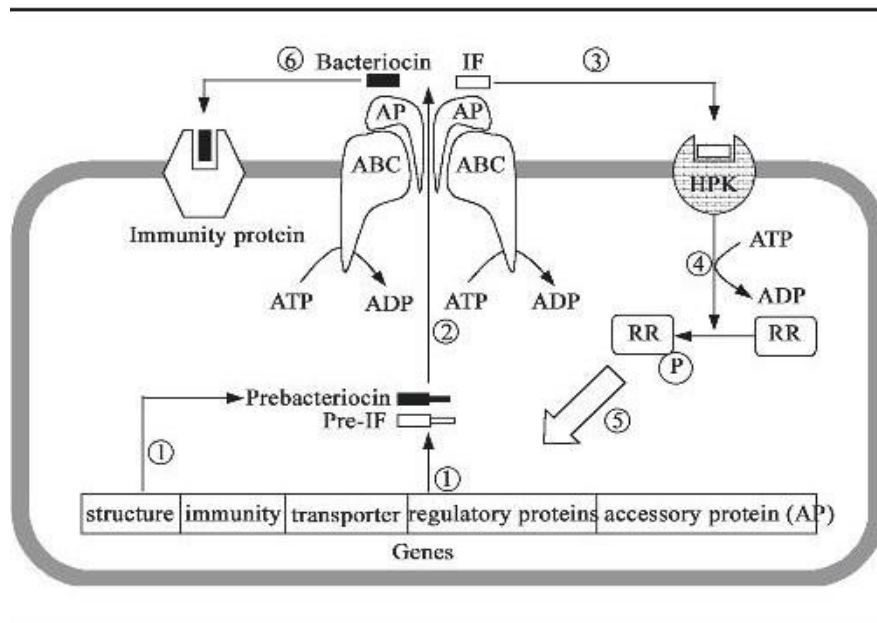
Ova klasifikacija je povezana s prethodnom podjelom lantibiotika u podrazrede a i b. Lantibiotici skupine I i II mogu biti tip a ili tip b. U skupini lantibiotika I (nisin, epidermin, subtilin) dehidratacija prepeptida katalizirana je enzimom LanB, dok je LanC uključen u formiranje tioetera. Modificirani prepeptid obrađuje serin proteaza LanP i translocira se pomoću ABC – transportera LanT. Lantibiotici II (citolizin, laktin 481 i mersacidin)

modificirani su LanM enzimom (McAuliffe i sur., 2001; Van Kraaij i sur., 1999), a obrada prepeptida se odvija zajedno s transportom LanT(P).



Slika 2. Biosinteza lantibiotika: (1) Formiranje prebakteriocina; (2) Prebakteriocin modificiraju LanB i LanC, translociran je pomoću ABC – transportera LanT i procesiran od strane LanP, rezultat je biološki aktivan bakteriocin; (3) Histidin protein kinaza (HPK) se u prisutnosti bakteriocina autofosforilira; (4) Fosforilna grupa (P) transferira se na molekulu regulator (RR); (5) RR aktivira transkripciju regulatornih gena; i (6) sinteza proteina LanI i LanFEG koji osiguravaju imunost bakterije domaćina na bakteriocine (Chen i Hoover, 2003)

Razred bakteriocina II ne mora proći kroz opsežnu posttranslacijsku modifikaciju kao lantibiotici (slika 3). Nakon što se formira prepeptid, uklanja mu se vodeći peptidna sekvenca i istodobno se transportira iz stanice pomoću ABC – transportera i dodatnog proteina (Ennahar i sur., 2000; Nes i sur., 1996).



Slika 3. Biosinteza bakteriocina II: (1) Sinteza prebakteriocina i prepeptida indukcijskog faktora (IF); (2) Prebakteriocin i pre-IF su procesirani i translocirani ABC- transporterom, nastaju aktivni bakteriocin i IF; (3) U prisutnosti IF histidin protein kinaza se autofosforilira; (4) Fosforilna grupa (P) transferira se na molekulu regulator (RR); (5) RR aktivira transkripciju regulaturnih gena; (6) Proteini na membrani stanice prepoznaju bakteriocine i osiguravaju imunost domaćina (Chen i Hoover, 2003)

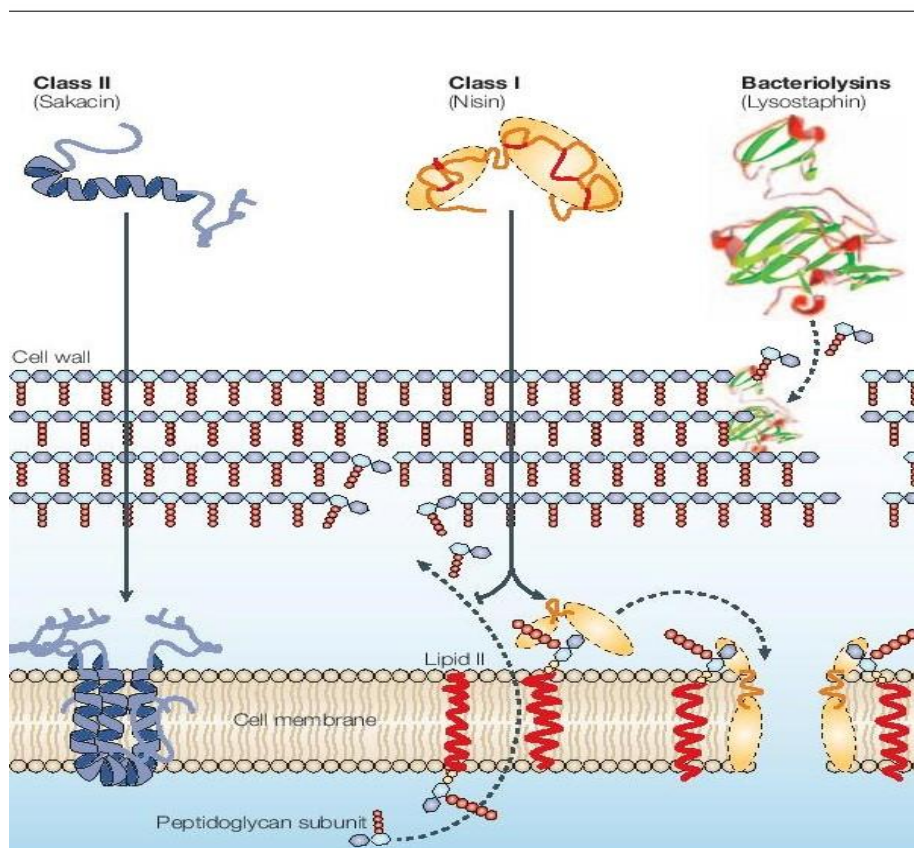
2.2.2. Regulacija biosinteze

Biosinteza lantibiotika i nelantibiotika regulirana je dvo-komponentnim sustavom (Nes i sur., 1996). Histidin protein kinaza (HPK) je vezana na membranu stanice koja, kada detektira određenu koncentraciju bakteriocina u okolišu, autofosforilira histidinski aminokiselinski ostatak u svojoj intracelularnoj domeni. Fosforilna skupina se transferira na asparginisku kiselinu regulatorne domene molekule regulatora čime su izazvane intramolekulske promjene koje uzrokuju aktivaciju regulatora (RR). Aktivni RR aktivira transkripciju reguliranih gena. Regulirani geni uključuju strukturni gen, gene odgovorne za transport proteina i za imunitet stanice, a u nekim slučajevima i regulatorne gene samih reguliranih gena (Kuipers i sur., 1998).

Bakteriocini razreda I (nisin i subtilin) reguliraju vlastitu biosintezu putem transdukcije signala (Guder i sur., 2000; Kuipers i sur., 1995). Većina bakteriocina razreda II su prvo sintetizirani peptidi bez antimikrobne aktivnosti i koriste se kao indukcijski faktor (IF) koji

aktivira transkripciju reguliranih gena. IF je mali, toplinski stabilan, kationski i hidrofoban peptid, koji se prvotno sintetizira kao prepeptid s dvostrukom glicin vodećom sekvencom. ABC – transporter cijepa vodeću sekvencu pre-IF , nastaje aktivni IF koji se izlučuje izvan stanice. Tada IF djeluje kao vanjski signal koji potiče transkripciju gena uključenih u sintezu bakteriocina (Ennahar i sur., 2000; Nes i sur., 1996).

Bakterije mliječne kiseline imaju razvijen mehanizam kojim razlikuju vlastite stanice od drugih bakterija npr. onih koje uzrokuju kvarenje hrane ili su patogene (slika 4) (Cotter i sur., 2005). Zaštita vlastitih stanica može biti osigurana posebnim imunitetnim proteinom i/ili specijaliziranim ABC – transportnim proteinima koji uključuju dvije ili tri podjedinice zadužene za odbijanje bakteriocina od membrane proizvođača (Stein i sur., 2005; Guder i sur., 2002; Otto i sur.,1998; Rince i sur., 1997). Imunitetni proteini rijetko nalikuju jedni drugima, takvi mehanizmi su visoko specifični i obično ne pružaju zaštitu protiv drugih bakteriocina, nego samo vlastitih (Stein i sur., 2005).



Slika 4. Način djelovanja bakteriocina bakterija mliječne kiseline. Bakteriocini I (lantibiotici) kao što je nisin, imaju dva načina djelovanja. Oni se mogu vezati na lipid II, glavne molekule

koja transportira peptidoglikanske podjedinice iz citoplazme do staničnog zida i time spriječiti ispravnu sintezu stanične stjenke što dovodi do smrti stanice. Isto tako mogu koristiti lipid II za deformaciju stanične membrane, te nastajanje pora i brze smrti stanice. Bakteriocini II imaju amfifilnu spiralnu strukturu, koja im omogućuje da se ugrade u membranu ciljane stanice što dovodi do depolarizacije i smrti. Veliki bakteriolitički proteini (bakteriocini III, bakteriolizini) poput lizostafina djeluju izravno na stanični zid Gram-pozitivnih bakterija te dolazi do lize stanice (Cotter i sur., 2005)

2.3. PRIMJENA BAKTERIOCINA

Proizvođači hrane suočeni su s velikim izazovom u kojem potrošači zahtijevaju sigurnost namirnica koje imaju dugi rok trajanja, te da su minimalno obrađene i ne sadrže kemijske konzervanse. Upotreba bakteriocina je opcija koja bi mogla pružiti barem dio rješenja. Organizmi prisutni u hrani proizvode bakteriocine, oni su obično toplinski stabilni spojevi i mogu inhibirati patogene organizme koji uzrokuju probleme u minimalno obrađenim prehrambenim proizvodima. Međutim, trenutno samo nisin i pediocin PA-1/AcH imaju široku primjenu. Nisin se koristi u obliku pripravka Nisaplin (Danisco) koji sadrži 2,5% nisina s NaCl (77,5%) i nemasno mlijeko (12% proteina i 6% ugljikohidrata). Pediocin PA-1 je komercijalno korišten u obliku ALTA 2431 (Quest) – sadrži fermentirane sastojke koje proizvodi bakterija *Pediococcus acidilactici* (Rodriguez i sur., 2002). Primjenjuje se u nekoliko američkih i europskih patenata (Ennahar i sur., 2000).

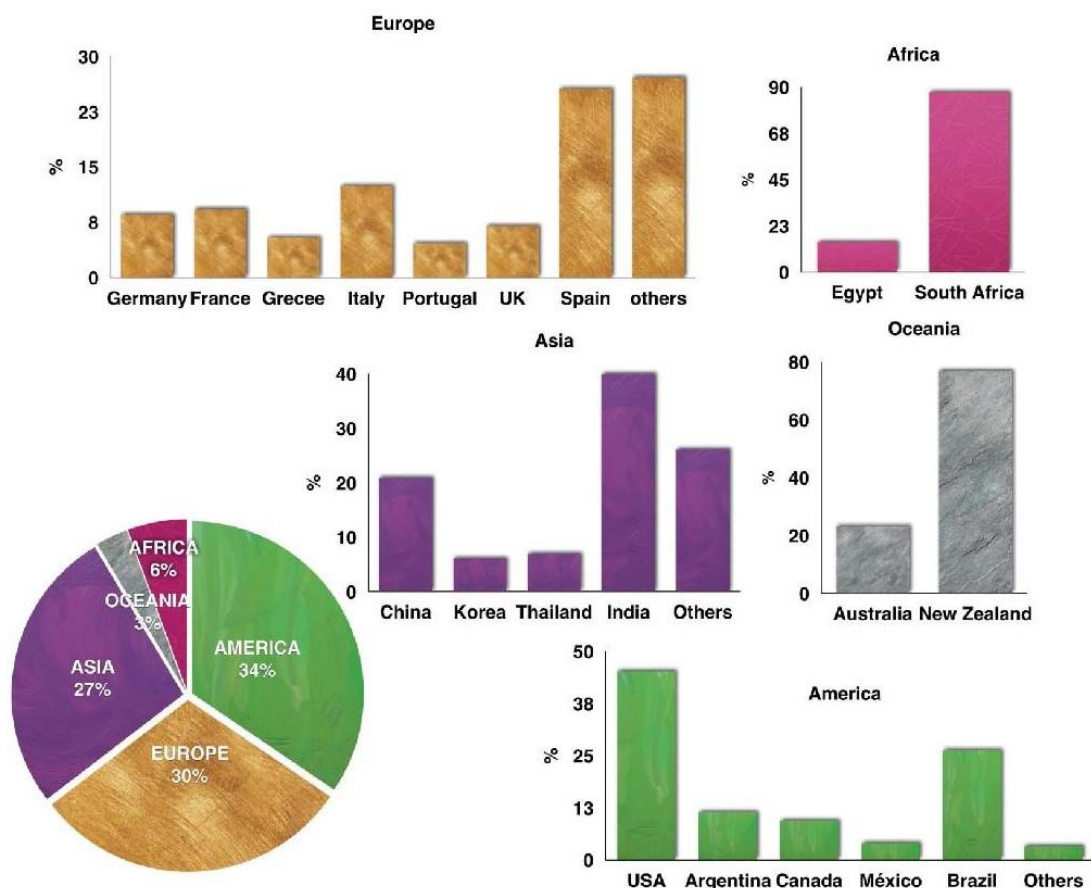
Da bi se bakteriocin mogao koristiti treba ispuniti važne kriterije: bakterijski soj koji ga proizvodi treba imati GRAS status, treba imati širok spektar inhibicije koji uključuje patogene mikroorganizme, mora biti toplinski stabilan spoj, nije povezan s zdravstvenim rizikom za ljude, treba imati benefitarne učinke na kvalitetu i okus namirnice i visoku specifičnu aktivnost (Holzapfel i sur., 1995).

Bakteriocini se u biokonzerviranju hrane mogu koristiti na tri načina (Schillinger i sur., 1996):

- (1) inokulacija hrane s kulturom bakterije mliječne kiseline koja proizvodi bakteriocin i (sposobnost bakterija mliječne kiseline da raste i proizvodi bakteriocin u prehrambenim proizvodima je presudno za uspješnu uporabu)
- (2) dodavanje pročišćenih ili polupročišćenih bakteriocina kao konzervansa hrani
- (3) korištenje namirnice koja je prethodno fermentirana kulturom bakterije mliječne kiseline.

2.3.1. Korištenje bakteriocina u 21. stoljeću

Primjena bakteriocina u medicinskom području uključuje prevenciju i liječenje od patogenih mikroorganizma koji su rezistentni na određene lijekove. Budući da je način djelovanja bakteriocina različit od konvencionalnih antibiotika, oni se smatraju novim potencijalnim i učinkovitim kontrolnim agensima u borbi protiv mikrobnih patogena. Alternativne primjene istražuju se u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji u cijelom svijetu (slika 5) (López-Cuellar i sur., 2016). Nova pravila i propisi na međunarodnom tržištu mijenjaju perspektivu navedenih industrija u svijetu. Prirodni proizvodi trebaju zadovoljiti visoke standarde kvalitete i sigurnosti pogotovo u tehnologiji koja koristi prirodne konzervanse i biorazgradive materijale u pakiranju hrane (Espitia i sur., 2014).



Slika 5. Globalni prikaz kontinenata i država koje se bave istraživanjima bakteriocina u razdoblju od 2004. do 2015. godine (López-Cuellar i sur., 2016)

U posljednjem desetljeću, 37% objavljenih istraživanja odnosilo se na biomedicinsko područje (respiratorne, oralne, želučane i vaginalne infekcije), 29% na postupke očuvanja hrane, 25% na upotrebu bio-nanomaterijala, a 9% cjelokupnog istraživanja vezano je za veterinu.

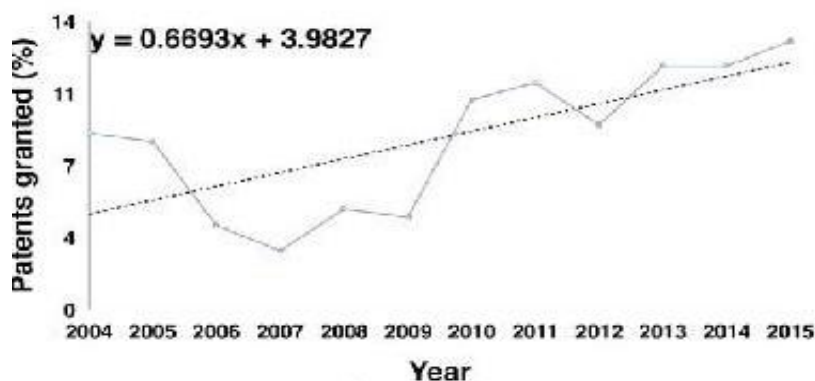
2.3.2. Antimikrobna aktivnost u pakiranju hrane i nanotehnologija

Pakiranje hrane s jestivim antimikrobnim aditivima u obliku filma omogućava inhibiciju nepoželjnih mikroorganizama tijekom skladištenja i distribucije (Guo i sur., 2014). Tako je ispitan odnos djelovanja bakteriocina nisina i biopolimera kitozana (prirodno vlakno iz hitina). U hrana koja je sadržavala nisin i bila zapakirana materijalom od kitozana, je zabilježena smanjena koncentracija bakterija iz roda *Listeria* u odnosu na hranu koja nije bila zapakirana ovim biopolimerom (Muriel-Galet i sur., 2012). Bakteriocini se mogu imobilizirati kovalentnim vezama u sustav pakiranja i osiguravati stabilnost protiv proteolitičkih enzima (Bali i sur., 2014; Al-Mathkhury i sur., 2011).

Bakteriocini u obliku nanokapsula, koje su omotane nanoemulzijama, nanoliposomima, nanočesticama i nanovlaknima, su pokazale moguću primjenu u prehrambenoj industriji i medicini. Ahire i Dicks (2015) su dokazali da nisin s dihidrokibenzoičnom kiselinom inkorporiran u nanovlakna (poli-D,L-mliječna kiselina i polietilen oksid), inhibira rast biofilma formiranog od metilicin rezistentnog soja *Staphylococcus aureus*.

2.3.3. Bakteriocini na tržištu

U razdoblju od 2010. do 2015. godine odobreno je 154 patenta koji uključuju korištenje bakteriocina, što je 66% više nego prethodnih godina tj. u razdoblju od 2004. do 2009. godine kada je odobreno 81 patentna prijava (slika 6). Tada je 31% odobrenih patenata bilo za biomedicinsku uporabu, 29% za očuvanje hrane, 5% za veterinarsku primjenu, a 13% patenata je odobreno za proizvodnju i pročišćavanje bakteriocina, dok je 16% bilo za rekombinantne proteine ili molekularne modifikacije bakteriocina. Manji udio odnosio se na bio-nanomaterijalne ambalaže (López-Cuellar i sur., 2016).



Slika 6. Prikaz rasta odobrenih patenata bakteriocina u razdoblju od 2004. do 2015. godine (López-Cuellar i sur., 2016)

Iako je povećan broj odobrenih patenata, proces primjene bakteriocina je spor i očekuje se povećanje narednih godina. Širok spektar djelovanja bakteriocina, samih ili u kombinaciji, pruža snažne alternative u ciljanom suzbijanju djelovanja patogenih mikroorganizama. Tvrtnke koje rade na ovom području su AvidBiotics Corporation (Sjedinjene Američke Države), Lanthiopep BV (Nizozemska), Novacta Biosystems Ltd. (Ujedinjeno Kraljevstvo), Danisco, Christian Hansen i Novozymes (Danska). Navedene tvrtke razvile su inovativne primjene bakteriocina (López-Cuellar i sur., 2016). Christian Hansen proizvodi Bactoferm-LC, miješanu kulturu bakterija mliječne kiseline koje proizvode pediocin i sakacin A. Proizvod se koristi protiv bakterija iz roda *Listeria* u fermentiranim kobasicama. Ta tvrtka proizvodi i kulture *Lactobacillus sakei* i *Leuconostoc carnosum* 4010 za očuvanje mesnatih proizvoda (Aymerich i sur., 2008). Tvrtka Danisco proizvodi HOLDBAC, mješavinu bakterijskih kultura za inhibiciju rasta gram-pozitivnih patogena, kvasca, plijesni, heterofermentativnih bakterija i enterokoka. Poraslo je i proizvodnja bakteriocina kao rekombinantnog proteina, nastalog metodama genetičkog inženjerstva kao što je insercija vektora u stanicu producenta ili njihova direktna mutagenaza. Do sada je 18% odobrenih patenata u ovom biotehnološkom polju, a predviđena se da će se u sljedećih 10 godina udvostručiti broj dodijeljenih patenata i time dati evolucijski preokret na cijelu biotehnologiju (López-Cuellar i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu je korištena bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* i test-mikroorganizmi prikazani u tablici 2. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 2. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu i optimalni uvjeti uzgoja

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus plantarum</i>	SF15C	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	BHI, 37°C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	BHI, 37°C, aerobno

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće podloge:

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO₄x7H₂O 0,1; MnSO₄x7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test – mikroorganizama

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

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

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

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

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

3.1.3. Kemikalije

- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- etanol, apsolutni, „Kemika“, Hrvatska
- etanol, 96% „Kemika“, Hrvatska
- etanol, 70% „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- trikloroetena kiselina, „Fisher Scientific“, UK
- amonij-perokosodisulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- triclin, „Acros Organics“, SAD
- β -merkaptetanol, „Sigma“, SAD
- Coomassie Brilliant Blue R-250, „Sigma“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletlen), „Sigma“, SAD
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija

- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- izopropranol, „Kemika“, Hrvatska
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- proteinaza K, „Fermentas“, Kanada
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- standard za elektroforezu proteina (molekulaske mase 1-26,6 kDa, Ultra Low Molecular Weight MarkerTM), „Sigma-Aldrich“, Velika Britanija
- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- početnice „Invitrogen“, SAD
- žučne soli, „Torlak“, Srbija

3.1.4. Aparatura i pribor

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

- stalci za ependorffice
- stalci za epruvete
- pinceta
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- elektroforetska kadica, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- elektroforetska kadica, „Bio-Rad“, SAD
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio- Rad“, SAD
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT, Izrael
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama

Soj bakterija mliječne kiseline, *Lb. plantarum* SF15C je čuvan pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80°C u hranjivom bujonu s 15% (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u tablici 2.

3.2.2. Izolacija DNA

Volumen od 1,5 ml prekonoćne kulture *Lb. plantarum* SF15C se centrifugira i ispire u GTE puferu (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500 µl GTE pufera, uz dodatak lizozima (8 mg/500 µl) i RNA-ze (50 µl/ml), i inkubiraju 30 minuta pri 37°C. Zatim se doda 250 µl 2% SDS-a i vorteksira 1 min. Nakon toga se doda 100 µl neutralnog fenol-kloroforma, vorteksira 30 sekundi i centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Supernatant, bez interfaze, se pomiješa s 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8), i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) slijedi centrifugiranje na 13 000 o/min tijekom 10 minuta. Talog se resuspendira u 300 µl 0,3 M NaAc i 10 mM MgCl₂ i vorteksira. Nakon dodatka 700 µl apsolutnog etanola (ohlađenog na -20°C), uzorak se inkubira preko noći pri -20°C. Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 14000 o/min tijekom 20 minuta. Talog se suspendira u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na -20°C) i ponovno centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Talog DNA se resuspendira u 50 µl TE (10mM Tris (pH 7,8) i 1mM EDTA) pufera.

3.2.3. PCR (Polymerase chain reaction)

Umnožavanje DNA molekule PCR metodom je provedeno u DNA-termobloku, Mastercycler personal, "Eppendorf". Kao DNA-kalup korištena je cjelokupna DNA bakterijskih stanica izolirana kao što je to opisano u poglavlju 3.2.2. Za sintezu željenog fragmenta DNA korištene su oligonukleotidne početnice konstruirane za gene, koji kodiraju za različite bakteriocine, prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Početnice korištene u PCR reakcijama za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocine

Ciljani gen	Bakteriocin	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Očekivana veličina PCR produkta	Literatura
<i>plnA</i>	Plantaricin A	GTACAGTACTAAT GGGAG	CTTACGCCAATCT ATACG	320 bp	Diep i sur., (1996); Remiger i sur., (1996)
<i>plnEF</i>	Plantaricin EF	GGCATAGTTAAAA TTCCCCC	CAGGTTGCCGCAA AAAAAG	428 bp	Anderssen i sur., (1998); Diep i sur., (1996)
<i>plnJ</i>	Plantaricin J	TAACGACGGATTG CTCTG	AATCAAGGAATTA TCACATTAGTC	475 bp	Anderssen i sur., (1998); Diep i sur., (1996)
<i>plnNC8</i>	Plantaricin NC8	GGTCTGCGTATAA GCATCGC	AAATTGAACATAT GGGTGCTTTAAAT TC	207 bp	Maldonado i sur., (2004)
<i>plnS</i>	Plantaricin S	GCCTTACCAGCGT AATGCCC	CTGGTGATGCAAT CGTTAGTTT	320 bp	Stephens i sur., (1998)
<i>plnW</i>	Plantaricin W	TCACACGAAATAT TCCA	GGCAAGCGTAAG AAATAAATGAG	165 bp	Holo i sur., (2001)

Sastav reakcijske smjese volumena 50 µl je prikazan u tablici 4. PCR reakcije su provedene prema uvjetima navedenim u tablici 5. Nakon reakcije, 20 µl reakcijske smjese je nanešeno na 1% agarozni gel i elektroforeza je provedena u kadici za elektroforezu pri naponu od 190 V. Nakon provedene elektroforeze, gel je 30 minuta inkubiran u otopini etidijevog bromida, koncentracije 0,5 µg/mL te zatim osvijetljen ultraljubičastim svjetlom u transiluminatoru i snimljen pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije

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

Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije za amplifikaciju početnica za plantaricine (Rojo-Bezares i sur., 2007)

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

3.2.4. Određivanje molekulske mase bakteriocina nakon taloženja s trikloroocetnom kiselinom primjenom tricin-SDS-PAGE

Prekonoćna kultura *L. plantarum* SF15C je uzgojena propagacijom u aerobnim uvjetima pri 37°C u 350 ml MRS bujona. Nakon inkubacije stanice su odvojene centrifugiranjem 30 min pri 4200 o/min. Dobiveni supernatant je tretiran trikloroocetnom kiselinom (TCA) u konačnoj koncentraciji 20 % s ciljem taloženja proteina prema Ogunbanwo i sur. (2003). Nakon dodatka

TCA uzorci su inkubirani 2 sata pri 4°C uz lagano miješanje na magnetnoj miješalici. Talog proteina je odvojen centrifugiranjem pri 16 000 rpm tijekom 40 min pri 4°C. Talog proteina je resuspendiran u destiliranoj vodi, te je provedena tricin SDS-PAGE prema Haider i sur. (2012).

Tricin SDS-PAGE

10 µl uzorka proteina je razrijeđeno s 10 µl pufera za uzroke i inkubirano pri 70°C tijekom 10 minuta. Pripremljeni uzorcima su nanošeni na 10%-tni tricin poliakrilamidni ge pomoću Hamilton igle. Elektroforeza je provedena u komori za elektroforezu, u puferu za elektroforezu, pri konstantnom naponu od 120 V kroz 90 min. Nakon završene elektroforeze, gel je bojan u otopini za bojanje tijekom 2 h. Nakon bojenja, gel je inkubiran u otopini za odbojavanje do obezbojenja pozadine te je nakon toga skeniran.

Priprava gelova:

gel za razdvajanje (10 %-tni)- donji gel(ukupnog voluma 10 ml):

2,5 M Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer pH 8,8	5,6 ml
30 % akrilamid	3,33 ml
destilirana voda	0,9 ml
TEMED	6 µl
APS (30 mg/ml)	150 µl

gel za sabijanje (4 %-tni)-gornji gel(ukupnog volumena 5 ml):

2,5 M Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer pH 8,8	0,76 ml
30% akrilamid	0,66 ml
destilirana voda	3,42 ml
TEMED	5 µl
APS (30 mg/ml)	150 µl

Pufer za elektroforezu (10 x koncentrat), za 1000 ml:

Tris	30,3 g
Tricin	45 g
SDS	5 g

Pufer za uzorke za elektroforezu (5 x koncentrat) (ukupnog volumena 10 ml):

Tris (100 mM)	0,12 g
---------------	--------

SDS (1%)	0,1 g
β-merkaptoetanol (4%)	0,4 ml
Coomassie Brilliant Blue (0,005%)	0,002 g
glicerol (24%)	10 ml

Otopina za bojanje:

Coomassie Brilliant Blue	0,025 g
Octena kiselina (10%)	100 ml

Otopina za odbojavanje:

10 % otopina octene kiseline

3.2.5. Kokultivacija soja *Lactobacillus plantarum* SF15C, nakon uzgoja sa i bez žučnih soli, uz test-mikroorganizme *Listera monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048

Proveden je združeni uzgoj *Lactobacillus plantarum* SF15C s test–mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *St. aureus* 3048, u svrhu provjere utjecaja kokultivacije na bakteriocinsku aktivnost soja producenta bakteriocina, *Lb. plantarum* SF15C, prema metodi Kos i sur. (2008). Uz kokultivaciju provjeren je i utjecaj uzgoja sojeva producenata bakteriocina uz dodatak žučnih soli u koncentraciji 1 mg/ml na proizvodnju bakteriocina kao jednog od stresnih okolišnih čimbenika za bakterije mliječne kiseline. Nakon prekonoćnog uzgoja bakterijske stanice su isprane dva puta s fiziološkom otopinom. Inokulirano je 10^7 CFU/ml soja producenta bakteriocina dok su test-mikroorganizmi inokulirani u broju 10^3 i 10^4 CFU/ml. Združeni uzgoj je proveden u 50 ml BHI bujona na način da su test–mikroorganizmi dodani 2 sata nakon dodatka soja *Lb. plantarum* SF15C. Proveden je i uzgoj svih ispitivanih sojeva zasebno u BHI bujonu pri istim uvjetima. Inkubacija je provedena aerobno 48 h pri 37°C. Tijekom prvih 10 sati uzimani su uzorci svaka 2 sata, jer se stanice tada nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, te su također uzeti uzorci nakon 22, 24 i 48 h inkubacije, u stacionarnoj fazi rasta. Nakon uzimanja svakog uzorka izmjerena je pH vrijednost podloge. Broj živih stanica u uzrocima određivan je na MRS selektivnoj podlozi za *Lb. plantarum* SF15C, Baird-Parker podlozi za test-mikroorganizam *St. aureus* 3048 i ChromoBio® *Listeria* podlozi za test-mikroorganizam *L. monocytogenes*.

MRS ploče su inkubirane anaerobno, dok su Baird-Parker i ChromoBio® Listeria agar ploče inkubirane aerobno 48 sati pri 37°C te je nakon inkubacije određivan broj bakterijskih stanica izražen kao log CFU/ml.

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

Tijekom kokultivacije također je provedeno ispitivanje bakteriocinske aktivnosti prema istim test–mikroorganizmima koji su korišteni za indukciju sinteze bakteriocina, primjenom metode s dvostrukim slojem agara. Ispitivanje bakteriocinske aktivnosti je provedeno nakon 4, 6, 8, 10, 22 i 24 h inkubacije, pri čemu su uzorci naciyepljeni na MRS agar. Ploče su inkubirane anaerobno preko noći pri 37°C. Ploče naciyepljene s uzorcima nakon kokultivacije s test–mikroorganizmom *St. aureus* 3048 su prelivene s 10 ml BHI „soft“ agara (0,7%) koji je prethodno inokuliran s istim test-mikroorganizmom. Ploče naciyepljene s uzorcima nakon kokultivacije s test–mikroorganizmom *L. monocytogenes* ATCC 19111 su prelivene s 10 ml BHI „soft“ agara (0,7%) koji je prethodno inokuliran s tim istim test–mikroorganizmom. Ploče su inkubirane aerobno preko noći pri 37°C. Nakon inkubacije izmjereni su promjeri porasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID) te se izračunao efektivni inhibicijski odnos (EIR) prema sljedećem izrazu (Coeuret i sur., 2004):

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

$\text{EIR} < 0,5$ – slaba inhibicija

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

$\text{EIR} > 1,5$ – jaka inhibicija

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. DETEKCIJA GENA KOJI KODIRAJU ZA BAKTERIOCINE I ODREĐIVANJE MOLEKULSKE MASE BAKTERIOCINA

Bakteriocini koje proizvode BMK su ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi ili proteini koji djeluju antimikrobno prema srodnim Gram-pozitivnim bakterijama (Šušković i sur., 2010). Bakterijska vrsta *Lactobacillus plantarum* proizvodi bakteriocine koji su nazvani plantaricini. Plantaricini su u literaturi jedni od najbolje opisanih bakteriocina pa je u ovom radu ispitan veći broj početnica za detekciju gena za plantaricine pri čemu je kao ispitivan soj korišten *Lactobacillus plantarum* SF15C. U PCR reakciji za detekciju gena koji kodiraju za plantaricine odabrane početnice su prikazane u tablici 3. Kao negativna kontrola korišten je uzorak bez dodane bakterijske DNA, čime se provjerava da DNA fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica (tablica 6). U svim ispitivanim sojevima *L. plantarum* detektirani su geni za određene plantaricine (tablica 6).

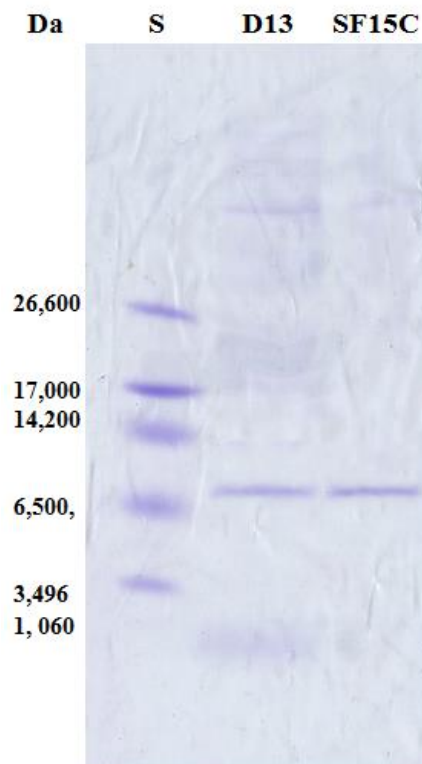
Tablica 6. Usporedba rezultata dobivenih nakon provođenja PCR reakcija za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocine (Pln – plantaricin)

Soj:	PlnA	PlnEF	PlnJ	PlnNC8	PlnS	PlnW
<i>L. plantarum</i> SF15C	+	+	+	-	-	-
negativna kontrola	-	-	-	-	-	-

+ detektiran gen za bakteriocin; - nije detektiran gen za bakteriocin

Prema dobivenim rezultatima PCR reakcija za detekciju gena koji kodiraju za bakteriocine vidljivo je da niti u jednoj negativnoj kontroli ne dolazi do dimerizacije korištenih početnica pa DNA vrpce dobivene sa specifičnim početnicama za detekciju gena za bakteriocine ukazuje na pozitivan rezultat PCR reakcije. Tablica 7 pokazuje da su pozitivni rezultati dobiveni za početnice za detekciju gena koji kodiraju za PlnA, PlnEF i PlnJ.

Tricine-SDS-PAGE elektroforezom je ustanovljena molekulska masa bakteriocina koja iznosi oko 7 kDa za plantaricin soja *L. plantarum* SF15C (Slika 7).



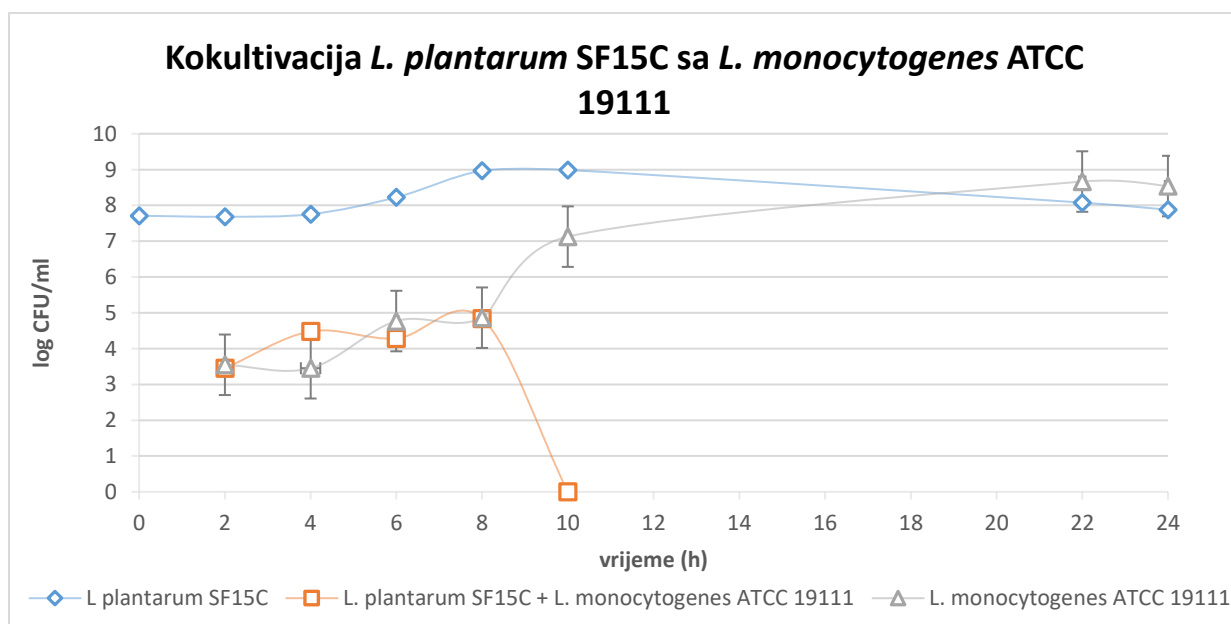
Slika 7. Određivanje molekulske mase bakteriocina nakon taloženja s trikloroocetnom kiselinom primjenom Tricine-SDS-PAGE: S- standard, SF15C - *L. plantarum* SF15C

4.2. INDUKCIJA BAKTERIOCINSKE AKTIVNOSTI KOKULTIVACIJOM S TEST-MIKROORGANIZMIMA

Antimikrobno djelovanje sojeva bakterija mliječne kiseline potječe prvenstveno od nespecifičnog inhibicijskog utjecaja mliječne kiseline, ali isto tako može biti i posljedica proizvodnje specifičnih supstancija kao što su bakteriocini. Bakteriocini su mali, ribosomski sintetizirani, peptidi ili proteini s antimikrobnim djelovanjem, u prvom redu prema srodnim bakterijskim vrstama (De Vuyst i Vandamme, 1994). Djeluju inhibitorno uglavnom prema srodnim Gram-pozitivnim bakterijama, uključujući i patogene u hrani kao što su *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*, dok je stanica producent imuna na proizvedeni bakteriocin (Šušković i sur., 2010). Na biosintezu bakteriocina utječe niz čimbenika, primjerice pH vrijednost medija, temperatura, faza rasta mikroorganizma producenta, no smatra se da je prisutnost mikroorganizma koji je osjetljiv na bakteriocinsko djelovanje presudan čimbenik. Stoga je u ovom radu ispitano antimikrobno djelovanje bakterijskog soja *Lactobacillus*

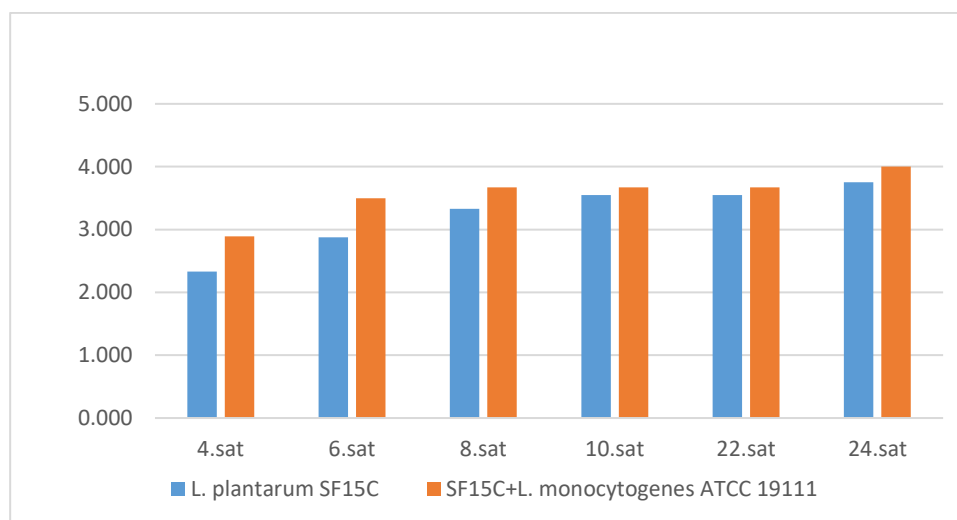
plantarum SF15C, prema test-mikroorganizmima *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048, nakon kokultivacije s istim test-mikroorganizmima.

Dakle, proveden je združeni uzgoj *Lactobacillus plantarum* SF15C s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048, u svrhu provjere utjecaja kokultivacije na bakteriocinsku aktivnost soja producenta bakteriocina (slike 8 i 11). Tijekom kokultivacije *L. plantarum* SF15C s navedenim test-mikroorganizmom provjeravana je stimulacija bakteriocinske aktivnosti ispitivanjem inhibicijskog učinka soja producenta nakon 4, 6, 8, 10, 22 i 24 sata metodom s dvostrukim sojem agara (slika 9). Ujedno je ovom metodom ispitana bakteriocinska aktivnost *L. plantarum* SF15C prema test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048 i bez prethodne kokultivacije s navedenim test-mikroorganizmom (slike 9 i 12). Prednost ove metode, u odnosu na ostale, kojima se ispituje antibakterijska aktivnost supernatanta, je u tome što mikroorganizam producent tijekom rasta luči antimikrobne supstancije direktno u podlogu na kojoj se testira inhibicija rasta test-mikroorganizma. Zone inhibicije označavaju antibakterijsko djelovanje ispitnog soja prema ispitanim bakterijama mliječne kiseline. Efektivni inhibicijski odnosi, koji uključuju promjere zona porasle kulture čije se antimikrobno djelovanje ispituje i promjere zona inhibicije korištenih test-mikroorganizama



Slika 8. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *L. plantarum* SF15C (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta *L. plantarum* SF15C (plava linija) i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (siva linija) u monokulturi

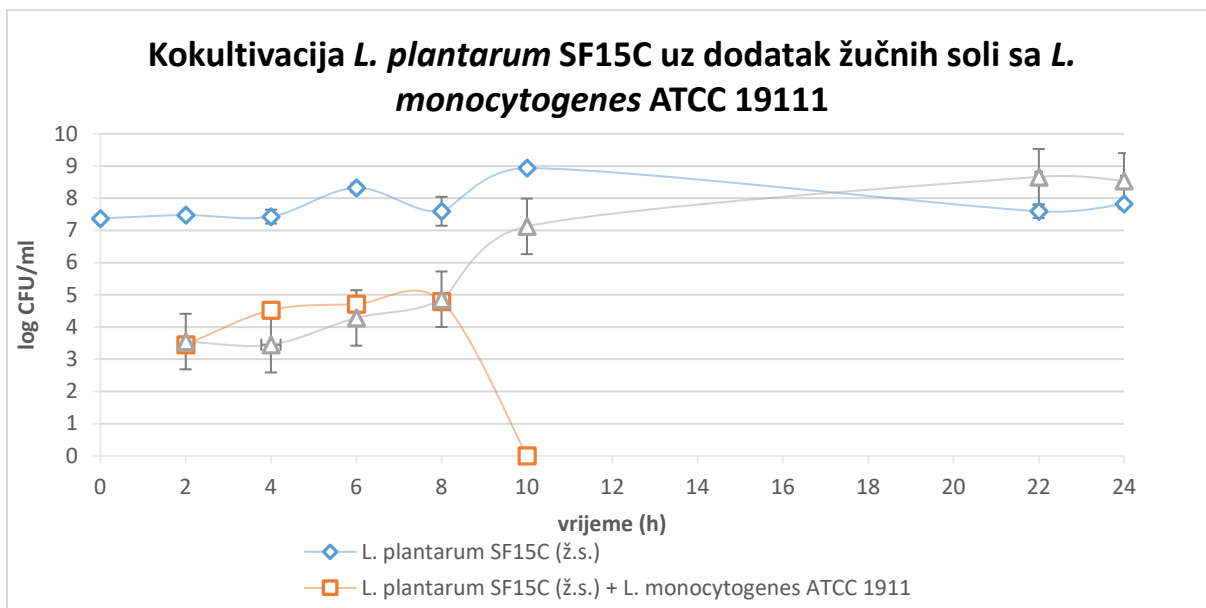
Iz rezultata kokultivacije vidljivo je da koncentracija test-mikroorganizam *L. monocytogenes* ATCC19111 nakon osmog sata naglo pada te je u desetom satu ravna nuli što ukazuje na baktericidno djelovanje bakterije *L. plantarum* SF15C prema ispitivanom test-mikroorganizmu (slika 8).



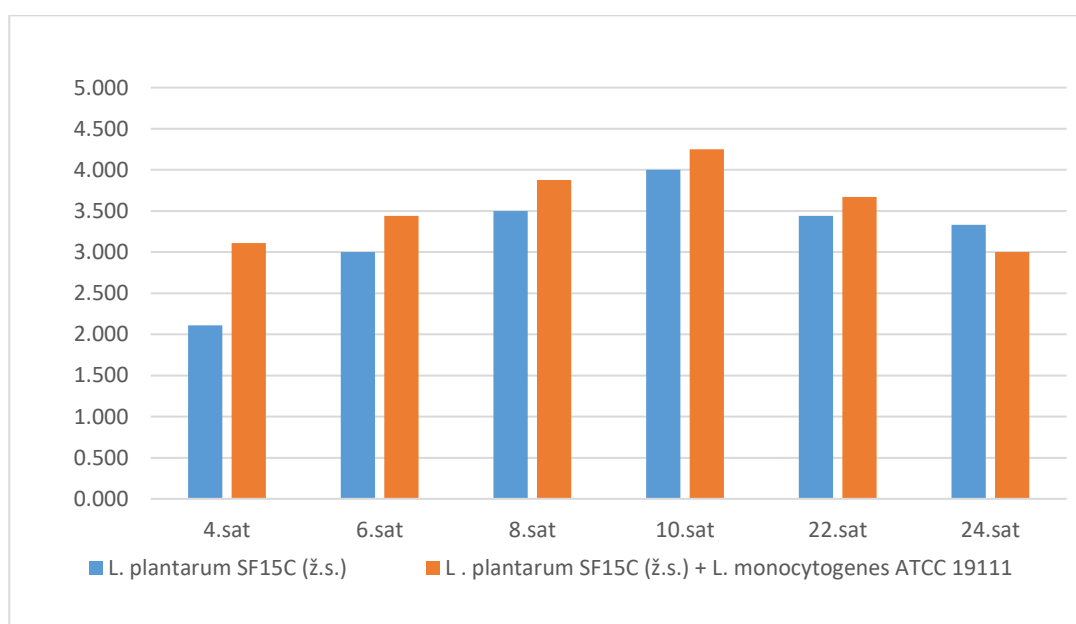
Slika 9. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 s *Lactobacillus plantarum* SF15C bez prethodne kokultivacije (plavi stupac) i nakon kokultivacije s *L. monocytogenes* ATCC19111 (narančasti stupac)

Rezultati određivanja efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 s *Lactobacillus plantarum* SF15C, bez prethodne kokultivacije te nakon kokultivacije ispitivanog soja s test-mikroorganizmom *Listeria monocytogenes* ATCC 1911, pokazuju da se veći inhibični učinak postiže kokultivacijom sojeva te je najveći nakon 24 sata inokulacije (slika 9).

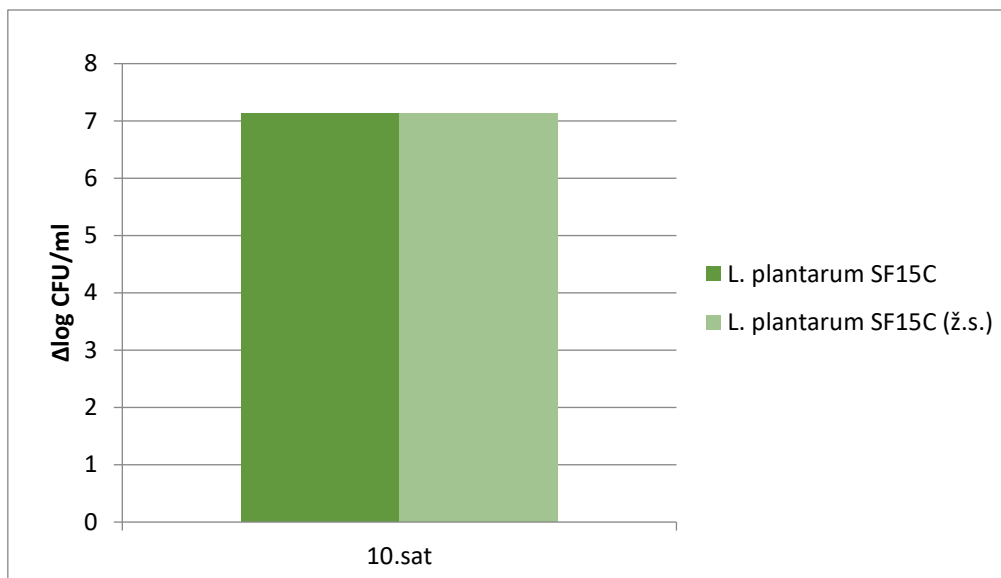
Kako bi se dodatno osigurali stresni uvjeti koji bi trebali potaknuti proizvodnju bakteriocina, uzgoj soja *L. plantarum* SF15C je proveden u kokultivaciji s test-mikroorganizmom i uz dodatak žučnih soli te je na isti način ispitano antimikrobno djelovanje (slike 10 i 11).



Slika 10. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *L. plantarum* SF15C uz dodatak žučnih soli (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta *L. plantarum* SF15C uz dodatak žučnih soli (plava linija) i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (siva linija) u monokulturi



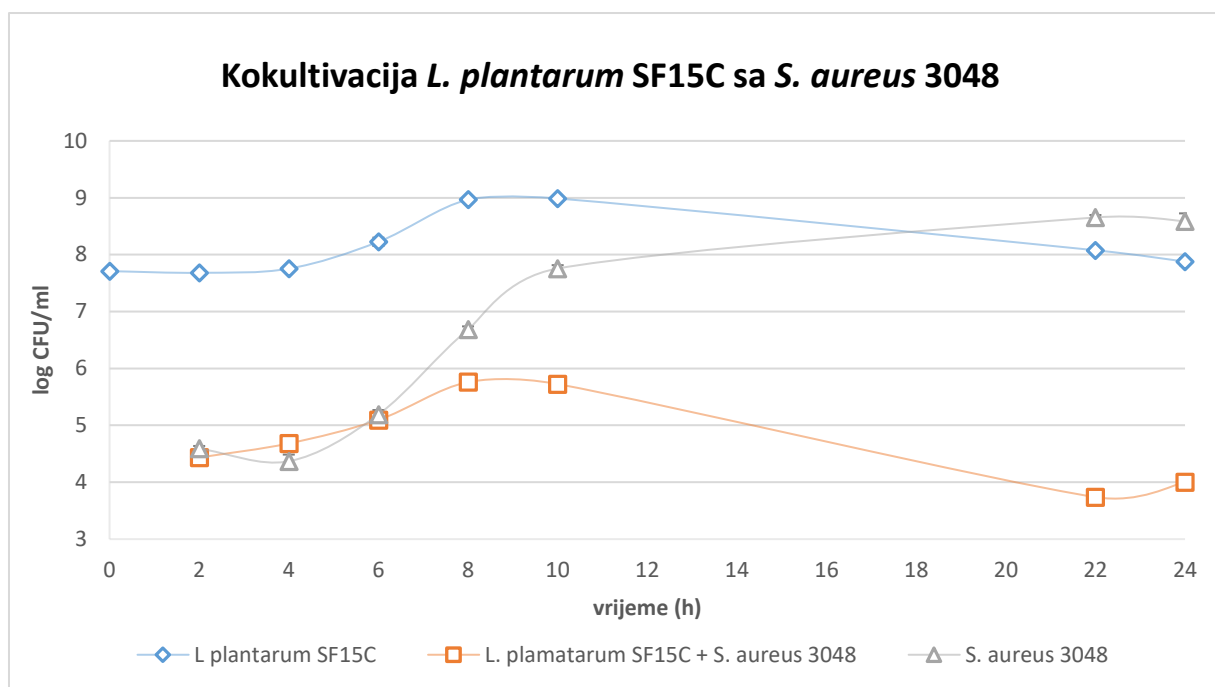
Slika 11. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 sa *Lactobacillus plantarum* SF15C uzgojenog u prisutnosti žučnih soli bez prethodne kokultivacije (plavi stupac) i nakon kokultivacije s *L. monocytogenes* ATCC 19111 (narančasti stupac)



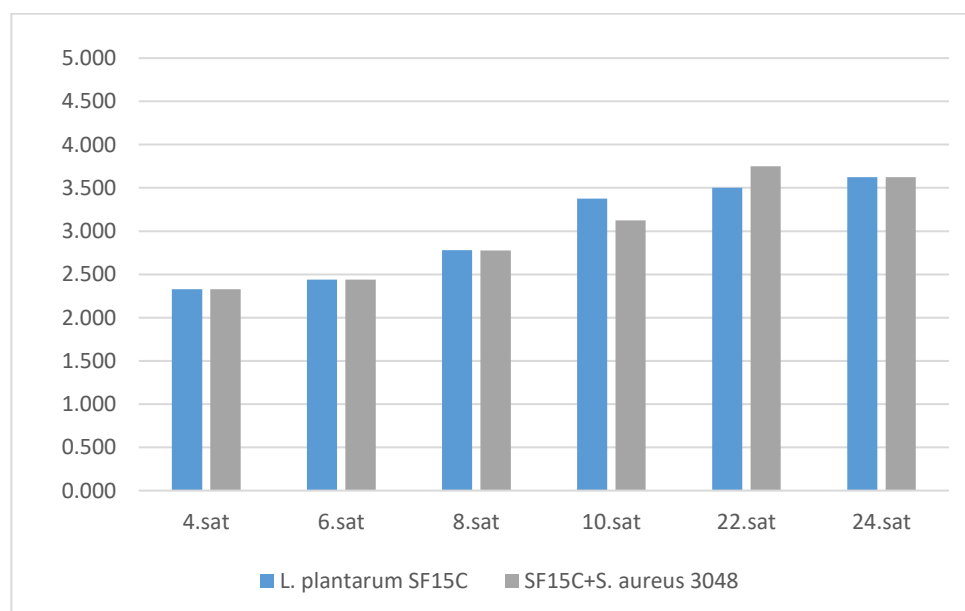
Slika 12. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 tijekom kokultivacije s *L. plantarum* SF15C sa i bez dodatka žučnih soli koja je prikazana kao razlika logaritamskih vrijednosti (Δ log CFU/ml) *L. monocytogenes* ATCC 19111 nakon 10 h inkubacije u monokulturi i tijekom kokultivacije s *L. plantarum* SF15C sa i bez dodatka žučnih soli

Rezultati kokultivacije *L. plantarum* SF15C i test-mikroorganizma uz dodatak žučnih soli pokazali su se vrlo sličnim onima bez dodatka žučnih soli te je koncentracija *L. monocytogenes* ATCC 19111 nakon osmog sata također počela naglo opadati te u desetom satu iznosi 0 (slika 10). Dodatak žučnih soli kao stresnog okolišnog čimbenika za bakterije mliječne kiseline, nije potaknuo dodatnu indukciju biosinteze bakteriocina s *L. plantarum* SF15C tijekom kokultivacije što je vidljivo na slici 12, na kojoj je prikazana usporedba inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 tijekom kokultivacije s *L. plantarum* SF15C sa i bez dodatka žučnih soli u 10. satu kokultivacije.

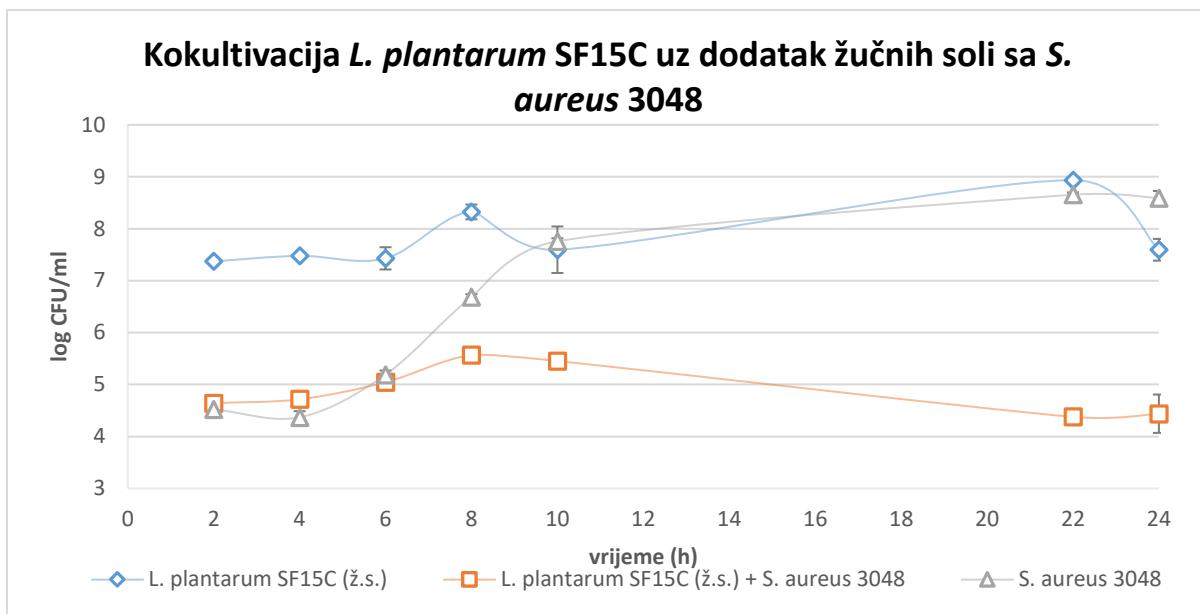
Na kraju eksperimenta (u 48. satu), pH vrijednost medija je iznosila 4,5. Pri višim koncentracijama mliječne kiseline u uzorcima nakon 48 h kokultivacije nije ustanovljena inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 metodom difuzije s rupama u agaru (rezultati nisu prikazani). Kako *L. monocytogenes* ATCC 19111 nije osjetljiva na djelovanje mliječne kiseline koja je uzrokovala snižavanje pH vrijednosti hranjive podloge, inhibicijsko djelovanje *L. plantarum* SF15C ukazuje na njegovu bakteriocinsku aktivnost.



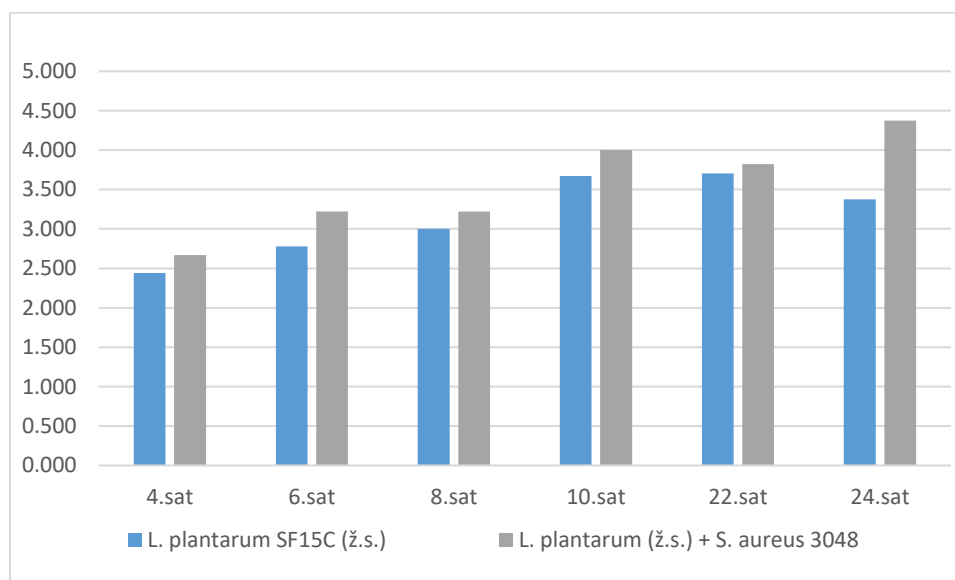
Slika 13. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *L. plantarum* SF15C (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta *L. plantarum* SF15C (plava linija) i *S. aureus* 3048 (siva linija) u monokulturi. Rast *L. plantarum* SF15C u kokultivaciji s test-mikroorganizmom *S. aureus* 3048 odgovara rastu u monokulturi



Slika 14. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta *S. aureus* 3048 s *Lactobacillus plantarum* SF15C bez prethodne kokultivacije (plavi stupac) i nakon kokultivacije sa *S. aureus* 3048 (sivi stupac)



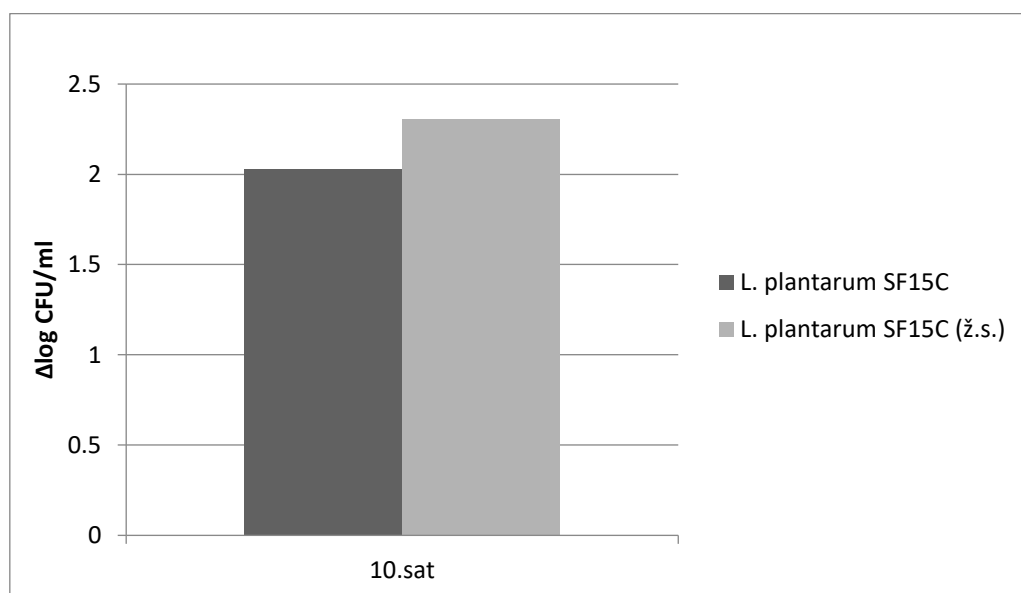
Slika 15. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *L. plantarum* SF15C uz dodatak žučnih soli (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta *L. plantarum* SF15C uz dodatak žučnih soli (plava linija) i *S. aureus* 3048 (siva linija) u monokulturi. Rast *L. plantarum* SF15C u kokultivaciji s test-mikroorganizmom *S. aureus* 3048 odgovara rastu u monokulturi



Slika 16. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta *S. aureus* 3048 s *Lactobacillus plantarum* SF15C uzgojenog u prisutnosti žučnih soli bez prethodne kokultivacije (plavi stupac) i nakon kokultivacije sa *S. aureus* 3048 (sivi stupac)

Kokultivacija s test-mikroorganizmom *S. aureus* 3048 pokazuje da je rast test-mikroorganizma *S. aureus* 3048 inhibiran nakon 10 sati uzgoja s *L. plantarum* SF15C, pri čemu je inhibični učinak ispitivanog soja prisutan do kraja praćenja rasta ispitivanog test-mikroorganizma (slika 13). Koncentracija test-mikroorganizma *Staphylococcus aureus* 3048, tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *L. plantarum* SF15C bez dodatka žučnih soli, je na kraju 4 log jedinica dok je njena koncentracija u uvjetima uz dodatak žučnih soli 4.5 log jedinice (slika 15). Time je prikazano da je inhibičijsko djelovanje bakteriocina prema *S. aureus* 3048 izraženije u uvjetima bez dodatka žučnih soli.

Uspoređujući učinak postignut kad su u hranjivu podlogu dodane žučne soli, inhibičijski učinak *L. plantarum* SF15C na rast *S. aureus* 3048 je ostao gotovo isti (slika 15), ali je bio nešto izraženiji na kraju eksponencijalne faze rasta *L. plantarum* SF15C u 10. satu kokultivacije, kao što je prikazano na slici 17. U skladu s tim rezultatom, ustanovljen je dodatni stimulacijski učinak žučnih soli na bakteriocinsku aktivnost soja *L. plantarum* SF15C (slika 16). Pri višim koncentracijama mliječne kiseline u uzorcima nakon 48 h kokultivacije nije ustanovljena inhibicija rasta *S. aureus* 3048 metodom difuzije s rupama u agaru (rezultati nisu prikazani). Stoga inhibičijsko djelovanje *L. plantarum* SF15C ukazuje na njegovu bakteriocinsku aktivnost.



Slika 17. Inhibicija rasta *S. aureus* 3048 tijekom kokultivacije s *L. plantarum* SF15C sa i bez dodatka žučnih soli koja je prikazana kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log \text{CFU/ml}$) *S. aureus* 3048 nakon 10 h inkubacije u monokulturi i tijekom kokultivacije s *L. plantarum* SF15C sa i bez dodatka žučnih soli

Slične rezultati se mogu vidjeti i kod drugih znanstvenika. Tako su Mills i suradnici (2011) dokazali da soj *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358, izoliran iz mekog francuskog sira, proizvodi bakteriocin koji strukturno odgovara plantaricinu 423 pri čemu je dokazano baktericidno djelovanje prema sojevima *Listeria innocua* i *Listeria monocytogenes*. Metodom difuzije s rupama u agrau je dokazano da *Lb. plantarum* LMG P-26358 u kombinaciji s producentom nisina efektivno inhibira rast *L. innocua*. Wilson i suradnici (2005) su kokultivacijom sojeva *Lactobacillus plantarum* SK1 i *Listeria monocytogenes* UMCC98 u MRS bujonu pokazali je antagonističko djelovanje *Lb. plantarum* SK1 prema *L. monocytogenes* u kasnoj logaritamskoj fazi rasta. Kokultivacijom bakterije *Lactobacillus plantarum* s kliničkim patogenima *Escherichia coli* NG 502121 i *Staphylococcus aureus* AY 507047 zabilježena je značajna redukcija rasta oba patogena (Shah i sur., 2016).

5. ZAKLJUČCI

1. PCR reakcija pokazuje da su dobiveni pozitivni rezultati detekcije plantaricina (PlnA, PlnEF, PlnJ) kod bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* SF15C, te je Tricine-SDS-PAGE elektroforezom ustanovljena molekulska masa plantaricina koja iznosi oko 7 kDa.
2. Kokultivacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* SF15C s test-mikroorganizmom *Listera monocytogenes* ATCC 19111, je povećala antimikrobno djelovanje prema tom test-mikroorganizmu, dok dodatak žučnih soli nije potaknuo dodatnu indukciju biosinteze bakteriocina *L. plantarum* SF15C.
3. Koncentracija *Staphylococcus aureus* 3048, tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *L. plantarum* SF15C bez dodatka žučnih soli, je na kraju 4 log jedinica dok je njena koncentracija u uvjetima uz dodatak žučnih soli 4.5 log jedinice. Time je prikazano da je inhibicijsko djelovanje bakteriocina prema *S. aureus* 3048 izraženije u uvjetima bez dodatka žučnih soli.
4. Metodom s dvostrukim slojem ustanovljeno je da *L. plantarum* SF15C jače inhibira rast test-mikroorganizma *S. aureus* 3048 nakon kokultivacije s istim test-mikroorganizmom, a ustanovljen je i dodatan stimulacijski učinak žučnih soli na bakteriocinsku aktivnost soja *L. plantarum* SF15C.

6. LITERATURA

Ahire, J.J., Dicks, L.M. (2015) Nisin incorporated with 2,3-dihydroxybenzoic acid in nanofibers inhibits biofilm formation by a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Probiotic Antimicro Proteins*. **7**, 52–59.

Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q., Imran, M. (2010) *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: An overview. *Afr. J. Biotechnol.* **9**(20), 2843–2850.

Al-Mathkhury, H.J., Ali, A.S., Ghafil, J.A. (2011) Antagonistic effect of bacteriocin against urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *N. Am. J. Med. Sci.* **3**, 367–370.

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

Aymerich, T., Picouet, P.A., Monfort, J.M. (2008) Decontamination technologies for meat products. *Meat Sci.* **78**, 114–129.

Bali, V., Panesar, P.S., Bera, M.B., Kennedy, J.F. (2016) Bacteriocins: Recent trends and potential applications. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **56**(5), 817-834.

doi:10.1080/10408398.2012.729231

Bali, V., Panesar, P.S., Bera, M.B. (2014) Potential of immobilization technology in bacteriocin production and antimicrobial packaging. *Food. Res. Int.* **30**, 244–263.

Chen, H., Hoover, D.G. (2003) Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**, 82-100.

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

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(10), 777-788.

Delves-Broughton, J. (1990) Nisin and its application as a food preservative. *J. Soc. Dairy Technol.* **43**, 73-76.

De Vuyst, L., Leroy F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 194-199.

De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994) Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. U: Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance, (De Vuyst, L., Vandamme, E.J., ured.), Springer Science+Business Media, New York, str. 1-5.

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

Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., Prevost, H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 564-582.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 85-106.

Espitia, P.J.P., Du, W.X., Avena-Bustillos, R.J. (2014) Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties– a review. *Food Hydrocoll.* **35**, 287–296.

Fernandes, C.F., Shahani, K.M., Amer, M.A. (1987) Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 343-56.

Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J. (2005) Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure and mode of action. *J. Pept. Sci.* **11**, 688-696.

Guder, A., Schmitter, T., Wiedemann, I., Sahl, H.G., Bierbaum, G. (2002) Role of the single regulator MrsR1 and the two-component system MrsR2/K2 in the regulation of mersacidin production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 106–113.

Guder, A., Wiedemann, I., Sahl, H.G. (2000) Post-translationally modified bacteriocins-the lantibiotics. *Biopolymers* **55**, 62-73.

Gurr, M. (1987) Nutritional aspects of fermented milk products. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 337-42.

Guo, M., Jin, T.Z., Wang, L. (2014) Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control.* **40**, 64–70.

Haider, S. R., Helen, J.R., Sharp, B.L. (2012) Tricine-SDS-PAGE, U: Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, (Kurien, B.T., Scofield, R.H., ured.), Springer Science+Business Media, str. 81-91.

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

Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 343–362.

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

Joerger, M.C., Klaenhammer, T.R. (1990) Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J.Bacteriol.* **172**, 6339–6347.

Jozala, A.F., Andrade, M.S., Arauz, L.J., Pessoa, A., Vessoni-Penna, T.C. (2007) Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **136**, 515-528.

Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* **12**, 39–86.

Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Francesco, C. (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 699-707.

Kuipers, O.P., De Ruyter, P.G.G.A., Kleerebezem, M., De Vos, W.M. (1998) Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* **64**, 15-21.

Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., De Ruyter, P.G.G.A., Luesink, E.J., De Vos, W.M. (1995) Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* **270**, 27299-304.

López-Cuellar, M.D.R., Rodríguez-Hernández, A.I., Chavarría-Hernández N. (2016) LAB bacteriocin applications in the last decade, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. doi:10.1080/13102818.2016.1232605

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

McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill C. (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 285-308.

Mills, S., Serrano, L.M., Griffin, C., O' Connor, P.M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, P., Meijer, W.C. (2011) Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microbial Cell Factories*, **10**.

- Mulders, J.W., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J., Vos, W.M. (1991) Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* **201**, 581-584.
- Muriel-Galet, V., Lopez-Carballo, G., Gavara, R. (2012) Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *Int. J. Food. Microbiol.* **157**, 239–244.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 113-28.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I., Onilude, A. A. (2003) Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African J. Biotechnol.* **2**(8), 219-227.
- Otto, M., Peschel, A., Gotz, F. (1998) Producer self-protection against the lantibiotic epidermin by the ABC transporter EpiFEG of *Staphylococcus epidermidis* Tu3298. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 203–211.
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. (2007) Bacteriocins from Lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **50**(3), 521–542.
- Remiger, A., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. (1996) Identification of bacteriocin genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR). *Syst. Appl. Microbiol.* **19**, 28–34.
- Rince, A., Dufour, A., Uguen, P., Le Pennec, J.P., Haras, D. (1997) Characterization of the lactacin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes *lctF*, *lctE*, and *lctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4252–4260.
- Rilla, N., Martinez, B., Rodriguez, A. (2004) Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'I Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. *J. Food Prot.* **67**, 928-933.

Rodriguez, J. M., Martinez, M. I., Kok, J. (2002) Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42**, 91–121.

Rojo-Bezares B., Saenz Y., Navarrol L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F. (2007) Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiol.* **24**, 482-491.

Sahl, H.G., Bierbaum, G. (1998) Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 41-79.

Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H. (1996) Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends. Food. Sci. Technol.* **7**, 158-64.

Shah, N., Patel, A., Ambalam, P. i sur. (2016) Determination of an antimicrobial activity of *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum* against clinical pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in co-culture. *Ann. Microbiol.* **66**(3), 1137–1143.

Stein, T., Heinzmann, S., Dusterhus, S., Borchert, S., Entian, K. D. (2005) Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes *spaIFEG* in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J. Bacteriol.* **187**, 822–828.

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

Van Kraaij, C., De Vos, W.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. (1999) Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 575-87.

Wilson, A.R., Sigee, D., Epton, H.A.S. (2005) Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.* **99**(6), 1516-1522.