



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

Marcelina Natalia Karbowskiak

**Zastosowanie metabolitów bakterii  
fermentacji mlekowej (LAB) oraz bakterii  
kwasu octowego (AAB) do biokonserwacji  
mięsa i przetworów mięsnych**

Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) and Acetic Acid  
Bacteria (AAB) Metabolites for the Biopreservation of Meat  
and Meat Products

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem  
dr hab. inż. Doroty Zielińskiej, prof. SGGW

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, Katedra Technologii Gastronomicznej  
i Higieny Żywności, SGGW

Promotor pomocniczy: dr inż. Piotr Szymański

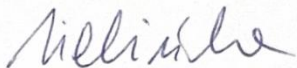
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład  
Technologii Mięsa i Tłuszczu w Warszawie

Warszawa 2026



**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej  
przygotowanej przez doktoranta Szkoły Doktorskiej SGGW**

Oświadczam, że **rozprawa doktorska autorstwa Marceliny Karbowiak została przygotowana pod moim kierunkiem na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 13/01 - 2026.....Czytelny podpis promotora .....

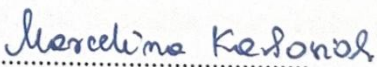
**Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej  
będącego doktorantem Szkoły Doktorskiej SGGW**

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że **niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW** i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 13.01.2026.....Czytelny podpis autora rozprawy .....



*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania moim Promotorom za nieocenione wsparcie, opiekę naukową oraz inspirujące zaangażowanie w proces realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.*

*Pani dr hab. Dorocie Zielińskiej, prof. SGGW wyrażam głęboką wdzięczność za przyjęcie mnie do zespołu badawczego, merytoryczne przewodnictwo, zaszczerpienie pasji do badań nad bakteriami fermentacji mlekowej, a także za życzliwość i przyjazną atmosferę towarzyszącą naszej współpracy na każdym jej etapie.*

*Panu dr Piotrowi Szymańskiemu dziękuję za możliwość realizacji części badań pod Jego opieką w Zakładzie Technologii Mięsa i Tłuszczu Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie oraz za nieustające wsparcie, otwartość i pozytywne nastawienie, które były dla mnie dużym źródłem motywacji.*

*Serdeczne podziękowania kieruję również do Pani prof. dr hab. Danuty Kołożyn-Krajewskiej za życzliwość oraz cenne uwagi i sugestie, które przyczyniły się do udoskonalenia niniejszej rozprawy, a także za powierzenie mi funkcji Sekretarza podczas Sympozjów Naukowych „Probiotyki i prebiotyki w żywności” oraz zachętę do aktywności w ramach Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności.*

*Z całego serca dziękuję także mojemu Mężowi i Synowi – dzięki Wam mogłam się realizować.*



## STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy była identyfikacja i charakterystyka metabolitów wytwarzanych przez bakterie fermentacji mlekowej (LAB) oraz bakterie kwasu octowego (AAB), odpowiedzialnych za ich aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii patogennych i psujących żywność, a także ocena możliwości zastosowania tych metabolitów, zarówno pojedynczych, jak i łączonych w mieszaniny, jako naturalnych, biologicznych środków konserwujących mięso i wyroby mięsne. Sformułowano trzy hipotezy badawcze, natomiast prowadzenie badań zaplanowano w trzech zasadniczych etapach, obejmujących analizy teoretyczne (Etap I), badania laboratoryjne (Etap II) oraz aplikacyjne wykorzystanie wybranych preparatów bakteryjnych w skali półtechnicznej (Etap III).

W badaniach wykorzystano dwa szczepy LAB – *L. paracasei* B1 oraz *L. plantarum* O24, pochodzące z kolekcji SGGW, które wybrano na podstawie wcześniejszych doniesień o ich właściwościach m.in. potencjalnie probiotycznych oraz postbiotycznych. Przygotowywano z nich trzy typy preparatów metabolitów bezkomórkowych: surowe, po inaktywacji cieplnej oraz po neutralizacji pH. Doświadczenia obejmowały także dwa szczepy AAB – *G. oxydans* KNS32 i *K. saccharivorans* KOM1, z których pozyskiwano supernatanty bezkomórkowe. Działanie przeciwbakteryjne oceniano z użyciem panelu szczepów wskaźnikowych reprezentujących zarówno bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne.

W części doświadczalnej wykorzystano dwa modele żywności: surowe mięso drobiowe, służące do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in situ*, oraz modelowy wyrób mięsny z mięsa wieprzowego, przygotowany w warunkach półtechnicznych z dodatkiem wybranych preparatów bakteryjnych.

Zakres metod obejmował systematyczną analizę literatury (PICO, PRISMA) oraz badania laboratoryjne i aplikacyjne, w tym ocenę składu i aktywności przeciwdrobnoustrojowej metabolitów, analizę synergii (MIC, FICI), charakterystykę genomową i proteomiczną szczepów LAB oraz ocenę stabilności i właściwości bioaktywnych preparatów. Skuteczność wybranych kombinacji weryfikowano w modelach żywnościowych z mięsa drobiowego i wieprzowego, z zastosowaniem analiz mikrobiologicznych, oksydacyjnych i fizykochemicznych. Dane analizowano z wykorzystaniem testów statystycznych odpowiednich dla charakteru i rozkładu wyników, obejmujących m.in. ANOVA, testy nieparametryczne, eksploracyjną analizę czynnikową oraz funkcjonalną analizę składowych głównych.

W ramach badań literaturowych w etapie I zidentyfikowano 1307 publikacji dotyczących biokonserwacji mięsa, z których po wieloetapowej selekcji i analizie uzupełniającej do oceny jakościowej włączono 45 unikatowych badań. Wykazano, że najczęściej stosowane kombinacje mikrobiologicznych barier, kultury starterowe, kultury ochronne oraz ich metabolity, skutecznie hamowały wzrost patogenów i drobnoustrojów psujących żywność, bez występowania efektów antagonistycznych. Przegląd systematyczny literatury potwierdził ponadto, że łączenie różnych barier mikrobiologicznych może wywoływać efekt synergii, choć zidentyfikowano brak badań dotyczących jednoczesnego zastosowania metabolitów LAB i AAB. Ta luka badawcza stała się podstawą do zaplanowania i realizacji kolejnych etapów pracy.

W II etapie badań określono właściwości przeciwdrobnoustrojowe preparatów uzyskanych z wyselekcjonowanych szczepów LAB i AAB. Najsilniejsze działanie obserwowano w odniesieniu do *L. monocytogenes*, natomiast największą oporność wykazał szczep wskaźnikowy *E. faecalis*. Wykazano istotne różnice między skutecznością preparatów stosowanych pojedynczo a w połączeniach, co potwierdziło

efekt synergistyczny oraz addytywny. Szczególnie istotne było to, że połączenia preparatów LAB i AAB zwiększały skuteczność działania wobec bakterii wskaźnikowych, zarówno Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, bez występowania efektu antagonistycznego. Oznaczenia MIC i indeksów FICI potwierdziły liczne interakcje synergistyczne, zwłaszcza wobec *S. Enteritidis*. Profil metaboliczny badanych szczepów potwierdził zdolność LAB do intensywnego wytwarzania kwasu mlekowego, a z kolei AAB – kwasu octowego i glukonowego. Dodatkowo preparaty LAB, szczególnie CFS i hkCFS, charakteryzowały się wyższą zawartością związków fenolowych i aktywnością antyoksydacyjną niż AAB. Analiza genomów szczepów *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24 wykazała obecność licznych sekwencji kodujących bakteriocyny. Badania właściwości fizykochemicznych uzyskanych metabolitów wykazały, że supernatanty bezkomórkowe obu szczepów zachowują ok. 70% aktywności po ogrzewaniu w temp. 100 °C przez 20 min, natomiast ulegają inaktywacji po autoklawowaniu w temp. 121 °C. Całkowita utrata aktywności po zastosowaniu trypsyny, pepsyny i proteinyzy K potwierdza białkowy lub peptydowy charakter związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Widma FT-IR ujawniły pasma amidowe I i II oraz grupy hydroksylowe i aminowe, co jednoznacznie wskazuje na obecność białek/peptydów. Oczyszczanie (precypitacja siarczanem amonu i dializa) zwiększyło aktywność swoistą 3,38-krotnie dla szczepu B1 i 4,06-krotnie dla O24. Analiza SDS-PAGE wykazała obecność białek o masach ok. 14–15 kDa (B1) i 10–11 kDa (O24), a badanie LC-MS/MS potwierdziło wartości 15 079 Da i 10 815 Da oraz częściową homologię do znanych bakteriocyn. Wyniki sugerują, że badane peptydy mogą być nowymi, dotąd nieopisanymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi.

Weryfikacja skuteczności biokonserwacyjnej metabolitów LAB i AAB w warunkach modelowych *in situ* na mięsie drobiowym sztucznie zakażonym *S. Enteritidis* potwierdziła skuteczność połączeń preparatów LAB i AAB w warunkach zbliżonych do rzeczywistych. Po 7 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych w próbach traktowanych preparatami nie wykryto żywych komórek patogenu, w przeciwieństwie do próby kontrolnej. Efekt przeciwdrobnoustrojowy zwiększał się wraz z czasem ekspozycji, co wskazuje na potencjał tych preparatów jako naturalnych środków wydłużających trwałość mięsa.

W etapie III badań oceniono wpływ wybranych preparatów z metabolitami LAB i AAB, *Lacticaseibacillus paracasei* B1 w połączeniu z *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1, jak i *Lactiplantibacillus plantarum* O24 z *Gluconobacter oxydans* KNS32, na jakość modelowego wyrobu mięsnego. Analiza mikrobiologiczna wykazała wyraźne spowolnienie wzrostu drobnoustrojów w mięsie z dodatkiem preparatów LAB i AAB – po 9 dniach ogólna liczba bakterii była istotnie niższa niż w próbie kontrolnej, ponadto zaobserwowano zahamowanie wzrostu Enterobacteriaceae i *E. coli*, a *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp. nie były obecne w żadnej próbie. Wskaźniki utleniania lipidów (TBARS) były niższe w próbach traktowanych mieszaniną preparatów metabolitów, co świadczy o spowolnieniu peroksydacji tłuszczów. Również degradacja cholesterolu w trakcie chłodniczego przechowywania w próbach mięsa z dodatkiem preparatów bakteryjnych LAB i AAB przebiegała wolniej. Ponadto, zaobserwowano wyższy poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) niż w próbie kontrolnej, co wskazuje na ochronę ich przed degradacją oksydacyjną. Zmiany parametrów fizykochemicznych (pH, ORP i barwa) były zależne głównie od czasu przechowywania, przy czym zastosowane preparaty metabolitów LAB i AAB nie wpływały negatywnie na wygląd ani stabilność oksydacyjną mięsa. Przeprowadzona analiza czynnikowa (EFA) wykazała, że głównym elementem decydującym o jakości mięsa były parametry mikrobiologiczne, a następnie procesy utleniania powiązane

z barwą oraz degradacja lipidów. Z kolei wykonana analiza FPCA potwierdziła, że warianty z dodatkiem preparatów bakteryjnych LAB i AAB pozwalały na dłuższe utrzymanie dobrej jakości mięsa w czasie przechowywania w porównaniu z próbą kontrolną, przy czym najlepsze efekty zaobserwowano w próbie z dodatkiem hkCFS O24 + CFS KNS32.

Badania wykazały, że metabolity LAB i AAB działały synergistycznie, skutecznie hamując wzrost patogenów i drobnoustrojów psujących mięso, zarówno *in vitro*, *in situ*, jak i w modelowym wyrobie mięsnym surowym typu mięso garmażeryjne. Kluczową rolę w tym działaniu odgrywa kompleks metabolitów bakteryjnych, w tym bioaktywnych peptydów, kwasów organicznych, związków fenolowych i substancji o właściwościach antyoksydacyjnych, których obecność potwierdzono zarówno w badaniach z użyciem metod genetycznych, proteomicznych, jak i biochemicznych. Najskuteczniejsze działanie biokonserwujące modelowego wyrobu mięsnego stwierdzono w przypadku połączenia 1,25% hkCFS *L. plantarum* O24 z 1,25% CFS *G. oxydans* KNS32. Uzyskane wyniki potwierdzają, że metabolity badanych szczepów mogą stanowić naturalne, efektywne narzędzie biokonserwacji wykazując także właściwości antyoksydacyjne i nie pogarszając parametrów fizykochemicznych mięsa i wyrobów mięsnych surowych.

**Słowa kluczowe:** Biokonserwacja; Bakterie fermentacji mlekowej (LAB); Bakterie kwasu octowego (AAB); Bakteriocyny; Surowe wyroby mięsne

## SUMMARY

The objective of this study was to identify and characterize metabolites produced by lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB) that are responsible for their antimicrobial activity against pathogenic and food-spoiling bacteria, and to evaluate the feasibility of applying these metabolites—both individually and in mixtures—as natural, biological preservatives for meat and meat products. Three research hypotheses were formulated, and the investigations were planned in three principal stages comprising theoretical analyses (Stage I), laboratory studies (Stage II), and the application of selected bacterial preparations at pilot scale (Stage III).

Two LAB strains—*Lacticaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24—from the Warsaw University of Life Sciences (SGGW) collection were selected based on prior reports of their properties, including potential probiotic and postbiotic effects. From these strains, three types of cell-free metabolite preparations were obtained: crude, after heat inactivation, and after pH neutralization. The experiments also included two AAB strains—*Gluconobacter oxydans* KNS32 and *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1—from which cell-free supernatants were obtained. Antibacterial activity was assessed using a panel of indicator strains representing both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

The experimental component employed two food models: raw poultry meat, used to assess *in situ* antimicrobial activity, and a model pork meat product prepared under pilot-scale conditions with the addition of selected bacterial preparations.

The methodological scope encompassed a systematic literature analysis (PICO, PRISMA) as well as laboratory and application-oriented studies, including evaluation of the composition and antimicrobial activity of metabolites, synergy analysis (MIC, FICI), genomic and proteomic characterization of LAB strains, and assessment of the stability and bioactive properties of the preparations. The effectiveness of selected combinations was verified in poultry and pork food models using microbiological, oxidative, and physicochemical analyses. Data were analysed using statistical tests appropriate to the nature and distribution of results, including ANOVA, non-parametric tests, exploratory factor analysis (EFA), and functional principal component analysis (FPCA).

In Stage I of the literature studies, 1,307 publications concerning meat biopreservation were identified; following multi-stage screening and supplementary analysis, 45 unique studies were included for qualitative assessment. It was demonstrated that the most frequently employed combinations of microbiological hurdles—starter cultures, protective cultures, and their metabolites—effectively inhibited the growth of pathogens and spoilage micro-organisms without antagonistic effects. The systematic review further confirmed that combining different microbiological hurdles may elicit synergistic effects; however, a lack of studies on the simultaneous use of LAB and AAB metabolites was identified. This research gap formed the basis for planning and implementing subsequent stages of the work.

In Stage II, the antimicrobial properties of preparations obtained from the selected LAB and AAB strains were determined. The strongest activity was observed against *Listeria monocytogenes*, whereas the indicator strain *Enterococcus faecalis* exhibited the greatest resistance. Significant differences were found between the effectiveness of preparations used individually versus in combinations, confirming both synergistic and additive effects. Notably, combinations of LAB and AAB preparations increased efficacy against both Gram-positive and Gram-negative indicator bacteria without antagonism. MIC determinations and FICI indices confirmed numerous synergistic interactions,

particularly against *Salmonella Enteritidis*. Metabolic profiling confirmed the capacity of LAB to produce lactic acid intensively, whereas AAB produced acetic and gluconic acids. Additionally, LAB preparations—especially CFS (cell-free supernatant) and hkCFS (heat-killed cell-free supernatant)—were characterized by higher contents of phenolic compounds and greater antioxidant activity than AAB preparations. Genome analyses of *L. paracasei* B1 and *L. plantarum* O24 revealed numerous bacteriocin-encoding sequences.

Studies of the physicochemical properties of the obtained metabolites showed that cell-free supernatants of both strains retained approximately 70% activity after heating at 100 °C for 20 min, but were inactivated by autoclaving at 121 °C. Complete loss of activity after treatment with trypsin, pepsin, and proteinase K confirms the proteinaceous/peptidic nature of the antimicrobial compounds. FT-IR spectra revealed amide I and II bands and hydroxyl and amino groups, unequivocally indicating the presence of proteins/peptides. Purification (ammonium sulphate precipitation and dialysis) increased specific activity 3.38-fold for strain B1 and 4.06-fold for O24. SDS-PAGE analysis revealed proteins of approximately 14–15 kDa (B1) and 10–11 kDa (O24), and LC-MS/MS confirmed masses of 15,079 Da and 10,815 Da, together with partial homology to known bacteriocins. The results suggest that the peptides under study may be novel, hitherto undescribed antimicrobial compounds.

Verification of the biopreservative effectiveness of LAB and AAB metabolites under *in situ* model conditions on poultry meat artificially inoculated with *S. Enteritidis* confirmed the efficacy of LAB–AAB combinations under near-real conditions. After 7 days of refrigerated storage, no viable pathogen cells were detected in treated samples, in contrast to the control. The antimicrobial effect increased with exposure time, indicating the potential of these preparations as natural agents for extending meat shelf life.

In Stage III, the impact of selected LAB and AAB metabolite preparations—*Lactocaseibacillus paracasei* B1 combined with *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1, and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 combined with *Gluconobacter oxydans* KNS32—on the quality of a model meat product was evaluated. Microbiological analysis showed a marked slowdown of microbial growth in meat with the LAB and AAB preparations: after 9 days, the total bacterial count was significantly lower than in the control; moreover, inhibition of *Enterobacteriaceae* and *E. coli* was observed, and *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. were absent from all samples, confirming the antimicrobial efficacy of the applied LAB and AAB preparations. Lipid oxidation indices (TBARS) were lower in samples treated with mixtures of metabolite preparations, evidencing slower lipid peroxidation. Cholesterol degradation during refrigerated storage also progressed more slowly in meat with the bacterial preparations. Furthermore, a higher level of polyunsaturated fatty acids (PUFA) than in the control was maintained, indicating protection against oxidative degradation. Changes in physicochemical parameters (pH, ORP—oxidation–reduction potential, and colour) depended mainly on storage time, while the applied LAB and AAB metabolite preparations did not adversely affect the appearance or oxidative stability of the meat. EFA indicated that microbiological parameters were the primary determinants of meat quality, followed by oxidation processes associated with colour and lipid degradation. FPCA confirmed that variants with the added LAB and AAB preparations allowed for a longer maintenance of good meat quality during storage compared with the control, with the best effects observed for the treatment containing hkCFS O24 + CFS KNS32.

The studies demonstrated that LAB and AAB metabolites acted synergistically, effectively inhibiting the growth of pathogens and meat-spoiling micro-organisms *in vitro*, *in situ*, and in a raw, model convenience-type meat product. A key role is played by the complex of bacterial metabolites—including bioactive peptides, organic acids, phenolic compounds, and antioxidant substances—the presence of which was confirmed using genetic, proteomic, and biochemical methods. The most effective biopreservative action for the model meat product was observed for the combination of 1.25% hkCFS of *L. plantarum* O24 with 1.25% CFS of *G. oxydans* KNS32. The findings confirm that the metabolites of the studied strains may constitute a natural, effective tool for biopreservation, exhibiting antioxidant properties and not impairing the physicochemical parameters of raw meat and raw meat products.

**Keywords:** Biopreservation; Lactic acid bacteria (LAB); Acetic acid bacteria (AAB); Bacteriocins; Raw meat products

## SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW I OZNACZEŃ.....	15
1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ.	18
2. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU .....	19
2.1 Znaczenie naturalnych strategii utrwalania żywności .....	19
2.2 Bakterie fermentacji mlekowej – aktywność przeciwdrobnoustrojowa..	24
2.3 Bakterie kwasu octowego – aktywność przeciwdrobnoustrojowa .....	26
2.4 Potencjał zastosowania metabolitów LAB i AAB w biokonserwacji żywności .....	27
3. CEL I HIPOTEZY BADAWCZE .....	30
3.1 Zakres pracy.....	31
4. MATERIAŁY I METODY BADAŃ.....	32
4.1 Materiał do badań.....	32
4.1.1 Publikacje zakwalifikowane do przeglądu systematycznego .....	32
4.1.2 Szczepy bakterii .....	32
4.1.3 Model badawczy z mięsa drobiowego.....	34
4.1.4 Modelowy wyrób mięsny surowy.....	34
4.2 Metody badań.....	35
4.2.1 Badanie literaturowe .....	35
4.2.2 Badania analityczne .....	37
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	44
5.1 Ocena synergistycznego efektu połączenia różnych barier mikrobiologicznych w kształtowaniu bezpieczeństwa i trwałości mięsa i jego wyrobów – studium literaturowe.....	44
5.1.1 Analiza wyników badań w oparciu o systematyczny przegląd literatury [P1] .....	44
5.1.2 Identyfikacja luki badawczej i selekcja szczepów LAB i AAB do badań eksperymentalnych .....	45
5.2 Ocena efektu antymikrobiologicznego i biokonserwującego <i>in vitro</i> oraz <i>in situ</i> połączenia metabolitów LAB i AAB.....	46
5.2.1 Ocena właściwości fizykochemicznych, przeciwdrobnoustrojowych i przeciwutleniających metabolitów LAB i AAB [P2], [P3] .....	46
5.2.1 Analiza determinantów genetycznych oraz analiza proteomiczna związków bioaktywnych obecnych w CFS szczepów <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> B1 i <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> O24 [P3].....	50
5.2.2 Weryfikacja skuteczności biokonserwacyjnej metabolitów LAB i AAB w warunkach modelowych [P2] .....	54
5.2.3 Wybór preparatów metabolitów LAB i AAB do dalszych badań i określenie warunków ich zastosowania .....	55

<b>5.3 Ocena jakości i trwałości wyrobów mięsnych surowych poddanych biokonserwacji preparatami metabolitów LAB i AAB – badania aplikacyjne w skali półtechnicznej.....</b>	<b>56</b>
5.3.1 Ocena wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na jakość mikrobiologiczną i trwałość modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania [P4] .....	56
5.3.2 Ocena wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na stabilność oksydacyjną modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania [P4] .....	57
5.3.3 Określenie wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na wybrane parametry fizykochemiczne modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania [P4] .....	58
<b>6. Dyskusja wyników .....</b>	<b>61</b>
<b>7. Stwierdzenia i wnioski .....</b>	<b>76</b>
<b>8. Dorobek naukowy .....</b>	<b>78</b>
<b>9. Literatura .....</b>	<b>87</b>
<b>10. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską wraz z oświadczeniami współautorów .....</b>	<b>96</b>

## WYKAZ SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

<b>AAB</b>	bakterie kwasu octowego (ang. acetic acid bacteria)
<b>ABTS*</b>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), związek chemiczny wykorzystywany teście oznaczającym całkowitą zdolność antyoksydacyjną
<b>ACN</b>	Acetonitryl (ang. acetonitrile)
<b>ANOVA</b>	analiza wariancji (ang. analysis of variance)
<b>AOI</b>	obszar zainteresowania (ang. area of interest)
<b>ATCC</b>	identyfikator szczepu konkretnego mikroorganizmu (ang. American Type Culture Collection)
<b>AU</b>	jednostka arbitralna (ang. arbitrary unit)
<b>AV</b>	liczba kwasowa (ang. acid value)
<b>B1</b>	szczep <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> B1
<b>BAGEL4</b>	narzędzie bioinformatyczne do wykrywania genów bakteriocyn w genomach mikroorganizmów (ang. Bacteriocin Genome Mining Tool version 4)
<b>BLIS</b>	substancje hamujące podobne do bakteriocyn (ang. bacteriocin-like inhibitory substances)
<b>Bs 6633</b>	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633
<b>Cas</b>	białka związane z CRISPR (ang. CRISPR-associated (proteins))
<b>CFS</b>	bezkomórkowy supernatant (ang. cell-free supernatant); zamiennie stosowane określenia „metabolity” oraz „preparaty”, uzupełniane przymiotnikami „pohodowlane” lub „bakteryjne”, odnoszące się do frakcji zawierających pozakomórkowe metabolity badanych szczepów i pozbawionych komórek bakteryjnych
<b>CIE Lab*</b>	przestrzeń barw (ang. Commission Internationale de l'Éclairage Lab color space*)
<b>CNS</b>	gronkowce koagulazo-ujemne (ang. coagulase negative staphylococci)
<b>CRAP</b>	baza zanieczyszczeń białkowych (ang. contaminant repository for affinity purification)
<b>CRISPR</b>	zgrupowane, regularnie rozmieszczone, krótkie palindromiczne powtórzenia międzyprzestrzenne (ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
<b>Da</b>	dalton, jednostka masy cząsteczkowej
<b>DNA</b>	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
<b>DOI</b>	identyfikator cyfrowy (ang. digital object identifier)
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, związek chemiczny stosowany w testach antyoksydacyjnych
<b>EC</b>	liczba <i>Escherichia coli</i>
<b>Ec 10536</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536
<b>Ef 51299</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299
<b>EFA</b>	eksploracyjna analiza czynnikowa (ang. exploratory factor analysis)
<b>EFSA</b>	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority)
<b>EH</b>	potencjał elektrochemiczny (ang. electrochemical potential)
<b>ENT</b>	liczba Enterobacteriaceae
<b>FAO</b>	Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization)
<b>FDA</b>	Agencja Żywności i Leków (ang. U.S. Food and Drug Administration)
<b>FDR</b>	wskaźnik fałszywych odkryć (ang. false discovery rate)
<b>FIC</b>	ułamkowe stężenie hamujące (ang. fractional inhibitory concentration)
<b>FICI</b>	wskaźnik ułamkowego stężenia hamującego (ang. fractional inhibitory concentration index)
<b>FPCA</b>	funkcyjna analiza głównych składowych (ang. functional principal component analysis)
<b>FT-IR</b>	spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. Fourier transform infrared spectroscopy)

<b>GAE</b>	równoważniki kwasu galusowego (ang. gallic acid equivalents)
<b>GC</b>	podłoże z glukozą i węglanem wapnia (ang. glucose calcium carbonate)
<b>GCF</b>	rodzina klastrów genowych (ang. gene cluster family)
<b>GRAS</b>	status określany przez FDA (ang. generally recognized as safe)
<b>HCD</b>	fragmentacja wysokiej energii kolizji (ang. high-energy collisional dissociation)
<b>HGT</b>	poziomy transfer genów (ang. horizontal gene transfer)
<b>hkCFS</b>	bezkomórkowy supernatant pozyskany z inaktywowanych termicznie hodowli bakterii (ang. heat-killed cell-free supernatant)
<b>HPLC</b>	wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high-performance liquid chromatography)
<b>HS</b>	pożywka Hestrina i Shramma
<b>IBPRS</b>	Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy
<b>IF</b>	współczynnik cytowań czasopisma naukowego (ang. impact factor)
<b>JTK/CFU</b>	jednostka tworząca kolonie (ang. colony forming unit)
<b>kDa</b>	kilodalton ( $10^3$ daltonów)
<b>KNS32</b>	szczep <i>Gluconobacter oxydans</i> KNS32
<b>KOM1</b>	szczep <i>Komagataeibacter saccharivorans</i> KOM1
<b>LAB</b>	bakterie fermentacji mlekowej (ang. lactic acid bacteria)
<b>LC-MS/MS</b>	chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (ang. liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry)
<b>Lm 19111</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111
<b>log</b>	logarytm dziesiętny (ang. logarithm base 10)
<b>M</b>	mol, jednostka SI ilości substancji
<b>MAP</b>	opakowanie ze zmodyfikowaną atmosferą (ang. modified atmosphere packaging)
<b>MDA</b>	malondialdehyd (ang. malondialdehyde)
<b>meq</b>	mili-ekwiwalent (ang. milliequivalent)
<b>MGE</b>	ruchome elementy genetyczne (ang. mobile genetic elements)
<b>MH</b>	pożywka Muellera-Hinton
<b>MIC</b>	minimalne stężenie hamujące (ang. minimal inhibitory concentration)
<b>MNiSW</b>	Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
<b>MRS</b>	pożywka de Mana, Rogosy i Sharpe'a
<b>MUFA</b>	jednolienasycone kwasy tłuszczowe (ang. monounsaturated fatty acids)
<b>nCFS</b>	zneutralizowany supernatant (ang. neutralized cell-free supernatant)
<b>O24</b>	szczep <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> O24
<b>OD600</b>	gęstość optyczna przy długości fali 600 nanometrów
<b>OLD/TVC</b>	ogólna liczba drobnoustrojów (ang. total viable count)
<b>ORF</b>	otwarta ramka odczytu (ang. open reading frame)
<b>ORP</b>	potencjał oksydacyjno-redukcyjny (ang. oxidation-reduction potential)
<b>PALCAM</b>	pożywka Polymyxin–Acriflavine–Lithium Chloride–Ceftazidime–Aesculin–Mannitol
<b>PBS</b>	bufor fizjologiczny fosforanowy (ang. phosphate-buffered saline)
<b>PCA</b>	podłoże do ogólnego oznaczania liczby drobnoustrojów (ang. plate count agar)
<b>Pf 2123</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PCM 2123
<b>PN-EN ISO</b>	oznaczenie normy międzynarodowej przyjętej w Polsce (ang. International Organization for Standardization)
<b>PUFA</b>	wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. polyunsaturated fatty acids)
<b>PV</b>	liczba nadtlenkowa (ang. peroxide value)
<b>QPS</b>	kwalifikowane domniemanie bezpieczeństwa (ang. qualified presumption of safety)
<b>RGI</b>	identyfikator genów oporności (ang. resistance gene identifier)

<b>RNA</b>	kwasy rybonukleinowe (ang. ribonucleic acid)
<b>RTC</b>	żywność gotowa do obróbki termicznej (ang. ready-to-cook)
<b>RTE</b>	żywność gotowa do spożycia (ang. ready-to-eat)
<b>Sa 25923</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<b>SD</b>	odchylenie standardowe (ang. standard deviation)
<b>SDS-PAGE</b>	elektroforeza żelowa w poliakrylamidzie w obecności dodecylosiarczanu sodu (ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
<b>SE 13076</b>	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076
<b>STA</b>	liczba koagulazo-dodatnich <i>Staphylococcus</i>
<b>TBA</b>	roztwór bromku tetrabutylowego (ang. tetrabutylammonium solution)
<b>TBARS</b>	substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym (ang. thiobarbituric acid reactive substances)
<b>TBX</b>	pożywka do wykrywania <i>Escherichia coli</i> (ang. tryptone bile x-glucuronide agar)
<b>TFA</b>	kwas trifluorooctowy (ang. trifluoroacetic acid)
<b>TPC</b>	całkowita zawartość związków fenolowych (ang. total phenolic content)
<b>TSA</b>	pożywka tryptozowo-sojowa
<b>UE</b>	Unia Europejska
<b>VCEAC</b>	współczynniki antyoksydacyjnej mocy równej witaminy C (ang. vitamin C equivalent antioxidant capacity)
<b>VRBG</b>	podłoże z fioletowo-czerwoną żółcią i glukozą (ang. violet red bile glucose agar)
<b>XLD</b>	pożywka ksylozowo-lizynowo-deoksychołanowa (ang. xylose, lysine, deoxycholate)

## 1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Niniejszą pracę doktorską stanowi cykl następujących publikacji:

[P1]. **Karbowiak, M.**, Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2023). Synergistic effect of combination of various microbial hurdles in the biopreservation of meat and meat products – systematic review. *Foods*, 12(7), 1430. DOI: 10.3390/foods12071430

IF: 4,7; MNiSW<sub>2023</sub>: 140 pkt.†

[P2]. **Karbowiak, M.\***, Kruk, M., Szymański, P. & Zielińska, D\*. (2025). Novel synergistic combination of lactic acid and acetic acid bacteria cell-free extracts for enhanced food biopreservation. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. DOI: 10.26444/aaem/214500

IF: 1,2; MNiSW<sub>2025</sub>: 100 pkt.†

[P3]. **Karbowiak, M.\***, Wójcicki, M., Hyun, J. E., Szymański, P., Niu, Y. D.\*, & Zielińska, D. (2025). Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived *Lactocaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. *LWT*, 118597. DOI: 10.1016/j.lwt.2025.118597

IF: 6,6; MNiSW<sub>2025</sub>: 100 pkt.†

[P4]. **Karbowiak, M.\***, Okoń, A., Łaskiewicz, B., Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2025). Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork. *Foods*, 14(11), 1934. DOI: 10.3390/foods14111934

IF: 5,1; MNiSW<sub>2025</sub>: 100 pkt.†

Łączna wartość IF: 17,6; punkty MNiSW: 440 †

---

\* Autor korespondencyjny

† Wartości współczynników Impact Factor poszczególnych publikacji podano w oparciu o dane udostępnione na InCites™ Journal Citation Reports® dn. 8.12.2025 r.; punktację czasopism podano w oparciu o wykazy czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów, stanowiące załączniki do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 5 stycznia 2024 r. (według roku publikacji).

## 2. UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU

### 2.1 Znaczenie naturalnych strategii utrwalania żywności

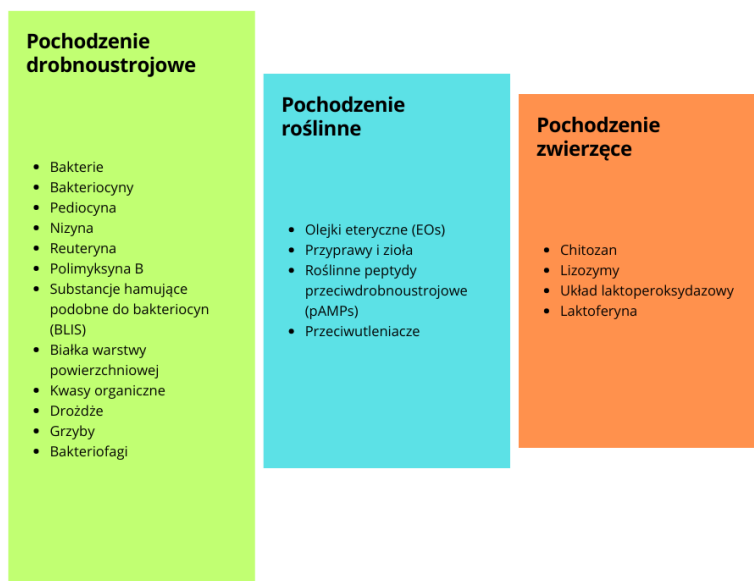
Zagrożenia mikrobiologiczne przenoszone drogą pokarmową stanowią jedno z poważniejszych wyzwań zdrowia publicznego, zarówno w skali globalnej, jak i regionalnej. Wśród czynników etiologicznych dominują zoonozy, a w Unii Europejskiej kampylobakterioza i salmonelloza pozostają najczęściej notowanymi infekcjami przewodu pokarmowego, ze znaczącym wzrostem liczby potwierdzonych przypadków w ostatnich latach [1]. Regulacje prawne koncentrują się na identyfikacji i ograniczaniu drobnoustrojów chorobotwórczych oraz mikroorganizmów powodujących psucie żywności w produktach o krótkiej trwałości, takich jak mięso i jego przetwory. Równocześnie rośnie oczekiwanie konsumentów, by żywność była pozbawiona syntetycznych dodatków, w tym azotanów (III) i azotanów (V), co zwiększa zapotrzebowanie na naturalne metody utrwalania [2].

Konserwanty pełnią ważną rolę w ograniczaniu psucia żywności i ryzyka skażenia patogenami, jednak dominujące w produkcji syntetyczne dodatki budzą coraz większe obawy zdrowotne. Wiele z nich może powodować reakcje alergiczne, zaburzenia metaboliczne czy zwiększać ryzyko chorób nowotworowych [3]. Przykładowo, benzoesan sodu może u osób wrażliwych wywoływać reakcje alergiczne [4] oraz reagować z witaminą C tworząc śladowe ilości benzenu, związku rakotwórczego [5]. Z kolei, azotan (III) sodu, powszechnie wykorzystywany w przetwórstwie mięsa jako substancja konserwująca, wykazująca wysoką skuteczność w hamowaniu wzrostu *Clostridium botulinum*, jednocześnie może prowadzić do powstawania N-nitrozoamin, związków o udokumentowanym potencjale kancerogennym, w produktach mięsnych [2]. W odpowiedzi na rosnące obawy dotyczące bezpieczeństwa konsumentów oraz długoterminowego wpływu tych substancji na zdrowie publiczne, Unia Europejska przyjęła bardziej restrykcyjne regulacje prawne w zakresie stosowania azotanów i azotanów w żywności. Zgodnie z rozporządzeniem Komisji (UE) 2023/2108 z dnia 6 października 2023 r., od 9 października 2025 r. obowiązują obniżone maksymalne dopuszczalne poziomy dodatków azotanów (E 249–250) oraz azotanów (E 251–252) w wybranych kategoriach produktów spożywczych [164]. Obowiązujące prawo unijne dopuszcza możliwość ustanowienia na poziomie krajowym bardziej rygorystycznych limitów stosowania tych dodatków wyłącznie po uzyskaniu odpowiedniej derogacji od Komisji Europejskiej [6]. Działania regulacyjne w tym zakresie wpisują się w dominujący obecnie trend tzw. „czystej etykiety”, zakładający ograniczanie dodatków

do żywności, w szczególności syntetycznych konserwantów. Należy jednak podkreślić, że redukcja związków azotowych w produktach mięsnych może prowadzić do zwiększenia ryzyka mikrobiologicznego, co implikuje konieczność poszukiwania i opracowywania bezpiecznych, skutecznych oraz technologicznie uzasadnionych naturalnych alternatyw dla tradycyjnie stosowanych dodatków azotynowych [7].

W odpowiedzi na rosnące wymagania dotyczące bezpieczeństwa i trwałości żywności coraz częściej sięga się po biokonserwację, rozumianą jako metoda wykorzystująca naturalne związki przeciwdrobnoustrojowe pochodzenia mikrobiologicznego, roślinnego lub zwierzęcego, w tym kultury mikroorganizmów oraz ich metabolity [8]. Rozwiązania te wpisują się w koncepcję zrównoważonego rozwoju i gospodarki cyrkularnej, sprzyjając ograniczeniu strat żywności oraz zmniejszeniu obciążenia środowiskowego [8,9]. Ich skuteczne wdrożenie wymaga jednak szczegółowej znajomości mechanizmów działania preparatów biokonserwujących, ich kompatybilności z żywnością oraz ograniczeń technologicznych, takich jak stabilność podczas przechowywania czy wpływ na cechy sensoryczne produktu końcowego [10]. W tym kontekście biokonserwacja umożliwia przedłużenie trwałości produktów bez pogorszenia ich jakości sensorycznej i wartości odżywczej [11]. Naturalne konserwanty charakteryzują się szerokim spektrum właściwości fizykochemicznych oraz mikrobiologicznych i mogą skutecznie hamować rozwój patogenów poprzez destabilizację błon komórkowych, zakłócanie syntezy białek lub kwasów nukleinowych czy działanie oksydacyjne [12]. Wśród najczęściej stosowanych biokonserwantów znajdują się bakteriocyny (nizyna, pediocyna), wybrane enzymy [11], olejki eteryczne, polisacharydy takie jak chitozan oraz bioaktywne związki roślinne, m.in. karotenoidy i antocyjany [13]. Źródła substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz ich przykłady stosowane w przemyśle spożywczym przedstawiono na **rys. 1**.

W praktyce przemysłowej obserwuje się jednocześnie wzrost zainteresowania łączeniem różnych metod konserwacji w ramach strategii tzw. technologii „płotków” (ang. *hurdle technology*) [14]. Koncepcja ta polega na zastosowaniu co najmniej dwóch komplementarnych mechanizmów przeciwdrobnoustrojowych, fizycznych, chemicznych i biologicznych, w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności bez konieczności intensyfikacji pojedynczego czynnika [15].



**Rysunek 1.** Źródła substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz ich przykłady stosowane w przemyśle spożywczym. Źródło: opracowanie własne na podstawie Karnwal i Malik (2024) [13].

Kluczowym założeniem technologii „płatków” jest wykorzystanie efektu synergii pomiędzy różnymi przeszkodami środowiskowymi, umożliwiającego skuteczne ograniczenie wzrostu drobnoustrojów przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości sensorycznej i wartości odżywczej produktu. Dobór kombinacji „przeszkód” zależy od rodzaju produktu, jego właściwości fizykochemicznych, warunków przechowywania oraz poziomu ryzyka mikrobiologicznego. W przypadku wielu grup produktów skuteczne może być połączenie niskiej temperatury przechowywania, atmosfery ochronnej oraz dodatku naturalnych preparatów mikrobiologicznych, takich jak preparaty bakterii fermentacji mlekowej, w tym bakteriocyn. Zastosowanie biologicznych „płatków” stanowi potencjalną alternatywę dla syntetycznych konserwantów, których ograniczenie może obniżać poziom bezpieczeństwa mikrobiologicznego [11].

Szczególne znaczenie w tym kontekście mają preparaty mikroorganizmów oraz ich metabolity, wykazujące ukierunkowane działanie wobec drobnoustrojów patogennych i powodujących psucie żywności. Wykorzystanie żywych kultur ochronnych, ich pozakomórkowych frakcji lub wyizolowanych związków bioaktywnych jest zgodne z koncepcją „czystej etykiety” i wpisuje się w globalne trendy ograniczania dodatków syntetycznych [16]. Kultury te działają m.in. poprzez niespecyficzne mechanizmy, takie jak zakwaszenie środowiska, konkurencja o składniki odżywcze oraz wytwarzanie związków antagonistycznych, w tym kwasów organicznych. Bakteriocyny, w odróżnieniu od tych mechanizmów, wykazują bardziej specyficzny i ukierunkowany

sposób działania, obejmujący m.in. tworzenie porów w błonie komórkowej, zaburzanie transportu elektronów oraz niekontrolowany przepływ jonów przez błonę komórkową [17]. Zróżnicowane mechanizmy działania wymienionych wyżej związków bioaktywnych sprzyjają uzyskiwaniu efektu synergistycznego przy ich łącznym stosowaniu [11,14,15].

Pomimo szerokiego zainteresowania technologią „płatków”, skuteczność łączenia biologicznych czynników przeciwdrobnoustrojowych wciąż wymaga szczegółowej analizy w odniesieniu do konkretnych grup żywności. Szczególnie uzasadnione wydaje się skupienie uwagi na mięsie i wyrobach mięsnych, które ze względu na wysoką aktywność wody oraz znaczną zawartość składników odżywczych należą do produktów o podwyższonym ryzyku rozwoju drobnoustrojów [18]. Zapewnienie ich bezpieczeństwa mikrobiologicznego przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej jakości sensorycznej stanowi istotne wyzwanie technologiczne. W tym kontekście coraz większe znaczenie zyskują badania nad zastosowaniem kombinacji środków przeciwdrobnoustrojowych pochodzenia mikrobiologicznego w biokonserwacji mięsa i przetworów mięsnych [19].

Badania nad zastosowaniem kombinacji kultur starterowych w wyrobach mięsnych wskazują, że łączenie różnych szczepów mikroorganizmów może skutecznie zwiększać bezpieczeństwo mikrobiologiczne [20-25]. Szczególnie istotne znaczenie mają mieszaniny bakterii fermentacji mlekowej (LAB), które wykazują silne właściwości bioprotekcyjne wobec patogenów, takich jak *Listeria monocytogenes*. Iacumin i in. (2020) [24] wykazali, że zastosowanie trójskładnikowych kultur LAB (*Carnobacterium divergens*, *C. maltaromaticum*, *Lactilactobacillus sakei*), skutecznie eliminowało lub hamowało rozwój *L. monocytogenes* w gotowanej szynce pakowanej w atmosferze modyfikowanej, podczas gdy autochtoniczna mikrobiota nie wykazywała takiego efektu. W wielu badaniach kultury LAB łączono z gronkowcami koagulazoujemnymi, co pozwalało na jednoczesne zwiększenie bezpieczeństwa mikrobiologicznego oraz poprawę cech technologicznych i sensorycznych produktów. Chen i in. (2021) [25] wykazali, że kombinacja *Staphylococcus xylosum* i *Lactiplantibacillus plantarum* skuteczniej ograniczała wzrost Enterobacteriaceae w fermentowanych kielbasach niż kultura jednoszczepowa, a bakterie te nie były wykrywane już po 6 dniach dojrzewania. Podobne efekty biokonserwujące i przeciwdrobnoustrojowe uzyskano w licznych innych badaniach dotyczących fermentowanych wyrobów mięsnych [20-23].

W przeciwieństwie do kultur starterowych, stosowanych głównie w produktach fermentowanych, niestarterowe kultury ochronne są częściej wykorzystywane

w biokonserwacji mięsa surowego i wyrobów mięsnych niefermentowanych, gdzie ich zadaniem jest ograniczenie wzrostu drobnoustrojów patogennych oraz mikroorganizmów odpowiedzialnych za psucie, bez wpływu na cechy sensoryczne produktu [26]. Badania wskazują, że łączenie różnych kultur ochronnych może zwiększać skuteczność przeciwdrobnoustrojową poprzez synergiczne oddziaływanie [26-29]. Xu in in. (2023) [26] wykazali, że kombinacja dwóch kultur ochronnych skutecznie hamowała wzrost bakterii psujących w chudej mielonej wołowinie, choć efekt ten był ograniczony w mięsie o wyższej zawartości tłuszczu, co podkreśla znaczenie matrycy produktu. Z kolei Xu i in. (2021) [30] zaobserwowali najsilniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe w mieszaninach *Lactilactobacillus sakei* z *Staphylococcus carnosus* lub *S. xylosum*, wskazując na synergistyczną interakcję tych mikroorganizmów. Skuteczność kombinacji kultur ochronnych nie zawsze jednak przewyższa działanie pojedynczych szczepów. Gargi in in. (2021) [31] wykazali, że marynata zawierająca pojedynczą kulturę *Lactilactobacillus casei* wykazywała wyższą skuteczność wobec patogenów niż marynaty zawierające kombinacje kultur ochronnych, co autorzy przypisali aktywności specyficznych metabolitów wytwarzanych przez ten szczep. Podobnie Castellano i in. (2011) [32] wykazali, że kombinacja kultur ochronnych LAB nie hamowała wzrostu *E. coli* O157:H7 bez dodatku czynnika chelatującego (Na<sub>2</sub>EDTA). Interesujące wyniki uzyskano również dla preparatów wieloszczepowych. Chaillou i in. (2014) [28] wykazali, że połączenie trzech szczepów *L. sakei* skutecznie ograniczało wzrost *Salmonella* Typhimurium i *E. coli* w mięsie pakowanym próżniowo lub w MAP. Ćncili i in. (2022) [29] potwierdzili natomiast, że postbiotyki otrzymane z *Pediococcus acidilactici* oraz mieszanej kultury *Lactilactobacillus sakei* / *Staphylococcus xylosum* skutecznie ograniczały wzrost drobnoustrojów chorobotwórczych zarówno *in vitro*, jak i na podudziach kurczaka, przy czym nie wpływały one negatywnie na cechy sensoryczne mięsa.

Wtórne metabolity mikrobiologiczne, w szczególności bakteriocyny, stanowią istotną grupę naturalnych środków biokonserwujących o potencjale zastosowania w technologii przetwórstwa mięsa. Z uwagi na ograniczenia związane z ich wąskim spektrum działania, oddziaływaniem z komponentami matrycy mięsnej oraz ryzykiem rozwoju oporności, coraz częściej badane są kombinacje różnych bakteriocyn w ramach technologii „płatków” [33,34]. Szczególnie intensywnie analizowano układy skierowane przeciwko *Listeria monocytogenes*, istotnemu patogenowi produktów mięsnych typu *ready-to-eat*. Wykazano, że połączenie bakteriocyn takich jak nizyna, laktocyna 705 oraz

enterocyna CRL35 wykazywało silniejsze działanie antilisterialne niż ich zastosowanie pojedyncze, a największą skuteczność obserwowano w kombinacjach zawierających nizynę [35]. Castellano i in. (2018) [36] udowodnili, że mieszanina częściowo oczyszczonych bakteriocyn (pochodzących z *Lactilactobacillus curvatus* CRL705 i *L. sakei* CRL1862), kwasów organicznych oraz nizyny całkowicie hamowała wzrost *L. monocytogenes* w parówkach przez cały okres przechowywania chłodniczego. Skuteczność biokonserwacji może być dodatkowo wzmacniana poprzez łączenie bakteriocyn z BLIS. Sant'Anna i in. (2013) [37] wykazali, że kombinacja BLIS syntetyzowanych przez *Bacillus* sp. P34 z nizyną istotnie skuteczniej redukowała liczebność *L. monocytogenes* w kiełbasach drobiowych niż BLIS stosowane samodzielnie. Takie podejście jest szczególnie korzystne w produktach mięsnych o podwyższonej zawartości tłuszczu, gdzie aktywność bakteriocyn może być ograniczona wskutek ich wiązania z komponentami hydrofobowymi pochodzącymi z matrycy [38].

Dostępne dane wskazują, że kombinacje różnych środków przeciwdrobnoustrojowych pochodzenia mikrobiologicznego stanowią obiecujące narzędzie biokonserwacji mięsa. Jednocześnie zróżnicowana skuteczność obserwowana w zależności od składu matrycy, czy doboru szczepów uzasadnia dalsze badania nad racjonalnym projektowaniem takich układów w ramach technologii „płatków”.

## **2.2 Bakterie fermentacji mlekowej – aktywność przeciwdrobnoustrojowa**

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB, ang. *lactic acid bacteria*) to powszechnie występujące, Gram-dodatnie, niezarodnikujące bakterie naturalnie obecne w fermentowanych produktach roślinnych, mlecznych i mięsnych. Są uznawane za bezpieczne, liczne gatunki i szczepy LAB posiadają status GRAS nadany przez FDA [39] oraz znajdują się na liście QPS prowadzonej przez EFSA [40], a także są cenione za potencjał prozdrowotny [41]. Przez wiele lat utożsamiano LAB przede wszystkim z rodzajem *Lactobacillus*, który postrzegano jako jednorodną i dominującą grupę mikroorganizmów bakterii fermentacji mlekowej. W ostatnim czasie analizy genomowe ujawniły wysoką heterogeniczność filogenetyczną rodzaju *Lactobacillus*, co wskazało na nieadekwatność dotychczasowej klasyfikacji. W 2020 roku dokonano więc pełnej rewizji, prowadząc do wyodrębnienia 25 nowych rodzajów i zmiany nazw niemal 200 gatunków, aby lepiej odzwierciedlić rzeczywistą różnorodność genetyczną LAB [42].

Część szczepów LAB wykazuje właściwości probiotyczne, spełniając kryteria bezpieczeństwa, funkcjonalności i przydatności technologicznej, a ich korzystny wpływ na zdrowie potwierdzono w licznych zastosowaniach do żywności funkcjonalnej i preparatów farmaceutycznych [43]. LAB obejmują gatunki homo- i heterofermentatywne, które różnią się profilem wytwarzanych metabolitów [44,45]. Mogą syntetyzować związki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, dominują kwas mlekowy ( $C_3H_6O_3$ ), octowy ( $CH_3COOH$ ), propionowy ( $CH_3CH_2COOH$ ), diacetyl ( $C_4H_6O_2$ ),  $CO_2$ , nadtlenuk wodoru ( $H_2O_2$ ) oraz bakteriocyny, czy peptydy o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [46]. Ponadto, selektywnie wytwarzane przez niektóre szczepy LAB metabolity, takie jak reuteryna i reuterycyklina, charakteryzują się silną aktywnością bakteriobójczą [46].

W praktyce biokonserwacji żywności LAB mogą być stosowane w różnych formach, w zależności od rodzaju produktu, warunków jego przechowywania oraz oczekiwanego efektu przeciwdrobnoustrojowego. Najczęściej wykorzystywane jest bezpośrednio wprowadzanie żywych komórek LAB w postaci kultur starterowych lub niestarterowych kultur ochronnych, które konkurują z drobnoustrojami niepożądanymi i wytwarzają metabolity hamujące ich wzrost [47,48]. Alternatywną strategią jest zastosowanie wyodrębnionych metabolitów LAB, takich jak bakteriocyny, kwasy organiczne czy inne niskocząsteczkowe związki przeciwdrobnoustrojowe [49]. Coraz większe zainteresowanie budzi również wykorzystanie postbiotyków, definiowanych jako preparaty złożone z nieożywionych mikroorganizmów i/lub ich składników, które wywierają korzystny efekt zdrowotny u gospodarza [50], w tym działanie przeciwdrobnoustrojowe. W praktyce technologicznej inne wykorzystywane preparaty LAB, poza postbiotykami, obejmują najczęściej supernatanty hodowlane oraz różnego rodzaju ekstrakty komórkowe [51], które umożliwiają wykorzystanie aktywności biologicznej LAB bez konieczności wprowadzania żywych komórek bakterii do produktu.

W odniesieniu do bakteriocyn, do chwili obecnej jedynie nizyna (produkt Nisaplin®), syntetyzowana przez *Lactococcus lactis*, pozostaje jedyną bakteriocyną zatwierdzoną przez FAO (ang. *Food and Agriculture Organization*) jako środek konserwujący żywność. Nizyna jest także uwzględniona w Unijnym wykazie dodatków do żywności w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 w sprawie dodatków do żywności, co oznacza, że jest dopuszczona do stosowania w określonych kategoriach produktów spożywczych na rynku UE [165]. Z kolei

pediocyna PA-1 (preparaty MicroGARD™ oraz ALTA 2431), mimo że została skomercjalizowana jako składnik środków konserwujących żywność, nie uzyskała dotychczas oficjalnego zatwierdzenia do stosowania w konserwacji żywności [15]. Ponadto, inne bakteriocynty również wykazują potencjał w biokonserwacji, co potwierdzają aktualne doniesienia naukowe [52].

Podsumowując, fermentacja węglowodanów przez LAB od lat wykorzystywana jest w celu przedłużania trwałości żywności, a kontrolowane użycie tych kultur to naturalna alternatywa wobec syntetycznych dodatków służących jej utrwaleniu [46].

### **2.3 Bakterie kwasu octowego – aktywność przeciwdrobnoustrojowa**

Bakterie kwasu octowego (AAB, ang. *acetic acid bacteria*) są Gram-ujemnymi, tlenowymi, nieprzetrwalnikującymi pałeczkami, najczęściej izolowanymi z owoców, miodów, fermentujących napojów alkoholowych, octów, a także z różnych roślin, zarówno uprawnych, jak i dziko rosnących [53]. Wykazują dodatnią aktywność katalazy, ujemną oksydazy i są szeroko stosowane przemysłowo, zwłaszcza w produkcji octu, celulozy bakteryjnej i wybranych farmaceutyków [54]. Ich kluczowym szlakiem metabolicznym jest tlenowe utlenianie etanolu do kwasu octowego, a w niektórych przypadkach także jego dalsza nadoksydacja [55]. Uczestniczą także w procesie wytwarzania wina, cydru oraz napoju kombucha [56]. W niektórych przypadkach znajdują również zastosowanie w dojrzewaniu produktów mięsnych, takich jak fermentowane kiełbasy, gdzie wpływają na rozwój specyficznych cech sensorycznych i stabilność mikrobiologiczną [57]. W przeciwieństwie do LAB, AAB stosuje się głównie jako mieszane, niezdefiniowane kultury (*backslopping*). Spośród nich jedynie *Gluconobacter oxydans* został objęty statusem QPS, z zastrzeżeniem użycia w produkcji witamin [58]. Najczęściej wykorzystywanymi w przemyśle spożywczym gatunkami są *Acetobacter pasteurianus*, *Komagataeibacter europaeus* oraz *Gluconobacter oxydans*. *A. pasteurianus* szybko wytwarza kwas octowy, lecz jest podatny na nadoksydację [59], podczas gdy *K. europaeus* toleruje wysokie stężenia kwasu i etanolu oraz jest wykorzystywany do produkcji celulozy bakteryjnej [60]. Z kolei *G. oxydans* skutecznie wytwarza kwas glukonowy i jego pochodne, co czyni go cennym mikroorganizmem w biotechnologii, m.in. w produkcji witaminy C, miglitolu i dihydroksyacetonu [61].

Bakterie kwasu octowego wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową przede wszystkim dzięki tlenowemu utlenianiu etanolu do kwasu octowego (CH<sub>3</sub>COOH), związku o silnych właściwościach konserwujących, oraz innych kwasów organicznych,

co prowadzi do istotnych zmian warunków środowiskowych ograniczających rozwój drobnoustrojów niepożądanych [56]. Wysoka tolerancja AAB na środowisko kwaśne umożliwia im dominację w takich układach, co znajduje zastosowanie w procesach technologicznych, m.in. w produkcji octu oraz fermentacji mieszanej napoju kombucha [62]. Natomiast celuloza bakteryjna może tworzyć ochronną matrycę polisacharydową, stanowiącą barierę fizyczną ograniczającą dostęp drobnoustrojów niepożądanych i sprzyjającą stabilności mikrobiologicznej produktu [63]. Choć w porównaniu do LAB potencjał przeciwdrobnoustrojowy AAB jest słabiej poznany, rosnące zainteresowanie ich właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi wskazuje na ich możliwe zastosowanie jako element wspomagający biokonserwację w wybranych produktach fermentowanych [64].

#### **2.4 Potencjał zastosowania metabolitów LAB i AAB w biokonserwacji żywności**

W obliczu rosnącego zapotrzebowania na biologiczne metody utrwalania żywności, coraz większe zainteresowanie wzbudza możliwość wykorzystania bakteryjnych metabolitów, zwłaszcza LAB i AAB. Mikroorganizmy te syntetyzują szereg związków o udokumentowanej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, takich jak wspomniane we wcześniejszych rozdziałach: bakteriocyny, kwas mlekowy, octowy, glukonowy, glukuronowy, nadtlenuk wodoru, diacetyl czy dwutlenek węgla. Związki te wpływają na obniżenie pH, zaburzenia funkcjonowania błon komórkowych mikroorganizmów, a także generowanie stresu oksydacyjnego, co skutecznie ogranicza rozwój bakterii patogennych i mikroorganizmów odpowiedzialnych za psucie żywności [18,65].

Łączne występowanie oraz funkcjonalne współdziałanie LAB i AAB znajduje szerokie zastosowanie w technologii żywności, przede wszystkim w procesach fermentacji tradycyjnych fermentacji i projektowania nowoczesnych produktów spożywczych. W takich systemach mikrobiologicznych obie grupy bakterii mogą współwystępować w procesie sukcesji ekologicznej, tworząc złożone społeczności, w których zachodzą zarówno interakcje synergistyczne, jak i antagonistyczne. Przykładami produktów, w których obserwuje się taką koegzystencję mikroorganizmów, są ocet, kwaśne piwa, fermentowane ziarna kakao i kawy, napoje kefirowe, napój kombucha oraz zakwas [53]. Jak wskazano w pracy przeglądowej Han i in. (2024) [53] inne mikroorganizmy często wspomagają wzrost AAB i produkcję kwasu octowego,

natomiast same AAB wykazują dominujący, hamujący wpływ na LAB i drożdże, głównie poprzez produkcję kwasu octowego, generowanie reaktywnych form tlenu oraz zaburzenia komunikacji *quorum sensing*. Bezpośrednią analizę interakcji LAB–AAB przeprowadzono m.in. w badaniu Xia i in. (2022) dotyczącym fermentacji stałej tradycyjnego chińskiego octu zbożowego [66]. Wykazano w nim, że *Acetobacter pasteurianus* hamował wzrost i metabolizm *Lactobacillus helveticus*, mimo braku bezpośredniej konkurencji o składniki odżywcze, co wskazuje na relację typu amensalizmu. Z kolei w badaniu Chai i in. (2020) [67] wykazano, że pomimo zahamowania wzrostu LAB przez AAB, kokultura *L. casei* i *A. pasteurianus* prowadziła do synergicznego zwiększenia produkcji acetoiny oraz modulacji metabolizmu całej mikrobioty fermentacyjnej, poprawiając profil fermentacyjny octu.

Dostępne są jedynie ograniczone dane dotyczące łącznego stosowania preparatów bakteryjnych czy związków przeciwdrobnoustrojowych wytwarzanych przez LAB i AAB w biokonserwacji żywności. Castellano i in (2018) [36] wykazali, że połączenie bakteriocyny produkowanej przez *Lactobacillus sakei* z kwasami organicznymi (mlekowym i octowym) skutecznie eliminowało *Listeria monocytogenes* z parówek podczas chłodniczego przechowywania. Z kolei Ghabraie i in. (2016) [68] zastosowali mikrokapsułki zawierające m.in. nizinę oraz sole kwasów organicznych, uzyskując istotne obniżenie liczebności *L. monocytogenes* w kiełbasach wieprzowych. Należy jednak podkreślić, że w tego typu badaniach pochodzenie zastosowanych kwasów organicznych nie było określone, co uniemożliwia jednoznaczne przypisanie ich aktywności do metabolizmu bakterii AAB.

Podsumowując, mimo istniejących badań nad łącznym stosowaniem bakteriocyn LAB i kwasów organicznych w biokonserwacji żywności oraz licznych doniesień o interakcjach LAB i AAB w procesach wytwarzania żywności fermentowanej, zauważono brak danych literaturowych dotyczących celowego stosowania metabolitów LAB i AAB jako zintegrowanego systemu biokonserwacji żywności. Jednocześnie, zamiast izolowania pojedynczych metabolitów, co jest kosztowne i technicznie wymagające, atrakcyjną alternatywą wydaje się wykorzystanie bezkomórkowych preparatów (CFS) – supernatantów zawierających mieszaninę metabolitów o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym, które mogą działać synergistycznie i stanowić skuteczne, a zarazem technologicznie przystępne rozwiązanie w kontekście biokonserwacji.

Jednocześnie brak jest danych dotyczących skuteczności połączonego CFS z LAB i AAB w warunkach rzeczywistych, szczególnie w wyrobach mięsnych, które ze względu na wysoką zawartość wody, wartość odżywczą i podatność na psucie stanowią odpowiednią matrycę do oceny naturalnych barier biologicznych. Połączony potencjał LAB i AAB wydaje się szczególnie obiecujący, zarówno z uwagi na komplementarność wytwarzanych metabolitów, jak i możliwe efekty synergiczne. Zastosowanie ich w ramach strategii łączących różne naturalne bariery mikrobiologiczne może zwiększyć skuteczność hamowania rozwoju niepożądanych mikroorganizmów przy minimalnym wpływie na jakość sensoryczną produktów, co uzasadnia potrzebę dalszych badań zarówno *in vitro*, jak i w rzeczywistych modelach spożywczych.

### **3. CEL I HIPOTEZY BADAWCZE**

Celem badań była identyfikacja metabolitów bakterii fermentacji mlekowej i bakterii kwasu octowego, analiza ich synergistycznego działania w układach modelowych wobec bakterii patogennych i psujących żywność oraz ocena możliwości ich zastosowania jako biologicznego środka konserwującego mięso i wyroby mięsne.

Cel pracy realizowany był w oparciu o następujące hipotezy badawcze:

- [H1].** Metabolity wytwarzane przez wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej oraz bakterii kwasu octowego, stosowane w mieszaninach, wykazują synergistyczne działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii patogennych i psujących mięso oraz jego wyroby.
- [H2].** Efekt przeciwdrobnoustrojowy metabolitów bakterii fermentacji mlekowej i bakterii kwasu octowego wynika z komplementarnego działania kwasów organicznych, bakteriocyn i innych związków bioaktywnych wytwarzanych przez te mikroorganizmy.
- [H3].** Aplikacja wybranych metabolitów bakteryjnych i ich mieszanin do mięsa, prowadzi do poprawy jakości mikrobiologicznej oraz wydłużenia trwałości przechowalniczej wyrobów mięsnych surowych.

### 3.1 Zakres pracy

Zakres oraz metody badawcze, opisane i zastosowane w niniejszej rozprawie doktorskiej, zostały zaprezentowane poniżej (**tab. 1**).

**Tabela 1.** Zakres i etapy badań przeprowadzonych w rozprawie doktorskiej.

Etap badań	Temat	Materiały i metody	Publikacja
Etap I	<p><i>Ocena synergistycznego efektu połączenia różnych barier mikrobiologicznych w kształtowaniu bezpieczeństwa i trwałości mięsa i jego wyrobów – studium literaturowe.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>Analiza wyników badań w oparciu o systematyczny przegląd literatury.</b></li> <li><b>Identyfikacja luki badawczej i selekcja szczepów LAB i AAB do badań eksperymentalnych.</b></li> </ol>	4.1.1., 4.2.1.	[P1]
Etap II	<p><i>Ocena efektu antymikrobiologicznego i biokonserwującego in vitro oraz in situ połączenia metabolitów LAB i AAB.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>Ocena właściwości fizykochemicznych, przeciwdrobnoustrojowych i przeciwutleniających metabolitów LAB i AAB.</b></li> <li><b>Analiza determinantów genetycznych oraz analiza proteomiczna związków bioaktywnych obecnych w CFS szczepów <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> B1 i <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> O24.</b></li> <li><b>Weryfikacja skuteczności biokonserwacyjnej metabolitów LAB i AAB w warunkach modelowych.</b></li> <li><b>Wybór preparatów metabolitów LAB i AAB do dalszych badań i określenie warunków ich zastosowania.</b></li> </ol>	4.1.2, 4.1.3, 4.2.2	[P2], [P3]
Etap III	<p><i>Ocena jakości i trwałości surowych wyrobów mięsnych poddanych biokonserwacji preparatami metabolitów LAB i AAB – badania aplikacyjne w skali półtechnicznej.</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li><b>Ocena wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na jakość mikrobiologiczną i trwałość modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania.</b></li> <li><b>Ocena wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na stabilność oksydacyjną modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania.</b></li> <li><b>Ocena wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na wybrane parametry fizykochemiczne modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania.</b></li> </ol>	4.1.2, 4.1.4, 4.2.2	[P4]

## 4. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

### 4.1 Materiał do badań

#### 4.1.1 Publikacje zakwalifikowane do przeglądu systematycznego

W etapie I badań materiał do analizy stanowiły publikacje naukowe z zakresu mikrobiologii żywności, dotyczące zastosowania kombinacji substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej pochodzenia bakteryjnego w ograniczaniu wzrostu bakterii chorobotwórczych oraz mikroorganizmów powodujących psucie żywności w mięsie i jego przetworach. W wyniku selekcji do dalszej oceny zakwalifikowano 45 unikatowych badań, które stanowiły podstawę analizy jakościowej.

#### 4.1.2 Szczepy bakterii

Do badań realizowanych w ramach etapu II oraz III wykorzystano cztery szczepy bakterii o udokumentowanym potencjale przeciwdrobnoustrojowym, w tym dwa szczepy LAB oraz dwa szczepy AAB, pochodzące z kolekcji mikroorganizmów Katedry Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Szczepy LAB: *Lacticaseibacillus paracasei* B1 (nr GenBank: CP161807, CP161808), wyizolowany z polskiego regionalnego sera owczego bundz, oraz *Lactiplantibacillus plantarum* O24 (nr GenBank: CP157747–CP157755), pochodzący z ogórków kiszonych, zostały wybrane na podstawie wcześniejszych badań Ołdak i in. (2017) [69], Zielińskiej i in. (2015) [70], Zielińskiej i in. (2019) [71] oraz Zielińskiej i in. (2021) [72], w których wykazano ich aktywność przeciwdrobnoustrojową *in vitro* oraz potencjalne właściwości probiotyczne.

Z kolei szczepy AAB obejmowały *Gluconobacter oxydans* KNS32 (nr GenBank: OQ597203), wyizolowany z lokalnego napoju kombucha, którego potencjał postbiotyczny supernatantu opisano wcześniej przez Neffe-Skocińską i in. (2024) [73], oraz *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1 (nr GenBank: OQ594827), pozyskany z lokalnego octu miodowego. Wybór szczepu *K. saccharivorans* KOM1 uzasadniono jego przynależnością do rodzaju powszechnie wykorzystywanego w procesach biotechnologicznych związanych z utlenianiem związków organicznych oraz zdolnością do wytwarzania metabolitów o potencjalnym znaczeniu przeciwdrobnoustrojowym.

Szczepy przechowywano w temperaturze  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  w postaci stoków z dodatkiem 20% (v/v) glicerolu, odpowiednio w podłożu MRS (LAB) lub GC (AAB). Przed rozpoczęciem doświadczeń szczepy rozmrażano, a następnie aseptycznie inokulowano

do odpowiednich podłoży hodowlanych i inkubowano w warunkach optymalnych dla danego rodzaju mikroorganizmów. Hodowle LAB prowadzono w bulionie MRS w temperaturze 37 °C, z zapewnieniem warunków beztlenowych przy użyciu słoików anaerobowych z saszetkami AnaeroGen™, natomiast hodowle AAB prowadzono tlenowo w podłożu Hestrina i Shramma (HS) w temperaturze 28 °C przez 48 h. W obu przypadkach uzyskiwano aktywne hodowle o liczebności rzędu  $10^7$ – $10^9$  jtk/ml.

Po zakończeniu inkubacji hodowle wirowano ( $3341\times g$ , 15 min) w celu oddzielenia biomasy komórkowej, a uzyskane supernatanty filtrowano sterylnie przez filtry o średnicy porów 0,22  $\mu m$ . Dla szczepów LAB przygotowano trzy typy preparatów: bezkomórkowe supernatanty (CFS), supernatanty z hodowli poddanych inaktywacji termicznej (hkCFS; 80 °C, 20 min) oraz supernatanty zneutralizowane do  $pH 6,0 \pm 0,2$  (nCFS) przy użyciu 1 M NaOH w celu eliminacji wpływu kwasów organicznych. W przypadku szczepów AAB, na podstawie badań wstępnych wykazujących utratę aktywności przeciwdrobnoustrojowej po inaktywacji termicznej i neutralizacji pH, przygotowano wyłącznie bezkomórkowe supernatanty (CFS), zgodnie z analogiczną procedurą separacji i filtracji dotyczącą szczepów LAB.

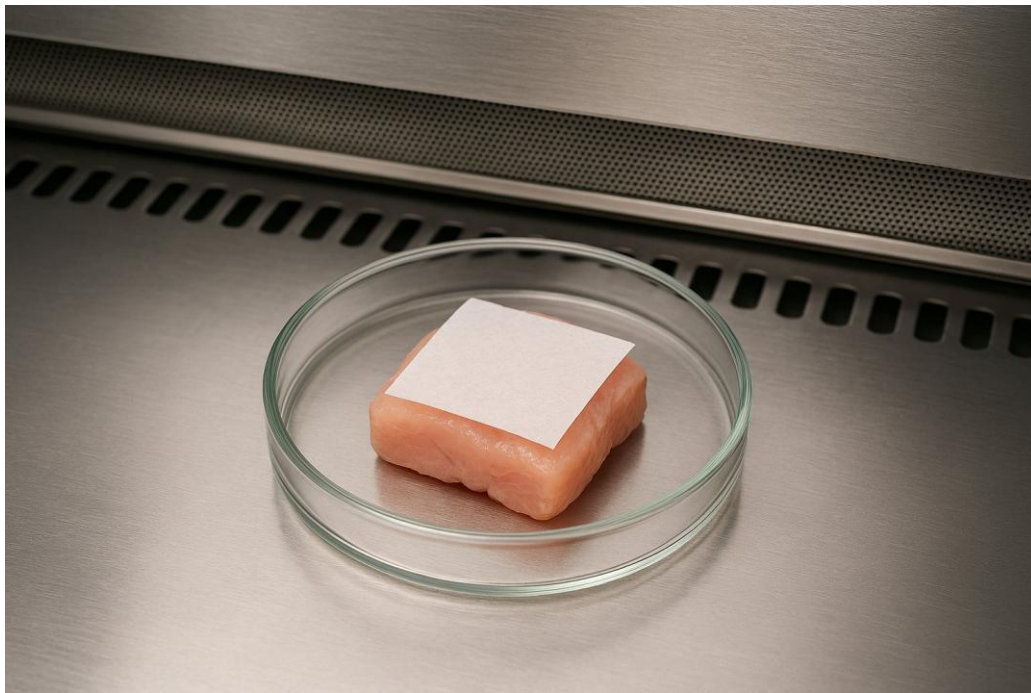
W ramach badań nad właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, zastosowano wyselekcjonowane szczepy wskaźnikowe, obejmujące bakterie Gram-dodatnie: *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 (wcześniej klasyfikowany jako *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*) oraz *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, a także bakterie Gram-ujemne: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 10536 oraz *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123. Ponadto, do badań wykorzystano szczególnie szczep wskaźnikowy – *Escherichia coli* O157:H7, dostępny podczas odbywanego w 2023 roku stażu naukowego na University of Calgary (Kanada). Jest to szczep o wysokiej zjadliwości, należący do grupy enterohemoragicznych *E. coli* (EHEC), charakteryzujący się zdolnością do wytwarzania toksyn Shiga i powodowania ciężkich zakażeń u ludzi. Z tego względu wszystkie eksperymenty z jego użyciem przeprowadzono w warunkach zwiększonego reżimu bezpieczeństwa biologicznego.

Wszystkie szczepy przechowywano w postaci zawiesin glicerolowych, a przed użyciem aktywowano poprzez wysiew na odpowiednie podłoża selektywne i różnicujące właściwe dla danego gatunku bakterii. Płytki z posiewami inkubowano w temperaturze 37 °C przez ok. 24 godziny. Następnie pojedyncze kolonie każdego szczepu przenoszono

do bulionu Mueller-Hinton, w którym prowadzono hodowle tlenowe, w warunkach statycznych bądź z łagodnym mieszaniem, w zależności od wymagań szczepu.

#### 4.1.3 Model badawczy z mięsa drobiowego

W etapie II badań do oceny działania przeciwdrobnoustrojowego zastosowano surowe filety z piersi kurczaka (Morliny, Animex, Kutno, Polska), które porcjowano aseptycznie (ok. 5 g). Mięso inokulowano 10  $\mu\text{L}$  zawiesiny *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 o końcowym poziomie ok.  $1 \times 10^3$  jtk/g. Następnie na powierzchnię mięsa nakładano jałowy papier bibułowy, po czym aplikowano 200  $\mu\text{L}$  wybranych preparatów bakteryjnych (kontrola: woda MilliQ). Próby inkubowano 24 h w temp. 37 °C oraz 7 dni w temp. 4 °C. Doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach (rys. 2).



**Rysunek 2.** Przykład przygotowanej porcji mięsa drobiowego w modelu badawczym zastosowanym w etapie II. Źródło: opracowanie własne z wykorzystaniem narzędzia sztucznej inteligencji (M365 Copilot).

#### 4.1.4 Modelowy wyrób mięsny surowy

W etapie III pracy jako matrycę do badań zastosowano modelowy surowy wyrób mięsny typu mięso garmazeryjne, który został wytworzony z mięsa drobnego klasy II z szynki wieprzowej, rozdrobnionego przez siatkę o średnicy oczek 8 mm z dodatkiem soli i wody. Mięso pochodziło z półtuszy wieprzowych pozyskanych 48 h po uboju,

schłodzonych do 2 °C i pozbawionych wad jakościowych. Jego podstawowy skład chemiczny (średnia ± SD, n=3) wynosił: woda – 60,95 ± 1,83%, białko – 16,00 ± 0,90%, kolagen – 1,36 ± 0,22%, tłuszcz – 22,48 ± 2,25%. Surowiec zakupiono w lokalnym zakładzie przetwórstwa mięsnego (okolice Warszawy, Polska). Produkcję modelowego wyrobu mięsnego przeprowadzono w hali technologicznej Zakładu Technologii Mięsa i Tłuszczu IBPRS w Warszawie.

Mięso podzielono na jednorodne porcje i przyporządkowano do trzech grup: dwóch badawczych oraz kontrolnej. Stężenie preparatów bakteryjnych ustalono na łączny dodatek 2,5% (v/v).

- **Próba 1** zawierała: 1,25% (v/v) hkCFS z *Lacticaseibacillus paracasei* B1, 1,25% (v/v) CFS z *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1, 2,5% wody (v/v) oraz 1% soli.
- **Próba 2** zawierała 1,25% (v/v) hkCFS z *Lactiplantibacillus plantarum* O24, 1,25% (v/v) CFS z *Gluconobacter oxydans* KNS32, 2,5% wody (v/v) oraz 1% soli.
- **Próba kontrolna** zawierała jedynie 5% wody oraz 1% soli.

Po dokładnym wymieszaniu próby porcjowano, pakowano próżniowo i przechowywano w temp. 4 ± 1 °C. Analizy prowadzono w 0, 3, 6 i 9 dniu przechowywania. Doświadczenie wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach (rys. 3).

## 4.2 Metody badań

### 4.2.1 Badanie literaturowe

Przegląd systematyczny literatury naukowej miał na celu identyfikację i ocenę badań dotyczących zastosowania kombinacji substancji o aktywności przeciwdrobnoustrojowej pochodzenia bakteryjnego w ograniczaniu wzrostu bakterii chorobotwórczych i powodujących psucie żywności, w mięsie i jego przetworach. W celu określenia zakresu badania zastosowano metodologię PICO (ang. *Population, Intervention, Comparator, Outcome*). System ten wywodzi się z badań medycznych, gdzie jest powszechnie stosowany do formułowania pytań badawczych i definiowania kryteriów włączenia w przeglądach systematycznych. W niniejszej pracy został on zaadaptowany na potrzeby nauk o życiu, ponieważ w tej dziedzinie nie opracowano dotąd dedykowanego, powszechnie uznanego schematu do prowadzenia przeglądów systematycznych.



**Rysunek 3.** Surowiec mięsny modelowego wyrobu surowego z dodatkiem mieszanin preparatów metabolitów LAB i AAB (Próba 1 i Próba 2) oraz próba kontrolna. A – surowiec mięsny bezpośrednio po etapie przygotowania prób; B – próby po wymieszeniu, porcjowaniu i zapakowaniu próżniowym, przygotowane do przechowywania w warunkach chłodniczych. Źródło: materiały własne.

- Populacja (P): mięso i produkty mięsne,
- Interwencja (I): zastosowanie kombinacji czynników przeciwdrobnoustrojowych pochodzenia bakteryjnego,
- Porównanie (C): brak zastosowania kombinacji, zastosowanie pojedynczego czynnika lub innych środków przeciwdrobnoustrojowych,
- Wynik (O): efektywność strategii przeciwdrobnoustrojowych oraz wydłużenie trwałości produktów.

Proces wyszukiwania literatury przeprowadzono w lutym 2023 r. Identyfikacja publikacji została przeprowadzona w ramach systematycznego przeszukania

międzynarodowych baz danych: PubMed, Scopus oraz Web of Science, ograniczając wyniki do publikacji w języku angielskim. Do dalszej analizy włączano badania:

- opublikowane po roku 2000,
- obejmujące eksperymentalne badania *in vitro*,
- opisujące synergistyczne działanie czynników pochodzenia mikrobiologicznego w mięsie i jego przetworach.

Z analizy wyłączano:

- badania *in vivo* oraz badania kliniczne,
- prace nieopisujące szczegółowo zastosowanych czynników przeciwdrobnoustrojowych lub warunków ich użycia,
- opracowania przeglądowe, listy do redakcji, opisy przypadków, dane nieopublikowane oraz publikacje zduplikowane.

Proces selekcji został przeprowadzony zgodnie z wytycznymi PRISMA. Na etapie selekcji odrzucono również prace dotyczące łączenia czynników mikrobiologicznych z kwasami organicznymi oraz ich solami, ze względu na niejednoznaczne pochodzenie tych związków (mikrobiologiczne lub chemiczne), co utrudniało jednoznaczną interpretację uzyskiwanych wyników. W wyniku przeszukania baz danych zidentyfikowano łącznie 1307 publikacji, w tym 134 w bazie PubMed, 452 w bazie Scopus oraz 721 w bazie Web of Science. Dodatkowo, poprzez analizę bibliografii publikacji zakwalifikowanych oraz wyszukiwania uzupełniające w Internecie, zidentyfikowano 20 kolejnych opracowań, które uwzględniono w ostatecznej analizie. Z uwagi na wysoką różnorodność (heterogeniczność) w zakresie metod, warunków badań oraz analizowanych efektów włączonych badań, nie przeprowadzono metaanalizy ilościowej. Wyniki opracowano w formie opisu jakościowego, z uwzględnieniem porównania głównych wniosków z poszczególnych badań.

#### **4.2.2      Badania analityczne**

##### ***Badania mikrobiologiczne***

- Aktywność przeciwdrobnoustrojową metabolitów bakteryjnych oraz ich mieszanin (1:1, v/v) oceniano metodą dyfuzji w podłożu agarowym. Szczepy wskaźnikowe namnażano w bulionie Mueller–Hinton przez 24–48 h w temperaturze 37 °C do uzyskania stężenia około  $1,4 \times 10^7$  jtk/mL. Następnie agar Mueller–Hinton zaszczipiano hodowlą wskaźnikową w ilości 1% inokulum, uzyskując końcowe

stężenie około  $1 \times 10^6$  jtk/mL, po czym podłoże wylewano na jałowe szalki Petriego. Po zestaleniu agaru wycinano studzienki o średnicy 5,5 mm, które napełniano 100  $\mu$ L badanego preparatu (CFS, hkCFS, nCFS lub ich mieszanin). Posiewy inkubowano przez 18 h w temperaturze 37 °C, a następnie oceniano obecność stref zahamowania wzrostu. Średnice stref inhibicji mierzono suwmiarką, a aktywność przeciwdrobnoustrojową wyrażano zgodnie ze wzorem:  $x = D - d$ , gdzie  $D$  oznacza średnicę strefy inhibicji (mm), a  $d$  – średnicę studzienki (mm).

- Minimalne stężenie hamujące (MIC) metabolitów bakteryjnych oznaczano metodą mikrorozcieńczeń w bulionie Mueller–Hinton. Hodowle nocne szczepów wskaźnikowych standaryzowano do wartości  $OD_{600} = 0,5$ , a następnie 100  $\mu$ L zawiesiny bakteryjnej przenoszono do dołków płytki 96-dołkowej. Preparaty bakterii fermentacji mlekowej (CFS, hkCFS, nCFS) oraz bakterii kwasu octowego (CFS) poddawano dwukrotnym rozcieńczeniom w zakresie 50–0,049% i dodawano do zawiesiny bakterii wskaźnikowych w objętości 100  $\mu$ L, uzyskując końcową objętość 200  $\mu$ L na dołek. Dodatkowo oceniano działanie kombinacji metabolitów LAB i AAB metodą mikrorozcieńczeń w układzie szachownicy (1:1, v/v). Płytki inkubowano przez 18–24 h w temperaturze 37 °C, po czym wzrost mikroorganizmów oceniano spektrofotometrycznie na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 600 nm. Wartość MIC definiowano jako najniższe stężenie badanego preparatu, przy którym wartość  $OD_{600}$  była niższa niż 0,05. W każdej serii pomiarów uwzględniano kontrolę dodatnią i ujemną.
- Frakcyjne stężenie hamujące (FIC) dla każdego preparatu obliczano, dzieląc MIC w kombinacji przez MIC samego preparatu. Następnie obliczano wskaźnik FICI (ang. *Fractional Inhibitory Concentration Index*) jako sumę FIC obu preparatów:
 
$$\text{FICI} = (\text{MIC preparatu A w kombinacji} / \text{MIC preparatu A osobno}) + (\text{MIC preparatu B w kombinacji} / \text{MIC preparatu B osobno})$$
 gdzie  $A$  to preparat pochodzenia LAB, a  $B$  to preparat pochodzenia AAB.  $\text{FICI} \leq 0,5$  oznacza synergizm,  $0,5-1,0$  interakcję addytywną,  $1,0-4,0$  brak interakcji, a  $\text{FICI} \geq 4,0$  antagonizm.
- Analizy mikrobiologiczne mięsa drobiowego zakażonego szczepem *Salmonella* Enteritidis przeprowadzono po 24 godzinach inkubacji w temp. 37 °C oraz po 7 dniach chłodniczego przechowywania w temp. 4 °C. W celu pobrania próby z powierzchni mięsa wykonywano wymaz jałowym patyczkiem wymazowym, który następnie bezpośrednio rozprowadzano na powierzchni odpowiedniego podłoża

agarowego metodą powierzchniową. Liczbę drobnoustrojów oznaczano metodą płytkową, stosując Plate Count Agar (PCA) (30 °C, 48 h) do oznaczania ogólnej liczby bakterii oraz Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) (37 °C, 24 h) do selektywnego oznaczania *S. Enteritidis*. Każde oznaczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki oznaczeń liczby drobnoustrojów wyrażano jako log<sub>10</sub> jtk/g.

- Analizy mikrobiologiczne modelowego surowego wyrobu mięsnego z dodatkiem mieszanin metabolitów bakteryjnych prowadzono w 0, 3., 6. oraz 9. dniu chłodniczego przechowywania. W celu oznaczenia liczby drobnoustrojów oraz wykrycia obecności patogenów próby mięsa o masie 10 g lub 25 g homogenizowano przez 2 min w Stomacherze z odpowiednio 90 mL lub 225 mL buforowanej wody peptonowej. Następnie wykonywano rozcieńczenia dziesiętne, które posiewano na odpowiednie podłoża selektywne. Ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD) oznaczano na podłożu PCA po inkubacji w temperaturze 30 °C przez 48 h, bakterie fermentacji mlekowej (LAB) na podłożu MRS (37 °C, 48 h), *Escherichia coli* na podłożu TBX (44 °C, 18–24 h), Enterobacteriaceae na podłożu VRBG (37 °C, 24 h), natomiast gronkowce koagulazo-dodatnie na podłożu RPF (37 °C, 18–24 h). Obecność *Salmonella* spp. wykrywano po wstępnym namnażaniu w bulionie tetracionianowym, a następnie po posiewie na podłoża XLD oraz Rambach (37 °C, 24 h). Wykrywanie *Listeria monocytogenes* prowadzono po namnażaniu w bulionach Half Fraser i Fraser, z wykorzystaniem podłoży selektywnych: agaru chromogenego Listeria oraz Palcam (37 °C, 24–48 h). Wyniki oznaczeń liczby drobnoustrojów wyrażano jako log<sub>10</sub> jtk/g.

#### ***Badania fizykochemiczne***

- Zawartość cukrów i kwasów organicznych oznaczono w wybranych supernatantach bakteryjnych oraz odpowiednich podłożach hodowlanych. Analizy wykonano metodą HPLC z użyciem kolumny Aminex HPX-87H, stosując 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> jako fazę ruchomą (0,5 mL/min, 40 °C). Wykorzystano detekcję UV (210 nm), RI oraz zewnętrzne krzywe wzorcowe. Oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach.
- Zawartość związków fenolowych (TPC) w preparatach metabolitów bakteryjnych oznaczono metodą Folina–Ciocalteu. Po rozcieńczeniu prób w wodzie MilliQ dodawano odczynnik Folina–Ciocalteu i roztwór Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, a następnie inkubowano 30 min w temp. pokojowej. Absorbancję mierzono przy 750 nm. Zawartość fenoli wyrażono jako mg GAE/100 mL na podstawie krzywej wzorcowej (R<sup>2</sup> = 0,999). Wykonano osiem powtórzeń biologicznych.

- Zdolność antyoksydacyjną metabolitów bakteryjnych oznaczano z wykorzystaniem metod redukcji kationu rodnikowego ABTS<sup>•+</sup> oraz rodniaka DPPH. Roztwór ABTS<sup>•+</sup> przygotowywano zgodnie z procedurą standardową i rozcieńczano do uzyskania absorbancji 0,7 przy długości fali 734 nm. Następnie roztwór ten mieszano z odpowiednio rozcieńczonymi próbkami w stosunku objętościowym 1:1, a po 6-minutowej inkubacji mierzono absorbancję przy 734 nm. Redukcję rodniaka DPPH do formy DPPH-H oceniano po 30-minutowej inkubacji mieszaniny prób z roztworem DPPH o absorbancji 1,1 przy 517 nm, wykonując pomiar absorbancji przy 517 nm. W obu metodach wyniki wyrażano jako równoważnik kwasu askorbinowego (VCEAC) na podstawie krzywych wzorcowych o wysokiej liniowości ( $R^2 = 0,998$ ). Oznaczenia przeprowadzono w ośmiu powtórzeniach biologicznych.
- Odczyn pH preparatów bakteryjnych oznaczano przy użyciu pH-metru Orion Star™ A211. Natomiast w przypadku modelowego surowego wyrobu mięsnego z dodatkiem mieszanin metabolitów bakteryjnych próby mięsa o masie 10 g homogenizowano z 50 mL wody destylowanej przez 1 min, po czym pomiar pH wykonywano pH-metrem Mettler Delta 350 wyposażonym w automatyczną kompensację temperatury oraz elektrodę szklano-kalomelową.
- Potencjał oksydacyjno-redukcyjny (ORP) modelowego surowego wyrobu mięsnego z dodatkiem mieszanin metabolitów bakteryjnych próby przeprowadzono przy użyciu pH-metru Mettler Delta 350 wyposażonego w elektrodę redoks InLab Redox Pro. Uzyskane wartości przeliczano na potencjał elektrochemiczny EH poprzez dodanie wartości elektrody odniesienia, wynoszącej 207 mV.
- Barwę modelowego surowego wyrobu mięsnego z dodatkiem mieszanin metabolitów bakteryjnych mierzono przy użyciu spektrofotometru CR-300 w systemie CIE Lab\*, przy standardowym oświetleniu D65 oraz obserwatorze 2°. Dla każdego powtórzenia wykonano sześć niezależnych pomiarów.
- Liczbę kwasową w próbkach modelowego wyrobu mięsnego oznaczano metodą miareczkową zgodnie z normą PN-EN ISO 660:2021-03, pkt 9.3. Wyniki wyrażano jako mg KOH przypadające na 1 g produktu, w zakresie pomiarowym 0,05–30,00 mg KOH/g.

- Liczbę nadtlenkową oznaczano metodą miareczkową zgodnie z normą PN-EN ISO 3960:2017-03. Wyniki wyrażano jako milirównoważniki tlenu na kilogram produktu (meq O<sub>2</sub>/kg).
- Utlenianie lipidów w modelowym surowym wyrobie mięsnym z dodatkiem mieszanin metabolitów bakteryjnych oznaczano metodą TBARS. Próby mięsa o masie 10 g homogenizowano przez 1 min z 4% kwasem nadchlorowym i 0,01% BHT w etanolu, następnie filtrowano, a 1 mL filtratu inkubowano z 1 mL roztworu 0,02 M TBA w temperaturze 100 °C przez 60 min. Absorbancję mierzono przy 532 nm, a wyniki wyrażano jako mg malondialdehydu (MDA)/kg próby.
- Zawartość cholesterolu określano przy użyciu chromatografii gazowej z detektorem FID (HP/Agilent 6890 II) zgodnie z procedurą IBPRS-PIB, a wyniki podawano w mg/100 g produktu.
- Skład kwasów tłuszczowych analizowano metodą chromatografii gazowej (HP 6890 II-FID, kolumna BPX 70) z użyciem standardu wewnętrznego C21:0. Identyfikację kwasów tłuszczowych przeprowadzano poprzez porównanie czasów retencji z wzorcem Supelco 37-Component FAME Mix, a wyniki podawano w g/100 g całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych.

#### ***Badania genetyczne***

Genomy szczepów B1 i O24 sekwencjonowano w GenXone SA (Złotniki, Polska) metodą Nanopore (platforma GridION X5). Po izolacji DNA przygotowano biblioteki Rapid Barcoding Kit, odczyty przetwarzano w Guppy, a genomy składano w Flye i annotowano w Prokka, Bakta oraz z użyciem RefSeq. Analizy obejmowały identyfikację genów oporności (RGI), przewidywanie HGT (Alien\_hunter), wykrywanie elementów mobilnych (mobileOG-db), systemów CRISPR-Cas (CRISPRCas-Finder), regionów profagowych (VirSorter, Phigaro) oraz genów bakteriocyn (BAGEL4).

#### ***Badania proteomiczne***

- Stabilność supernatantów LAB wobec czynników fizykochemicznych i enzymatycznych badano oceniając wpływ wysokiej temperatury (20 min w 60, 80, 100 lub 121 °C), szerokiego zakresu pH (2–11, regulowanego 1 M NaOH/HCl) oraz enzymów proteolitycznych (trypsyna, pepsyna, proteinaza K w stężeniu 1 mg/mL, rozpuszczone w 0,05 M buforze Tris). Przygotowane czynniki inkubowano z CFS w temperaturze 37 °C przez 2 h, a następnie oceniano aktywność przeciwdrobnoustrojową metodą dyfuzyjną wobec *L. monocytogenes*, *S. aureus*

i *S. Enteritidis*, wyrażając wyniki jako utratę strefy zahamowania wzrostu względem kontroli.

- Analizę spektroskopową FT-IR przeprowadzono badając grupy funkcyjne i składniki aktywne w supernatantach CFS oraz w supernatantach po inaktywacji cieplnej hodowli (80 °C, 5, 15, 30 min). Preparaty suszono, prasowano z KBr i analizowano w zakresie 4000–400 cm<sup>-1</sup> przy użyciu spektrofotometru Nicolet 6700.
- Częściowe oczyszczenie i frakcjonowanie białek z supernatantów LAB prowadzono przez strącanie siarczanem amonu (80%). Po 24 h mieszania w temp. 4°C osady odwirowywano, rozpuszczano w buforze PBS i dializowano przez 24 h w kasetach Slide-A-Lyzer™ (próg 2 kDa), a następnie przechowywano w temp. –20 °C. Aktywność przeciwdrobnoustrojową oznaczano metodą mikrorozcieńczeń wobec *E. coli* O157:H7 i wyrażano w AU/mL, a zawartość białka określano zestawem Qubit Protein Assay Kit.
- Szacowanie masy cząsteczkowej białek przeprowadzono metodą SDS-PAGE przy użyciu żeli SurePAGE™ 8–16% oraz wzorca PageRuler Plus (10–250 kDa). Elektroforezę prowadzono przy 120 V przez 1,5 h, po czym pasma barwiono błękitem Coomassiego i wycięte fragmenty przekazywano do dalszej analizy LC-MS/MS w Laboratorium Spektrometrii Mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Warszawa, Polska). Do trawienia białek stosowano sekwencję odbarwiania w 50% acetonitrylu w 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, suszenia w 100% ACN, redukcji cystein DTT (10 mM, 30 min, 57 °C) i alkilacji jodoacetamidem (0,5 M, 45 min, temperatura pokojowa). Trawienie trypsyną (10 ng/μL) prowadzono przez 16–18 h w temperaturze 37 °C, a uzyskane peptydy ekstrahowano w roztworze 0,1% TFA i 2% ACN.
- Analizę spektrometrii masowej (LC-MS/MS) przeprowadzono przy użyciu systemu Evosep One połączonego z Orbitrap Exploris 480, wykorzystując kolumnę EvoTIPS C18 i gradient 44-minutowy przy przepływie 500 nL/min. Parametry pomiaru: MS1 – rozdzielczość 60 000, MS2 – 15 000, dynamiczna ekskluzja 20 s, fragmentacja HCD przy 32%, temperatura kapilary 275 °C, napięcie 2,1 kV. Dane MS wstępnie przetworzono przy użyciu programu Mascot Distiller v2.8.5, a identyfikację białek przeprowadzono na serwerze Mascot v2.8.3.
- Identyfikację białek przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch najczęściej stosowanych baz danych: SwissProt oraz UniProt/Lactobacillales (v06\_2024),

uzupełnionej o bazę zanieczyszczeń CRAP. W wyniku analizy wygenerowano raport z Mascot, zawierający listy zidentyfikowanych białek w każdym prążku. Dodatkowo, tam gdzie było to możliwe, uzyskano szczegółowe informacje na temat zidentyfikowanych peptydów oraz alternatywnych białek odpowiadających tym samym zestawom peptydów. W trakcie analizy utrzymano wskaźnik FDR poniżej 5%, zapewniając wysoką wiarygodność wyników.

### *Analizy statystyczne*

W II etapie badań do oceny jednorodności wariancji zastosowano test Browna-Forsythe'a, natomiast do weryfikacji normalności rozkładu danych użyto testu Shapiro-Wilka. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a test Tukeya posłużył do identyfikacji istotnych różnic pomiędzy zestawami danych ( $p < 0,05$ ). Wykorzystano oprogramowanie Statistica v13.1.

W III etapie badań pomiary wykonano w dniach 0, 3., 6. i 9. Wyniki przedstawiono jako mediany i zakresy międzykwartyłowe. Wpływ czasu przechowywania oceniano testem Friedmana, a efekt zabiegów – testem Kruskala-Wallisa ( $\alpha = 0,05$ ). Porównania par median wykonano testem Durbin-Conovera z korektą Dunn-Sidak. Do analizy wielowymiarowej zastosowano eksploracyjną analizę czynnikową (EFA) z faktoryzacją osi głównych i rotacją Oblimin, przy liczbie czynników określonej na podstawie wartości własnych  $> 1$  i ładunkach czynnikowych  $> 0,50$  (analiza dla dni 0 i 9.). Zmiany parametrów w czasie analizowano funkcjonalną analizą składowych głównych (FPCA). Obliczenia wykonano w Jamovi (v. 2.6.26) i RStudio 2024.12.1-563.

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

### 5.1 Ocena synergistycznego efektu połączenia różnych barier mikrobiologicznych w kształtowaniu bezpieczeństwa i trwałości mięsa i jego wyrobów – studium literaturowe

#### 5.1.1 Analiza wyników badań w oparciu o systematyczny przegląd literatury [P1]

W I etapie badań, w oparciu o analizę dostępnej literatury naukowej, przeprowadzono ocenę synergistycznego efektu wynikającego z zastosowania różnych barier mikrobiologicznych w biokonserwacji mięsa i jego wyrobów.

Szczegółowa analiza 45 zakwalifikowanych do systematycznego przeglądu oryginalnych prac badawczych wykazała, że zdecydowana większość aplikacji polegała na dodaniu kultur starterowych bezpośrednio do produktów mięsnych w trakcie procesu fermentacji [P1 – tab. 1]. Innym często stosowanym rozwiązaniem było łączenie różnych niestarterowych kultur ochronnych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [P1 – tab. 2]. W tym przypadku badane produkty mięsne nie były fermentowane, lecz stanowiły produkty świeże, takie jak mięso mielone czy produkty gotowe do spożycia (*ready-to-eat*). W obu grupach przypadków mieszaniny czynników przeciwdrobnoustrojowych dodawano w postaci świeżej, liofilizowanej lub w formie supernatantów uzyskanych w wyniku wirowania hodowli bakteryjnych. W innych badaniach oceniano potencjalne zastosowanie metabolitów oraz oczyszczonych lub częściowo oczyszczonych związków biologicznie czynnych pochodzenia mikrobiologicznego, w tym działanie synergiczne bakteriocyn z innymi bakteriocynami, substancjami o działaniu bakteriocynopodobnym – BLIS (ang. *bacteriocin-like inhibitory substances*), reuteryną oraz białkami warstwy powierzchniowej (ang. *S-layer*) [P1 – tab. 3, 4, 5, 6, 7]. W jednym z badań zastosowano kombinację białka przeciwgrzybiczego PgAFP z kulturami ochronnymi [P1 – tab. 8].

Na podstawie dostępnych danych literaturowych można stwierdzić, że preparaty bakteryjne stosowane w badaniach włączonych do przeglądu systematycznego w zdecydowanej większości opierały się substancjach pozyskanych ze szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Najczęściej wykorzystywano przedstawicieli rodzajów *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* oraz bakterie zaliczane wcześniej do rodzaju *Lactobacillus*, które dominują w fermentowanych produktach mięsnych ze względu na swoje właściwości technologiczne i przeciwdrobnoustrojowe. Rzadziej w badaniach stosowano preparaty mieszane łączące LAB z koagulazo-ujemnymi gronkowcami, głównie *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus carnosus*, których

obecność miała na celu poprawę cech sensorycznych oraz stabilności produktu. Najczęściej wykorzystywano kombinacje LAB z drożdżami, takimi jak *Debaryomyces* spp. czy *Candida* spp., ze względu na ich potencjał w kształtowaniu aromatu i barwy oraz udział w procesach dojrzewania.

Zestawione dane wskazują, że odpowiednio dobrane połączenia mikrobiologicznych barier mogą (1) zwiększać skuteczność konserwacji, (2) poszerzać spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, (3) ograniczać ryzyko ponownego wzrostu patogenów oraz (4) umożliwiać redukcję dawek stosowanych dodatków, zarówno mikrobiologicznych, jak i chemicznych. Przyczynia się to do poprawy jakości i bezpieczeństwa produktów mięsnych, a jednocześnie zmniejsza koszty i obciążenie środowiskowe procesów technologicznych.

### **5.1.2 Identyfikacja luki badawczej i selekcja szczepów LAB i AAB do badań eksperymentalnych**

W trakcie realizacji etapu I badań, obejmującego systematyczny przegląd literatury naukowej, zidentyfikowano istotną lukę badawczą polegającą na braku danych dotyczących synergistycznego zastosowania preparatów bakteryjnych zawierających jednocześnie szczepy bakterii fermentacji mlekowej (LAB) oraz bakterii kwasu octowego (AAB), w szczególności w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w biokonserwacji żywności.

W odpowiedzi na zidentyfikowaną lukę badawczą zaprojektowano kolejne etapy badań (II oraz III), których celem była eksperymentalna ocena synergistycznego działania wyselekcjonowanych szczepów LAB i AAB pochodzących z naturalnych, tradycyjnych produktów fermentowanych, charakteryzujących się udokumentowanymi właściwościami funkcjonalnymi i technologicznymi. Dobór szczepów był konsekwencją przyjętej koncepcji badawczej oraz analizy wyników wcześniejszych badań zespołowych realizowanych w Katedrze Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności SGGW w Warszawie, w ramach których liczne szczepy LAB i AAB wstępnie oceniano pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, potencjału probiotycznego / postbiotycznego oraz zdolności do wytwarzania bioaktywnych metabolitów. Na tej podstawie do dalszych badań wybrano szczepy wykazujące najbardziej obiecujące właściwości funkcjonalne: dwa szczepy bakterii fermentacji mlekowej: *Lactocaseibacillus paracasei* B1 i *Lactiplantibacillus plantarum* O24 oraz dwa szczepy

bakterii kwasu octowego *Gluconobacter oxydans* KNS32 i *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1.

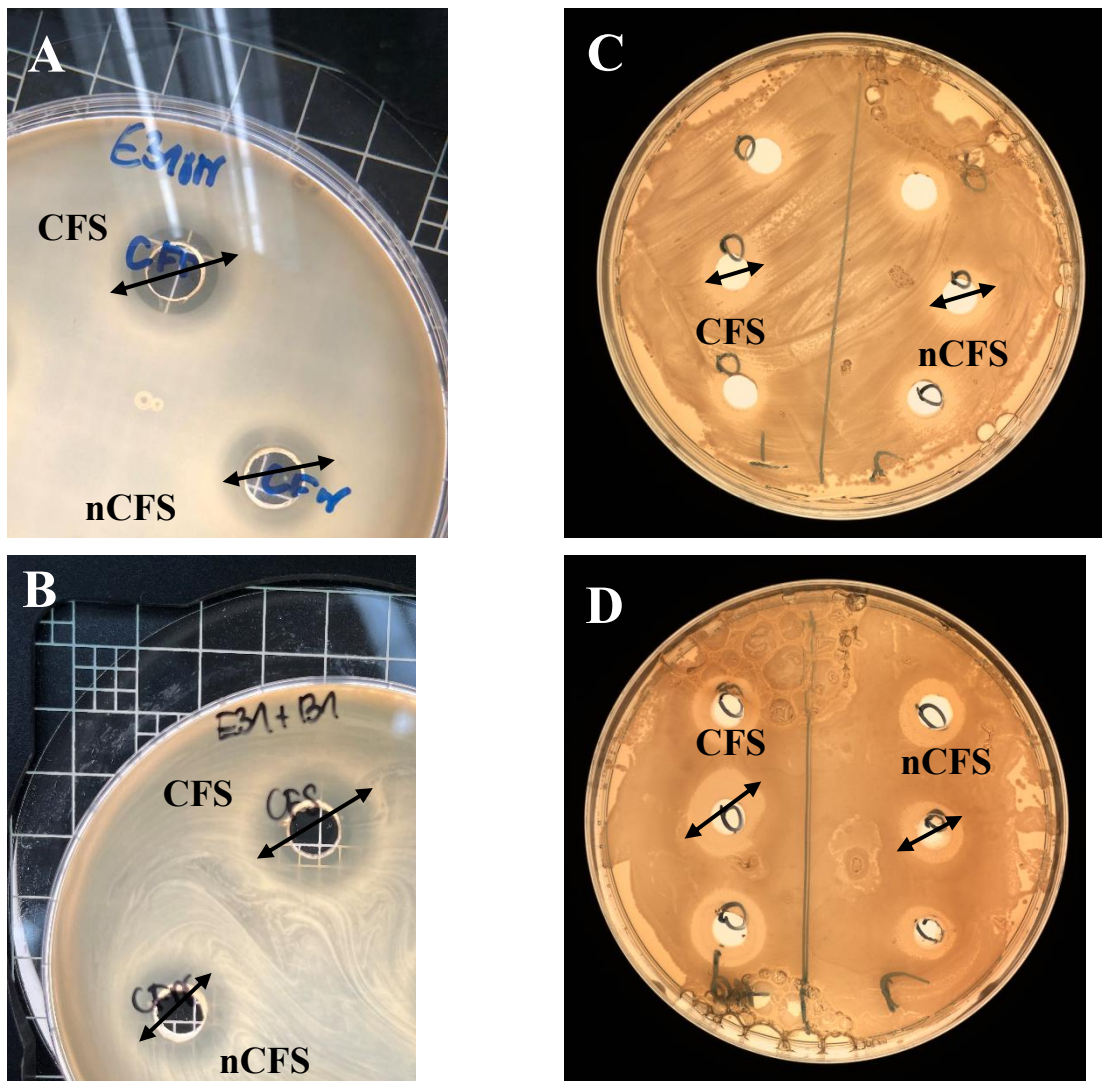
## **5.2 Ocena efektu antymikrobiologicznego i biokonserwującego *in vitro* oraz *in situ* połączenia metabolitów LAB i AAB**

### **5.2.1 Ocena właściwości fizykochemicznych, przeciwdrobnoustrojowych i przeciwtleniających metabolitów LAB i AAB [P2], [P3]**

W niniejszej pracy przyjęto precyzyjną definicję materiału badawczego opartego na bezkomórkowych frakcjach pochodzących bakterii fermentacji mlekowej oraz bakterii kwasu octowego. Zamiennie stosowane określenia „supernatanty”, „metabolity” oraz „preparaty”, uzupełniane przymiotnikami „pochodzące”, „bezkomórkowe” lub „bakteryjne”, odnoszą się do frakcji zawierających pozakomórkowe metabolity badanych szczepów i pozbawionych komórek bakteryjnych. Zróżnicowanie terminologiczne wynika z kontekstu prowadzonych analiz i etapu badań oraz nie oznacza różnic w sposobie otrzymywania ani w składzie stosowanych preparatów.

W pierwszej kolejności oceniono aktywność przeciwdrobnoustrojową uzyskanych preparatów metabolitów bakteryjnych względem szczepów wskaźnikowych, które stanowiły zarówno bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne (**rys. 4**). Preparaty te, poddane ocenie przy użyciu metody polegającej na dyfuzji w żelu agarowym, wykazały zróżnicowaną aktywność antagonistyczną wobec szczepów wskaźnikowych, co odzwierciedlają strefy zahamowania wzrostu oraz towarzyszące im wartości pH [**P2 – tab. 4; P3 – tab. 5**].

Supernatant (CFS) szczepu *L. paracasei* B1 wykazywał najsilniejszą aktywność wobec *L. monocytogenes* ATCC 19111 oraz *E. coli* O157:H7, przy średnicach stref zahamowania wzrostu wynoszących odpowiednio  $12,2 \pm 1,0$  mm i  $12,7 \pm 1,9$  mm [**P3 – tab. 5**]. Porównanie preparatów *L. paracasei* B1 w formie CFS i nCFS wobec szczepów wskaźnikowych wykazało istotne statystycznie różnice ( $p < 0,05$ ), przy czym CFS wykazywał silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe. Podobną aktywność wobec obu patogenów zaobserwowano w przypadku CFS szczepu *L. plantarum* O24 [**P3 – tab. 5**]. Zastosowanie hkCFS również skutkowało silniejszym działaniem inhibicyjnym wobec drobnoustrojów wskaźnikowych niż forma nCFS [**P2 – tab. 4**].



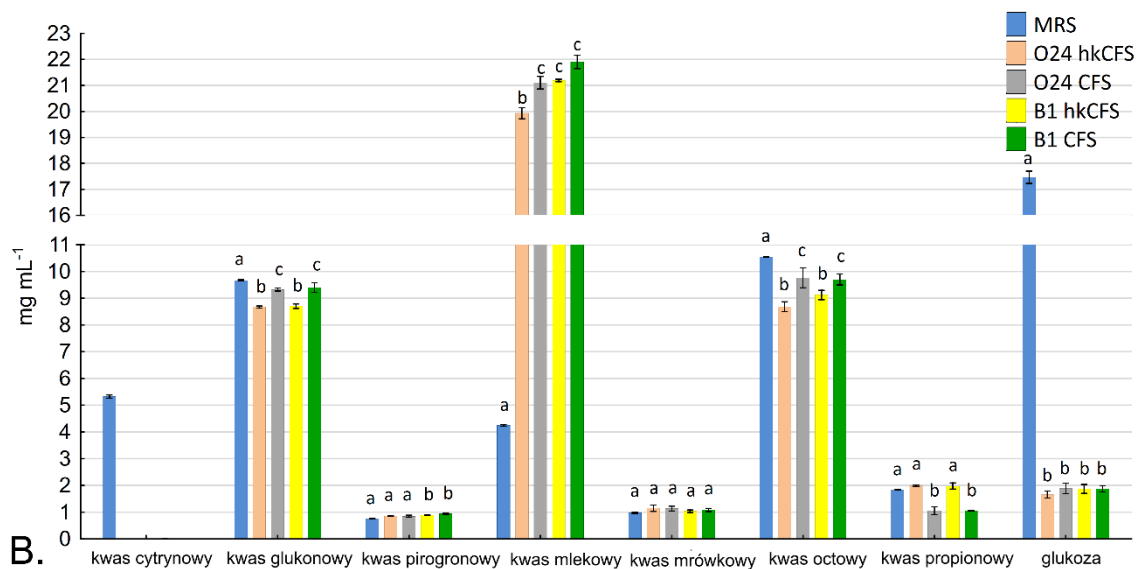
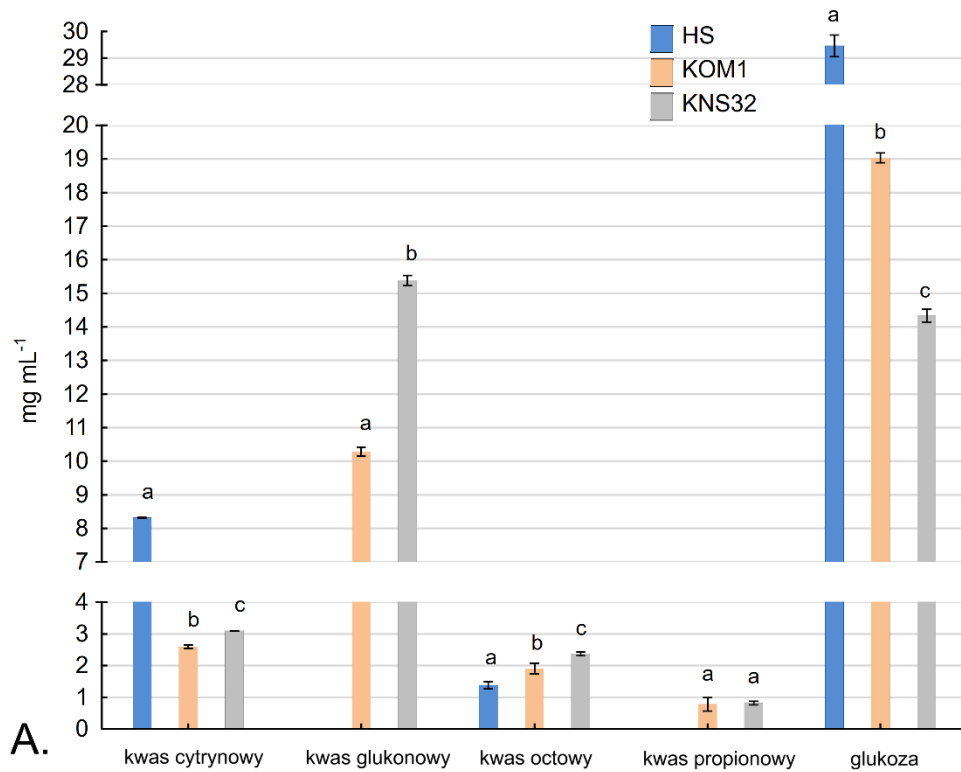
**Rysunek 4.** Przykładowe wyniki badań przeciwdrobnoustrojowych metodą dyfuzji w podłożu agarowym, ilustrujące aktywność przeciwdrobnoustrojową preparatów LAB (CFS i nCFS) wobec wybranych szczepów wskaźnikowych. A – średnice zahamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego *E. coli* O157:H7 przez dwa wybrane preparaty szczepu *L. plantarum* O24; B – średnice zahamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego *E. coli* O157:H7 przez dwa wybrane preparaty szczepu *L. paracasei* B1; C – średnice zahamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego *L. monocytogenes* przez dwa wybrane preparaty szczepu *L. plantarum* O24; D – średnice zahamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego *L. monocytogenes* przez dwa wybrane preparaty szczepu *L. paracasei* B1. Źródło: materiały własne.

W przypadku porównania efektów supernatantów pozyskanych z kultur LAB i AAB stwierdzono, że preparaty AAB wykazywały silniejsze właściwości hamujące wzrost wybranych drobnoustrojów niż preparaty LAB. Najbardziej opornym szczepem w badaniach okazał się *Enterococcus faecalis*, wykazując najmniejszą wrażliwość na działanie analizowanych metabolitów bakteryjnych [P2 – tab. 4]. Przy jednoczesnym zastosowaniu preparatów z LAB i AAB jako mieszaniny supernatantów, cechowały

się istotnie wyższą skutecznością inhibicji wzrostu drobnoustrojów w porównaniu do pojedynczo zastosowanych metabolitów ( $p < 0,05$ ) w szczególności wobec *L. monocytogenes* oraz *Bacillus spizizenii* [P2 – tab. 4].

W następnej kolejności, oznaczono minimalne stężenia hamujące wzrost (MIC) [P2 – tab. 5, S1, S2] oraz indeksy frakcyjne (FICI), co pozwoliło na ilościową ocenę interakcji między preparatami. Uzyskane wyniki wskazywały na zróżnicowany charakter interakcji pomiędzy preparatami LAB i AAB, obejmujący synergizm, efekt addytywny lub brak interakcji, w zależności od zastosowanej kombinacji oraz drobnoustroju wskaźnikowego. Efekt synergistyczny ( $FICI \leq 0,5$ ) zaobserwowano m.in. dla połączeń B1 hkCFE z supernatantami AAB wobec *L. monocytogenes* i *S. Enteritidis* oraz O24 hkCFE z KOM1 CFE wobec *S. Enteritidis*. Interakcje addytywne ( $FICI > 0,5-1,0$ ) występowały najczęściej, zwłaszcza wobec *E. faecalis* i *E. coli*, natomiast brak interakcji ( $FICI > 1,0-4,0$ ) odnotowano głównie w przypadku *S. aureus* i *B. spizizenii*. Nie stwierdzono efektów antagonistycznych ( $FICI > 4,0$ ) [P2 – tab. 6]. Największą liczbę przypadków synergizmu zaobserwowano wobec *S. Enteritidis*, co uzasadniało dalsze wykorzystanie tego szczepu w badaniach modelowych.

Następnie zaplanowano ocenę zawartości wybranych kwasów organicznych oraz glukozy w analizowanych supernatantach. W preparatach LAB zaobserwowano obniżenie stężeń glukozy i kwasu cytrynowego, natomiast zwiększenie stężenia kwasu mlekowego w porównaniu do czystej pożywki MRS ( $p < 0,05$ ) (rys. 5), [P2 – tab. 2]. Stężenia kwasu mlekowego w supernatantach LAB wahały się od 19,9 do 21,9 mg/mL. Dodatkowo, supernatanty uzyskane z inaktywowanych termicznie kultur LAB (hkCFS) zawierały istotnie statystycznie wyższe stężenia kwasu propionowego, ale niższe poziomy kwasu glukonowego, mlekowego i octowego w porównaniu do CFS pochodzących z żywych kultur bakteryjnych. W przypadku preparatów AAB, bakterie znacząco zużywały kwas cytrynowy i glukozę podczas wzrostu, ponieważ ich stężenia były istotnie statystycznie wyższe w kontrolnej pożywce HS niż w uzyskanych supernatantach ( $p < 0,05$ ). Ponadto, supernatanty AAB zawierały dwa charakterystyczne kwasy organiczne: kwas glukonowy i kwas octowy. Najwyższe stężenie kwasu glukonowego (15,4 mg/mL) zaobserwowano w preparacie ze szczepu *G. oxydans*. Stężenia kwasu octowego wahały się od 1,9 do 2,4 mg/mL we wszystkich supernatantach AAB, przy czym najwyższe również odnotowano w preparacie z *G. oxydans* ( $p < 0,05$ ) (rys. 5), [P2 – tab. 2].



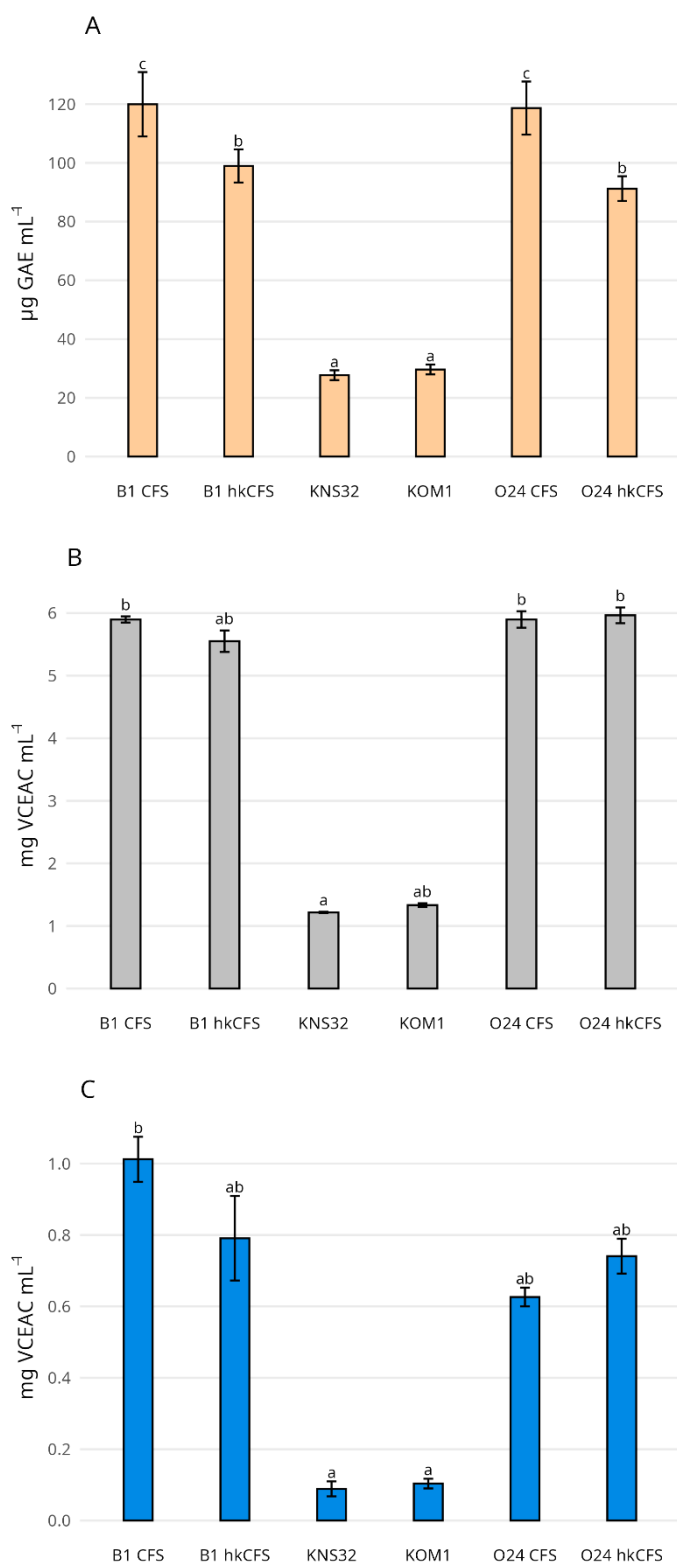
**Rysunek 5.** Stężenie cukrów i kwasów organicznych w preparatach AAB (A) i LAB (B) oraz w pożywkach, w których hodowano szczepy. Wartości przedstawiono jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe. Średnie oznaczone różnymi literami (a–c) różnią się statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ). Źródło: opracowanie własne.

Z kolei zawartość polifenoli w badanych preparatach mieściła się w zakresie od 27,7 do 120,0  $\mu\text{g}$  GAE/mL, przy czym najwyższe stężenia odnotowano w supernatantach *L. paracasei* B1 (120,0  $\mu\text{g}$  GAE/mL) oraz *L. plantarum* O24 (118,6  $\mu\text{g}$  GAE/mL). Preparaty LAB charakteryzowały się istotnie statystycznie wyższą całkowitą zawartością związków fenolowych w porównaniu z preparatami AAB ( $p < 0,05$ ) (**rys. 6**), [**P2 – tab. 3**]. Aktywność antyoksydacyjna, określona na podstawie zdolności zmiatania wolnych rodników ABTS $\bullet^+$  i DPPH, wahała się odpowiednio od 1,2 do 6,0  $\mu\text{g}$  VCEAC/mL oraz od 0,1 do 1,0 mg VCEAC/mL. Spośród analizowanych preparatów najwyższą aktywność zmiatania rodnika DPPH wykazał CFS *L. paracasei* B1, osiągając wartości istotnie wyższe niż w przypadku preparatów AAB ( $p < 0,05$ ). Podobną tendencję odnotowano w przypadku zmiatania rodnika ABTS $\bullet^+$ , gdzie preparaty LAB przewyższały aktywnością preparaty AAB. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że hcCFS uzyskany z *L. plantarum* O24 charakteryzował się najwyższą zdolnością zmiatania rodnika ABTS $\bullet^+$ , istotnie przewyższającą wartości uzyskane dla supernatantu z hodowli *G. oxydans* KNS32 ( $p < 0,05$ ) (**rys. 6**), [**P2 – tab. 3**]. Uzyskane dane wskazują na istotny potencjał antyoksydacyjny preparatów bakteryjnych, ze szczególnym uwzględnieniem kultur żywych oraz termicznie inaktywowanych szczepów *L. paracasei* i *L. plantarum*.

### **5.2.2 Analiza determinantów genetycznych oraz analiza proteomiczna związków bioaktywnych obecnych w CFS szczepów *Lacticaseibacillus paracasei* B1 i *Lactiplantibacillus plantarum* O24 [P3]**

W następnej kolejności przeprowadzono identyfikację i szczegółową charakterystykę związków bioaktywnych wytwarzanych przez *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24, wykorzystując analizy genomowe i proteomiczne, w celu wyjaśnienia mechanizmów ich działania przeciwdrobnoustrojowego.

W pierwszym kroku przeprowadzono sekwencjonowanie całego genomu wybranych szczepów LAB. Wykazano, że genom *L. paracasei* B1 obejmuje chromosom (3,11 Mb; 46,24% G+C) i plazmid (26,9 kb). W chromosomie wykryto klaster vanT (wrodzona oporność na wankomycynę), 62 zdarzenia HGT, 159 MGE (45 fagowych), elementy koniugacyjne i kompletny system CRISPR-Cas typu II-A. Zidentyfikowano cztery regiony profagowe. Plazmid nie zawierał genów oporności ani profagów, lecz miał jedno zdarzenie HGT i krótką matrycę CRISPR bez cas [**P3 – tab. S2; rys. S1**].



**Rysunek 6.** Całkowita zawartość polifenoli (A), aktywność zmiatania rodnika ABTS<sup>•+</sup> (B) oraz aktywność zmiatania rodnika DPPH (C) w preparatach AAB i LAB. Wartości przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe; średnie oznaczone różnymi literami (a–c) różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ ). Źródło: opracowanie własne.

Z kolei genom *L. plantarum* O24 składa się z chromosomu (3,13 Mb; 44,71% G+C) i ośmiu plazmidów. W chromosomie obecne są geny vanH/vanY, 61 zdarzeń HGT, 125 MGE (41 fagowych), pojedyncza matryca CRISPR bez cas oraz trzy zdegenerowane regiony profagowe. Spośród plazmidów jedynie pLplO24\_7 zawiera fragmenty profagowe [P3 – tab. S3-S4; rys. S2].

Analiza genomu *L. paracasei* B1 (RefSeq v6.7, BAGEL4) ujawniła 12 regionów genowych związanych z biosyntezą bakteriocyn, w tym dwa główne klastry (AOI\_1 – 24 245 pz, AOI\_2 – 20 180 pz) zawierające odpowiednio siedem i jeden peptyd rdzeniowy. W klastrach zidentyfikowano geny kodujące białka oporności, regulatory transkrypcji, oksydoreduktazy oraz transportery metali. W AOI\_1 zidentyfikowano geny kodujące peptydy podobne do laktokocyn, bakteriocyn typu ComC, enterocyny X i karnocyny (klasa IIa). W AOI\_2 stwierdzono obecność genu kodującego enterolizynę A. Przewidywane masy cząsteczkowe peptydów wynosiły 5–12 kDa, natomiast enterolizyny A ok. 35 kDa [P3 – rys. 1, 3; tab. 2]. Analiza genomu szczepu *L. plantarum* O24 również wykazała obecność genów związanych z syntezą bakteriocyn. W chromosomie zidentyfikowano 13 regionów genowych, natomiast na plazmidzie pLplO24\_7 – 2 regiony (m.in. geny kodujące bakteriocynę z rodziny garwicyny Q oraz białko oporności na laktokokcynę). Predykcja przy użyciu BAGEL4 wskazała dwa klastry genów odpowiedzialnych za biosyntezę substancji antybakteryjnych, jeden w chromosomie, a drugi na plazmidzie. Chromosomalny klaster (AOI\_1, 29,5 kb) zawierał 64 ORF-y, w tym sześć rdzeniowych peptydów bakteriocynowych, natomiast plazmidowy klaster (AOI\_1, 17,6 kb) obejmował 47 ORF-ów z jednym rdzeniowym peptydem. W klastrze chromosomalnym zidentyfikowano peptydy związane z plantarycyną, m.in. plantarycyny E, F, A, N, J i K, a także geny kodujące białka oporności, czynniki transkrypcyjne, kinazy histydynowe oraz transportery ABC. Plazmidowy klaster zawierał podobne elementy funkcjonalne, w tym białka oporności, enzymy redoks i transpozazy [P3 – rys. 2, 4; tab. 3, 4].

W dalszej części oceniono wpływ wysokiej temperatury, zróżnicowanego pH oraz enzymów proteolitycznych na aktywność przeciwdrobnoustrojową CFS uzyskanych ze szczepów *L. paracasei* B1 oraz *L. plantarum* O24. Wszystkie badane supernatanty wykazały dobrą stabilność termiczną, zachowując około 70% pierwotnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej po ogrzewaniu w temperaturze 100 °C przez 20 minut. Jednakże zaobserwowano wyraźne obniżenie aktywności po sterylizacji w 121 °C przez 20 minut [P3 – tab. 6]. Analizowane supernatanty LAB wykazywały aktywność

przeciwdrobnoustrojową w szerokim zakresie pH, od 2 do 7, wobec wszystkich analizowanych szczepów wskaźnikowych. Zachowana aktywność mieściła się w przedziale od 121,9% do 38,8% w porównaniu do aktywności pierwotnej. Wyjątek stanowiła inhibicja wzrostu *L. monocytogenes*, wobec której oba preparaty, również przy pH 8, nadal wykazywały zdolność hamowania wzrostu patogenu, choć ze zmniejszoną aktywnością przeciwdrobnoustrojową [P3 – tab. 6]. Dalsze potwierdzenie białkowego charakteru aktywnych metabolitów uzyskano poprzez zastosowanie enzymów proteolitycznych – trypsyny, pepsyny oraz proteinazy K, które całkowicie znosiły aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych preparatów [P3 – tab. 6].

Jako kolejny etap badań proteomicznych, ukierunkowany na potwierdzenie białkowej natury substancji obecnych w supernatantach oraz identyfikację charakterystycznych grup funkcyjnych, zastosowano spektroskopię FT-IR. Analiza pozwoliła na ocenę wpływu obróbki cieplnej na ewentualne zmiany konformacyjne substancji przeciwdrobnoustrojowych. Widma rejestrowano w zakresie 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  i obejmowały zarówno surowy CFS, jak i próby poddane obróbce cieplnej przez 5, 15 i 30 minut. Zastosowanie FT-IR wykazało charakterystyczne piki wskazujące na obecność grup funkcyjnych i struktur białkowych w CFS obu szczepów. W *L. paracasei* B1 zaobserwowano pasma w zakresie 3400,41–3386,34  $\text{cm}^{-1}$ , a w *L. plantarum* O24 – 3381,37–3373,69  $\text{cm}^{-1}$ , związane z wiązaniami wodorowymi i grupami –OH, –NH oraz –COOH. Dodatkowo, piki przy 1612,15–1608,41  $\text{cm}^{-1}$  (B1) i 1648,14–1645,92  $\text{cm}^{-1}$  (O24) odpowiadały drganiom C=O w grupach amidowych (pasma amidu I). Pasma około 2950  $\text{cm}^{-1}$  wskazywało na grupy alkilowe C–H. Porównanie widm FT-IR przed i po obróbce cieplnej wykazało zmiany w położeniu i intensywności pasm absorpcyjnych. W zakresie około 3400  $\text{cm}^{-1}$  odnotowano przesunięcia pików po zastosowaniu ogrzewania. W próbach *L. plantarum* O24 w niepodgrzewanym CFS nie stwierdzono obecności pików odpowiadającego grupie C=O. Po obróbce cieplnej zarejestrowano pojawienie się pasm przy 1648,14  $\text{cm}^{-1}$  po 5 min, 1645,92  $\text{cm}^{-1}$  po 15 min oraz 1647,67  $\text{cm}^{-1}$  po 30 min ogrzewania [P3 – rys. S3, S4].

Kontynuując badania, przeprowadzono proces oczyszczania substancji przeciwdrobnoustrojowych obecnych w supernatantach bakteryjnych. Supernatanty pochodzące od szczepów *L. paracasei* B1 oraz *L. plantarum* O24 zostały poddane precypitacji siarczanem amonu, w wyniku czego uzyskano surowe ekstrakty o wydajności odpowiednio 4,00% i 3,14% oraz aktywności swoistej wynoszącej 251,47 AU/mg i 167,36 AU/mg. Następnie ekstrakty te zostały poddane dalszemu oczyszczaniu

metodą dializy, co pozwoliło uzyskać preparaty o aktywności przeciwdrobnoustrojowej równej odpowiednio 402,67 AU/mg oraz 387,94 AU/mg i wydajności 3,20% i 3,64%. Odpowiada to wzrostowi aktywności oczyszczonej substancji 3,38- i 4,06-krotnie w porównaniu do pierwotnych supernatantów dla odpowiednio *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24 [P3 – tab. 7]. W wyniku zastosowanej procedury uzyskano wstępnie oczyszczone frakcje zawierające substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, o charakterze białkowym, potencjalnie bakteriocynopodobnym.

Masa cząsteczkowa potencjalnych bakteriocyn została oszacowana za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Zabarwione żele zawierające preparaty pochodzące od *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24 wykazały odpowiednio obecność pojedynczych prążków o masie około 14–15 kDa oraz 10–11 kDa [P3 – rys. 5]. Dwa zidentyfikowane charakterystyczne prążki zostały następnie wycięte i poddane analizie spektrometrii masowej. Na podstawie kompleksowej analizy danych wyselekcjonowano potencjalne białka do dalszych badań [P3 – tab. 8].

Oszacowane masy cząsteczkowe potencjalnych bakteriocyn lub substancji o działaniu bakteriocynopodobnym, syntetyzowanych przez szczepy *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24 i poddanych analizie LC-MS/MS, wynosiły odpowiednio 15 079 Da oraz 10 815 Da, co było zgodne z wynikami elektroforezy SDS-PAGE. Zaobserwowane pokrycie sekwencji białkowej wynosiło 34% dla prążka pochodzącego od szczepu *L. plantarum* O24 oraz 43% dla szczepu *L. paracasei* B1, przy teoretycznych punktach izoelektrycznych (pI) odpowiednio 10,09 i 4,66 [P3 – tab. 8; rys. 6].

### **5.2.3 Weryfikacja skuteczności biokonserwacyjnej metabolitów LAB i AAB w warunkach modelowych [P2]**

W ramach badania oceniono ogólną liczbę drobnoustrojów tlenowych oraz wzrost *Salmonella Enteritidis* pod wpływem zastosowanych preparatów przeciwdrobnoustrojowych na powierzchni mięsa drobiowego. Zastosowano łącznie 12 wariantów mieszanin preparatów oraz trzy próby kontrolne (bulion MRS, HS oraz woda destylowana). Warianty te opracowano poprzez połączenie trzech rodzajów preparatów LAB pochodzących z dwóch analizowanych szczepów bakterii B1 oraz O24 (CFS, hkCFS oraz nCFS) z dwoma preparatami AAB – CFS KOM1 oraz CFS KNS32. Wyniki wskazują, że zastosowane preparaty były skuteczne w redukowaniu liczby drobnoustrojów na powierzchni mięsa drobiowego w porównaniu do prób kontrolnych. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37 °C, próby kontrolne traktowane wodą

destylowaną, pożywką MRS lub pożywką HS wykazywały wyższą ogólną liczbę bakterii tlenowych, osiągając średnio odpowiednio około 5,67, 6,25 i 5,97 log jtk/mL. Dla porównania, w próbach traktowanych kombinacjami preparatów takimi jak B1 CFS + KOM1 CFS oraz B1 hkCFS + KOM1 CFS stwierdzono znacznie niższą liczebność bakterii, w zakresie od około 4,00 do 4,96 log jtk/mL, przy czym podobne obniżenie odnotowano również dla wariantów z udziałem supernatantu pozyskanego ze szczepu KNS32. Po 7 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C w próbach kontrolnych nadal utrzymywała się stosunkowo wysoka liczebność bakterii (około 3,87 do 4,19 log jtk/mL), podczas gdy w próbach traktowanych preparatami przeciwdrobnoustrojowymi zaobserwowano dalsze obniżenie ogólnej liczby drobnoustrojów – w niektórych przypadkach do poziomu poniżej granicy wykrywalności i nieprzekraczającego około 3,46 log jtk/mL. Po 24 godzinach inkubacji w temp. 37 °C, w próbach kontrolnych liczebność *S. Enteritidis* wynosiła średnio około 5,21–5,44 log jtk/mL, natomiast zastosowanie preparatów B1 CFS + KOM1 CFS oraz B1 hkCFS + KOM1 CFS obniżyło te wartości do zakresu około <3,92 log jtk/mL. Co istotne, po 7 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C w żadnej z prób traktowanych preparatami przeciwdrobnoustrojowymi nie wykryto żywych komórek *S. Enteritidis*, podczas gdy w próbach kontrolnych utrzymywały się one na poziomie średnio około 4,03–4,19 log jtk/mL [P2 – rys. 1].

#### **5.2.4 Wybór preparatów metabolitów LAB i AAB do dalszych badań i określenie warunków ich zastosowania**

Na podstawie wyników badań *in vitro* oraz *in situ* w modelu mięsa drobiowego do dalszych analiz wytypowano następujące kombinacje preparatów LAB i AAB:

- hkCFS *Lacticaseibacillus paracasei* B1 + CFS *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1,
- hkCFS *Lactiplantibacillus plantarum* O24 + CFS *Gluconobacter oxydans* KNS32.

W badaniach *in vitro* obie kombinacje charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową i należały do wariantów o najwyższym oraz najbardziej powtarzalnym efekcie hamowania wzrostu badanych drobnoustrojów. W badaniach *in situ* w modelu mięsa drobiowego potwierdzono ich skuteczność, obserwując obniżenie liczby drobnoustrojów po 24 godzinach inkubacji oraz efekt bakteriobójczy po 7 dniach przechowywania w temp. 4°C.

### **5.3 Ocena jakości i trwałości wyrobów mięsnych surowych poddanych biokonserwacji preparatami metabolitów LAB i AAB – badania aplikacyjne w skali półtechnicznej**

#### **5.3.1 Ocena wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na jakość mikrobiologiczną i trwałość modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania [P4]**

Ocena jakości mikrobiologicznej modelowego surowego wyrobu mięsnego wykazała zróżnicowanie liczebności drobnoustrojów pomiędzy wariantami traktowanymi preparatami LAB i AAB a próbą kontrolną w trakcie przechowywania. We wszystkich wariantach odnotowano stopniowy wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD) wraz z czasem przechowywania. W wariantach zawierających mieszaniny hkCFS B1 + CFS KOM1 oraz hkCFS O24 + CFS KNS32 wartości OLD były istotnie niższe niż w próbie kontrolnej we wszystkich punktach czasowych analizy ( $p < 0,05$ ). Po 9 dniach przechowywania, w próbie kontrolnej liczba drobnoustrojów osiągnęła poziom 4,55 log jtk/g, natomiast w wariantach z dodatkiem mieszanin metabolitów pozostawała poniżej 3,2 log jtk/g. Liczebność bakterii fermentacji mlekowej wykazywała analogiczną tendencję. W 9. dniu przechowywania w próbie kontrolnej odnotowano istotny statystycznie wzrost liczby LAB do poziomu 4,26 log jtk/g ( $p < 0,05$ ), podczas gdy w wariantach traktowanych mieszaninami metabolitów wartości te pozostawały poniżej 2,5 log jtk/g. Mikroorganizmy z rodziny Enterobacteriaceae również wykazywały wzrost liczebności wraz z czasem przechowywania we wszystkich wariantach. Jednak w próbie kontrolnej wartości te były wyższe niż w wariantach traktowanych mieszaninami metabolitów, szczególnie w 9. dniu przechowywania. W wariantach z dodatkiem preparatów LAB i AAB liczba Enterobacteriaceae nie przekroczyła 3,01 log jtk/g, natomiast *E. coli* pozostawała poniżej progu wykrywalności wynoszącego 2 log jtk/g. Liczebność gronkowców koagulazo-dodatnich we wszystkich wariantach i punktach czasowych pozostawała poniżej granicy wykrywalności wynoszącej 2 log jtk/g. W żadnym z analizowanych wariantów, w całym okresie przechowywania, nie stwierdzono obecności *Listeria monocytogenes* ani *Salmonella* spp. [P4 – tab. 3; rys. S1, S2].

### 5.3.2 Ocena wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na stabilność oksydacyjną modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania [P4]

Ocenę intensywności peroksydacji lipidów przeprowadzono z wykorzystaniem testu TBARS. Już w 3. dniu przechowywania odnotowano istotny wzrost wartości TBARS ( $p < 0,05$ ) we wszystkich próbach, co wskazuje na rozpoczęcie procesów oksydacyjnych. W okresie od 3. do 9. dnia przechowywania wartości TBARS uległy istotnemu statystycznie obniżeniu ( $p < 0,05$ ). Jednocześnie w 9. dniu w próbie kontrolnej odnotowano nieznaczny wzrost wartości tego parametru. W żadnym z analizowanych punktów czasowych nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi próbami ( $p > 0,05$ ) [P4 – tab. 4].

W zakresie stabilności lipidów wszystkie próby wykazały istotne obniżenie zawartości cholesterolu po 9. dniach przechowywania ( $p < 0,05$ ). Najmniejszą redukcję zawartości cholesterolu odnotowano w próbie kontrolnej ( $43,50 \pm 1,11$  mg/100 g), większą w próbie z dodatkiem hkCFS B1 + CFS KOM1 ( $41,80 \pm 0,40$  mg/100 g), a najwyraźniejszą w próbie traktowanej kombinacją hkCFS O24 + CFS KNS32 ( $40,22 \pm 0,04$  mg/100 g) [P4 – tab. 4].

Liczba nadtlenkowa (PV), wskaźnik pierwotnego utleniania, uległa zwiększeniu we wszystkich próbach ( $p < 0,05$ ). Najwyższy poziom odnotowano po 9. dniach przechowywania w wariacie z dodatkiem hkCFS B1 + CFS KOM1 ( $5,10 \pm 0,41$  meq  $O_2$ /kg), następnie w hkCFS O24 + CFS KNS32 ( $2,35 \pm 0,32$  meq  $O_2$ /kg), a najniższy w próbie kontrolnej ( $1,29 \pm 0,24$  meq  $O_2$ /kg). Z kolei liczba kwasowa (AV), określająca stopień hydrolizy lipidów, w wariacie hkCFS O24 + CFS KNS32 uległa obniżeniu w trakcie przechowywania (9. dzień w porównaniu do dnia 0), podczas gdy w próbie kontrolnej oraz w wariacie hkCFS B1 + CFS KOM1 odnotowano wzrost wartości AV w tym samym okresie, przy czym nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wariantami ( $p > 0,05$ ) [P4 – tab. 4].

Kolejnym etapem badań była analiza profilu kwasów tłuszczowych. W badanych wariantach zidentyfikowano trzy główne grupy kwasów tłuszczowych: nasycone (SFA), jednonienasycone (MUFA) oraz wielonienasycone (PUFA). Najwyższy udział stanowiły kwasy nasycone, w szczególności kwas palmitynowy (C16:0, 23,35–23,58 g/100 g) oraz stearynowy (C18:0, 12,52–12,83 g/100 g). Ich zawartość pozostawała względnie stabilna we wszystkich próbach, przy niewielkim wzroście odnotowanym po 9 dniach przechowywania. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy

analizowanymi wariantami ( $p > 0,05$ ). W grupie MUFA dominującym kwasem był kwas oleinowy (C18:1cis9), którego udział w dniu 0 wynosił około 39 g/100g. W trakcie przechowywania jego zawartość pozostawała stabilna lub ulegała nieznacznemu obniżeniu w próbach traktowanych mieszaninami metabolitów bakteryjnych, natomiast w próbie kontrolnej odnotowano jego niewielki wzrost ( $p < 0,05$ ). W przypadku kwasów tłuszczowych wielonienasyconych (PUFA), w tym kwasu linolowego (C18:2) oraz  $\alpha$ -linolenowego (C18:3n3), zaobserwowano nieznaczną tendencję spadkową w czasie przechowywania, bardziej wyraźną w próbie kontrolnej oraz w próbie z dodatkiem hkCFS O24 + CFS KNS32. Po 9 dniach zawartość kwasu linolowego obniżyła się o około 0,5% we wszystkich wariantach, jednak nie obserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami ( $p > 0,05$ ). Zawartość kwasu  $\alpha$ -linolenowego pozostawała względnie stabilna w próbach poddanych działaniu preparatów metabolitów, podczas gdy w próbie kontrolnej odnotowano jego istotne statystycznie obniżenie ( $p < 0,05$ ) [P4 – tab. 5].

### **5.3.3 Określenie wpływu mieszaniny metabolitów LAB i AAB na wybrane parametry fizykochemiczne modelowego wyrobu mięsnego surowego podczas przechowywania [P4]**

Jednym z parametrów technologicznych, które poddano analizie po zastosowaniu preparatów LAB i AAB, była wartość pH mięsa. W badaniu stwierdzono, że początkowe wartości pH w dniu 0 były bardzo zbliżone we wszystkich grupach – zarówno w próbach kontrolnych, jak i w próbach z dodatkiem preparatów, co sugeruje brak natychmiastowego, istotnego zakwaszenia mięsa po aplikacji mieszaniny metabolitów. W kolejnych dniach przechowywania obserwowano stopniowe obniżenie wartości pH, najbardziej wyraźne do 6. dnia, jednak nadal umiarkowane. Minimalne wartości wynosiły średnio 5,38 w przypadku próby stanowiącej połączenie preparatów hkCFS O24 oraz CFS KNS32. W dalszym okresie przechowywania, do 9. dnia, zaobserwowano nieznaczną tendencję wzrostową wartości pH, jednak pozostawały one poniżej poziomu odnotowanego w 3. dniu przechowywania. W 9. dniu przechowywania nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy próbami ( $p > 0,05$ ) [P4 – tab. 1].

Analiza ORP wykazała, że od dnia 0 do 6. następował wzrost potencjału oksydacyjno-redukcyjnego. W obu próbach traktowanych mieszaniną metabolitów bakteryjnych wartości ORP osiągnęły maksimum w dniu 6., a następnie odnotowano ich istotne statystycznie obniżenie do dnia 9 ( $p < 0,05$ ). W próbie kontrolnej odnotowano istotny statystycznie wzrost wartości potencjału oksydoredukcyjnego w 9. dniu

przechowywania ( $p < 0,05$ ), przy czym osiągnięta wartość stanowiła najwyższą medianę spośród wszystkich analizowanych prób (374,5 mV) [P4 – tab. 1].

Analiza parametrów barwy  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  wykazała, że obserwowane zmiany były związane przede wszystkim z czasem przechowywania prób, natomiast nie stwierdzono istotnego wpływu rodzaju zastosowanego preparatu. W trakcie przechowywania wartości  $L^*$  dla wszystkich analizowanych prób wykazywały niewielką tendencję wzrostową ( $p < 0,05$ ). Istotną statystycznie różnicę ( $p < 0,05$ ) stwierdzono wyłącznie w 6. dniu przechowywania dla prób z dodatkiem hkCFS B1 oraz CFS KOM1 w porównaniu z próbą kontrolną. Parametr  $a^*$  wzrastał w początkowym okresie przechowywania, po czym ulegał stabilizacji lub nieznacznemu obniżeniu w dalszym czasie. W próbie z dodatkiem mieszaniny hkCFS O24 oraz CFS KNS32 w 9. dniu odnotowano nieznacznie niższe wartości parametru  $a^*$  względem pozostałych wariantów, jednak różnice te nie były istotne statystycznie ( $p > 0,05$ ). Wartości parametru  $b^*$  wykazywały nieznaczną tendencję wzrostową do 6. dnia przechowywania. W 9. dniu przechowywania w próbach z dodatkiem mieszaniny preparatów bakteryjnych odnotowano obniżenie wartości parametru  $b^*$  (w zakresie 9,87–10,06), podczas gdy w próbie kontrolnej parametr ten nadal wykazywał tendencję wzrostową. Pomimo tych obserwacji nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy analizowanymi wariantami ( $p > 0,05$ ) [P4 – tab. 2].

Ostatnim etapem badań zrealizowanych w etapie III była analiza wpływu czasu przechowywania oraz zastosowanych mieszanin preparatów LAB i AAB na wybrane parametry jakościowe mięsa. W tym celu przeprowadzono analizę czynnikową (ang. *Exploratory Factor Analysis*, EFA), która umożliwiła wyodrębnienie struktur opisujących zmienność pomiędzy badanymi parametrami jakości mięsa w próbach poddanych działaniu mieszanin preparatów przeciwdrobnoustrojowych w dniu 0 oraz 9 przechowywania. Następnie przeprowadzono funkcjonalną analizę głównych składowych (FPCA), która pozwoliła zidentyfikować zmiany wartości pH, potencjału oksydo-redukcyjnego (ORP), barwy oraz parametrów mikrobiologicznych w kolejnych dniach przechowywania (0, 3., 6. i 9.) i ocenić ich wpływ na jakość oraz stabilność produktu.

W przypadku analizy czynnikowej w dniu 0 wyodrębniono trzy czynniki, które łącznie wyjaśniały 75,38% całkowitej zmienności. Pierwszy czynnik, „Mikrobiologia” (32,88%), obejmował ENT, OLD, LAB, EC, parametr  $b^*$  oraz STA, odzwierciedlając aktywność drobnoustrojów i powiązane z nią zmiany w żółtości barwy. Drugi czynnik,

„Utlenianie–Barwa” (27,58%), obejmował ORP, TBARS,  $a^*$ ,  $L^*$ ,  $b^*$  oraz pH, wskazując na powiązania między procesami oksydacyjnymi a cechami barwy. Trzeci czynnik, „Lipidy” (14,92%), obejmował cholesterol, liczbę kwasową oraz liczbę nadtlenkową, co odnosi się do degradacji lipidów. Stwierdzono słabą korelację ujemną między parametrami mikrobiologicznymi a czynnikiem „Utlenianie–Barwa” ( $r = -0,025$ ) oraz dodatnie korelacje pomiędzy degradacją lipidów a zarówno parametrami mikrobiologicznymi ( $r = 0,147$ ), jak i czynnikiem „Utlenianie–Barwa” ( $r = 0,167$ ). Podobną strukturę czynników uzyskano w dniu 9., przy czym wyjaśniały one 80,17% całkowitej zmienności. Czynnik „Mikrobiologia” (39,79%) obejmował OLD, LAB, ENT, EC i STA, „Barwa–Utlenianie” (28,62%) zawierał pH, TBARS, ORP,  $L^*$ ,  $a^*$  oraz  $b^*$ , natomiast parametr „Lipidy” (11,77%) obejmował cholesterol, liczbę kwasową i liczbę nadtlenkową. W dniu 9. stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy obciążeniem mikrobiologicznym a czynnikiem „Barwa–Utlenianie” ( $r = 0,139$ ) oraz słabe korelacje ujemne pomiędzy degradacją lipidów a zarówno obciążeniem mikrobiologicznym ( $r = -0,039$ ), jak i czynnikiem „Barwa–Utlenianie” ( $r = -0,128$ ) [P4 – rys. 2].

Analiza FPCA wskazała na dwie główne składowe, które wyjaśniały łącznie około 95,90% całkowitej zmienności (PC1 – 92,44%, PC2 – 3,46%). Pierwsza składowa (PC1) odzwierciedlała średnie poziomy badanych parametrów w całym okresie przechowywania, ponieważ wyższe wartości PC1 odpowiadały bardziej korzystnym właściwościom jakościowym i były obserwowane między 4. a 6. dniem. Najwyższe wartości PC1 uzyskały próby z dodatkiem mieszaniny preparatów hkCFS B1 + CFS KOM1 oraz hkCFS O24 + CFS KNS32, natomiast najniższe próba kontrolna, co wskazuje na szybszą utratę jakości w jej przypadku. Druga składowa (PC2) różnicowała próby w zależności od momentu osiągnięcia maksymalnych wartości parametrów, ponieważ wartości dodatnie wskazywały na próby po szczycie jakości, a ujemne na próby będące w fazie najwyższej jakości. Wykres dwuwymiarowy (*biplot*) potwierdził, że próby z dodatkiem mieszaniny metabolitów utrzymywały lepsze parametry jakościowe przez dłuższy czas niż próba kontrolna. Wśród badanych układów doświadczalnych szczególną skuteczność w spowalnianiu procesów psucia wyrobu mięsnego wykazał wariant z dodatkiem hkCFS O24 + CFS KNS32, następnie hkCFS B1 + CFS KOM1, podczas gdy próba kontrolna uległa najszybszej degradacji [P4 – rys. 3].

## 6. Dyskusja Wyników

Mięso i przetwory mięsne należą do grupy żywności o szczególnie wysokim ryzyku mikrobiologicznym, co wynika z ich składu chemicznego oraz wysokiej aktywności wody, sprzyjających rozwojowi drobnoustrojów patogennych i mikroorganizmów powodujących psucie. Jednocześnie obserwuje się narastające ograniczenia dotyczące stosowania syntetycznych konserwantów oraz wzrost oczekiwań konsumentów wobec żywności bezpiecznej, naturalnej i zgodnej z koncepcją „czystej etykiety”. W odpowiedzi na te wyzwania coraz większe znaczenie zyskują biologiczne strategie utrwalania żywności, w szczególności biokonserwacja oparta na wykorzystaniu mikroorganizmów i ich metabolitów o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Rozwiązania te wpisują się w koncepcję zrównoważonego rozwoju i technologii „płatków”, umożliwiając ograniczenie wzrostu niepożądanych drobnoustrojów bez negatywnego wpływu na jakość sensoryczną produktów mięsnych. Bakterie fermentacji mlekowej oraz bakterie kwasu octowego stanowią ważne źródło związków bioaktywnych, takich jak kwasy organiczne, bakteriocyyny czy inne niskocząsteczkowe metabolity, wykazujących potencjał przeciwdrobnoustrojowy. Pomimo szerokiego zainteresowania ich zastosowaniem w biokonserwacji, dostępne dane wskazują na istotne zróżnicowanie skuteczności działania tych związków, zależne od ich budowy, mechanizmów oddziaływania oraz właściwości matrycy żywnościowej [20-25].

Przeprowadzony systematyczny przegląd literatury, stanowiący I etap pracy, potwierdził, że łączenie różnych barier mikrobiologicznych jest jednym z kluczowych podejść w biokonserwacji mięsa i jego wyrobów. W analizowanych badaniach dominowało zastosowanie kultur starterowych oraz niestarterowych kultur ochronnych, zarówno w produktach fermentowanych, jak i w mięsie świeżym oraz wyrobach typu *ready-to-eat*. Takie podejście wpisuje się w koncepcję technologii „płatków”, zakładającą wzajemne uzupełnianie się mechanizmów przeciwdrobnoustrojowych w celu zwiększenia bezpieczeństwa mikrobiologicznego bez intensyfikowania pojedynczych czynników konserwujących. Należy zauważyć, że w wyniku przeszukiwania i analizy literatury nie znaleziono doniesień o antagonistycznym oddziaływaniu łączonych czynników przeciwdrobnoustrojowych, co potwierdza zasadność ich stosowania w układach złożonych. Kombinacje mikrobiologicznych barier mogą poszerzać spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego oraz ograniczać ryzyko wtórnego wzrostu patogenów, co ma istotne znaczenie w kontekście podatności mięsa na psucie mikrobiologiczne [11,14,15].

Analiza piśmiennictwa wskazuje, że preparaty bakteryjne stosowane w badaniach objętych przeglądem systematycznym w zdecydowanej większości opierały się na substancjach pochodzących ze szczepów bakterii fermentacji mlekowej, głównie przedstawicieli rodzajów *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* oraz bakterii wcześniej zaliczanych do rodzaju *Lactobacillus*. Tendencja ta wskazuje na wyraźną dominację LAB jako kluczowego elementu stosowanych układów biologicznych w badaniach nad fermentacją i biokonserwacją produktów mięsnych, obejmujących zarówno kultury starterowe i ochronne, jak i źródła bakteriocyn oraz innych czynników przeciwdrobnoustrojowych.

Jednocześnie analiza danych ujawniła istotne ograniczenia interpretacyjne, wynikające z faktu, że w wielu badaniach nie porównywano skuteczności kombinacji barier z działaniem poszczególnych czynników stosowanych oddzielnie. Utrudnia to jednoznaczną ocenę występowania synergizmu w ścisłym znaczeniu, mimo że obserwowano wzmocnienie aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Skuteczność badanych układów była ponadto silnie zależna od właściwości matrycy mięsnej oraz interakcji metabolitów z jej składnikami, co potwierdzają doniesienia Liu i in. (2022), wskazujące na ograniczoną aktywność bakteriocyn i innych związków w złożonych układach żywnościowych [15]. Z tego względu podkreśla się znaczenie odpowiedniej formy aplikacji barier biologicznych oraz konieczność dalszych badań nad mechanizmami ich wzajemnych interakcji.

Powyzsze ograniczenia mogą wynikać nie tylko z właściwości matrycy mięsnej, lecz także z założeń metodologicznych analizowanych badań. Wysoki odsetek publikacji odnalezionych na etapie uzupełniającego przeszukiwania mógł wynikać z faktu, iż w wielu przypadkach synergizm pomiędzy czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi nie stanowił głównego celu badań. Autorzy niekiedy nie używali w słowach kluczowych pojęć takich jak „*synergism*”, „*combination*” czy „*additivity*”, a efekt synergistyczny uzyskiwano niejako przypadkowo

W efekcie analizy danych literaturowych zidentyfikowano lukę badawczą dotyczącą wspólnego zastosowania LAB i AAB, szczególnie w kontekście oddziaływania ich metabolitów pozakomórkowych, co wskazuje na niedostateczne rozpoznanie potencjalnych efektów synergistycznych pomiędzy tymi grupami mikroorganizmów. Pomimo licznych doniesień dotyczących indywidualnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej LAB i AAB [18,74,75], dotychczas nie opublikowano badań analizujących jednoczesne działanie LAB i AAB ani potencjalny efekt synergistyczny.

W tym kontekście narracja niniejszej dyskusji pozostaje spójna z założeniami hipotezy [H1], zakładającej synergistyczne działanie metabolitów LAB i AAB stosowanych w mieszaninach, oraz hipotezy [H3], odnoszącej się do poprawy jakości mikrobiologicznej i wydłużenia trwałości przechowalniczej mięsa surowego w wyniku aplikacji wybranych metabolitów bakteryjnych. Przeprowadzony systematyczny przegląd literatury stanowił zatem uzasadnioną podstawę do dalszych etapów badań eksperymentalnych, ukierunkowanych na weryfikację tych założeń w warunkach modelowych i aplikacyjnych. Tym samym, niniejsza praca jako jedna z pierwszych koncentruje się na synergizmie metabolitów LAB i AAB, a nie pojedynczych kultur bakteryjnych.

Celem II etapu badań była kompleksowa ocena potencjału antymikrobiologicznego i biokonserwującego preparatów LAB i AAB, obejmująca charakterystykę ich właściwości biologicznych oraz weryfikację skuteczności działania w warunkach modelowych.

W wyniku badań wykazano wyraźnie wyższą skuteczność przeciwdrobnoustrojową wybranych mieszanin metabolitów LAB i AAB w porównaniu do preparatów stosowanych pojedynczo. Zjawisko to wskazuje na występowanie efektów synergistycznych i addytywnych, co znajduje potwierdzenie w analizach interakcji ilościowych oraz w doniesieniach literaturowych opisujących „wieloskładnikowe” mechanizmy inhibicji wzrostu drobnoustrojów [15,76]. Szczególnie istotne z punktu widzenia aplikacyjnego jest rozszerzenie spektrum działania mieszanin wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, co znacząco zwiększa ich potencjał jako uniwersalnych środków biokonserwujących w różnych typach produktów. Takie podejście może pozwalać na jednoczesne oddziaływanie na kilka kluczowych struktur i szlaków metabolicznych komórki bakteryjnej, w tym błonę cytoplazmatyczną, gradient protonowy oraz mechanizmy regulacji pH i potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, co zostało wskazane w przeglądzie systematycznym Ju i in. (2024) [77].

Uzyskane wyniki sugerują, że synergiczne łączenie preparatów LAB i AAB umożliwia osiągnięcie wysokiej skuteczności przeciwdrobnoustrojowej przy zastosowaniu niższych dawek poszczególnych składników, co ma istotne znaczenie praktyczne. Redukcja stężeń substancji aktywnych może nie tylko ograniczać potencjalny wpływ dodatków na cechy sensoryczne produktu, ale również zmniejszać presję selekcyjną wywieraną na mikroorganizmy, a tym samym obniżać ryzyko rozwoju oporności drobnoustrojów na czynniki przeciwdrobnoustrojowe. Znaczenie ograniczania

presji selekcyjnej w kontekście bezpieczeństwa żywności i zdrowia publicznego zostało jednoznacznie podkreślone przez Brepoels i in. (2025) [78], którzy wskazują, że długotrwałe oddziaływanie subletalnych stężeń związków przeciwdrobnoustrojowych sprzyja selekcji szczepów opornych. Z kolei Conceição i in. (2023) [79], analizując problem oporności przeciwdrobnoustrojowej bakterii izolowanych z mięsa i produktów mięsnych w ujęciu koncepcji *One Health*, podkreślają, że stosowanie strategii umożliwiających ograniczenie dawek środków przeciwdrobnoustrojowych, w tym podejść opartych na synergizmie biologicznych metabolitów, może stanowić istotny element działań prewencyjnych w łańcuchu żywnościowym.

Wykonane w ramach niniejszej pracy analizy genomowe i proteomiczne umożliwiły wstępną identyfikację mechanizmów odpowiedzialnych za aktywność przeciwdrobnoustrojową szczepów *Lacticaseibacillus paracasei* B1 oraz *Lactiplantibacillus plantarum* O24. Analizy genomowe wykazały obecność rozbudowanych klastrów genowych odpowiedzialnych za biosyntezę bakteriocyn, w tym plantarycyn, enterocyn oraz karnocyn, co pozostaje zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi szczepów *L. plantarum* i *L. paracasei* izolowanych z żywności fermentowanej [80-87]. Zróżnicowanie liczby i rodzaju regionów bakteriocynowych, a także ich lokalizacja zarówno w chromosomie, jak i w plazmidach, wskazują na wysoki potencjał adaptacyjny badanych szczepów, wynikający m.in. z mechanizmów horyzontalnego transferu genów [86,88]. Jednocześnie brak ruchomych elementów genetycznych niosących oporność na antybiotyki oraz obecność systemów CRISPR-Cas potwierdzają bezpieczeństwo aplikacyjne analizowanych kultur, co ma istotne znaczenie z punktu widzenia technologii żywności.

Wyniki analiz proteomicznych dostarczyły dodatkowych argumentów dotyczących białkowego charakteru części aktywnych metabolitów obecnych w supernatantach bezkomórkowych LAB. Przeprowadzone analizy wykazały, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa CFS szczepów *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24 była stabilna przy ogrzewaniu do 100 °C, natomiast ulegała istotnemu obniżeniu po sterylizacji. Podobne wyniki uzyskali Xue i in. (2024) [89] oraz Heredia-Castro i in. (2015) [90], gdzie preparaty bakteryjne pochodzące od środowiskowych szczepów LAB (w tym *L. casei*, *L. fermentum*, *L. pentosus* oraz *L. paracasei* subsp. *tolerans*) również zachowywały ponad 70% aktywności po ogrzewaniu w temp. 100 °C przez 30 minut, natomiast ulegały inaktywacji po sterylizacji. Obserwacje te sugerują obecność związków o charakterze białkowym, takich jak bakteriocyny lub substancje bakteriocynopodobne,

które wykazują względną oporność na wysoką temperaturę i ulegają inaktywacji w warunkach sterylizacji [15]. Z kolei, zastosowanie enzymów proteolitycznych całkowicie zniżyło aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych preparatów. Podobne wyniki przedstawili Ghanbari i in. (2013) [91], gdzie aktywność supernatantów *L. casei* AP8 oraz *L. plantarum* H5 była eliminowana przez działanie enzymów takich jak trypsyna, papaina, proteinaza K, pronaza E oraz  $\alpha$ -amylaza, co również wskazywało na obecność związków bakteriocynopodobnych o charakterze białkowym. W celu dalszej weryfikacji białkowego charakteru aktywnych metabolitów przeprowadzono analizę spektroskopową FT-IR, pozwalającą na identyfikację grup funkcyjnych i charakterystycznych wiązań chemicznych. Technika ta umożliwia nieinwazyjne określenie struktury chemicznej substancji oraz ewentualnych zmian konformacyjnych pod wpływem czynników zewnętrznych, takich jak obróbka cieplna. Analiza FT-IR potwierdziła obecność struktur białkowych w CFS obu szczepów, a obserwowane zmiany po obróbce cieplnej wskazują na modyfikacje wiązań wodorowych i reorganizację struktury białek, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi wpływu temperatury na konformację białek i peptydów [92-97].

Proces oczyszczania i wstępnej charakterystyki substancji przeciwdrobnoustrojowych z supernatantów szczepów *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24 wykazał, że zawierają one białka o masie cząsteczkowej zgodnej z potencjalnymi bakteriocynami, których aktywność przeciwdrobnoustrojowa wzrosła po oczyszczeniu i została potwierdzona zarówno elektroforezą SDS-PAGE, jak i analizą LC-MS/MS. Zidentyfikowane białka wykazały częściową homologię z wcześniej opisanymi bakteriocynami, co sugeruje, że mogą one reprezentować nowe bakteriocyny lub substancje o działaniu bakteriocynopodobnym. Zaobserwowane wskaźniki pokrycia sekwencji białkowych mieszczą się w oczekiwanym zakresie dla analiz proteomicznych opartych na spektrometrii mas i są uzależnione od dobrze udokumentowanych czynników, takich jak właściwości peptydów, efektywność trawienia enzymatycznego oraz ilość danego białka [98,99]. Modyfikacje potranslacyjne mogą również wpływać na obniżenie poziomu pokrycia sekwencji, jeśli nie zostaną uwzględnione podczas analizy. Podobne wartości pokrycia zostały odnotowane w literaturze, m.in. 43% dla bakteriocyny pozyskanej z *Bacillus cereus* B4264 [100] oraz 52,4% w analizie bakteriocyny BM1829, bakteriocyny klasy II wytwarzanej przez *Lactobacillus crustorum* MN047 [101].

Masa cząsteczkowa bakteriocyn i substancji o działaniu bakteriocynopodobnym syntetyzowanych na ogół przez szczepy *L. paracasei* oraz *L. plantarum* wykazuje znaczną zmienność. Bakteriocyna wytwarzana przez szczep *L. paracasei* F9-02, według doniesień Duraisamy i in. (2022) [102], charakteryzowała się masą cząsteczkową wynoszącą około 28 kDa. Natomiast szczep *L. paracasei* CNCM I-5369 wytwarzał pięć różnych bakteriocyn o masach cząsteczkowych w zakresie od 5035,80 do 14 088,07 Da [103]. Bakteriocyny wytwarzane przez szczepy *L. plantarum* wykazują zazwyczaj niższą masę cząsteczkową, zwykle mieszczącą się w zakresie od 1 do 10 kDa. Przykładowo, doniesienia literaturowe opisują bakteriocyny o masach <10 kDa [104] oraz 6,73 kDa [105]. Niemniej jednak odnotowano także wyjątki od tej reguły. W badaniu Makhoul i in. (2024) [106], analiza SDS-PAGE oczyszczonego preparatu wykazała obecność białka o masie około 12 kDa, zidentyfikowanego jako bakteriocyna syntetyzowana przez *L. plantarum*. Z kolei Han i in. (2023) [107] opisali plantarycynę Z057 o masie cząsteczkowej 1272,61 Da. Poza tym, szczep *L. plantarum* BP102 wytwarzał plantarycynę o masie około 15,9 kDa, wykazującą aktywność wobec *Bacillus cereus* i *E. coli* [108]. Natomiast w badaniu Jiang i in. (2022) [109] opisano nową bakteriocynę LFX01 produkowaną przez *L. plantarum* LF-8, wyizolowaną z jelita tilapii, o masie 1049,56 Da, charakteryzującą się stabilnością termiczną oraz zdolnością do hamowania wzrostu i tworzenia biofilmu przez *Shigella flexneri*. Analiza literatury oraz badań własnych wskazuje na znaczną zmienność mas cząsteczkowych bakteriocyn wytwarzanych przez poszczególne szczepy, co odzwierciedla ich strukturalną i funkcjonalną różnorodność. Uzyskane wyniki badań własnych pozostają w zgodzie z przedstawionymi doniesieniami literaturowymi.

Pomimo szczegółowych prognoz genomowych, zaobserwowano niewielkie rozbieżności pomiędzy bakteriocynami kodowanymi przez geny obecne w genomach badanych szczepów a białkami rzeczywiście oczyszczonymi i zidentyfikowanymi eksperymentalnie metodą SDS-PAGE oraz LC-MS/MS. Różnice te mogą wynikać z szeregu czynników charakterystycznych dla badanych szczepów. Dla przykładu, ekspresja genów związanych z biosyntezą bakteriocyn jest często regulowana przez sygnały środowiskowe lub stresowe, które mogą nie być odtworzone w standardowych warunkach hodowli *in vitro* [110]. Dotyczy to szczególnie szczepów *L. plantarum*, w których biosynteza plantarycyn kontrolowana jest przez złożone operony regulacyjne reagujące na *quorum sensing* i bodźce środowiskowe [84]. Modyfikacje potranslacyjne, powszechne w przypadku bakteriocyn klasy I oraz zmodyfikowanych bakteriocyn klasy

II, mogą wpływać na pozorną masę cząsteczkową i utrudniać ich detekcję [111]. Proces oczyszczania może również preferencyjnie selekcjonować białka bardziej stabilne lub obecne w większej ilości, co prowadzi do niedoszacowania mniej licznych bakteriocyn przewidzianych na podstawie analizy genomu [112]. Techniczne ograniczenia metod SDS-PAGE i LC-MS/MS, takie jak niepełne odzyskiwanie białek lub efekt tłumienia jonów, mogą dodatkowo wpływać na selektywną detekcję [113].

Zintegrowanie analiz genomowych i proteomicznych uwidacznia złożoność procesu biosyntezy bakteriocyn przez szczepy *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24. Choć analiza BAGEL4 wykazała potencjał genetyczny badanych szczepów bakterii do syntezy wielu bakteriocyn, wyniki eksperymentalne sugerują, że jedynie ich podzbiór ulega ekspresji lub jest możliwy do wykrycia w zastosowanych warunkach. Identyfikacja białek o częściowej homologii z dobrze scharakteryzowanymi peptydami przeciwdrobnoustrojowymi potwierdza zasadność dalszych badań nad tymi szczepami jako obiecującymi kandydatami do zastosowań w przemyśle spożywczym

Interpretując te obserwacje, należy podkreślić komplementarny charakter metabolizmu obu grup mikroorganizmów LAB i AAB. W przypadku LAB kluczowym metabolitem był kwas mlekowy, odpowiedzialny za obniżanie pH środowiska i hamowanie wzrostu mikroorganizmów patogennych, co potwierdza utrwalone w literaturze mechanizmy działania bakterii fermentacji mlekowej [114,115]. Profil aktywności biologicznej kwasów organicznych, polegający przede wszystkim na zakłócaniu homeostazy, został dobrze poznany [116]. Mechanizm ten polega na przenikaniu niezjonizowanych kwasów przez błony komórkowe drobnoustrojów i ich dysocjacji w cytoplazmie [117]. Wyniki badań innych autorów oraz badań własnych wskazują jednak, że aktywność LAB nie ogranicza się wyłącznie do właściwości zakwaszających. Obecność bakteriocyn oraz innych metabolitów bioaktywnych, zgodnie z doniesieniami o egzopolisacharydach, peptydach czy enzymach antyoksydacyjnych [118], wskazuje na wielowymiarowy charakter ich oddziaływania. Ponadto supernatanty badanych LAB charakteryzowały się wysoką zawartością fenoli, zgodnie z licznymi doniesieniami, że fermentacja mlekowa intensyfikuje produkcję lub uwalnianie związków fenolowych i flawonoidów [119,120]. Potwierdzone w badaniu własnym silne zdolności do neutralizacji wolnych rodników ABTS<sup>•+</sup> i DPPH były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi fermentowanych napojów oraz preparatów LAB [74]. AAB natomiast, dzięki peryplazmatycznemu utlenianiu cukrów, wytwarzały przede wszystkim kwas octowy oraz kwas glukonowy, związki o silnym potencjale

hamowania rozwoju drobnoustrojów. Wysoka tolerancja na kwasowość przedstawicieli rodzaju *Komagataeibacter* i ich zdolność do syntezy związków wielkocząsteczkowych dodatkowo stabilizuje środowisko hodowli [121,122], natomiast częściowe utlenianie substratów charakterystyczne dla *Gluconobacter* sprzyja akumulacji produktów metabolizmu wtórnego [123]. Co istotne, AAB wykazują także zdolność do modyfikacji oraz sprzęgania fenoli, zwiększając ich biodostępność i stabilność, a także wspierając ochronę przed procesami oksydacyjnymi [58,74,122-124]. Tym samym, nawet jeśli ich własna aktywność antyoksydacyjna była niższa niż LAB, mogą stanowić istotny element systemu chroniącego produkty spożywcze przed utlenianiem.

Przeprowadzone badania *in vitro*, obejmujące ocenę właściwości fizykochemicznych, przeciwdrobnoustrojowych i przeciwutleniających preparatów LAB i AAB, wpisują się w aktualny nurt poszukiwań naturalnych rozwiązań biokonserwacyjnych opartych na wykorzystaniu metabolitów drobnoustrojów jako alternatywy dla syntetycznych dodatków do żywności. Uzyskane wyniki potwierdziły wieloczynnikowy charakter aktywności przeciwdrobnoustrojowej metabolitów bakteryjnych, zależnej zarówno od profilu wytwarzanych metabolitów, jak i ich wzajemnych interakcji, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi [125,126]. Wykazano, iż kluczową rolę w hamowaniu wzrostu drobnoustrojów odgrywają kwasy organiczne, gdyż neutralizacja pH supernatantów LAB prowadziła do istotnego osłabienia efektu antagonistycznego. Jednocześnie utrzymująca się, choć ograniczona aktywność neutralizowanych supernatantów LAB wskazuje na udział dodatkowych związków bioaktywnych, potencjalnie o charakterze bakteriocynowym lub bakteriocynopodobnym [125]. Zachowanie, a miejscami nawet wzrost aktywności po obróbce cieplnej potwierdza stabilność wybranych metabolitów oraz ich potencjał aplikacyjny, szczególnie w systemach niewymagających obecności żywych komórek bakterii [127,128]. Całość obserwacji wskazuje, że metabolity LAB i AAB tworzą funkcjonalnie zintegrowany układ bioaktywny, którego działanie wpisuje się w koncepcję technologii „płatków” i współczesne podejście do projektowania naturalnych barier przeciwdrobnoustrojowych.

W kontekście postawionych hipotez badawczych całość uzyskanych obserwacji dotyczących etapu II badań pozytywnie weryfikuje hipotezę **[H1]**, wskazując na zasadność stosowania mieszanin metabolitów LAB i AAB w celu uzyskania wzmocnionego, synergistycznego i addytywnego efektu przeciwdrobnoustrojowego wobec bakterii patogennych i psujących mięso. Jednocześnie wyniki analiz

mikrobiologicznych, fizykochemicznych, genomowych i proteomicznych potwierdzają hipotezę [H2], zgodnie z którą efekt antagonistyczny wynika z komplementarnego działania kwasów organicznych, związków o charakterze peptydowym, w tym potencjalnie bakteriocyn, oraz innych metabolitów bioaktywnych. Charakter uzyskanych obserwacji, w połączeniu ze stabilnością oraz szerokim spektrum działania badanych mieszanin metabolitów LAB i AAB, uzasadnia dalsze badania aplikacyjne w matrycy mięsnej, dotyczące poprawy jakości mikrobiologicznej oraz wydłużenia trwałości przechowalniczej surowych wyrobów mięsnych.

Wyniki badań modelowych wykazały ponadto, że zastosowane mieszaniny preparatów skutecznie hamowały rozwój patogenu *S. Enteritidis* w mięsie z piersi kurczaka już po 24 godzinach inkubacji. Co istotne, wszystkie wybrane kombinacje wykazywały działanie bakteriobójcze po 7 dniach przechowywania w warunkach chłodniczych. Zaobserwowano również wyraźną zależność pomiędzy długością ekspozycji mięsa na preparaty a nasileniem efektu przeciwdrobnoustrojowego, przy czym dłuższy czas kontaktu skutkowało większą redukcją liczebności drobnoustrojów. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, liczne preparaty na bazie bakterii fermentacji mlekowej, stosowane w formie bezkomórkowych supernatantów, wykazują skuteczność w hamowaniu lub eliminowaniu niepożądanych mikroorganizmów w mięsie oraz posiadają właściwości umożliwiające ich zastosowanie w biokonserwacji żywności, co zostało wykazane m.in. w badaniach Wang i in. (2024), Abouloifa i in. (2022) oraz Segli i in. (2021) [22,129-131]. Z kolei metabolity bakterii kwasu octowego (AAB) są wykorzystywane głównie jako środki bakteriobójcze, spośród których najczęściej stosowanym związkiem jest kwas octowy [132]. Wyniki badań własnych potwierdzają skuteczność preparatów pochodzenia LAB i AAB w ograniczaniu skażenia mięsa przez *S. Enteritidis*, co potwierdza słuszność hipotez [H1] oraz [H2].

Wybór konkretnych kombinacji szczepów LAB i AAB do dalszych badań aplikacyjnych w skali półtechnicznej opierał się zarówno na skuteczności *in vitro*, jak i *in situ* w modelu mięsa drobiowego. Zarówno hkCFS z *Lactocaseibacillus paracasei* B1 w połączeniu z CFS *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1, jak i hkCFS z *Lactiplantibacillus plantarum* O24 z CFS *Gluconobacter oxydans* KNS32, wykazały szybki efekt hamujący wzrost drobnoustrojów oraz działanie bakteriobójcze po 7 dniach przechowywania, co stanowiło podstawę ich wyboru do dalszych badań aplikacyjnych nad modelem surowego wyrobu mięsnego. Optymalizacja stężenia preparatów w modelu surowego mięsa okazała się kluczowa dla uzyskania równowagi między skutecznością

przeciwdrobnoustrojową a zachowaniem właściwości sensorycznych produktu. W eksperymencie przechowalniczym planowano zastosowanie preparatów bakteryjnych w postaci mieszanin jako czynników o potencjalnym znaczeniu technologicznym, analogicznie do rozwiązań stosowanych w wyrobach mięsnych surowych przeznaczonych do spożycia po obróbce cieplnej. Zgodnie z definicją Rozporządzenia (WE) nr 853/2004, do surowych wyrobów mięsnych, w tym wytworzonych z mięsa rozdrobnionego typu mięso garmażeryjne, dopuszcza się dodatek środków spożywczych, przypraw lub innych substancji, o ile proces przetwarzania nie prowadzi do istotnej modyfikacji struktury włókien mięśniowych [166]. Jednocześnie należy podkreślić, że zakres dopuszczalnych dodatków do surowych wyrobów mięsnych jest obecnie ograniczony do substancji określonych w Rozporządzeniu (UE) nr 1129/2011, obejmujących m.in. wybrane kwasy spożywcze [167]. W aktualnym stanie prawnym brak jest jednoznacznych regulacji dopuszczających stosowanie supernatantów w surowych wyrobach mięsnych. Ich wykorzystanie w niniejszej pracy miało wyłącznie charakter badań naukowych, ukierunkowanych na ocenę bezpieczeństwa oraz potencjału aplikacyjnego. W praktyce przemysłowej niewielki dodatek wody, rzędu 5%, do mięsa przeznaczonego do produkcji wyrobów garmażeryjnych jest stosowany w celu ułatwienia równomiernego rozprowadzenia pozostałych składników, w tym soli i przypraw, podczas procesu mieszania oraz wytwarzania farszów mięsnych. Na tej podstawie opracowano warianty, w których bezkomórkowe supernatanty stanowiły łącznie 2,5% (v/v), a pozostałe 2,5% (v/v) uzupełniono wodą. W badaniach wstępnych analizowano różne warianty dozowania CFS, co pozwoliło na wstępną ocenę ich wpływu na właściwości produktu. Badania wykazały, że wyższe stężenia dodatku pogarszały cechy sensoryczne wyrobu, natomiast wariant 2,5% + 2,5% okazał się optymalny, ponieważ nie powodował zmian w zapachu ani barwie, a jednocześnie wykazywał wyraźne działanie przeciwdrobnoustrojowe. Zbliżone poziomy stężeń, jak te przyjęte w niniejszych badaniach, wykazały skuteczność również w innych pracach dotyczących zastosowania supernatantów bakteryjnych w matrycach mięsnych [133-136]. Wyniki te potwierdzają zasadność doboru zastosowanych stężeń oraz ich potencjał technologiczny i przeciwdrobnoustrojowy.

W III etapie badań oceniono wpływ zastosowania wyselekcjonowanych preparatów bakteryjnych LAB i AAB na podstawowe parametry jakościowe modelowego wyrobu mięsnego surowego, typu mięso garmażeryjne. Badania nad mięsem surowym w kontekście zastosowania bakterii fermentacji mlekowej prowadzone

są od wielu lat, jednak w niniejszej pracy nowością było jednoczesne zastosowanie preparatów z LAB i AAB, co pozwoliło ocenić ich wpływ na jakość mikrobiologiczną, a następnie na stabilność lipidów, profil kwasów tłuszczowych, odczyn pH, potencjał oksydacyjno-redukcyjny (ORP), czy barwę. Ponadto zbadano wpływ czasu przechowywania na parametry jakościowe mięsa przy użyciu analiz statystycznych.

Ocena wpływu preparatów LAB i AAB na jakość mikrobiologiczną oraz trwałość modelowego, surowego wyrobu mięsnego potwierdziła ich silny potencjał przeciwdrobnoustrojowy. Zaobserwowane zmiany odpowiadały typowemu zachowaniu drobnoustrojów środowiskowych w mięsie przechowywanym w warunkach chłodniczych, gdzie stopniowy wzrost ich liczebności jest powszechnie opisywany w literaturze [137]. Jednocześnie istotne ograniczenie rozwoju drobnoustrojów w próbach traktowanych mieszaninami metabolitów LAB i AAB wskazuje, że zastosowane substancje skutecznie modulowały dynamikę wzrostu mikroorganizmów odpowiedzialnych za psucie mięsa. Szczególnie istotne z punktu widzenia technologii i bezpieczeństwa żywności było ograniczenie rozwoju bakterii z rodziny Enterobacteriaceae oraz *E. coli*, które są uznawane za wskaźniki higieny procesu i świeżości surowca. Obserwowany efekt potwierdza szerokie spektrum działania metabolitów LAB i AAB, obejmujące zarówno mikroorganizmy Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Brak obecności patogenów takich jak *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp. w całym okresie przechowywania potwierdza wysoki poziom bezpieczeństwa mikrobiologicznego analizowanego modelu oraz sugeruje, że warunki przechowywania w połączeniu z zastosowanymi preparatami ograniczały rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych.

W świetle uzyskanych wyników potwierdzono zasadność przyjętych hipotez badawczych [H1] oraz [H3]. Synergiczne zastosowanie metabolitów LAB i AAB wykazało wyraźną skuteczność w ograniczaniu rozwoju drobnoustrojów oraz w poprawie jakości mikrobiologicznej surowego wyrobu mięsnego, co przekłada się na wydłużenie jego trwałości przechowalniczej. Uzyskane dane potwierdzają, że metabolity LAB i AAB, szczególnie stosowane w postaci mieszanin, mogą stanowić efektywne i funkcjonalne narzędzie biokonserwacji surowych produktów mięsnych.

Procesy utleniania lipidów stanowią jeden z kluczowych czynników determinujących jakość mięsa, prowadząc m.in. do powstawania zjełczałych nut smakowo-zapachowych oraz innych niepożądanych zmian sensorycznych [138]. Zmiany intensywności peroksydacji lipidów, oceniane metodą TBARS, odzwierciedlają

dynamikę reakcji oksydacyjnych zachodzących w trakcie przechowywania mięsa i są powszechnie opisywane w literaturze jako zjawisko inicjowane we wczesnych etapach przechowywania, zgodnie z obserwacjami Kaczmarek i in. (2021) [139] i Abouloifa i in. (2022) [140]. Obserwowane w późniejszym okresie obniżenie wartości TBARS może wynikać z degradacji dialdehydu malonowego (MDA) lub jego wiązania z białkowymi komponentami mięsa, co potwierdzają również Wazir i in. (2021) [141]. Istotne znaczenie aplikacyjne ma fakt, że próby traktowane mieszaninami metabolitów bakteryjnych charakteryzowały się niższą intensywnością peroksydacji lipidów w porównaniu do próby kontrolnej, co sugeruje potencjalne działanie przeciwutleniające zastosowanych preparatów. Podobne właściwości ochronne metabolitów pochodzenia mikrobiologicznego w matrycach mięsnych opisali Stadnik i in. [142].

Z kolei zmiany obserwowane w zakresie stabilności lipidów wskazują, że zastosowanie mieszanin metabolitów LAB i AAB mogło modulować przebieg procesów utleniania i hydrolizy lipidów w mięsie podczas przechowywania. Zaobserwowane obniżenie zawartości cholesterolu w próbach traktowanych preparatami może wskazywać na ich potencjalny wpływ na stabilność lipidów, związany z modulacją procesów utleniania cholesterolu. Analiza liczby nadtlenkowej (PV), jako wskaźnika wczesnych etapów utleniania lipidów, sugeruje, że wyższe wartości tego parametru w próbach traktowanych nie muszą wykluczać późniejszego działania antyoksydacyjnego preparatów, lecz mogą wynikać z przejściowej akumulacji pierwotnych produktów utleniania [143]. Z kolei zmiany liczby kwasowej (AV), odzwierciedlające stopień hydrolizy lipidów, wskazują, że kombinacje metabolitów mogły skuteczniej ograniczać procesy hydrolityczne, co jest zgodne z obserwacjami Arrijoja i in. (2020) [133]. Jednoczesna analiza PV i AV potwierdza, że w mięsie zachodzą równoległe procesy oksydacyjne i hydrolityczne, których intensywność może być modyfikowana przez zastosowanie biokonserwantów [144].

Interpretacja składu kwasów tłuszczowych wskazuje, że zastosowanie mieszanin metabolitów bakteryjnych nie powodowało niekorzystnych zmian w głównych frakcjach lipidowych. Stabilność kwasów tłuszczowych nasyconych (SFA) obserwowana w trakcie przechowywania jest zgodna z doniesieniami Coombs i in. (2018) [145], którzy wykazali ograniczoną podatność tej frakcji na utlenianie. W przypadku jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA), w szczególności kwasu oleinowego, zachowanie względnej stabilności w próbach traktowanych preparatami potwierdza wcześniejsze obserwacje Horbańczuka i in. (2019) [146], wskazujące na możliwość ograniczenia ich

degradacji w warunkach chłodniczych. Najbardziej podatną na zmiany frakcją pozostawały wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA), jednak mniejsza skala ich degradacji w próbach z dodatkiem mieszanin metabolitów sugeruje łagodne działanie ochronne zastosowanych preparatów wobec procesów oksydacyjnych [147]. Podobne efekty ochronne w odniesieniu do PUFA, wynikające z zastosowania naturalnych środków przeciwdrobnoustrojowych, w tym bakterii kwasu octowego, opisali Okoń i in. (2024) [57].

Analizy fizykochemiczne wykazały, że aplikacja mieszanin metabolitów LAB i AAB nie powodowała zmian kwasowości mięsa w odniesieniu do próby kontrolnej. Z perspektywy technologii przetwórstwa mięsa jest to korzystne, ponieważ pozwala utrzymać punkt izoelektryczny białek, zachować zdolność wiązania wody i uniknąć nadmiernych strat w trakcie obróbki cieplnej [148]. Zbliżony przebieg zmian pH w próbach kontrolnych i traktowanych mieszaninami metabolitów wskazuje, że ich działanie przeciwdrobnoustrojowe nie zaburzało naturalnych procesów zachodzących w mięsie. Po 6. dniu pH nieznacznie wzrosło, co, według Kumara i Tanwara (2011), jest zjawiskiem typowym i wynika z proteolizy oraz aktywności enzymów uwalnianych przez drobnoustroje [149]. Zjawisko to nie neguje skuteczności zastosowanych preparatów, lecz potwierdza, że ich działanie przeciwdrobnoustrojowe realizowane było bez istotnej ingerencji w podstawowe parametry fizykochemiczne mięsa.

Natomiast wartości ORP w początkowym okresie przechowywania odzwierciedlały narastający stres oksydacyjny związany z dostępnością tlenu i aktywnością enzymów prooksydacyjnych, typowy dla procesów zachodzących w mięsie podczas przechowywania w warunkach chłodniczych, jak podają Domínguez i in. (2021) [150]. Odmienny przebieg zmian ORP w próbach traktowanych mieszaniną metabolitów bakteryjnych wskazuje na modulujący wpływ preparatów i sugeruje ich potencjalne działanie antyoksydacyjne w mięsie [151]. W przeciwieństwie do prób traktowanych mieszaniną metabolitów, dalszy wzrost ORP obserwowany w próbie kontrolnej należy interpretować jako objaw postępujących procesów degradacyjnych, co może wskazywać na wyższy poziom stresu oksydacyjnego i intensyfikację procesów psucia, jak wykazał Estévez i in. (2011) [152].

W odniesieniu do analizy parametrów barwy, brak istotnych różnic pomiędzy próbami traktowanymi mieszaniną metabolitów i kontrolnymi, sugeruje, że supernatanty LAB i AAB nie pogarszały barwy mięsa, a aspekt ten, jak wskazują Cardona i in. (2023) oraz Feuz i in. (2020), ma kluczowe znaczenie dla akceptacji produktu przez

konsumentów [153,154]. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych badaczy, m.in. Stadnik i in. (2022) [142] wykazali, że związki bioaktywne z kultur bakteryjnych nie wpływały negatywnie na barwę mięsa, natomiast Yang i in. (2023) [155] odnotowali, że steki wołowe traktowane *Lactobacillus sakei* RS-25 wykazywały poprawę jasności i opóźnioną degradację koloru bez negatywnego wpływu na ogólne parametry jakościowe produktu.

Zastosowanie wielowymiarowych metod analizy danych, takich jak eksploracyjna analiza czynnikowa (EFA) oraz funkcjonalna analiza głównych składowych (FPCA), umożliwiło kompleksową interpretację wzajemnych zależności pomiędzy parametrami mikrobiologicznymi, fizykochemicznymi i barwy mięsa w trakcie przechowywania. Uzyskane zależności potwierdzają, że jakość surowego mięsa jest kształtowana przez współwystępowanie procesów mikrobiologicznych, oksydacyjnych oraz degradacji lipidów, których znaczenie zmienia się wraz z czasem przechowywania. Dominująca rola czynnika mikrobiologicznego jako głównego determinanty zmian jakości mięsa jest zgodna z obserwacjami Ercoliniego i in. (2006), którzy wskazali, że rozwój mikroorganizmów stanowi kluczowy element inicjujący procesy psucia mięsa podczas przechowywania [156]. Wzrost znaczenia tego czynnika wraz z czasem przechowywania potwierdza, że kontrola rozwoju drobnoustrojów stanowi podstawowy element strategii wydłużania trwałości surowych produktów mięsnych. Jednocześnie wyodrębnienie czynnika łączącego parametry oksydacyjne i cechy barwy wskazuje na ścisłe powiązania pomiędzy procesami utleniania lipidów i barwy mięsa a percepcją jakości przez konsumenta. Zależności pomiędzy nasileniem procesów utleniania lipidów a aktywnością drobnoustrojów obserwowane w późniejszych etapach przechowywania są spójne z doniesieniami Papuc i in. (2017) [157], którzy wykazali, że metabolizm mikroorganizmów może przyspieszać degradację lipidów oraz składników odpowiedzialnych za barwę mięsa. W tym kontekście zastosowanie metabolitów LAB i AAB mogło pośrednio ograniczać tempo tych zmian poprzez hamowanie aktywności metabolicznej populacji drobnoustrojów obecnych w mięsie. Zależność pomiędzy obniżoną liczebnością drobnoustrojów a ograniczeniem peroksydacji lipidów została szeroko opisana w przeglądach literaturowych Domíngueza i in. (2019) [147] oraz Wu i in. (2022) [158], co wskazuje na możliwy mechanizm synergiczny sprzyjający zwiększeniu stabilności oksydacyjnej mięsa. Jednoczesne ograniczenie wzrostu drobnoustrojów oraz intensywności procesów utleniania lipidów potwierdza wielofunkcyjny charakter metabolitów LAB i AAB jako biokonserwantów, co pozostaje

w zgodzie z wnioskami płynącymi z przeglądów literaturowych Papadochristopoulou i in. (2021) [159] oraz Yu i in. (2021) [160], opisujących tzw. „podwójny efekt” naturalnych dodatków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i antyoksydacyjnym [161].

Zastosowanie FPCA pozwoliło uchwycić dynamikę zmian jakości mięsa w czasie, co stanowi istotne uzupełnienie klasycznych analiz PCA stosowanych wcześniej w badaniach mięsa, m.in. Hu i in. (2007) oraz Cañeque i in. (2007) [162,163]. Analiza ta potwierdziła, że mięso traktowane mieszaninami metabolitów LAB i AAB dłużej utrzymywało korzystne parametry jakościowe w porównaniu do próby kontrolnej, co wskazuje na spowolnienie procesów degradacyjnych zachodzących w trakcie przechowywania. Wyniki FPCA jednoznacznie wskazały najwyższą skuteczność mieszaniny hkCFS O24 + CFS KNS32, a w dalszej kolejności hkCFS B1 + CFS KOM1, podczas gdy próba kontrolna ulegała najszybszej degradacji w trakcie przechowywania.

Wyniki analiz wielowymiarowych potwierdzają hipotezę [H1], wskazując na skuteczne działanie przeciwdrobnoustrojowe mieszanin metabolitów LAB i AAB. Jednocześnie obserwowane różnicowanie parametrów jakościowych mięsa wspiera hipotezę [H2], sugerując, że komplementarne oddziaływanie kwasów organicznych, bakteriocyn i innych związków bioaktywnych może przyczyniać się do poprawy jakości mikrobiologicznej i opóźnienia psucia mięsa. Najpełniejsze potwierdzenie uzyskano dla hipotezy [H3], ponieważ zastosowane mieszaniny umożliwiły utrzymanie pożądaných właściwości jakościowych surowego wyrobu mięsnego przez cały analizowany okres przechowywania, tj. do 9. Dnia w temp. 4°C, co wiązało się z wydłużeniem jego trwałości przechowalniczej. Całościowo wyniki te wskazują, że metabolity LAB i AAB, stosowane w postaci mieszanin, mogą stanowić efektywną i wielokierunkową strategię biologicznej konserwacji mięsa i wyrobów mięsnych.

## 7. STWIERDZENIA I WNIOSKI

Na podstawie wyników uzyskanych w toku przeprowadzonych badań sformułowano poniższe stwierdzenia:

1. Metabolity wybranych bakterii fermentacji mlekowej (LAB) oraz bakterii kwasu octowego (AAB) wykazują synergistyczne i addytywne działanie przeciwdrobnoustrojowe *in vitro* oraz *in situ* wobec bakterii patogennych i psujących mięso oraz jego wyroby, w szczególności względem *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp. Skuteczność tę potwierdzono zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w modelowym układzie z wykorzystaniem mięsa garmażeryjnego.
2. Zidentyfikowane w genomach szczepów *L. paracasei* B1 oraz *L. plantarum* O24 geny odpowiedzialne za kodowanie bakteriocyn, a także potwierdzony białkowy charakter aktywnych związków przeciwdrobnoustrojowych, wskazują na istotną rolę bioaktywnych peptydów w mechanizmie przeciwdrobnoustrojowego działania zastosowanych metabolitów.
3. Preparaty zawierające metabolity bakterii *L. paracasei* B1 i *L. plantarum* O24 w połączeniu z *G. oxydans* KNS32 oraz *K. saccharivorans* KOM1 wykazały właściwości antyoksydacyjne, co wpłynęło na spowolnienie peroksydacji lipidów, ograniczenie degradacji cholesterolu i ochronę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w mięsie podczas chłodniczego przechowywania.
4. Zastosowanie mieszaniny metabolitów bakterii *L. paracasei* B1, *L. plantarum* O24 oraz *G. oxydans* KNS32 i *K. saccharivorans* KOM1 nie spowodowało pogorszenia podstawowych parametrów fizykochemicznych mięsa garmażeryjnego, takich jak pH, ORP czy barwa, co potwierdza bezpieczeństwo aplikacyjne preparatów i brak ich negatywnego wpływu na jakość produktu.
5. Największą skuteczność przeciwdrobnoustrojową i stabilizującą jakość mikrobiologiczną mięsa spośród badanych wariantów wykazała mieszanina zawierająca: 1,25% (v/v) hkCFS *L. plantarum* O24 oraz 1,25% (v/v) CFS *G. oxydans* KNS32, co wskazuje, że właśnie to połączenie metabolitów LAB i AAB jest najbardziej obiecującym preparatem do biokonserwacji mięsa i jego wyrobów.

W oparciu o uzyskane rezultaty oraz ich interpretację przedstawiono również następujące wnioski:

1. Metabolity *L. paracasei* B1, *L. plantarum* O24, *G. oxydans* KNS32 oraz *K. saccharivorans* KOM1 mogą stanowić skuteczny element strategii biokonserwacji mięsa, przyczyniając się do wydłużenia jego trwałości przechowalniczej, co potwierdza hipotezy [H1] oraz [H3].
2. Potencjalny synergistyczny i addytywny mechanizm działania metabolitów LAB i AAB wynika prawdopodobnie z komplementarnego oddziaływania kwasów organicznych, bakteriocyn, związków fenolowych i innych bioaktywnych metabolitów obecnych w mieszaninach badanych preparatów, co pozytywnie weryfikuje hipotezę [H2].
3. Zidentyfikowane metabolity LAB i AAB, wykazując synergistyczne i addytywne działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec drobnoustrojów patogennych i powodujących psucie, stwarzają realną możliwość ich zastosowania jako naturalnych czynników biologicznego utrwalania mięsa i jego przetworów.

## 8. DOROBEK NAUKOWY

### Wykształcenie

**2021-2025 r. Doktorantka w dyscyplinie technologia żywności i żywienia**

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka

Szkoła Doktorska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**2013-2016 r. Magister dietetyki**

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**2010-2013 r. Licencjat dietetyki**

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

### SPIS PUBLIKACJI

#### Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

1. **Karbowiak, M.**, Kruk, M., Szymański, P. & Zielińska, D. (2025). Novel synergistic combination of lactic acid and acetic acid bacteria cell-free extracts for enhanced food biopreservation. *Ann Agric Environ Med*. DOI: 10.26444/aaem/214500
2. **Karbowiak, M.**, Wójcicki, M., Hyun, J. E., Szymański, P., Niu, Y. D., & Zielińska, D. (2025). Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived *Lacticaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. *LWT*, 118597. DOI: 10.1016/j.lwt.2025.118597
3. **Karbowiak, M.**, Okoń, A., Łaszkiwicz, B., Szymański, P., & Zielińska, D. (2025). Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork. *Foods*, 14(11), 1934. DOI: 10.3390/foods14111934
4. **Karbowiak, M.**, Szymański, P., & Zielińska, D. (2023). Synergistic effect of combination of various microbial hurdles in the biopreservation of meat and meat products – systematic review. *Foods*, 12(7), 1430. DOI: 10.3390/foods12071430

#### Pozostałe publikacje (chronologicznie)

5. Rudzka, A., Patloka, O., Płecha, M., Zborowski, M., Królikowski, T., Oczkowski, M., Kołożyn-Krajewska, D., Kruk, M., **Karbowiak, M.**, Mosiej, W., & Zielińska,

- D. (2025). A Comparison of the Response of the Human Intestinal Microbiota to Probiotic and Nutritional Interventions In Vitro and In Vivo—A Case Study. *Nutrients*, 17(19), 3093. DOI: 10.3390/nu17193093
6. Kęska, P., Stadnik, J., **Karbowiak, M.**, & Zielińska, D. (2025). The effect of sonicated cell-free supernatant from *Lacticaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 on selected quality determinants of cooked pork sausages. *Meat Science*, 109951. DOI: 10.1016/j.meatsci.2025.109951
  7. Kęska, P., Zielińska, D., **Karbowiak, M.**, Kruk, M., Lisiecka, U., & Stadnik, J. (2025). The potential of cell-free supernatants from *Lacticaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 as antioxidant and antimicrobial agents. *Food Chemistry*, 145408. DOI: 10.1016/j.foodchem.2025.145408
  8. Sionek, B., Okoń, A., Łepecka, A., Zielińska, D., Jaworska, D., Kajak-Siemaszko, K., Neffe-Skocińska, K., Trzaskowska, M., **Karbowiak, M.**, Szymański, P., Dolatowski, Z. J., & Kołożyn-Krajewska, D. (2024). The Role of Autochthonous *Levilactobacillus brevis* B1 Starter Culture in Improving the Technological and Nutritional Quality of Cow's Milk Acid-Rennet Cheeses-Industrial Model Study. *Foods*, 13(3), 392. DOI:10.3390/foods13030392
  9. Kossowska, M., Olejniczak, S., **Karbowiak, M.**, Mosiej, W., Zielińska, D., & Brzezicka, A. (2024). The Interplay between Gut Microbiota and Cognitive Functioning in the Healthy Aging Population: A Systematic Review. *Nutrients*, 16(6), 852. DOI:10.3390/nu16060852
  10. Okoń, A., Zielińska, D., Szymański, P., Łepecka, A., Siekierko, U., Neffe-Skocińska, K., Trzaskowska, M., Kajak-Siemaszko, K., Sionek, B., **Karbowiak, M.**, Kołożyn-Krajewska, D., & Dolatowski, Z. J. (2024). The Effect of Apple Vinegar Addition on the Quality and Shelf Life of Cooked Sausage during Chilling Storage. *Applied Sciences*, 14(10), 4027. DOI:10.3390/app14104027
  11. Neffe-Skocińska, K., **Karbowiak, M.**, Kruk, M., Kołożyn-Krajewska, D., & Zielińska, D. (2023). Polyphenol and antioxidant properties of food obtained by the activity of acetic acid bacteria (AAB)—A systematic review. *Journal of Functional Foods*, 107, 105691. DOI:10.1016/j.jff.2023.105691
  12. Łepecka, A., Szymański, P., Okoń, A., Siekierko, U., Zielińska, D., Trzaskowska, M., Neffe-Skocińska, K., Sionek, B., Kajak-Siemaszko, K., **Karbowiak, M.**, Kołożyn-Krajewska, D., & Dolatowski, Z. J. (2023). The Influence of the Apple Vinegar Marination Process on the Technological, Microbiological and Sensory

- Quality of Organic Smoked Pork Hams. *Foods*, 12(8), 1565. DOI:10.3390/foods12081565
13. Zielińska, D., **Karbowiak, M.**, & Brzezicka, A. (2022). The Role of Psychobiotics to Ensure Mental Health during the COVID-19 Pandemic-A Current State of Knowledge. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17), 11022. DOI:10.3390/ijerph191711022
  14. **Karbowiak, M.**, Gałek, M., Szydłowska, A., & Zielińska, D. (2022). The Influence of the Degree of Thermal Inactivation of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Their Postbiotics on Aggregation and Adhesion Inhibition of Selected Pathogens. *Pathogens*, 11(11), 1260. DOI:10.3390/pathogens11111260
  15. Zielińska, D., Marciniak-Łukasiak, K., **Karbowiak, M.**, & Łukasiak, P. (2021). Effects of Fructose and Oligofructose Addition on Milk Fermentation Using Novel Lactobacillus Cultures to Obtain High-Quality Yogurt-like Products. *Molecules*, 26(19), 5730. DOI:10.3390/molecules26195730
  16. **Karbowiak, M.**, & Zielińska, D. (2022). Zastosowanie aktywnych opakowań i powłok zawierających postbiotyki do biokonserwacji mięsa i wyrobów mięsnych. *Przemysł Spożywczy*, vol. 76, nr 3, s.33-39. DOI:10.15199/65.2022.3.6
  17. **Karbowiak, M.**, Mosiej, W., & Zielińska, D. (2022). Wpływ dodatku błonnika i  $\beta$ -glukanu na przeżywalność bakterii probiotycznych w mlecznych napojach fermentowanych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, vol. 29, nr 1, s.88-101. DOI:10.15193/zntj/2022/130/410
  18. **Karbowiak, M.**, Brzezicka, A., & Zielińska, D. (2022). The impact of the supplementation of probiotics used as psychobiotics on adolescents' and young adults' mental health and well-being affected by the covid-19 pandemic – a literature review of the current state of knowledge. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, vol. 29, nr 4, s.27-49. DOI:10.15193/zntj/2022/133/428
  19. **Karbowiak, M.**, & Zielińska, D. (2020). Postbiotyki – właściwości, zastosowanie i wpływ na zdrowie człowieka. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, vol. 27, nr 2, s.22-37. DOI: 10.15193/zntj/2020/123/332

#### **Współautorstwo rozdziałów w monografiach (chronologicznie)**

20. **Karbowiak Marcelina**, Pawlak Mateusz, Zielińska Dorota: Wpływ inaktywacji cieplnej komórek bakterii kwasu mlekowego na ich zdolność do adhezji do śluzu jelitowego, W: *Żywność dzisiaj. Lokalna czy globalna, tradycyjna czy innowacyjna?* Monografia pokonferencyjna / Beszterda-Buszcak Monika,

Przeor Monika (red.), 2022, Poznań, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, s.68-84, ISBN 978-83-67112-29-1

21. **Karbowiak Marcelina**, Zielińska Dorota: Postbiotyki – prozdrowotne składniki żywności funkcjonalnej, W: Wybrane problemy współczesnego świata w ujęciu interdyscyplinarnym / Decyk Agnieszka, Sitko Barbara, Stachyra Rafał (red.), 2021, Łódź, Wydawnictwo Naukowe ArchaeGraph Diana Łukomiak, s.49-69, ISBN 978-83-66709-98-0

Punkty MNSiW: 2000; Sumaryczny IF: 68,227; Indeks Hirscha (WoS): 6

Liczba cytowań (bez autocytowań): Web of Science: 106; Scopus: 137\*

### **Staże, warsztaty i szkolenia w zagranicznych lub krajowych ośrodkach**

1. Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego – PIB, Zakład Technologii Mięsa i Tłuszczu. Warszawa, Polska. Staż krajowy, 01.08–31.10.2024. Tematyka: Opracowanie i przygotowanie płynów pochodzących zawierających wyselekcjonowane szczepy LAB (*Lactocaseibacillus paracasei* B1, *Lactiplantibacillus plantarum* O24) oraz AAB (*Gluconobacter oxydans* KNS32, *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1); Udział w produkcji mięsa garmazeryjnego z dodatkiem płynów pochodzących i przygotowanie wariantu kontrolnego; Analiza jakości przechowywanych prób mięsa: badania mikrobiologiczne (m.in. LAB, *E. coli*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, gronkowce koagulazododatnie). Opiekun naukowy: dr inż. Piotr Szymański
2. Uniwersytet w Aarhus, Katedra Epidemiologii Klinicznej. Grenaa, Dania. Szkoła Letnia z Farmakoepidemiologii, 10–17.06.2024
3. European Bioeconomy University. Wageningen, Holandia / online. Udział w projekcie ERASMUS+ FOEBE+. (Wspieranie przedsiębiorczości na rzecz zrównoważonej i innowacyjnej bioekonomii), 01–04.2024
4. University of Calgary, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Ecosystem and Public Health. Calgary, Alberta, Kanada. Staż zagraniczny (Visiting Student Researcher), 01.06–01.09.2023. Finansowanie: Własny Fundusz Stypendialny

---

\* Wartości współczynników Impact Factor poszczególnych publikacji podano w oparciu o dane udostępnione na InCites™ Journal Citation Reports® dn. 8.12.2025 r.; punktację czasopism podano w oparciu o wykazy czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów, stanowiące załączniki do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 5 stycznia 2024 r. (według roku publikacji).

SGGW. Tematyka: Badanie skuteczności bakteriofagów w biokontroli szczepów referencyjnych *E. coli* (ECOR); Charakterystyka chemiczna i identyfikacja metabolitów środowiskowych szczepów LAB. Opiekun naukowy: Dongyan Niu, PhD MSc

5. Szkoła Główna Handlowa w Warszawie. Warszawa, Polska. Kurs dokształcający: Statystyka z programem Excel, 03–04.2022. Opiekun naukowy: dr Irena Kasperowicz-Ruka

#### **Udział w konferencjach (chronologicznie)**

1. Konferencja stacjonarna, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Okoń A., Łaskiewicz B., Szymański P., Zielińska D. XLVII Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN połączona z Jubileuszem 80-lecia Wydziału Nauki o Żywności „Doskonalenie żywności i żywienia dla zachowania komfortu życia człowieka” Olsztyn, 03-04.07.2025. Wystąpienie: „Nowe zastosowanie preparatów bakterii fermentacji mlekowej i bakterii kwasu octowego w kształtowaniu jakości technologicznej i mikrobiologicznej mięsa garmażeryjnego”.
2. Konferencja stacjonarna, poster, j. angielski, **Karbowiak M.**, Hyun J-E, Niu Y-D., Zielińska D., 15<sup>th</sup> CASEE Conference, ”Green transitions in agriculture, forestry, veterinary medicine and food systems under a changing climate” (25-27.06.2025, Nowy Sad, Serbia). Poster: “Genomic insights and functional characterization of novel antimicrobial compounds from food-origin strains of lactic acid bacteria”.
3. Konferencja stacjonarna, poster, j. polski, **Karbowiak M.**, Zielińska D., VIII Narodowy Kongres Żywnościowy „Partnerstwo instytucjonalne w trosce o zdrowie dzieci i młodzieży” (19.09.2024, Centrum Wodne SGGW, Warszawa). Poster: „Azotany i azotyny w diecie dzieci: przegląd literatury dotyczący spożycia i konsekwencji zdrowotnych”.
4. Konferencja stacjonarna, poster, j. angielski, **Karbowiak M.**, Hyun J-E, Kruk M., Niu Y-D., Zielińska D., 14<sup>th</sup> CASEE Conference, ” The Role of the Life Sciences Universities in the Green Transition of Central and Eastern Europe” (19-21.06.2024, Kluż-Napoka, Rumunia). Poster: “Characterization of the chemical composition of the postbiotics obtained from environmental strains of lactic acid bacteria to serve as promising food biopreservatives”.

5. Konferencja stacjonarna, prezentacja, j. polski. Kęska P., Stadnik J., Zielińska D., **Karbowiak M.**, Kruk M. XXVIII Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Politechnika Gdańska, 16-17.05.2024. Wystąpienie: „Wpływ dawki liofilizowanych płynów pochodowlanych na wybrane wyróżniki jakości kiełbas parzonych”.
6. Konferencja stacjonarna, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Kruk M., Szymański P., Zielińska D. Krokusowe XIV Sympozjum Naukowe „Probiotyki i prebiotyki w żywności” Kiry pod Zakopanem, 17-19.04.2024. Wystąpienie: „Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej mieszaniny postbiotyków pochodzących z bakterii fermentacji mlekowej i bakterii kwasu octowego w modelu mięsnym”.
7. Konferencja on-line, prezentacja, j. angielski. **Karbowiak M.**, Hyun J-E, Zielińska D., Niu Y-D. V Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioty – współczesne problemy w naukach o życiu” Warszawa-Lublin, 14.12.2024. Wystąpienie: “Does Efficacy of Individual Lactic Acid Bacteria Preparations Predict Efficacy of Cocktails of Preparations for Control of Escherichia coli O157:H7?”.
8. Konferencja stacjonarna, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Zielińska D. XXVII Konferencja Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Rozwój Nauk o Żywności. Zrównoważona przyszłość? Warszawa, 11-12.05.2023. Wystąpienie: „Potwierdzenie obecności sekwencji genów kodujących brewicyny u bakteriocynogennych bakterii fermentacji mlekowej *Levilactobacillus brevis* – badania molekularne”.
9. Konferencja stacjonarna, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Szymański P., Zielińska D. Krokusowe XIII Sympozjum Naukowe „Probiotyki i prebiotyki w żywności” Kiry pod Zakopanem, 19-21.04.2023. Wystąpienie: „Aktywność przeciwdrobnoustrojowa mieszaniny postbiotyków bakterii fermentacji mlekowej i bakterii kwasu octowego wobec enteropatogenów przenoszonych przez żywność i bakterii powodujących psucie – badania in vitro”.
10. Konferencja on-line, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Zielińska D. V Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioty - współczesne problemy w naukach o życiu” Warszawa-Lublin, 14.12.2022. Wystąpienie: „Weryfikacja białkowego charakteru substancji przeciwdrobnoustrojowych syntetyzowanych przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej – *Levilactobacillus brevis* O24 oraz B1”.

11. Konferencja stacjonarna, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Brzezicka A., Zielińska D. IX Ogólnopolska Konferencja Naukowa z cyklu ŻYWNOSĆ – ŻYWIENIE – DIETETYKA na temat: Żywienie dzieci w/po pandemii Częstochowa, 17-18.11.2022. Wystąpienie: „Wpływ pro(–psycho)biotykoaterapii na zdrowie psychiczne i dobrostan dzieci, młodzieży i młodych dorosłych w kontekście pandemii COVID-19 – aktualny stan wiedzy”.
12. Konferencja stacjonarna, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Pawlak M., Zielińska D. XXVI Konferencja Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Żywność dzisiaj – lokalna czy globalna? Tradycyjna czy innowacyjna? Poznań, 19-20.05.2022. Wystąpienie: „Wpływ stopnia inaktywacji cieplnej komórek *Lactobacillus* spp. na ich hydrofobowość oraz zdolności do autoagregacji i adhezji”.
13. Konferencja on-line, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Gałek M., Zielińska D. VI Sympozjum Naukowe „Drobnoustroje i ich metabolity – produkcja żywności i biotechnologia” Warszawa, 17-18.05.2022. Wystąpienie: „Wpływ stopnia inaktywacji cieplnej komórek *Lactobacillus* spp. na ich zdolność do hamowania agregacji i adhezji innych mikroorganizmów”.
14. Konferencja stacjonarna, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Kurpiewski J., Zielińska D. Krokusowe XII Sympozjum Naukowe „Probiotyki i prebiotyki w żywności” Kiry pod Zakopanem, 28-29.04.2022. Wystąpienie: „Optymalizacja właściwości przeciwdrobnoustrojowych bakterii *Levilactobacillus brevis* O24”.
15. Konferencja on-line, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Rożek A., Zielińska D. IV Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioły – współczesne problemy w naukach o życiu” Warszawa-Lublin, 14.12.2021. Wystąpienie: „Psychobiotyki – mechanizm działania oraz ocena skuteczności na podstawie najnowszych danych naukowych (przegląd systematyczny z metaanalizą)”.
16. Konferencja on-line, prezentacja, j. polski. **Karbowiak M.**, Mosiej W., Zielińska D. II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Żywność, Żywienie, Rynek. Innowacje w nauce i praktyce” Warszawa, 18.11.2021. Wystąpienie: „Wpływ dodatku błonnika i  $\beta$ -glukanu na przeżywalność bakterii probiotycznych w mlecznych napojach fermentowanych”.

#### **Sekwencje DNA zdeponowane i zarejestrowane w banku genów GenBank**

1. Genome assembly ASM4080320v1  
NCBI RefSeq assembly GCF\_040803205.1

Submitted GenBank assembly GCA\_040803205.1

*Lacticaseibacillus paracasei* Strain B1

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_040803205.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_040803205.1/)

2. Genome assembly ASM4011274v1

NCBI RefSeq assembly GCF\_040112745.1

Submitted GenBank assembly GCA\_040112745.1

*Lactiplantibacillus plantarum* Strain O24

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_040112745.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_040112745.1/)

### **Nagrody i wyróżnienia**

1. Otrzymanie finansowania w ramach Systemu Wsparcia Finansowego dla Naukowców SGGW. *Numer uczelniany zadania S25005*. Warszawa, 30.06.2025
2. Nagroda zespołowa (dyplom) II stopnia JM Rektora SGGW za osiągnięcia naukowe. Warszawa, 30.09.2024
3. Otrzymanie finansowania w ramach Własnego Funduszu Stypendialnego SGGW. *Decyzja BWM/24/2023*. Warszawa, 24.04.2023
4. I miejsce, nagroda Komisji Naukowej w kategorii referat. *Wpływ stopnia inaktywacji cieplnej komórek Lactobacillus spp. na ich hydrofobowość oraz zdolności do autoagregacji i adhezji*". XXVI Konferencja Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ „Żywność dzisiaj – lokalna czy globalna? Tradycyjna czy innowacyjna?”. Poznań, 19-20.05.2022
5. Wyróżnienie za wystąpienie na konferencji on-line. *Weryfikacja białkowego charakteru substancji przeciwdrobnoustrojowych syntetyzowanych przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej – Levilactobacillus brevis O24 oraz B1*. V Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioty – współczesne problemy w naukach o życiu”. Warszawa, 14.12.2022
6. Wyróżnienie za wystąpienie na konferencji on-line. *Psychobiotyki – mechanizm działania oraz ocena skuteczności na podstawie najnowszych danych naukowych*. IV Konferencja Doktorantów „Cztery Żywioty – współczesne problemy w naukach o życiu”. Lublin, 14.12.2021
7. Wyróżnienie, najlepsza publikacja przeglądowa opublikowana w 2020 w czasopiśmie ŻNTJ. *Postbiotyki – właściwości, zastosowanie i wpływ na zdrowie człowieka*. Karbowski M., Zielińska D., ŻYWNOSĆ – Nauka Technologia Jakość, 2020, vol. 27, nr 2, s. 22-37. Wrocław, 14.09.2021

### **Projekty i inne aktywności**

1. Członkini Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności, Oddział Warszawski – od 2021 roku.
2. Odpowiedzialna za strategię komunikacji i prowadzenie mediów społecznościowych Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności – od 2021 roku; działania te wspierają popularyzację osiągnięć naukowych oraz działalności Towarzystwa.
3. Członkini komitetów organizacyjnych konferencji naukowych organizowanych przez SGGW; aktywny udział w wydarzeniach popularyzujących naukę, w tym corocznie w Dniach SGGW.
4. Recenzentka artykułów naukowych dla czasopisma Foods, Fermentation, Microorganism (wydawnictwo MDPI) oraz Cogent Food & Agriculture (wydawnictwo Taylor & Francis).

## 9. LITERATURA

1. The European Union One Health 2024 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **2025**, 23.
2. Mirza, S.K.; Asema, U.; Kasim, S.S. To study the harmful effects of food preservatives on human health. *Journal of Medicinal Chemistry and Drug Discovery* **2017**, 2, 610-616.
3. Cao, Y.; Liu, H.; Qin, N.; Ren, X.; Zhu, B.; Xia, X. Impact of food additives on the composition and function of gut microbiota: A review. *Trends in Food Science & Technology* **2020**, 99, 295-310.
4. Lawrance, N.J.; Holden, C.R.; Gawkrödger, D.J. Sodium benzoate as an emerging but problematic allergen: retrospective analysis of patch test results in 3198 cases underlines the need for an improved test preparation, as even dubious reactions may be clinically relevant. *Contact Dermatitis* **2025**.
5. Reynoso-Noverón, N.; Santibáñez-Andrade, M.; Torres, J.; Bautista-Ocampo, Y.; Sánchez-Pérez, Y.; García-Cuellar, C.M. Benzene exposure and pediatric leukemia: From molecular clues to epidemiological insights. *Toxicology letters* **2024**, 400, 113-120.
6. Szymański, P. Nowe wymagania Unii Europejskiej dotyczące stosowania wybranych dozwolonych substancji dodatkowych w przetwórstwie mięsa. *Gospodarka Mięsna* **2025**, s. 24-28.
7. Szymański, P.; Okoń, A.; Zielińska, D.; Łaszkiwicz, B.; Kołożyn-Krajewska, D.; Dolatowski, Z.J. Use of Selected Environmental Lactic Acid Bacteria During Industrial Production of Heat-Treated Nitrite-Free Organic Sausage. *Foods* **2025**, 14, 1028.
8. da Silva, K.G.; de Lima Costa, I.H.; Fonseca, L.M.; Saraiva, M.M.T.; da Fonseca Antunes, B.; Borges, C.D.; Zambiasi, R.C. Food biopreservation, global trends and applications: A bibliometric approach. *Food Control* **2025**, 168, 110901.
9. Moradi, M.; Kousheh, S.A.; Almasi, H.; Alizadeh, A.; Guimarães, J.T.; Yılmaz, N.; Lotfi, A. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2020**, 19, 3390-3415.
10. Gyawali, R.; Ibrahim, S.A. Natural products as antimicrobial agents. *Food control* **2014**, 46, 412-429.
11. Singh, S.; Shalini, R. Effect of Hurdle Technology in Food Preservation: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2016**, 56, 641-649.
12. Obafemi, Y.D.; Obiukwu, A.C.; Oranusi, S.U. Revisiting the application, current trends, and prospect of bacteriocins in food preservation. *Discover Food* **2025**, 5.
13. Karnwal, A.; Malik, T. Exploring the untapped potential of naturally occurring antimicrobial compounds: novel advancements in food preservation for enhanced safety and sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems* **2024**, 8, 1307210.
14. Bigi, F.; Maurizzi, E.; Quartieri, A.; De Leo, R.; Gullo, M.; Pulvirenti, A. Non-thermal techniques and the “hurdle” approach: How is food technology evolving? *Trends in Food Science & Technology* **2023**, 132, 11-39.
15. Liu, G.; Nie, R.; Liu, Y.; Mehmood, A. Combined antimicrobial effect of bacteriocins with other hurdles of physicochemic and microbiome to prolong shelf life of food: A review. *Science of the Total Environment* **2022**, 825, 154058.
16. Chauhan, K.; Rao, A. Clean-label alternatives for food preservation: An emerging trend. *Heliyon* **2024**, 10, e35815.
17. Rendueles, C.; Duarte, A.C.; Escobedo, S.; Fernández, L.; Rodríguez, A.; García, P.; Martínez, B. Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. A review. *International Journal of Food Microbiology* **2022**, 368, 109611.
18. Barcenilla, C.; Ducic, M.; López, M.; Prieto, M.; Álvarez-Ordóñez, A. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science* **2022**, 183, 108661.
19. Kaveh, S.; Hashemi, S.M.B.; Abedi, E.; Amiri, M.J.; Conte, F.L. Bio-preservation of meat and fermented meat products by lactic acid bacteria strains and their antibacterial metabolites. *Sustainability* **2023**, 15, 10154.
20. Mafra, J.F.; Cruz, A.I.C.; Santana, T.S.D.; Ferreira, M.A.; Araújo, F.M.; Evangelista-Barreto, N.S. Probiotic characterization of a commercial starter culture used in the fermentation of sausages. *Food Science and Technology* **2021**, 41, 240-246.
21. Najjari, A.; Boumaiza, M.; Jaballah, S.; Boudabous, A.; Ouzari, H.I. Application of isolated *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosum* strains as a probiotic starter culture during the industrial manufacture of Tunisian dry-fermented sausages. *Food science & nutrition* **2020**, 8, 4172-4184.

22. Segli, F.; Melian, C.; Muñoz, V.; Vignolo, G.; Castellano, P. Bioprotective extracts from *Lactobacillus acidophilus* CRL641 and *Latilactobacillus curvatus* CRL705 inhibit a spoilage exopolysaccharide producer in a refrigerated meat system. *Food Microbiology* **2021**, *97*, 103739.
23. Segli, F.; Melian, C.; Vignolo, G.; Castellano, P. Inhibition of a spoilage exopolysaccharide producer by bioprotective extracts from *Lactobacillus acidophilus* CRL641 and *Latilactobacillus curvatus* CRL705 in vacuum-packaged refrigerated meat discs. *Meat Science* **2021**, *178*, 108509.
24. Iacumin, L.; Cappellari, G.; Colautti, A.; Comi, G. *Listeria monocytogenes* survey in cubed cooked ham packaged in modified atmosphere and bioprotective effect of selected lactic acid bacteria. *Microorganisms* **2020**, *8*, 898.
25. Chen, X.; Mi, R.; Qi, B.; Xiong, S.; Li, J.; Qu, C.; Qiao, X.; Chen, W.; Wang, S. Effect of proteolytic starter culture isolated from Chinese Dong fermented pork (Nanx Wudl) on microbiological, biochemical and organoleptic attributes in dry fermented sausages. *Food Science and Human Wellness* **2021**, *10*, 13-22.
26. Xu, M.M.; Kaur, M.; Pillidge, C.J.; Torley, P.J. Culture-dependent and culture-independent evaluation of the effect of protective cultures on spoilage-related bacteria in vacuum-packaged beef mince. *Food and Bioprocess Technology* **2023**, *16*, 382-394.
27. Xu, M.M.; Kaur, M.; Pillidge, C.J.; Torley, P.J. Evaluation of the potential of protective cultures to extend the microbial shelf-life of chilled lamb meat. *Meat science* **2021**, *181*, 108613.
28. Chaillou, S.; Christieans, S.; Rivollier, M.; Lucquin, I.; Champomier-Verges, M.-C.; Zagorec, M. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Science* **2014**, *97*, 332-338.
29. İncili, G.K.; Karatepe, P.; Akgöl, M.; Güngören, A.; Koluman, A.; İlhak, O.İ.; Kanmaz, H.; Kaya, B.; Hayaloğlu, A.A. Characterization of lactic acid bacteria postbiotics, evaluation in-vitro antibacterial effect, microbial and chemical quality on chicken drumsticks. *Food microbiology* **2022**, *104*, 104001.
30. Xu, M.M.; Kaur, M.; Pillidge, C.J.; Torley, P.J. Evaluation of the potential of protective cultures to extend the microbial shelf-life of chilled lamb meat. *Meat Science* **2021**, *181*, 108613.
31. Gargi, A.; Sengun, I.Y. Marination liquids enriched with probiotics and their inactivation effects against food-borne pathogens inoculated on meat. *Meat Science* **2021**, *182*, 108624.
32. Castellano, P.; Belfiore, C.; Vignolo, G. Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157: H7 in frozen ground-beef patties. *Food control* **2011**, *22*, 1461-1465.
33. Marcelli, V.; Osimani, A.; Aquilanti, L. Research progress in the use of lactic acid bacteria as natural biopreservatives against *Pseudomonas* spp. in meat and meat products: A review. *Food Research International* **2024**, *196*, 115129.
34. Rodríguez-Marca, C.; Domenech-Coca, C.; Nakamura, M.; Ortega-Olivé, N.; Puigbò, P. Use of Live Biopreservatives and Bacteriophages to Enhance the Safety of Meat Products. *Life (Basel)* **2025**, *15*.
35. Vignolo, G.; Palacios, J.; Farias, M.E.; Sesma, F.; Schillinger, U.; Holzapfel, W.; Oliver, G. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Current Microbiology* **2000**, *41*, 410-416.
36. Castellano, P.; Peña, N.; Ibarreche, M.P.; Carduza, F.; Soteras, T.; Vignolo, G. Antilisterial efficacy of *Lactobacillus* bacteriocins and organic acids on frankfurters. Impact on sensory characteristics. *Journal of Food Science and Technology* **2018**, *55*, 689-697.
37. Sant'Anna, V.; Quadros, D.A.; Motta, A.S.; Brandelli, A. Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. *Brazilian Journal of Microbiology* **2013**, *44*, 1163-1167.
38. Bizani, D.; Morrissy, J.A.; Dominguez, A.P.; Brandelli, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology* **2008**, *121*, 229-233.
39. Recently published GRAS Notices and FDA Letters. **2024**.
40. Hazards, E.P.o.B.; Koutsoumanis, K.; Allende, A.; Alvarez-Ordóñez, A.; Bolton, D.; Bover-Cid, S.; Chemaly, M.; Davies, R.; De Cesare, A.; Hilbert, F. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021. *EFSA Journal* **2022**, *20*, e07045.
41. Abouloifa, H.; Hasnaoui, I.; Rokni, Y.; Bellaouchi, R.; Ghabbour, N.; Karboune, S.; Brasca, M.; Abousalham, A.; Jaouadi, B.; Saalaoui, E. Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application in food biopreservation. In *Advances in applied microbiology*; Elsevier: 2022; Volume 120, pp. 33-77.

42. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.M.; Harris, H.M.; Mattarelli, P.; O'toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **2020**, *70*, 2782-2858.
43. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **2014**, *11*, 506-514.
44. Salvetti, E.; Harris, H.M.; Felis, G.E.; O'Toole, P.W. Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Applied and Environmental Microbiology* **2018**, *84*, e00993-00918.
45. Giaccon, T.G.; de Gois E Cunha, G.C.; Eliodório, K.P.; Oliveira, R.P.d.S.; Basso, T.O. Homo- and heterofermentative lactobacilli are distinctly affected by furanic compounds. *Biotechnology Letters* **2022**, *44*, 1431-1445.
46. Akpogheli, P.O.; Edo, G.I.; Ali, A.B.; Yousif, E.; Zainulabdeen, K.; Owhero, J.O.; Isoje, E.F.; Igbuku, U.A.; Essaghah, A.E.A.; Makia, R.S. Lactic acid bacteria: Nature, characterization, mode of action, products and applications. *Process Biochemistry* **2025**.
47. Feitosa, B.F.; Xavier, L.E.; de Araújo, J.S.F.; Gonçalves, M.C.; Dos Santos, K.M.O.; do Egito, A.S.; Cavalcanti, M.T. Bioconservation of artisanal raw goat milk cheese produced with lactic acid bacteria of the genus *Lactocaseibacillus* spp. *Food Research International* **2025**, *206*, 116070.
48. Garin-Murguialday, N.; Espina, L.; Virto, R.; Pagán, R. Lactic Acid Bacteria and *Bacillus subtilis* as Potential Protective Cultures for Biopreservation in the Food Industry. *Applied Sciences* **2024**, *14*, 4016.
49. Ansari, A.; Ibrahim, F.; Haider, M.S.; Aman, A. In vitro application of bacteriocin produced by *Lactiplantibacillus plantarum* for the biopreservation of meat at refrigeration temperature. *Journal of Food Processing and Preservation* **2022**, *46*.
50. Salminen, S.; Collado, M.C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E.M.M.; Sanders, M.E.; Shamir, R.; Swann, J.R.; Szajewska, H.; et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **2021**, *18*, 649-667.
51. Ozogul, Y.; Kuley, E.; Kosker, A.R.; Uçar, Y.; Yazgan, H.; Durmuş, M.; Sakarya, Y.; Takadaş, F.; Özkütük, S.T.; Özkütük, A.S. The impacts of biopreservation with *Lactobacillus sakei* cell-free supernatant in combination with plant-based extracts on the quality of modified atmosphere packed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *LWT* **2024**, *209*, 116756.
52. Liang, Q.; Liu, Z.; Liang, Z.; Fu, X.; Li, D.; Zhu, C.; Kong, Q.; Mou, H. Current challenges and development strategies of bacteriocins produced by lactic acid bacteria applied in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2025**, *24*, e70038.
53. Han, D.; Yang, Y.; Guo, Z.; Dai, S.; Jiang, M.; Zhu, Y.; Wang, Y.; Yu, Z.; Wang, K.; Rong, C.; et al. A Review on the Interaction of Acetic Acid Bacteria and Microbes in Food Fermentation: A Microbial Ecology Perspective. *Foods* **2024**, *13*, 2534.
54. Sengun, I.Y.; Karabiyikli, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food control* **2011**, *22*, 647-656.
55. Qiu, X.; Zhang, Y.; Hong, H. Classification of acetic acid bacteria and their acid resistant mechanism. *AMB Express* **2021**, *11*.
56. Neffe-Skocinska, K.; Dybka-Stepien, K.; Antolak, H. Izolacja i identyfikacja szczepów bakterii kwasu octowego o potencjalnych właściwościach prozdrowotnych. *Żywność Nauka Technologia Jakość* **2019**, *26*.
57. Okoń, A.; Lepecka, A.; Szymański, P.; Neffe-Skocińska, K. The Effect of the Use of the Beneficial Acetic Acid Bacteria Starter Cultures on the Microbiological and Physicochemical Quality of Raw Ripening Sausages. *Applied Sciences* **2024**, *15*, 263.
58. Lynch, K.M.; Zannini, E.; Wilkinson, S.; Daenen, L.; Arendt, E.K. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2019**, *18*, 587-625.
59. Mamlouk, D.; Gullo, M. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology* **2013**, *53*, 377-384.
60. Xu, Y.; Wei, K.; Bian, L.; Li, G.; Zhang, C. High-yield bacterial cellulose production from rice bran using a genetically characterized *Komagataeibacter europaeus* strain. *International Journal of Biological Macromolecules* **2025**, 143201.

61. Antolak, H.; Kregiel, D. Bakterie kwasu octowego-taksonomia, ekologia oraz wykorzystanie przemysłowe. *Żywność Nauka Technologia Jakość* **2015**, *22*.
62. Kaemmel, J.; Ferrari, A.; Robotti, F.; Bottan, S.; Eichenseher, F.; Schmidt, T.; Gonzalez Moreno, M.; Trampuz, A.; Eulert-Grehn, J.-J.; Knosalla, C.; et al. On the function of biosynthesized cellulose as barrier against bacterial colonization of VAD drivelines. *Scientific Reports* **2021**, *11*.
63. Płoska, J.; Garbowska, M.; Klemková, S.; Stasiak-Róžańska, L. Obtaining Bacterial Cellulose through Selected Strains of Acetic Acid Bacteria in Classical and Waste Media. *Applied Sciences* **2023**, *13*, 6429.
64. Neffe-Skocińska, K.; Kruk, M.; Ścibisz, I.; Zielińska, D. The Novel Strain of *Gluconobacter oxydans* H32 Isolated from Kombucha as a Proposition of a Starter Culture for Sour Ale Craft Beer Production. *Applied Sciences* **2022**, *12*, 3047.
65. Lynch, K.M.; Zannini, E.; Wilkinson, S.; Daenen, L.; Arendt, E.K. Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2019**, *18*, 587-625.
66. Xia, M.; Zhang, X.; Xiao, Y.; Sheng, Q.; Tu, L.; Chen, F.; Yan, Y.; Zheng, Y.; Wang, M. Interaction of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria in multispecies solid-state fermentation of traditional Chinese cereal vinegar. *Frontiers in Microbiology* **2022**, *13*, 964855.
67. Chai, L.J.; Qiu, T.; Lu, Z.M.; Deng, Y.J.; Zhang, X.J.; Shi, J.S.; Xu, Z.H. Modulating microbiota metabolism via bioaugmentation with *Lactobacillus casei* and *Acetobacter pasteurianus* to enhance acetoin accumulation during cereal vinegar fermentation. *Food Research International* **2020**, *138*, 109737.
68. Ghabraie, M.; Vu, K.D.; Huq, T.; Khan, A.; Lacroix, M. Antilisterial effects of antibacterial formulations containing essential oils, nisin, nitrite and organic acid salts in a sausage model. *Journal of food science and technology* **2016**, *53*, 2625-2633.
69. Ołdak, A.; Zielińska, D.; Rzepkowska, A.; Kołożyn-Krajewska, D. Comparison of Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Koryciński Cheese. *BioMed Research International* **2017**, *2017*, 6820369.
70. Zielińska, D.; Rzepkowska, A.; Radawska, A.; Zieliński, K. In vitro screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Current Microbiology* **2015**, *70*, 183-194.
71. Zielińska, D.; Długosz, E.; Zawistowska-Deniziak, A. Functional Properties of Food Origin *Lactobacillus* in the Gastrointestinal Ecosystem—In Vitro Study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2019**, *11*, 820-829.
72. Zielińska, D.; Lepecka, A.; Ołdak, A.; Długosz, E.; Kołożyn-Krajewska, D. Growth and adhesion inhibition of pathogenic bacteria by live and heat-killed food-origin *Lactobacillus* strains or their supernatants. *FEMS Microbiology Letters* **2021**, *368*.
73. Neffe-Skocińska, K.; Długosz, E.; Szulc-Dąbrowska, L.; Zielińska, D. Novel *Gluconobacter oxydans* strains selected from Kombucha with potential postbiotic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2024**, *108*, 27.
74. Yassunaka Hata, N.N.; Surek, M.; Sartori, D.; Vassoler Serrato, R.; Aparecida Spinosa, W. Role of Acetic Acid Bacteria in Food and Beverages. *Food Technology and Biotechnology* **2023**, *61*, 85-103.
75. Stasiak, L.; Błażejczak, S. ACETIC ACID BACTERIA – PERSPECTIVES OF APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY – A REVIEW. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **2009**, *59*, 17-23.
76. Imade, E.E.; Omonigho, S.E.; Babalola, O.O.; Enagbonma, B.J. Lactic acid bacterial bacteriocins and their bioactive properties against food-associated antibiotic-resistant bacteria. *Annals of Microbiology* **2021**, *71*.
77. Ju, J.; Xie, Y.; Yu, H.; Guo, Y.; Cheng, Y.; Qian, H.; Yao, W. Synergistic interactions of plant essential oils with antimicrobial agents: a new antimicrobial therapy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2022**, *62*, 1740-1751.
78. Brepoels, P.; De Wit, G.; Lories, B.; Belpaire, T.E.R.; Steenackers, H.P. Selective pressures for public antibiotic resistance. *Critical Reviews in Microbiology* **2025**, *51*, 417-426.
79. Conceição, S.; Queiroga, M.C.; Laranjo, M. Antimicrobial Resistance in Bacteria from Meat and Meat Products: A One Health Perspective. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2581.
80. Hu, C.B.; Malaphan, W.; Zendo, T.; Nakayama, J.; Sonomoto, K. Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, *76*, 4542-4545.

81. Saint-Hubert, C.; Durieux, A.; Bodo, E.; Simon, J.P. Large scale purification protocol for carnocin KZ 213 from *Carnobacterium piscicola*. *Biotechnology Letters* **2009**, *31*, 519-523.
82. Zhou, X.; Wang, Y.; Shinali, T.S.; Gao, B.; Yang, R.; Li, P.; Shang, N. Purification, characterization, and mechanistic studies of Gassericin GA-3.1: A novel class IIc bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LG145. *International Journal of Biological Macromolecules* **2025**, 139811.
83. Nigutová, K.; Serencová, L.; Píknová, M.; Javorský, P.; Pristas, P. Heterologous expression of functionally active enterolysin A, class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **2008**, *60*, 20-24.
84. Goel, A.; Halami, P.M. Structural and biosynthetic diversity of plantaricins from *Lactiplantibacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2023**, 107.
85. Garsa, A.K.; Choudhury, P.K.; Puniya, A.K.; Dhewa, T.; Malik, R.K.; Tomar, S.K. Bovicins: The Bacteriocins of Streptococci and Their Potential in Methane Mitigation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2019**, *11*, 1403-1413.
86. Campelo, A.B.; Gaspar, P.; Roces, C.; Rodríguez, A.; Kok, J.; Kuipers, O.P.; Neves, A.R.; Martínez, B. The Lcn972 bacteriocin-encoding plasmid pBL1 impairs cellobiose metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, *77*, 7576-7585.
87. Zheng, X.; Liang, Q.; Zhao, B.; Song, X.; Zhang, Y. Whole genome sequencing and analysis of probiotic characteristics for *Lactiplantibacillus plantarum* EL2 isolated from yak yogurt. *LWT* **2024**, *198*, 116039.
88. Chikindas, M.L.; Weeks, R.; Drider, D.; Chistyakov, V.A.; Dicks, L.M. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current opinion in biotechnology* **2018**, *49*, 23-28.
89. Xue, X.; Gao, Y.; Liu, F.; Du, P.; Li, C.; Liu, Y.; Yu, W.; Liu, L. Purification, characterization, and identification of a novel bacteriocin produced by *Lactocaseibacillus casei* KLS1, and its antimicrobial mechanism against *Staphylococcus aureus*. *LWT* **2024**, *200*, 116207.
90. Heredia-Castro, P.Y.; Méndez-Romero, J.I.; Hernández-Mendoza, A.; Acedo-Félix, E.; González-Córdova, A.F.; Vallejo-Cordoba, B. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of dairy science* **2015**, *98*, 8285-8293.
91. Ghanbari, M.; Jami, M.; Kneifel, W.; Domig, K.J. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. *Food Control* **2013**, *32*, 379-385.
92. Benabbou, R.; Subirade, M.; Desbiens, M.; Fliss, I. Divergicin M35-Chitosan Film: Development and Characterization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2020**, *12*, 1562-1570.
93. Guo, X.; Ma, L.; Qiao, Z.; Luo, L.; Zhang, Y.; Wang, X.; Lü, X. The antibacterial mechanism of the novel bacteriocin LpH25 and the synergistic preservation effect of this bacteriocin and Nisin in fresh milk. *LWT* **2024**, *194*, 115766.
94. Jiao, D.; Liu, Y.; Zeng, R.; Hou, X.; Nie, G.; Sun, L.; Fang, Z. Preparation of phosphatidylcholine nanovesicles containing bacteriocin CAMT2 and their anti-listerial activity. *Food chemistry* **2020**, *314*, 126244.
95. Peng, Z.; Xu, X.; Fan, P.; Qiao, B.; Xie, M.; Huang, T.; Xiong, T. Identification and characterization of a novel pH and heat stable bacteriocin-like substance lactococcin036019 with food preserving potential. *Food Control* **2023**, *148*, 109682.
96. Blando, J.D.; Porcja, R.J.; Turpin, B.J. Issues in the quantitation of functional groups by FTIR spectroscopic analysis of impactor-collected aerosol samples. *Aerosol Science & Technology* **2001**, *35*, 899-908.
97. Kilimann, K.V.; Doster, W.; Vogel, R.F.; Hartmann, C.; Gänzle, M.G. Protection by sucrose against heat-induced lethal and sublethal injury of *Lactococcus lactis*: an FT-IR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2006**, *1764*, 1188-1197.
98. Ahrens, C.H.; Wade, J.T.; Champion, M.M.; Langer, J.D. A Practical Guide to Small Protein Discovery and Characterization Using Mass Spectrometry. *Journal of Bacteriology* **2022**, *204*, e0035321.
99. Tuli, L.; Ransom, H.W. LC-MS Based Detection of Differential Protein Expression. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* **2009**, *2*, 416-438.
100. Ahmad, A.; Usup, G. Purification and partial characterisation of an antifungal bacteriocin from *Bacillus* sp. Sh10 associated with marine carpet clam (*Paphia textile*). *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* **2021**, *10*, e2513-e2513.
101. Yan, H.; Lu, Y.; Li, X.; Yi, Y.; Wang, X.; Shan, Y.; Liu, B.; Zhou, Y.; Lü, X. Action mode of bacteriocin BM1829 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Bioscience* **2021**, *39*, 100794.

102. Duraisamy, S.; Sathyan, A.; Balakrishnan, S.; Subramani, P.; Prahalathan, C.; Kumarasamy, A. Bactericidal and non-cytotoxic activity of bacteriocin produced by *Lacticaseibacillus paracasei* F9-02 and evaluation of its tolerance to various physico-chemical conditions. *Environmental Microbiology* **2023**, *25*, 2882-2896.
103. Madi-Moussa, D.; Coucheney, F.; Drider, D. Expression of Five Class II Bacteriocins with Activity against *Escherichia coli* in *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, and in a Heterologous Host. *Biotechnology Reports* **2021**, *30*, e00632.
104. de Lira, F.M.; Tanaka, F.Y.R.; Rios, E.A.; Carrilho, S.M.; de Abreu, S.S.; Ferreira, G.F.; Gonzaga, N.; de Pádua Pereira, U.; Tamanini, R.; Fagnani, R. Identification of lactic acid bacteria with anti-*Listeria* activity. Characterization and application of a bacteriocinogenic strain in the control of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Journal of Dairy Research* **2023**, *90*, 318-323.
105. Zhang, J.; Yang, Y.; Yang, H.; Bu, Y.; Yi, H.; Zhang, L.; Han, X.; Ai, L. Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. *Frontiers in microbiology* **2018**, *9*, 2165.
106. Makhlof, F.Z.; Bramki, A.; Smati, M.; Khaine, F.; Merouane, F.; Barkat, M. Purification and Characterization of Plantaricin PQ12: A Novel Bacteriocin from *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Fermented Cucumbers, with Inhibitory Activity against Foodborne Pathogens. *ACS Food Science & Technology* **2024**, *4*, 3088-3096.
107. Han, X.; Zhang, M.; Peng, J.; Wu, J.; Zhong, Q. Purification and characterization of a novel bacteriocin from *Lactiplantibacillus plantarum* Z057, and its antibacterial and antibiofilm activities against *Vibrio parahaemolyticus*. *LWT* **2023**, *173*, 114358.
108. Suryani, E.M.; Jatmiko, Y.D.; Mustafa, I. Detection of Plantaricin-Encoding Gene and Its Partial Purification in *Lactobacillus plantarum* BP102. *Jurnal Biodjati* **2023**, *8*, 233-247.
109. Jiang, Y.-H.; Xin, W.-G.; Zhang, Q.-L.; Lin, L.-B.; Deng, X.-Y. A novel bacteriocin against *Shigella flexneri* from *Lactiplantibacillus plantarum* isolated From *Tilapia* intestine: purification, antibacterial properties and antibiofilm activity. *Frontiers in Microbiology* **2022**, *12*, 779315.
110. Guinane, C.M.; Piper, C.; Draper, L.A.; O'Connor, P.M.; Hill, C.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. Impact of Environmental Factors on Bacteriocin Promoter Activity in Gut-Derived *Lactobacillus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, *81*, 7851-7859.
111. Xu, Y.; Reuvekamp, R.; Kuipers, O.P. Biosynthesis of Antimicrobial Ornithine-Containing Lacticin 481 Analogues by Use of a Combinatorial Biosynthetic Pathway in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology* **2024**, *13*, 4209-4217.
112. Twomey, E.; Hill, C.; Field, D.; Begley, M. Recipe for Success: Suggestions and Recommendations for the Isolation and Characterisation of Bacteriocins. *International Journal of Microbiology* **2021**, *2021*, 9990635.
113. Kurnianto, M.A.; Lioe, H.N.; Chasanah, E.; Kusumaningrum, H.D. Purification, HR-LC-ESI-MS-MS Identification, and Peptide Prediction of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances Produced by *Streptomyces* sp. Isolated from *Chanos chanos*. *International Journal of Food Science* **2022**, *2022*, 8672643.
114. Łepecka, A.; Okoń, A.; Szymański, P.; Zielińska, D.; Kajak-Siemaszko, K.; Jaworska, D.; Neffe-Skocińska, K.; Sionek, B.; Trzaskowska, M.; Kołożyn-Krajewska, D. The use of unique, environmental lactic Acid Bacteria strains in the traditional production of organic cheeses from unpasteurized cow's Milk. *Molecules* **2022**, *27*, 1097.
115. Szymański, P.; Łaskiewicz, B.; Kern-Jędrychowska, A.; Siekierko, U.; Kołożyn-Krajewska, D. The effect of the use of *Limosilactobacillus fermentum* S8 isolated from organic acid whey on nitrosyl pigment concentration and the colour formation of uncured cooked meat products. *Meat Science* **2023**, *196*, 109031.
116. Wang, C.; Chang, T.; Yang, H.; Cui, M. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **2015**, *47*, 231-236.
117. Davarzani, S.; Mojgani, N.; Sanjabi, M.; Mirdamadi, S.; Soltani, M.; Ashique, S. Functional Properties, Metabolic Profile and Safety Attributes of Postbiotics from *Lacticaseibacillus acidophilus* and *Lactiplantibacillus plantarum*. *Applied Food Research* **2025**, 101412.
118. Bangar, S.P.; Suri, S.; Trif, M.; Ozogul, F. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food bioscience* **2022**, *46*, 101615.
119. Kuo, H.-C.; Kwong, H.K.; Chen, H.-Y.; Hsu, H.-Y.; Yu, S.-H.; Hsieh, C.-W.; Lin, H.-W.; Chu, Y.-L.; Cheng, K.-C. Enhanced antioxidant activity of *Chenopodium formosanum* Koidz. by lactic acid bacteria: Optimization of fermentation conditions. *PLOS ONE* **2021**, *16*, e0249250.

120. Septembre-Malaterre, A.; Remize, F.; Poucheret, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International* **2018**, *104*, 86-99.
121. Anguluri, K.; La China, S.; Brugnoli, M.; Cassanelli, S.; Gullo, M. Better under stress: Improving bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* K2G30 (UMCC 2756) using adaptive laboratory evolution. *Frontiers in Microbiology* **2022**, *13*, 994097.
122. Gomes, R.J.; de Sousa Faria-Tischer, P.C.; Tischer, C.A.; Constantino, L.V.; de Freitas Rosa, M.; Chideroli, R.T.; de Pádua Pereira, U.; Spinosa, W.A. *Komagataeibacter intermedius* V-05: An Acetic Acid Bacterium Isolated from Vinegar Industry, with High Capacity for Bacterial Cellulose Production in Soybean Molasses Medium. *Food Technology and Biotechnology* **2021**, *59*, 432-442.
123. da Silva, G.A.R.; Oliveira, S.S.S.; Lima, S.F.; do Nascimento, R.P.; Baptista, A.R.S.; Fiaux, S.B. The industrial versatility of *Gluconobacter oxydans*: current applications and future perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2022**, *38*, 134.
124. Neffe-Skocinska, K.; Karbowski, M.; Kruk, M.; Kolozyn-Krajewska, D.; Zielinska, D. Polyphenol and antioxidant properties of food obtained by the activity of acetic acid bacteria (AAB)-A systematic review. *Journal of Functional Foods* **2023**, *107*.
125. Stoyanova, L.G.; Ustyugova, E.A.; Netrusov, A.I. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2012**, *48*, 229-243.
126. da Costa, W.K.A.; de Souza, G.T.; Brandão, L.R.; de Lima, R.C.; Garcia, E.F.; dos Santos Lima, M.; de Souza, E.L.; Saarela, M.; Magnani, M. Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International* **2018**, *108*, 172-182.
127. Karbowski, M.; Gafek, M.; Szydłowska, A.; Zielińska, D. The Influence of the Degree of Thermal Inactivation of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Their Postbiotics on Aggregation and Adhesion Inhibition of Selected Pathogens. *Pathogens* **2022**, *11*, 1260.
128. Sharafi, H.; Divsalar, E.; Rezaei, Z.; Liu, S.Q.; Moradi, M. The potential of postbiotics as a novel approach in food packaging and biopreservation: a systematic review of the latest developments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2023**, 1-31.
129. Wang, Z.; Zhang, Y.; Chen, C.; Fan, S.; Deng, F.; Zhao, L. A novel bacteriocin isolated from *Lactobacillus plantarum* W3-2 and its biological characteristics. *Frontiers in Nutrition* **2022**, *9*, 1111880.
130. Abouloifa, H.; Hasnaoui, I.; Ben Slima, S.; Rokni, Y.; Gaamouche, S.; Trabelsi, I.; Bellaouchi, R.; Ghabbour, N.; Ben Salah, R.; Jaouadi, B.; et al. Bio-preservation Effect of Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* S61 Against *Rhodotorula glutinis* and *Listeria monocytogenes* in Poultry Meat. *Current Microbiology* **2022**, *79*, 232.
131. Wang, J.; Xu, L.; Gu, L.; Lv, Y.; Li, J.; Yang, Y.; Meng, X. Cell-Free Supernatant of *Lactiplantibacillus plantarum* 90: A Clean Label Strategy to Improve the Shelf Life of Ground Beef Gel and Its Bacteriostatic Mechanism. *Foods* **2023**, *12*.
132. Saad, S.M.; Hassanin, F.S.; Salem, A.M.; Saleh, E.A.E. Efficiency of some organic acids as decontaminants in sheep carcasses. *Benha Veterinary Medical Journal* **2020**, *38*, 116-119.
133. Arrijoa-Bretón, D.; Mani-López, E.; Palou, E.; López-Malo, A. Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control* **2020**, *115*, 107286.
134. Tirloni, E.; Bernardi, C.; Celandroni, F.; Ghelardi, E.; Stella, S. Effectiveness of lactic and acetic acids on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in primo sale fresh cheese. *Lwt* **2021**, *151*, 112170.
135. Tirloni, E.; Cattaneo, P.; Ripamonti, B.; Agazzi, A.; Bersani, C.; Stella, S. In vitro evaluation of *Lactobacillus animalis* SB310, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SB137 and their mixtures as potential bioprotective agents for raw meat. *Food Control* **2014**, *41*, 63-68.
136. Ozturk, B.; Sengun, I.Y. Effects of cell-free supernatants produced by lactic acid bacteria on the safety and quality of poultry meat. *British Poultry Science* **2025**, 1-13.
137. Hultman, J.; Johansson, P.; Björkroth, J. Longitudinal metatranscriptomic analysis of a meat spoilage microbiome detects abundant continued fermentation and environmental stress responses during shelf life and beyond. *Applied and Environmental Microbiology* **2020**, *86*, e01575-01520.
138. Dragoev, S.G. Lipid Peroxidation in Muscle Foods: Impact on Quality, Safety and Human Health. *Foods* **2024**, *13*, 797.
139. Kaczmarek, A.M.; Muzolf-Panek, M. Predictive modelling of TBARS changes in the intramuscular lipid fraction of raw ground pork enriched with plant extracts. *Journal of Food Science and Technology* **2022**, *59*, 1756-1768.




140. Al-Dalali, S.; Li, C.; Xu, B. Effect of frozen storage on the lipid oxidation, protein oxidation, and flavor profile of marinated raw beef meat. *Food Chemistry* **2022**, *376*, 131881.
141. Wazir, H.; Chay, S.Y.; Ibadullah, W.Z.W.; Zarei, M.; Mustapha, N.A.; Saari, N. Lipid oxidation and protein co-oxidation in ready-to-eat meat products as affected by temperature, antioxidant, and packaging material during 6 months of storage. *RSC Advances* **2021**, *11*, 38565-38577.
142. Stadnik, J.; Keška, P.; Gazda, P.; Siłka, L.; Kołozyn-Krajewska, D. Influence of LAB fermentation on the color stability and oxidative changes in dry-cured meat. *Applied Sciences* **2022**, *12*, 11736.
143. Zhang, M.; Ma, J.; Li, J. Influence of NaCl on lipid oxidation and endogenous pro-oxidants/antioxidants in chicken meat, *Food Sci. Animal Production* **2023**, *1*, 9240010.
144. Tatiyaborworntham, N.; Oz, F.; Richards, M.P.; Wu, H. Paradoxical effects of lipolysis on the lipid oxidation in meat and meat products. *Food Chemistry: X* **2022**, *14*, 100317.
145. Coombs, C.E.O.; Holman, B.W.B.; Ponnampalam, E.N.; Morris, S.; Friend, M.A.; Hopkins, D.L. Effects of chilled and frozen storage conditions on the lamb M. longissimus lumborum fatty acid and lipid oxidation parameters. *Meat Science* **2018**, *136*, 116-122.
146. Horbańczuk, O.K.; Moczowska, M.; Marchewka, J.; Atanasov, A.G.; Kurek, M.A. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* **2019**, *24*.
147. Domínguez, R.; Pateiro, M.; Gagaoua, M.; Barba, F.J.; Zhang, W.; Lorenzo, J.M. A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants (Basel)* **2019**, *8*.
148. Barbut, S. Measuring water holding capacity in poultry meat. *Poultry Science* **2024**, *103*, 103577.
149. Kumar, D.; Tanwar, V.K. Effects of incorporation of ground mustard on quality attributes of chicken nuggets. *Journal of Food Science and Technology* **2011**, *48*, 759-762.
150. Domínguez, R.; Pateiro, M.; Munekata, P.E.; Zhang, W.; Garcia-Oliveira, P.; Carpena, M.; Prieto, M.A.; Bohrer, B.; Lorenzo, J.M. Protein oxidation in muscle foods: A comprehensive review. *Antioxidants* **2021**, *11*, 60.
151. Lepecka, A.; Szymański, P.; Okoń, A.; Zielińska, D. Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *LWT* **2023**, *174*, 114440.
152. Estévez, M. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat science* **2011**, *89*, 259-279.
153. Cardona, M.; Izquierdo, D.; Barat, J.M.; Fernández-Segovia, I. Intrinsic and extrinsic attributes that influence choice of meat and meat products: techniques used in their identification. *European Food Research and Technology* **2023**, *249*, 2485-2514.
154. Feuz, R.; Norwood, F.B.; Ramanathan, R. Do consumers have an appetite for discolored beef? *Agribusiness* **2020**, *36*, 631-652.
155. Yang, H.; Luo, X.; Zhu, L.; Liang, R.; Mao, Y.; Yang, X.; Niu, L.; Zhang, Y.; Dong, P. The biological effect of a beef-derived *Lactobacillus sakei* on beef steaks during chilled storage. *Food Science & Nutrition* **2023**, *11*, 1059-1072.
156. Ercolini, D.; Russo, F.; Torrieri, E.; Masi, P.; Villani, F. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and environmental microbiology* **2006**, *72*, 4663-4671.
157. Papuc, C.; Goran, G.V.; Predescu, C.N.; Nicorescu, V. Mechanisms of oxidative processes in meat and toxicity induced by postprandial degradation products: A review. *Comprehensive Reviews in food science and food safety* **2017**, *16*, 96-123.
158. Wu, H.; Richards, M.P.; Undeland, I. Lipid oxidation and antioxidant delivery systems in muscle food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2022**, *21*, 1275-1299.
159. Papadochristopoulos, A.; Kerry, J.P.; Fegan, N.; Burgess, C.M.; Duffy, G. Natural Anti-Microbials for Enhanced Microbial Safety and Shelf-Life of Processed Packaged Meat. *Foods* **2021**, *10*, 1598
160. Yu, H.H.; Chin, Y.W.; Paik, H.D. Application of Natural Preservatives for Meat and Meat Products against Food-Borne Pathogens and Spoilage Bacteria: A Review. *Foods* **2021**, *10*.
161. Ricardo-Rodrigues, S.; Rouxinol, M.I.; Aguilheiro-Santos, A.C.; Potes, M.E.; Laranjo, M.; Elias, M. The antioxidant and antibacterial potential of thyme and clove essential oils for meat preservation—an overview. *Applied Biosciences* **2024**, *3*, 87-101.
162. HU, Y.; SUZUKI, T.; NOGUCHI, G.; LI, Y.; KITAMURA, Y.; SATAKE, T. Study on evaluation of carcass traits and pork quality using principal component analysis. *Journal of the Society of Agricultural Structures, Japan* **2007**, *37*, 173-182.
163. Cañeque, V.; Pérez, C.; Velasco, S.; Díaz, M.; Lauzurica, S.; Álvarez, I.; De Huidobro, F.R.; Onega, E.; De la Fuente, J. Carcass and meat quality of light lambs using principal component analysis. *Meat science* **2004**, *67*, 595-605.

164. Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/2108 z dnia 6 października 2023 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 oraz załącznik do rozporządzenia Komisji (UE) nr 231/2012 w odniesieniu do dodatków do żywności: azotyny (E 249–250) i azotany (E 251–252) (Dz.U. L, 2023/2108, 9.10.2023).
165. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności (Dz. U. UE. L. z 2008 r. Nr 354, str. 16 z późn. zm.).
166. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (Dz. U. UE. L. z 2004 r. Nr 139, str. 55 z późn. zm.).
167. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1129/2011 z dnia 11 listopada 2011 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 poprzez ustanowienie unijnego wykazu dodatków do żywności Tekst mający znaczenie dla EOG (Dz.U. L 295 z 12.11.2011, pp. 1–177 przed 152).

**10. PUBLIKACJE STANOWIĄCE ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ WRAZ  
Z OŚWIADCZENIAMI WSPÓLAUTORÓW**

Review

# Synergistic Effect of Combination of Various Microbial Hurdles in the Biopreservation of Meat and Meat Products—Systematic Review

Marcelina Karbowskiak <sup>1</sup>, Piotr Szymański <sup>2</sup> and Dorota Zielińska <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Gastronomy and Food Hygiene, Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW), Nowoursynowska 159C St., (Building No. 32), 02-776 Warsaw, Poland; marcelina\_karbowskiak@sggw.edu.pl

<sup>2</sup> Department of Meat and Fat Technology, Wacław Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute, Rakowiecka 36 St., 02-532 Warsaw, Poland

\* Correspondence: dorota\_zielinska@sggw.edu.pl

**Abstract:** The control of spoilage microorganisms and foodborne pathogens in meat and meat products is a challenge for food producers, which potentially can be overcome through the combined use of biopreservatives, in the form of a mix of various microbial hurdles. The objective of this work is to systematically review the available knowledge to reveal whether various microbial hurdles applied in combination can pose an effective decontamination strategy for meat and meat products. PubMed, Web of Science, and Scopus were utilized to identify and evaluate studies through February 2023. Search results yielded 45 articles that met the inclusion criteria. The most common meat biopreservatives were combinations of various starter cultures (24 studies), and the use of mixtures of non-starter protective cultures (13 studies). In addition, studies evaluating antimicrobial combinations of bacteriocins with other bacteriocins, BLIS (bacteriocin-like inhibitory substance), non-starter protective cultures, reuterin, and S-layer protein were included in the review (7 studies). In one study, a biopreservative mixture comprised antifungal protein PgAFP and protective cultures. The literature search revealed a positive effect, in most of the included studies, of the combination of various bacterial antimicrobials in inhibiting the growth of pathogenic and spoilage bacteria in meat products. The main advantages of the synergistic effect achieved were: (1) the induction of a stronger antimicrobial effect, (2) the extension of the spectrum of antibacterial action, and (3) the prevention of the regrowth of undesirable microorganisms. Although further research is required in this area, the combination of various microbial hurdles can pose a green and valuable biopreservation approach for maintaining the safety and quality of meat products.

**Keywords:** synergism; compounds; meat safety; shelf life extension; bacterial-derived antimicrobials; decontamination strategies; foodborne pathogens



**Citation:** Karbowskiak, M.; Szymański, P.; Zielińska, D. Synergistic Effect of Combination of Various Microbial Hurdles in the Biopreservation of Meat and Meat Products—Systematic Review. *Foods* **2023**, *12*, 1430.

<https://doi.org/10.3390/foods12071430>

Academic Editor: Qian Chen

Received: 28 February 2023

Revised: 24 March 2023

Accepted: 26 March 2023

Published: 28 March 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Foodborne pathogens are a threat to international public health and safety. A majority of zoonosis cases reported at the European Union level in 2021 were campylobacteriosis, with 127,840 confirmed cases, followed by salmonellosis, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections, yersiniosis, and listeriosis with 60,050, 6789, 6084 and 2183 confirmed cases, respectively [1]. On the other hand, multistate outbreaks were most frequently caused by *Salmonella* (83 outbreaks, 64%), followed by STEC (29 outbreaks, 22%), and then *Listeria* (18 outbreaks, 14%) [2]. Meat and meat products were the main carriers of these pathogens, in both the European Union and the United States [1,2]. In the United States, during the period 2017–2020, beef consumption was associated with 900 hospitalizations due to *E. coli*, *Salmonella*, or *Listeria* contamination. At the same time, the consumption of contaminated chicken was linked to 679 cases and pork to 126 cases [2]. In the European

Union, chicken meat (broilers) is considered to be the most important foodborne source of both campylobacteriosis and salmonellosis, which are the two most frequently reported foodborne human diseases [1]. While meat and meat products are still among the best sources of nutrients for humans due to their high protein content, essential amino acids, vitamin B groups, and minerals [3], their high water activity and nutrient composition also contribute to the development of foodborne pathogens, as well as spoilage microorganisms, including *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Brochothrix*, some lactic acid bacteria (LAB) species, and different strains of *Enterobacteriaceae* [4,5]. There are also several metabolites secreted by spoilage microorganisms that can negatively impact meat quality and pose health risks, including biogenic amines (histamine, putrescine, cadaverine, spermine, and spermidine), as well as toxins (botulinum and staphylococcus toxin) [6]. Development of these bacteria in meat leads to the reduction of nutritional compounds, primarily proteins, amino acids, and vitamins (mostly B complex vitamins), as well as degradation of lipids, which are more susceptible to oxidation in these environments [4]. Additionally, important sensory characteristics such as color, texture, and odor are altered, making the meat unfit for consumption.

To ensure the quality and safety of products, and in response to increasing pressure from consumers for safe-to-eat and high-quality clean-label food products, interest in the meat industry is now focused on novel biopreservation strategies. Biopreservation involves using natural or primary and/or secondary metabolites or antimicrobials, from such sources as bacteria, fungi, plants, and animals, as a means to minimize lipid oxidation, reduce color loss, or extend product shelf life [7]. According to this approach, biopreservatives are defined as compounds, derived from natural sources or made from food ingredients, which are capable of preventing or retarding spoilage related to chemical or biological deterioration and combating foodborne pathogens [8]. In practice, it is more common for authors to define the concept of 'biopreservation' with reference merely to the use of microorganisms and/or their metabolites in order to extend shelf life and enhance food safety [9]. Lactic acid bacteria (LAB) possess the biggest potential for use in biopreservation, being used as a starter or protective culture due to the wide spectrum of their activity against the development of unfavorable microbiota. Their antagonistic effect is due to different mechanisms, such as competition for nutrients and production of organic acids, hydrogen peroxide, enzymes, antimicrobial peptides, or bacteriocins [8]. Bacteria of the former genus *Lactobacillus*, which has recently been reclassified into twenty-five new species [10], *Bifidobacterium*, and other microorganisms such as *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Pediococcus acidilactici* are of especial interest in the biopreservation of meat and meat products [11]. The vast majority of LAB and their metabolites have the status 'Generally Recognized As Safe' (GRAS) according to the U.S. Food and Drug Administration (FDA) [12]. The European Food Safety Authority (EFSA) has also given the rank of 'Qualified Presumption of Safety' (QPS) to many LAB species, included in the genera *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* and the former *Lactobacillus* genus [13]. To conclude, an ideal biopreservation agent should be able to exhibit specific antimicrobial activity to combat microorganisms that cause a food safety risk and should not cause adverse effects on the human intestinal microbiome.

Alternatively, biopreservatives might also be used in combination with other strategies as part of a hurdle technology approach to decontaminate food. A hurdle concept is the combination of different preservation techniques as a conservation strategy, and has been used successfully in many countries for years [14]. The combined use of multiple preservation methods may include physical (e.g., heat treatment), chemical (chemical preservatives such as EDTA, organic acid, etc.), and biological (microorganisms and their metabolites) factors [15]. A combination of these approaches is rationalized by the belief that synergism may occur by exposing undesired microorganisms to a series of obstacles to their growth and survival. Furthermore, if synergism occurs, preservative doses or technological treatment intensities may be reduced [15]. Using hurdle technology in the

meat industry is a successful method of obtaining mildly processed meat products that are both safe and appealing to consumers [16]. However, foodborne disease outbreaks linked to meat products continue to occur despite promising evidence that these interventions result in safer products. Up to this date, several reviews have been published, where an attempt was made to collect available data on meat biopreservation strategies, some belonging to the category of hurdle technology [9,15,17–24]. According to a preliminary literature search, there has not yet been a review of the combination of bacterially derived antimicrobials to achieve a synergistic effect in the decontamination of meat and meat products.

In light of the above, as outbreaks of foodborne diseases related to meat products continue to be reported, and based on the numerous positive reports describing the antimicrobial and potentially synergistic effects of preservatives of microbial origin, the purpose of this study was to review systematically the current knowledge about the combined antimicrobial effect of a variety of microbial hurdles to control the growth of undesirable microorganisms in meat and meat products.

## 2. Materials and Methods

To the best of the authors' knowledge, until today there is no published or registered protocol concerning this topic or a similar review of the literature. The review was registered with the PROCEED prospective register of evidence syntheses in the environmental sector (registration number PROCEED-23-00084), available at the following address: <https://www.proceedevidence.info/protocol/view?id=84> (accessed on 28 February 2023). Guidelines and Standards for Evidence Synthesis in Environmental Management Version 5.1 were strictly followed in this systematic review [25].

### 2.1. Focus Question

What is the impact of the mixture of bacterial-origin antimicrobials on the growth of foodborne pathogens and spoilage bacteria in the food system? Can this biopreservative effect be accomplished by using specific mechanisms and/or compounds? Is there a way to utilize these combined bacterial antimicrobials in the meat industry?

### 2.2. Protocol and Selection Criteria

The population, intervention, control, outcome (PICO) design methodology was applied in this case [26]. "Population" constituted meat and meat products, "intervention" pertained to the combination of a variety of antimicrobial agents of bacterial origin, "comparator" constituted no combination used, single antimicrobial or other agents, and "outcome" referred to decontamination strategies and effects. Studies were qualified to be included if they met the following criteria: published since 2000, comprising experimental *in vitro* research, and referring to the synergistic antibacterial effect of diverse microorganisms or microbial origin metabolites applied in combination to enhance food safety or extend the shelf life of contaminated meat and meat products. Studies were excluded when related to animal or *in vivo* research, to human trials, and when lacking sufficient details on either the antimicrobial agents or their utilization in the meat system. Unpublished or duplicate data, reviews, letters, case reports and editorials were also excluded.

No restrictions were placed regarding the use of control samples, in order to include a wide range of potential studies. To that end, studies without a comparator, e.g., without comparing to antimicrobial agents used separately, were also included.

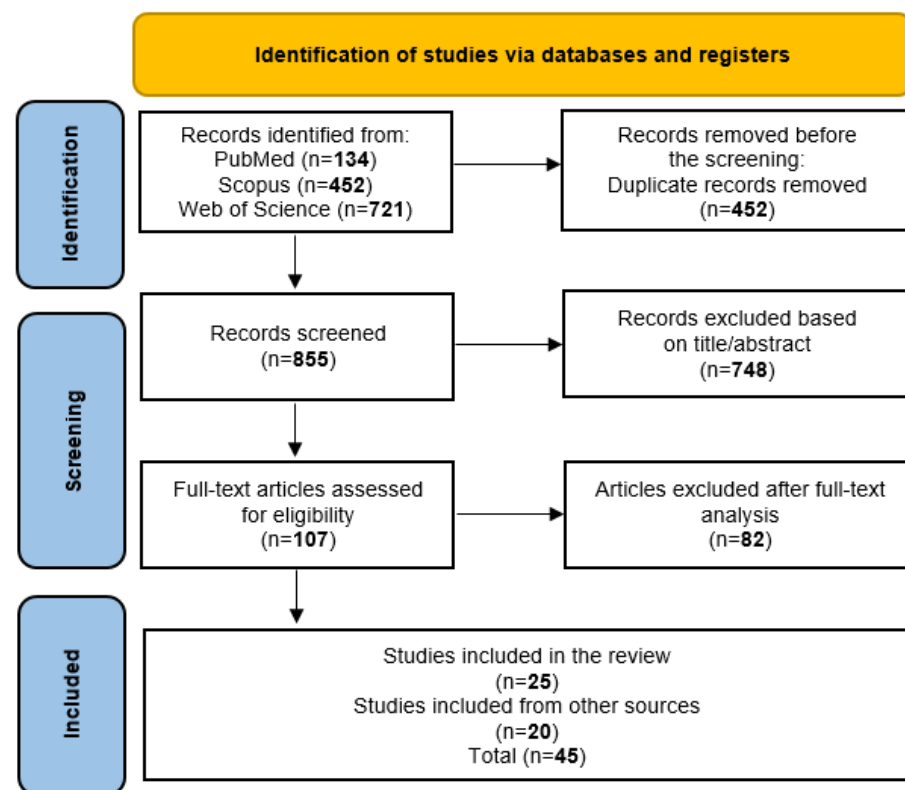
A combination of microbial hurdles with organic acids and their derivative salts was excluded at the research selection stage as having no certainty as to the microbial origin of the chemicals. It should be noted that lactic acid, citric acid, propionic acid, acetic acid, and other organic acids are chemical compounds that can be produced by microbial activity; however, chemical synthesis and enzymatic production processes are also possible ways to obtain these antimicrobials [27]. Thus, they are typically classified as chemical additives for controlling microorganism growth, improving sensory attributes, and extending the shelf life of various food products, including meat [15].

### 2.3. Search Methods

The following databases were searched in February 2023: PubMed, Scopus, and Web of Science, with the search restricted to the English language. Following the methodology of Bramer et al. (2018) [28], keywords were carefully selected and tested in order to provide a broad screening of the available and relevant literature. Search queries were tailored to each database's structure. The specific search terms combined with the Boolean operators, as well as details on the customization of the query to each database, are provided in the PROCEED protocol. Additionally, titles and abstracts of the literature were screened for duplication across search engines.

### 2.4. Selection of Articles

The title and abstract of each article were independently reviewed by two researchers to ensure they met the eligibility criteria. Full texts of articles were then retrieved, and two researchers independently screened them for inclusion. Disagreements were settled through discussion between the two researchers. The PRISMA diagram [29] was used to guide the review process (Figure 1). Citations were exported to the citation generator.



**Figure 1.** PRISMA flowchart illustrating the identification of studies for inclusion.

### 2.5. Risk of Bias Assessment

The Guidelines for Systematic Review and Evidence Synthesis in Environmental Management Version 5.1 2022 [25], Collaboration for Environmental Evidence Critical Appraisal Tool Version 0.3 (Prototype) was utilized for a critical appraisal of included studies that met the eligibility criteria. This tool is intended for use in environmental management research, including pathogen control, which is one of the research topics of this review. Criteria for avoiding systematic biases which may pose a threat to the study's internal validity are described in detail in the PROCEED protocol.

### 2.6. Search for Heterogeneity

Given the high heterogeneity among the studies, meta-analyses could not be performed because similar comparisons could not be made between outcomes that differed between the studies.

## 3. Results

### 3.1. Study Selection

A total of 1307 papers were identified, 134 in the PubMed database, 452 in Scopus, and 721 in the Web of Sciences. These three lists were compared identifying 452 duplications or triplicates. The title and abstract screening allowed exclusion of 748 articles since they lacked relevance to the topic. Among the 107 articles subjected to full-text review, 82 articles were excluded as not complying with the inclusion criteria. An additional twenty relevant studies were identified by checking the references from included studies or searching the Internet and were added to the final analysis. In total, forty-five unique studies were selected for data analysis. The large number of studies that were identified additionally, rather than through a systematic search, may be because the studies' main objectives were not to investigate synergism between antimicrobial agents. It is possible that the authors did not use such keywords as "synergism", "combination" or "additivity", and the synergistic effect was obtained somewhat accidentally.

The selection strategy employed in the qualitative analysis is summarized in Figure 1. To examine the topic deeply, a content analysis of all articles found was conducted. The data extracted from the studies included in the systematic review are expressed in Tables 1–8.

### 3.2. Risk of Bias

All forty-five studies included in this review were considered to be moderately biased. A detailed description of the scoring results of individual studies will be provided upon request.

### 3.3. Main Findings

Evaluation and in-depth examination of the articles included in this review showed that the vast majority of interventions were the addition of starter cultures directly to meat products during the fermentation process. Another common mixture of antimicrobial agents was a combination of non-starter protective cultures. In this case, the target meat products were not fermented but fresh, such as minced meat or ready-to-eat products. In both cases, the mix of agents was added fresh or lyophilized, or in the form of the supernatants obtained by centrifugation of bacterial cultures. In other cases, the potential use of secondary metabolites and purified or semipurified biologically active compounds of microbial origin, such as bacteriocins, bacteriocin-like substances, surface layer proteins, and reuterin were assessed in different variations, as a part of the decontamination strategies for meat. Often, combined physical or chemical hurdles technology approaches and active packaging techniques were applied simultaneously.

Therefore, it was decided to use these categories in the rest of the study. To determine whether microbial hurdle technology has an advantage over microbial biopreservatives used alone, the articles included in the review were considered according to their function, namely, whether they were added into the meat as a mixture of starter cultures, or used as bioprotective non-starter cultures. Other combinations of microbial secondary metabolites were considered separately.

The most popular microbial hurdles in the studies included in this review were combined starter cultures applied to meat [30–53]. The use of a mixture of non-starter protective cultures to inhibit spoilage bacteria or/and foodborne pathogens was also assessed [54–66]. Gao et al. (2015) [67] investigated the antimicrobial properties of the non-starter protective culture of *Lactobacillus sakei* C2 in combination with bacteriocin sakacin C2 prepared from the cell-free supernatant of *L. sakei* C2. In the study of de Souza de Azevedo et al. (2019) [68], nisin and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced

by *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43,200 were tested together to preserve pork meat samples after artificial contamination by *Lactobacillus sakei* ATCC 15521. Interestingly, in the Delgado et al. study (2018) [69], non-starter protective cultures were combined with protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* in order to investigate their combined antifungal capacity against *A. parasiticus* in dry-fermented sausage. In turn, the biopreservation of meat by using a combination of bacteriocins was evaluated by Castellano et al. (2018) [70] and Vignolo et al. (2000) [71]. In other similar studies, combinations of nisin with bacteriocin-like-substance (BLIS) against *Listeria monocytogenes* [72] and with surface layer protein (SLP) against *Staphylococcus saprophyticus* P2 [73] were appraised. The inhibitory activity of synergetic antimicrobial consortia of, inter alia, reuterin and microcin J25 against *Salmonella enterica* on broiler chicken carcasses was also evaluated [74].

## 4. Discussion

### 4.1. Combination of Various Microbial Hurdles against Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms in Meat and Meat Products

#### 4.1.1. Combination of Starter Cultures

Starter cultures refer to preparations that contain a large number of cells, whether of a single type or a mixture of two or more microorganisms, that are added to food to gain benefits from their metabolism and enzyme activity [75]. Across the meat industry, starter cultures are widely used, primarily in the preparation of sausages. Fermentation is the oldest known method of preserving meat, obtaining a microbiologically stable product with special sensory properties that can be stored for months. Habitually, the fermentation process of meat products has been conducted by the natural microbiota present in the meat [76]. The use of starter cultures in the manufacture of meat products has received considerable attention in recent years. A variety of strains are used in different products based on technological requirements and consumer preferences [77]. In fermented meat products, the LAB are usually facultative anaerobes and belong primarily to the genera *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, and the former *Lactobacillus*. Among coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus xylosum* and *S. carnosus* are the most commonly used facultative anaerobes in the fermentation of meat products [19]. Yeasts commonly used as meat starters are *Debaryomyces* spp. and *Candida* spp. which can exhibit either an aerobic or a facultatively anaerobic metabolism [78]. The main objective of using the combinations of various strains within a starter culture is to obtain potent synergistic activity in terms of antimicrobial effect enhancement, sensory quality improvement, reduction of usage, avoiding resistance, saving energy, and the extension of meat shelf-life which is beneficial to the meat industry.

In the included studies, a starter culture composed of at least two LAB strains was used by Lee et al. (2018) [39], Olaoye et al. (2010) [43], Olaoye et al. (2011) [44], Olaoye et al. (2015) [45], Iacumin et al. (2020) [36], and Vatanyoopaisarn et al. (2011) [51] (Table 1). In the study by Iacumin et al. (2020) [36], two different bioprotective mixed cultures consisting of lactic acid bacteria were used against *L. monocytogenes* bacteria that were intentionally inoculated into cooked cubed ham, which was packaged in modified atmosphere packaging (MAP). The use of two types of bioprotective mixed cultures, including Lyocarni Sacco BOX-74 (*Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum*, and *Latilactobacillus sakei*) and Lyocarni BOX-57 (*C. divergens*; *C. maltaromaticum* and *L. sakei*—bacteriocin producer) eliminated or prevented the development of *L. monocytogenes* in the meat products [36]. According to the authors, the activity of these bioprotective cultures was mainly based on competition at the substrate level and also, in the case of BOX-57, inclusion of a bacteriocin producer. As demonstrated in the experiment, the presence of autochthonous (natural) LAB did not inhibit *L. monocytogenes*, and the mixed three-strain starter cultures did [36].

In the remaining studies concerning the use of a combination of strains in a starter culture, the LAB were combined also with coagulase-negative staphylococci (CNS), which possess different properties. Due to their nitrate-reducing capabilities, coagulase-negative

staphylococci contribute to limiting lipid oxidation and producing nitrosomyoglobin, thus promoting the development of the typical red color of meat [79]. *Staphylococcus* species, such as *Staphylococcus xylosum*, also contribute to aroma formation by performing proteolytic and lipolytic activities. According to several recent studies, protein hydrolysis is caused not only by endogenous meat enzymes but also by certain bacteria, including *Staphylococcus* [80,81]. Interestingly, the success of *Staphylococcus* in proteolysis during meat fermentation may depend directly on the presence of lactic acid bacteria [82], which indicates collective interaction between those species. In the study by Chen et al. (2020) [33] on the production of dry fermented sausage, the multi-strain starter of *Staphylococcus xylosum* SX16 and *Lactiplantibacillus plantarum* CMRC6 was compared to the single-strain starter culture of *L. plantarum* CMRC6 and a non-inoculated control. Besides acceleration of acidification and proteolysis during ripening, the mixed culture starter improved the microbiological safety of the meat sausages, dominating the microbial community by suppressing *Enterobacteriaceae* growth which was not detected after 6 days of ripening. In comparison, in sausages inoculated with the single culture starter, the *Enterobacteriaceae* population decreased more slowly and was not detected after 14 days of ripening but no information was given as to whether the difference was significant [33].

Similar results of improvement of the safety and biochemical and sensory characteristics of the fermented meat products when using the combination of LAB and CNS strains were obtained by Du et al. (2019) [64], Frece et al. (2014) [35], Pavli et al. (2020) [46], Zhao et al. (2011) [53], Xiao et al. (2020) [52], Bonomo et al. (2011) [30], Casaburi et al. (2017) [31], Mafra et al. (2020) [40], and Najjari et al. (2021) [42] (Table 1). It is worth mentioning that in the study of Pavli et al. (2020) [46], a three-strain starter culture of *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* and *Lactiplantibacillus plantarum* L125 was compared with a two-strain starter culture of *P. pentosaceus* and *S. carnosus* and applied separately to meat batter. The use of the three-strain starter culture led to equal or better technological characteristics of the produced sausages compared to the control sample. At the same time, the population of staphylococci in meat samples inoculated with the mix of three strains decreased more than in meat samples with the addition of the two-strain starter culture ( $p < 0.05$ ) in the initial stage of fermentation, probably due to the strong competition between LAB cultures. Despite this fact, staphylococci levels were higher in meat samples incorporated with the three-strain starter culture by the end of the storage period (182 days) compared to the meat sample impoverished by the *L. plantarum* strain. Overall, the mix of three-starter cultures was found to possess desirable technological characteristics, indicating its effectiveness for use in fermented sausage manufacturing [46]. In the study by Mafra et al. (2020) [40], the mixed starter culture composed of *Lactilactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosum*, and *Staphylococcus carnosus* was used in the fermentation of meat sausages and resulted in improvement of the safety and shelf-life of products. According to the authors, the mixed starter culture presented technological characteristics anticipated for application in the maturation of sausages [40].

Nevertheless, the reason for using synergistic bacterial cultures may be wider than obtaining antimicrobial action. Among the many hazards associated with meat products, nitrosamines, biogenic amines (BAs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and mycotoxins are among the most significant [48–50].

**Table 1.** The use of diverse combinations of starter cultures against different target microorganisms.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Starter cultures of <i>Latilactobacillus sakei</i> and <i>Staphylococcus equorum</i>	Traditional fermented sausages of Basilicata region	LAB, CNS, <i>Enterobacteriaceae</i> , gram-negative bacteria, molds, and yeasts	Yes	Bonomo et al. (2011) [30]
Starter cultures of <i>Staphylococcus xylosus</i> CVS11 or FVS21 with <i>Latilactobacillus curvatus</i>	Fermented sausages	<i>Enterobacteriaceae</i> , Enterococci, molds, yeast, LAB, and <i>Micrococcaceae</i>	Yes	Casaburi et al. (2007) [31]
Starter cultures of <i>Pediococcus acidilactici</i> (MC184, MS198, or MS200) and <i>Staphylococcus vitulus</i> RS34	Traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo	Various pathogens ( <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> ), <i>Enterobacteriaceae</i> , and <i>Micrococcus</i>	Yes	Casquete, et al. (2012) [32]
Starter cultures of <i>Staphylococcus xylosus</i> SX16 and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CMRC6	Gourmet fermented dry sausage	LAB, CNS, and <i>Enterobacteriaceae</i>	Yes, but only concerning <i>Enterobacteriaceae</i>	Chen et al. (2020) [33]
Starter cultures of <i>Pediococcus pentosaceus</i> and <i>Staphylococcus xylosus</i>	Xiangxi sausages	TVC, LAB, <i>Staphylococcus</i> , and <i>Enterobacteriaceae</i>	No significant difference with the control sample	Du et al. (2019) [34]
Autochthonous starter culture of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 1K and <i>Staphylococcus carnosus</i> 4K1	Traditional Croatian dry sausages	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> ssp., <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , yeasts, and molds	Yes	Frece et al. (2014) [35]
Two starter cultures of Lyocarni BOX-74 ( <i>Carnobacterium divergens</i> , <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> , and <i>Latilactobacillus sakei</i> ) and Lyocarni BOX-57 ( <i>Carnobacterium divergens</i> , <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> , and <i>Latilactobacillus sakei</i> bacteriocin producers)	Cooked cubed pork ham	LAB, <i>L. monocytogenes</i> , TVC	Yes	Iacumin et al. (2020) [36]
Two starter cultures of the mix of <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Latilactobacillus curvatus</i> + <i>Staphylococcus xylosus</i> , and <i>Latilactobacillus sakei</i> + <i>Staphylococcus carnosus</i>	Sucuk, Turkish dry-fermented sausage	<i>S. aureus</i> , LAB, <i>Micrococcus/Staphylococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Yes	Kaban et al. (2006) [37]
Two starter cultures of the mix of <i>Staphylococcus xylosus</i> DD-34, <i>Pediococcus acidilactici</i> PA-2 + <i>Latilactobacillus bavaricus</i> MI-401, and <i>S. carnosus</i> MIII + <i>Latilactobacillus curvatus</i> Lb3	Dry sausage	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i>	Yes	Lahti et al. (2001) [38]
Starter cultures of <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., and <i>Weissella</i> spp.	Fermented sausages	TVC, yeast mold, and LAB	Yes, but no significant difference with the commercial LAB starter culture used as a control sample	Lee et al. (2018) [39]

Table 1. Cont.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Starter culture of <i>Latilactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i> , and <i>Staphylococcus carnosus</i>	Meat sausages	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922, <i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC13076, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212, and <i>Listeria monocytogenes</i> CERELA	Yes	Mafra et al. (2020) [40]
Starter culture of <i>Pediococcus pentosaceus</i> and <i>Staphylococcus carnosus</i> with co-cultures of <i>Limosilactobacillus reuteri</i> and <i>Bifidobacterium longum</i>	Dry fermented sausages	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Yes	Muthukumarasamy & Holley (2007) [41]
Starter culture of <i>Latilactobacillus sakei</i> (23K, BMG 95, or BMG 37) and <i>Staphylococcus xylosum</i>	Tunisian dry-fermented sausages	<i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> spp., total coliforms, LAB, anaerobic sulphate-reducing bacteria, yeast, and molds	Yes	Najjari et al. (2021) [42]
Starter culture of <i>Pediococcus pentosaceus</i> LIV 01 and <i>P. acidilactici</i> FLE 01	Sliced fresh beef	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> , yeasts, molds, <i>Listeria monocytogenes</i> , and <i>Salmonella</i> Typhimurium	Yes	Olaoye et al. (2010) [43]
Starter culture of <i>Pediococcus pentosaceus</i> GOAT 01 and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> GOAT 012	Goat meat	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus</i> , yeasts, molds, <i>Listeria monocytogenes</i> , and <i>Salmonella</i> Typhimurium	Yes, but no significant difference with the control sample concerning yeast and mold counts	Olaoye et al. (2011) [44]
Starter cultures of <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> I23 (Llac01) and <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordinae</i> E91 (Llac02)	Pork meat	<i>Brochothrix thermosphata</i>	Yes	Olaoye et al. (2015) [45]
Starter cultures of <i>Pediococcus pentosaceus</i> and <i>Staphylococcus carnosus</i> with <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> L125	Traditional Greek dry-fermented sausage	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brochothrix</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> , yeasts, molds, and <i>Listeria monocytogenes</i>	Yes	Pavli et al. (2020) [46]
Commercial starter culture (FloraCarn) consisting of a mixture of <i>Pediococcus pentosaceus</i> and <i>Staphylococcus xylosum</i> in combination with a non-traditional meat starter culture of dairy or human intestinal origin	Hungarian salami	<i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Escherichia coli</i> O111	Yes	Pidcock et al. (2002) [47]
Starter culture of <i>Staphylococcus xylosum</i> and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Harbin dry sausage	TVC, LAB, and <i>Enterobacteriaceae</i>	Yes, but only concerning <i>Enterobacteriaceae</i>	Sun et al. (2016) [48]

Table 1. Cont.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Starter culture of <i>Staphylococcus xylosum</i> and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Harbin dry sausage	TVC, LAB, and <i>Enterobacteriaceae</i>	Yes	Sun et al. (2019) [49]
Starter cultures of <i>Limosilactobacillus fermentum</i> S8 and <i>Staphylococcus carnosus</i> ATCC 51365	Canned minced pork meat	TVC, LAB, <i>Staphylococcus</i>	Yes	Szymański et al. (2021) [50]
Starter cultures of diverse mix of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CP1-15, <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CP2-11 and <i>Pediococcus acidilactici</i> CP7-3	Thai fermented sausage “Sai-Krok-Prew”	LAB, <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , total staphylococci, and <i>S. aureus</i>	Yes	Vatanyoopaisarn et al. (2011) [51]
Starter culture of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> R2 and <i>Staphylococcus xylosum</i> A2	Chinese dry fermented sausages	TVC, LAB, and <i>Staphylococcus</i> spp.	Yes	Xiao et al. (2020) [52]
Starter culture of <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> and <i>Staphylococcus carnosus</i>	Mutton sausages	LAB, TVC, micrococci–staphylococci	Yes	Zhao et al. (2011) [53]

#### 4.1.2. Combination of Non-Starter Protective Cultures

A natural preservation technique for extending the shelf life of fresh meat by inhibiting spoilage and/or pathogenic bacteria is the use of protective cultures. It is worth emphasizing that protective cultures do not change the technological and sensory properties of food [66]. Usually, the bacterial species that serve as protective cultures have long been used as starter cultures for fermented meat products and have the GRAS and/or QPS status, including not only lactic acid bacteria (e.g., lactobacilli, streptococci, enterococci, lactococci) and bifidobacteria but also *E. coli* and species of *Bacillus*, yeasts such as *Saccharomyces*, and molds such as *Aspergillus* [78]. The protective effect may result from several mechanisms, including the production of bacteriocins and other antagonistic molecules (e.g., organic acids, hydrogen peroxide, and enzymes) and the competition for nutrients. There is also speculation that mixtures of protective cultures may be more effective than single isolates [56].

The findings from most studies suggest that combinations of protective cultures have the potential to control the growth of foodborne pathogens [54,55,57,58] and spoilage bacteria [60,61,65,66], both of them [56,59], or EPS-producers [63,64] to extend the shelf-life of fresh meat products (Table 2).

In the study of Xu et al. (2023) [66], the combination of two protective cultures suppressed the growth of spoilage bacteria in premium (lean) beef mince, whereas this inhibitory effect was not observed in standard (higher fat) beef mince [66]. The activity of antimicrobial compounds produced by protective cultures can be reduced or lost due to interaction with fat because some of these compounds contain lipophilic or hydrophobic portions which interact with the cell membranes of bacteria [66].

According to Xu et al. (2021) [65], the greatest antimicrobial action was observed when *L. sakei* was present in mixtures with either *S. carnosus*, or *S. xylosum*. The stronger inhibitory effect induced by combined cultures may be attributed to the synergistic effects between the staphylococci and *L. sakei* [65]. However, in the Gargi et al. (2021) [58] study, the synergistic effect of protective bacterial cultures was not obtained. According to this study [58], marination containing a single culture of *L. casei* and unripe grape and onion juices was the most effective against pathogens inoculated on meat surfaces and also met consumer expectations at a high level, in terms of flavor properties. The authors

explained this by the effects of specific metabolites produced by the *L. casei* strain during the marination process [58]. The results of this study are in line with [61], where the combination of supernatants did not exceed the antimicrobial effectiveness of individual supernatants [61]. In turn, Castellano et al. (2011) [55] reported the varied effectiveness of protective cultures of *L. curvatus* CRL705 and *L. lactis* CRL1109 in combination with Na<sub>2</sub>EDTA on frozen ground-beef patties contaminated with *Escherichia coli* O157:H7. The bioprotective cultures failed to inhibit *E. coli* or coliforms in the absence of Na<sub>2</sub>EDTA, with the pathogen reaching similar counts as with control samples [55]. This inhibitory effect may be attributed to the chelating activity of Na<sub>2</sub>EDTA which binds trace metals valuable for fastidious LAB growth while in the presence of *E. coli*. As compared with substrate metallic trace elements, the chelator exhibits a higher affinity for the outer membrane ions of Gram-negative strains [55]. In the study of Chaillou et al. (2014) [56], a *L. sakei* cocktail of three strains showed an effect against *S. Typhimurium* and *E. coli* under vacuum or modified atmosphere packaging. Real-time quantitative PCR showed that the three inoculated *L. sakei* strains had different growth patterns and that the association of these three strains indeed impaired the growth of pathogens [56].

**Table 2.** The use of diverse combinations of non-starter protective cultures against different target microorganisms.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Supernatants from <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactocaseibacillus casei</i> , and <i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	Frankfurters and cooked ham	<i>L. monocytogenes</i>	No significant difference with the control sample	Amézquita & Brashears (2002) [54]
Cultures of bacteriocin-producing strains of <i>Latilactobacillus curvatus</i> CRL705 and <i>Lactococcus lactis</i> CRL1109	Frozen ground-beef patties	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Yes	Castellano et al. (2011) [55]
Six strain combinations containing three different strains of <i>Latilactobacillus sakei</i>	Vacuum-packed or modified atmosphere-packed ground beef	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> O157:H7, and <i>Brochothrix thermosphacta</i>	The growth of indicator strains was variable and depended on both the storage conditions and the amount of indigenous microbiota	Chaillou et al. (2014) [56]
Neutralized cell-free supernatants from <i>Latilactobacillus sakei</i> CWBI-B1365 and <i>Latilactobacillus curvatus</i> CWBI-B28	Raw beef and poultry meat	<i>Listeria monocytogenes</i>	Yes	Dortu et al. (2008) [57]
Cultures of <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5, <i>Lactocaseibacillus casei</i> 01 and <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> HN001	Marinated meat	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, and <i>S. Typhimurium</i>	No	Gargi et al. (2021) [58]
Postbiotics from <i>Latilactobacillus sakei</i> and <i>Staphylococcus xylosum</i>	Chicken drumsticks	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium, TVC, psychrotrophic bacteria, and LAB	Yes	Incili et al. (2022) [59]
<i>Latilactobacillus sakei</i> 27, 44 and 63 strains	Lamb meat	General anaerobic bacteria	Yes	Jones et al. (2010) [60]

Table 2. Cont.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
<i>Latilactobacillus sakei</i> CECT 4808, and <i>Latilactobacillus curvatus</i> CECT 904T	Vacuum-packaged sliced beef	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brochothrix thermosphacta</i> , yeasts and molds, and LAB	No	Katikou et al. (2005) [61]
Three LAB strains (Lactiguard®)—La51 ( <i>Ligilactobacillus</i> ), M35 ( <i>Lactobacillus amylovorus</i> ), and D3 ( <i>Pediococcus acidilactici</i> ) in combination with their CFS	Frankfurters	<i>Listeria monocytogenes</i>	Yes	Koo et al. (2012) [62]
Supernatants from <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL641 and <i>Latilactobacillus curvatus</i> CRL705	Bovine meat discs	<i>Latilactobacillus sakei</i> CRL1407 (exopolysaccharide producer)	Yes	Segli et al. (2021a) [63]
Supernatants from <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL641 and <i>Latilactobacillus curvatus</i> CRL705	Bovine fresh lean meat	<i>Latilactobacillus sakei</i> CRL1407 (exopolysaccharide producer)	No	Segli et al. (2021b) [64]
<i>Latilactobacillus sakei</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , and <i>Staphylococcus carnosus</i> in various combinations	Lamb meat	<i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., and <i>Enterobacteriaceae</i>	Yes	Xu et al. (2021) [65]
Mixed culture containing <i>Staphylococcus carnosus</i> and <i>Latilactobacillus sakei</i>	Beef mince	Aerobic counts, LAB, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Yes	Xu et al. (2023) [66]

Finally, Jones et al. (2010) [60] inoculated fresh commercial lamb meat with a cocktail of three *L. sakei* strains and proved that the protective culture is capable of developing into dominant components of stored meat bacterial flora under standard commercial chilled storage conditions without reducing sensory acceptability [60].

Currently, bacteria are used in food in two different forms: (1) the incorporation of living bacteria into the matrix of foods, as well as (2) the use of purified antimicrobials obtained from major strains. There is no doubt that both methods have their strengths and weaknesses, depending upon the type of food and the nature and characteristics of each strain of bacterium [83]. Viable microorganisms cells can be used directly in food, but there are limitations since their growth and survival are influenced by external factors such as food type, temperature and pH. On the other hand, there are some limitations to the use of bacteriocins. Proteins and lipids appear to interact with bacteriocins in fresh meat and meat products. Bacteriocins and bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) may be also inhibited by proteolytic enzymes [84]. There is also a high risk of contamination of food by Gram-negative bacteria, which are naturally resistant to the action of bacteriocins produced by Gram-positive bacteria, that are widely explored in foods [85]. On the other hand, bacteriocins are costly substances due to the expensive and laborious purification process [86]. The application of postbiotics can be an alternative to reap the benefits of all these natural bacterial antimicrobials. The word “postbiotics” is used to refer to the “preparation of inanimate microorganisms and/or their components that confers a health benefit on the host” [87]. Practically, postbiotics are bioactive soluble factors, products, or metabolites produced by food-grade microorganisms during their

growth and fermentation in complex microbiological cultures. On that account, they are sometimes called cell-free supernatant (CFS). Postbiotics are credited with exerting health benefits to the host equivalent to probiotics [88]; however, in this context, there has been discussion of the latest applications of postbiotics in terms of food safety. The inhibitory effects exhibited by postbiotics include producing antimicrobial agents that fall into the category of low molecular weight compounds (i.e., hydrogen peroxide, carbon dioxide, and di-acetylene) or high molecular weight compounds (i.e., bacteriocins and bacteriocin-like substances) [89]. According to recent studies, postbiotics derived from lactic acid bacteria exhibit inhibitory properties toward different groups of microorganisms including *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Aeromonas* spp., *Bacillus* spp., viruses, yeast, and molds [83]. Nevertheless, most of those studies have been conducted in vitro, whereas studies on food matrices are relatively rare [84]. On the other hand, data on the use of postbiotic cocktail combinations for the biopreservation of food, including meat and meat products, are limited. Six studies, identified in the following review, aimed to apply antagonistic postbiotic combinations in a meat model to inhibit meat potential spoilage or pathogens [54,57,59,61,63,64] (Table 2). In the study of Segli et al. (2021a) [63], the effect of postbiotic extracts from *L. acidophilus* CRL641 (BE-1) and *L. curvatus* CRL705 (BE-2) against the exopolysaccharide producer *L. sakei* CRL1407 in vacuum-packaged meat discs was evaluated. The postbiotics mixture led to a greater growth reduction of 3.31 log CFU/g compared to the control, while the supernatants applied individually reduced bacterial growth by 2.11 and 1.35 log CFU/g, respectively [63]. Interestingly, the inhibition of *L. sakei* CRL1407 was significantly higher even at lower concentrations of each supernatant (MIC) in the postbiotics mixture than those used on postbiotics added separately (2-fold MIC) [63]. Another study by Segli et al. (2021b) [64] was conducted under aerobic conditions at 4 and 10 °C using the same strains from which the postbiotics were obtained and the same spoilage strain contaminating the meat. It was shown that the postbiotics from *L. acidophilus* completely inhibited the spoilage strain, whereas the postbiotics from *L. curvatus* CRL705 and a combination of both extracts exhibited a bacteriostatic effect [64]. Thus, a lack of synergistic interaction was found, since there was a weaker inhibitory effect of the postbiotics mixture compared to the supernatant obtained from *L. acidophilus* CRL641 used individually [64]. Similarly, in Amézquita and Brashears (2002) [54] study, an antilisterial effect of the combined supernatants of three LAB strains (*Pediococcus acidilactici*, *L. casei*, and *L. paracasei*) was observed in commercial frankfurters and cooked ham under refrigeration ( $p > 0.05$ ).

In a study by Incili et al. (2022) [59], the antimicrobial effect on the meat matrix of a combination of postbiotics (mix of *L. sakei* and *S. xylosum*) was compared with postbiotics obtained from *Pediococcus acidilactici*, instead of comparing to single postbiotics. The combination of postbiotics was characterized by the lowest ability to reduce *S. Typhimurium* relative to all tested antimicrobial agents ( $p < 0.05$ ) [59]. Throughout the storage period, *L. monocytogenes* counts in the postbiotics mixture and *P. acidilactici* postbiotics samples were found lower than the control, while the difference from the control was found insignificant ( $p > 0.05$ ) in both cases [59]. In turn, the study by Dortu et al. (2008) [57] obtained different results for *L. monocytogenes* growth inhibition depending on the meat matrix tested. Neutralized cell-free supernatants from *L. sakei* and *L. curvatus* applied either separately or in combination exhibited antilisterial activity in raw beef, whereas, in poultry meat, the inhibition of *L. monocytogenes* could only be achieved by a combined application of these bacteriocin-producing strains, probably due to the activity of proteases produced by proteolytic spoilage strains present in chicken meat [57].

An interesting result was obtained by Koo et al. (2012) [62], who evaluated the antilisterial activity of a combination of three LAB strains (*L. animalis*, *L. amylovorus*, and *P. acidilactici*) in ready-to-eat (RTE) meat. In addition, an antimicrobial preparation consisting of a mixture of the three strains was combined with their cell-free extract [62]. The combination of the LAB was inhibitory to *L. monocytogenes* inoculated onto frankfurters (0.6 log reduction compared to *L. monocytogenes* control after eight weeks of refrigerated

storage), and when postbiotics were added to the LAB preparation even more inhibition was obtained (1.2 log reduction compared with *L. monocytogenes*) [62]. The authors attribute the increased antimicrobial activity after the addition of postbiotics to the supernatant content of various biologically active substances that had a synergistic effect when used in combination (potentially, the effect could be due to a bacteriocin—pediocin, secreted by *P. acidilactici*) [62].

#### 4.1.3. Combination of a Variety of Secondary Microbial Metabolites Combination of Bacteriocins

One of the most widely described biopreservation methods involving bioprotection focuses on bacteriocins. The term “bacteriocins” refers to ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by bacteria and capable of exhibiting a narrow spectrum of activity (targeting members of the same species), while others display a broader spectrum of activity (targeting other species and genera) [90]. Bacteriocins can inhibit the growth of foodborne pathogens or spoilage organisms, and some of these compounds may serve as biopreservatives in the food industry. The popularity of bacteriocins in the food sector is mainly due to (1) their inhibitory properties against pathogenic bacteria *C. perfringens*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *B. cereus*, and *L. monocytogenes* [91]; (2) non-resistance of most foodborne pathogens and spoilage microorganisms to bacteriocins; (3) safety—since most bacteriocins can be degraded by enzymes in the human body, they are safe for the human microbiome, and they also inhibit only sensitive bacteria while leaving beneficial bacteria intact [92]; (4) lack of effect on the nutritional and sensory properties of food.

However, there have only been a limited number of bacteriocins approved for commercial use out of those discovered and preserved in the laboratory: (1) nisin A produced by *Lactococcus lactis*—the most extensively studied bacteriocin and the only product approved as an additive to food by regulatory agencies (WHO, FDA, EFSA); (2) pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici*—FDA-approved bacteriocin-containing metabolites; (3) starter/protective cultures containing a mix of bacteriocin-producing strains—they can improve both flavor and safety, providing fermentation and preservation simultaneously [93]. There are some difficulties in the wide dissemination of bacteriocins in food technology. (1) Firstly, it is known that some bacteriocins have an antibacterial spectrum that is relatively narrow; (2) cytolysin, a cytotoxic compound produced by some strains of *Enterococcus faecalis*, is associated with acutely fatal outcomes in humans [94] and Gram-negative bacteriocins may also produce some endotoxins that can have a deleterious effect, thus requiring rigorous purification protocols; (3) there may be interactions between bacteriocins and other components of the food matrix (its pH, enzymes, etc.); (4) there are some reports that strains of *L. monocytogenes* and *S. aureus* could become nisin-, plantaricin C19- and sakacin A-resistant [95]; (5) finally, obtaining bacteriocins is associated with very high costs.

There has been considerable interest in the hurdle technology approach, however, involving use of bacteriocins to expand the antibacterial spectrum, reduce usage, enhance the antibacterial effect, and avoid resistance. A synergistic effect between bacteriocins, alone or in combination with other microbial hurdle technologies, may facilitate the adjustment of bacteriocins to maximize the viability loss of the target bacteria and also minimize the development of resistance. Among the microbial hurdles associated with the use of bacteriocins are combinations with (1) other bacteriocins [70,71] (Table 3), (2) BLIS (bacteriocin-like-substance) [72] (Table 4), (3) non-starter protective cultures [67,68] (Table 5), (4) reuterin [74] (Table 6) and (5) the surface layer protein [73] (Table 7).

The lantibiotic nisin has been the subject of several antimicrobial combination studies aimed at targeting *L. monocytogenes*, often connected with the consumption of ready-to-eat (RTE) meat products; this notorious foodborne pathogen causes listeriosis and has the potential to cause opportunistic infections, which may result in meningitis or sepsis in severe cases [96]. It was found that a combination of more than one LAB bacteriocin may be more effective in preventing the spontaneous emergence of bacteriocin-resistant

*Listeria* in fresh lean meat than when used individually [71]. A significant antilisterial effect was observed when bacteriocins from among lactocin 705, enterocin CRL35 (both in the concentration of 17,000 AU/mL) and 5000 IU/mL of nisin were combined in pairs; maximal inhibition was reached when nisin was involved [71]. Moreover, in a study by Castellano et al. (2018) [70], it was shown that a significant reduction in *L. monocytogenes* growth was observed when antimicrobials were combined in the dipping solution. A combination of semi-purified bacteriocins (*L. curvatus* CRL705 (533 AU/mL) + *L. sakei* CRL1862 (266 AU/mL)), organic acids, and nisin (2.500 IU/mL) has a 100% of anti-listeria effect on frankfurters, from day 6 to the end of the storage [70]. The authors suggest that it is more effective to prevent *Listeria* in foods by using a mixture of bacteriocins that belong to different classes, such as nisin, lactocin, and enterocin, which are, respectively, lantibiotics (class I), a two-peptide bacteriocin (class IIB), and pediocin-, lactocin- or sakacin-like (class IIA). The effectiveness of separately used bacteriocins may be weakened by many factors acting simultaneously (adsorption on meat components and/or degradation by proteolytic enzymes) [71]. In contrast, the mixture would probably be bactericidal to more bacterial cells since cells resistant to one bacteriocin would be killed by another [70].

**Table 3.** The use of diverse combinations of bacteriocins against different target microorganisms.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Bacteriocins from <i>Latilactobacillus curvatus</i> and <i>Latilactobacillus sakei</i> , in combination with nisin	Frankfurters	<i>L. monocytogenes</i> and psychrophilic microbiota	Yes	Castellano et al. (2018) [70]
Bacteriocins nisin, lactocin 705, and enterocin CRL35 in combinations	Fresh lean meat	<i>Listeria monocytogenes</i> FBUNT	Yes	Vignolo et al. (2000) [71]

By combining bacteriocins, the antimicrobial effect is enhanced and reduced dosage is practicable, lowering the cost of food preservation. Moreover, the bacteriocins will produce synergistic effects if they act in different modes.

#### Combination of BLIS with Bacteriocin

All bacteria can produce antimicrobial peptides (AMPs), but not all of these peptides are defined as bacteriocins. The non-ribosomally synthesized AMPs are known as BLIS, bacteriocin-like inhibitory substances. BLIS are also defined as antimicrobial peptides that have not been fully characterized in terms of their amino acid sequences and biochemical properties [97]. BLIS have the potential for use as biopreservatives, acting as antagonistic substances, with bactericidal or bacteriostatic potential against Gram-positive and/or Gram-negative bacteria, as well as being innocuous to the producer strain [97].

Sant'Anna et al. (2013) [72] (Table 4) tested the ability of BLIS produced by *Bacillus* sp. strain P34 in combination with nisin to control *L. monocytogenes* in chicken sausages. Combining P34 with nisin (64 AU/g BLIS P34 + 6.5 µg/g nisin) reduced viable counts of *L. monocytogenes* more effectively than P34 alone in an amount of 128 AU/g [72]. The synergistic antimicrobial activity of the bacteriocin and BLIS is particularly important in the context that the activity of bacteriocins can be reduced in a fatty environment, including meat. The use of bacteriocins in the food matrix is ineffective with increasing fat content [98]. Bacteriocins usually contain a high concentration of hydrophobic amino acids [99]. In this regard, binding by bacteriocins to charged and hydrophobic macromolecules in food is a significant disadvantage when they are to be used as food biopreservatives [72].

**Table 4.** The use of a combination of bacteriocin with BLIS against a target microorganism.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Bacteriocin-like substance (BLIS) from <i>Bacillus</i> sp. strain P34 and nisin	Chicken sausage	<i>Listeria monocytogenes</i>	Yes	Sant'Anna et al. (2013) [72]

#### Combination of Non-Starter Protective Cultures with Bacteriocins

Based on reports of a synergistic effect of antimicrobial substances when used in combination, in two studies it was decided to check whether the antibacterial effect would be enhanced when bacteriocins were combined with non-starter protective cultures in the form of a cell-free supernatant [67,68] (Table 5).

**Table 5.** The use of diverse combinations of bacteriocins with non-starter protective cultures against different target microorganisms.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Nisin with neutralized cell-free supernatant obtained from <i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 43,200	Pork meat	<i>Latilactobacillus sakei</i> ATCC 15521	No	de Souza de Azevedo et al. (2019) [68]
<i>Latilactobacillus sakei</i> C2 and sakacin C2	Sliced cooked pork ham	<i>L. monocytogenes</i> CMCC 54002	Yes	Gao et al. (2015) [67]

The combination of nisin with the neutralized cell-free supernatant, obtained from *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43,200 culture at the same concentration (50%, *w/v*), was not superior to nisin alone in reducing pathogenic bacteria in a meat matrix, probably due to a negative interaction that may have occurred between them as a result of the environment [68]. The effectiveness of bacteriocins could be influenced by environmental factors such as pH and temperature, interactions with food components, preparation, inactivation, or uneven distribution of bacteriocin in the medium (e.g., agar medium, liquid medium, food) [100]. In addition, there are considerable differences in sensitivity to bacteriocins among Gram-positive bacteria, and the extent of inhibition appears to vary according to the species, genus, and strain type [101]. All this could have contributed to the lack of synergistic effect observed in this study [68].

On the other hand, Gao et al. (2015) [67] investigated the effect of cell-free supernatant from *L. sakei* C2 (0.2 mL of culture) and partially-purified bacteriocin sakacin C2 (concentration of 640 AU/mL), individually or in combination, on the growth of *L. monocytogenes* during the storage of sliced cooked ham at refrigeration temperature for 60 days. When *L. sakei* C2 and sakacin C2 were used in combination, the entire elimination of the cells of *L. monocytogenes* was observed at 30 days of storage and the mixture had no negative effect on the quality of the meat product [67].

#### Combination of Reuterin with Bacteriocin

The antimicrobial compound reuterin ( $\beta$ -hydroxypropionaldehyde) is produced by certain strains of *Limosilactobacillus reuteri* during the anaerobic fermentation of glycerol. It exhibits a wide spectrum of antimicrobial activity against foodborne pathogens and spoilage bacteria. There have been several studies that demonstrate the antimicrobial properties of reuterin solutions against Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, and molds [102]. Reuterin is thought to cause depletion of free thiol groups in glutathione (GSH), proteins, and enzymes, resulting in an imbalance of the cellular redox status; in turn, this leads to the death of bacterial cells [103]. The efficacy of mixtures of antimicrobial

compounds, namely reuterin (2 mM), microcin J25 (0.03  $\mu$ M), and additionally lactic acid for reducing the viability of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and total aerobes on broiler chicken carcasses were evaluated [74] (Table 6). The results of in vitro study indicated that the combination of reuterin + microcin J25 was synergic, making these compounds effective at four times lower concentrations than those used alone. The mixture sprayed onto chilled chicken carcasses reduced *Salmonella* spp. counts by 0.83 CFU/g ( $p < 0.05$ ) and applied as a post-chill spray, could contribute to food safety by decreasing *Salmonella* counts on chicken carcasses while limiting the number of single metabolites used [74].

**Table 6.** The use of a combination of bacteriocin and BLIS against different target microorganisms.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Reuterin (produced by <i>Limosilactobacillus reuteri</i> ) and microcin J25 (produced by <i>E. coli</i> MC4100)	Chicken carcasses	The mixture of <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Heidelberg, <i>Salmonella</i> Newport, and TVC	Yes	Zhang et al. (2021) [74]

#### Combination of the Surface Layer Protein (S-Layer Protein/SLP) with Bacteriocin

Surface layer proteins belong to the group of microbial secondary metabolites. The S-layer proteins are monomolecular crystalline arrays composed of a single homogeneous protein or glycoprotein that ranges in size from 40 kDa to 200 kDa [104]. Lactic acid bacteria S-layer proteins have poorly understood biological functions, but their presence can be associated with probiotic-relevant properties such as promoting bacterial adhesion to host cells or extracellular matrix proteins [105]. It has also been demonstrated that S-layer proteins inhibit the growth of some pathogens. According to Meng et al. (2015) [106], the SLP derived from *Lactobacillus acidophilus* damaged the cell walls and membranes of *Escherichia coli*, inhibiting their growth. A study by Sun et al. (2017) [73] aimed to determine the effect of the combination of SLP and nisin against the foodborne spoilage bacterium *S. saprophyticus* P2 in chicken meat and to clarify how SLP acted synergistically with nisin. It has been demonstrated that SLP alone had a controlling effect on total viable counts in the meat model, although to a lesser extent than nisin [73]. It was found that SLP significantly enhanced nisin's ability to control microbial growth. By using nisin + SLP and 0.5 nisin + SLP combinations, the microbiological shelf life was extended by six days [73]. As for the mechanism of action, the mode of action of SLP/nisin applied individually was different from the combination of SLP and nisin. The authors reported that, in the combination condition, SLP bonded to the cell wall through electrostatic interactions, which not only reduced cell wall integrity in vegetative bacteria and intensified the access of nisin to form a stable pore on the cell membrane but also influenced plasma membrane permeabilization [73]. As a result of these actions, cell content was released fiercely from the damaged cells, preventing them from producing energy and ultimately leading to the death of the damaged cells. The cell lysing effect was not observed when SLP or nisin was used separately [73]. Therefore, in the food industry, nisin + SLP may prove to be a new antibacterial combination that can be utilized to preserve food (Table 7).

**Table 7.** The use of a combination of bacteriocin and surface layer protein against a target microorganism.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Surface layer protein isolated from <i>Lactobacillus crispatus</i> K313 (SLP) and nisin	Minced chicken meat	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> P2	Yes	Sun et al. (2017) [73]

#### Combination of PgAFP with Protective Cultures

Certain molds produce proteins which inhibit other molds and some yeasts, while the activity against prokaryotes is quite limited [69]. PgAFP protein from *Penicillium chrysogenum* is a molecule that belongs to the group of small, cysteine-rich, and basic proteins with fungistatic activity [107]. Molds that produce aflatoxins can grow on food, especially fermented ones. The use of antifungal proteins produced by molds represents a novel and promising biopreservation strategy. The search identified one study that investigated the antifungal capability of PgAFP in combination with protective cultures of *Debaryomyces hansenii* and/or *Pediococcus acidilactici* against *A. parasiticus* in, inter alia, dry-fermented sausage [69] (Table 8). The combination of these two agents was chosen because the presence of calcium in the environment abolishes the inhibitory effect of PgAFP on certain *Aspergillus* spp. [69,108]. The effect of calcium on PgAFP fungal inhibition may be counteracted by lactic acid bacteria. At the same time, combining this protein with protective cultures may maximize its antifungal effect. PgAFP and *D. hansenii* were found to effectively inhibit *A. parasiticus* growth and aflatoxin production in sliced dry-fermented sausages that had been ripened for up to 15 days [69]. *A. parasiticus* growth or mycotoxin production was not substantially inhibited by the addition of *P. acidilactici* as an additional protective culture in meat products. The contribution of *P. acidilactici* thus appears to be insignificant, probably due to the poor ability of the bacteria to grow on dry-fermented sausage. The authors suggest that the highest inhibition reached by Pg + Dh treatments can be attributed to the combined effect of the different mechanisms of action. A consequence of ROS (reactive oxygen species) is the induction of permeability, the loss of membrane integrity, and the induction of apoptosis by PgAFP [69]. In contrast, the inhibitory effect of *D. hansenii* is attributed to its volatile compounds and competition for nutrients and space [109]. The results of this study indicate that PgAFP in combination with *D. hansenii* can successfully control the aflatoxigenic population in dry fermented foods, most likely due to complementary mechanisms of action and overcoming the limitations associated with the inhibitory effect of the calcium-rich environment on the antimicrobial activity of the PgAFP protein.

**Table 8.** The use of a combination of PgAFP with protective cultures against different target microorganisms.

Mixture	Meat System	Target Microorganism(s)	Synergism Occurrence	References
Small, basic, cysteine-rich antifungal protein PgAFP from <i>Penicillium chrysogenum</i> combined with <i>Debaryomyces hansenii</i> and/or <i>Pediococcus acidilactici</i>	Dry-fermented sausage	Mold, yeast, LAB, aflatoxin B1, and aflatoxin G1	Yes	Delgado et al. (2018) [69]

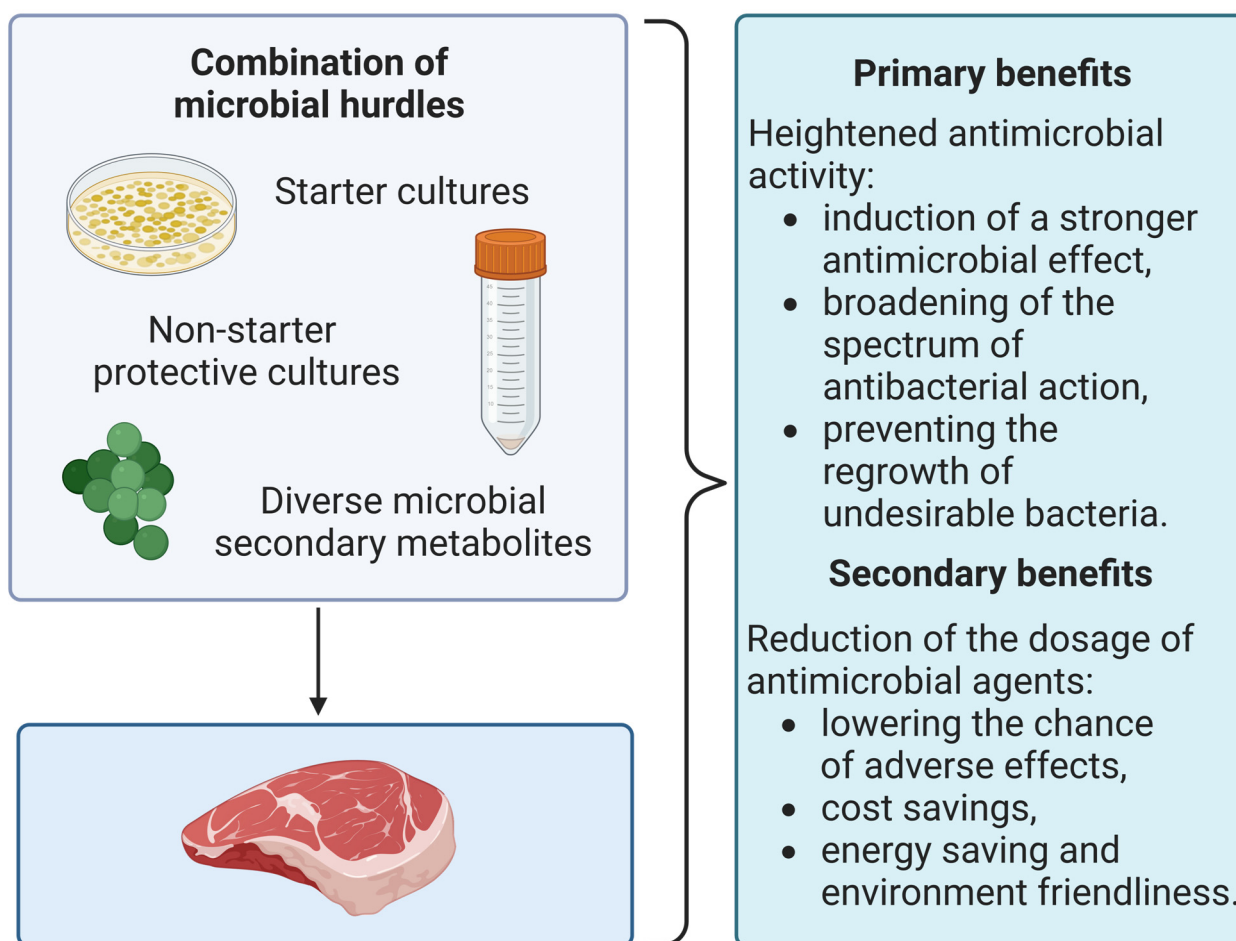
#### 4.2. Mode of Synergistic Action

The studies published over the past two decades were reviewed in order to gain a more comprehensive understanding of whether there are advantages of combining

microbial hurdles in the biopreservation of meat and meat products. It was decided to search the literature systematically, although this is not a popular method for environmental research. A systematic review can deliver a clear and comprehensive overview of available evidence. As is well known, *in vitro* results do not necessarily predict the success of various combinations applied in a food matrix (*in situ*), therefore it was also decided to discuss the combination of microbial hurdles as combined antimicrobial agents in a meat matrix extensively. As opposed to *in vitro* assays, which are much simpler, a food matrix is an environment in which a number of microbial populations interact and influence the overall structure of the community. Including studies based on the experiments designed to be as close as possible to real industrial conditions seems to be the most appropriate.

The synergistic effect of two antimicrobial agents can be measured using the fractional inhibitory concentration (FIC) index. The FIC is determined by dividing each agent's minimum inhibitory concentration (MIC) when used in combination with each agent's MIC when used alone. MIC is the lowest concentration of an antibacterial agent expressed in mg/L ( $\mu\text{g/mL}$ ) which, under strictly controlled *in vitro* conditions, completely prevents visible growth of the test strain of an organism [110]. The fractional inhibitory concentration (FIC) index is commonly used to determine the interaction of the two agents in combination, ranging from 0.5 to 4. The parameter may indicate: (i) full synergy ( $\text{FIC} \leq 0.5$ ), (ii) partial synergy ( $0.5 \leq \text{FIC} \leq 0.75$ ), (iii) additive effects ( $0.75 \leq \text{FIC} \leq 1.0$ ), (iv) indifferent effects ( $1.0 \leq \text{FIC} \leq 2.0$ ) and (v) antagonistic effects ( $\text{FIC} \geq 2.0$ ) [111]. Systematic review can highlight methodological concerns in research studies that can be used to improve future work in the topic area [112]. In this case, attention should be drawn to the fact that the possibility of synergistic action should be investigated in each included study. In only one [74] of the forty-five studies found in this review, was there an attempt to establish an FIC index. The literature describes a variety of methods for assessing antimicrobial synergy in laboratory conditions. Checkerboard assays and e-tests to evaluate synergy are some examples of these tests [113]. As mentioned above, using the checkerboard method, it is possible to determine the fractional inhibitory concentration (FIC) index. There is one primary disadvantage to the checkerboard assay, which is that it can only examine two antimicrobials simultaneously. On the other hand, the multiple combination bactericidal test (MCBT) allows the evaluation of up to four antimicrobial combinations at a time [113]. It is suspected that the lack of an appropriate parameter to examine this synergism in most of the included studies may be due to the fact that the synergism may have arisen completely by chance because it was not the original intention of the authors. In addition, methods that study synergism, such as FIC or MCBT, are not widespread among studies relating to the use of antimicrobial agents of bacterial origin in the food system. These methods are found more frequently in the study of drugs, especially antibiotics [114].

In the included studies, the effect of preventing the development of foodborne pathogens and spoilage bacteria was obtained in the majority of the cases. Thus, the results indicate that microbial hurdles in combination may find application in the meat industry as one of the biopreservation techniques. However, the combination of microbial hurdles was not always compared with these agents used separately. Thus, it is difficult to say unequivocally whether the synergism effect has occurred, and to what extent. According to [30–33,35–53,55,57,59,60,62,63,65–67,69–74], the combination of microbial hurdles predominantly enhanced the antimicrobial effect. However, there is a need for further investigation of the mechanism that caused those combinations. According to Liu et al. (2022), the efficiency of bacteriocins, as well as other antimicrobials, can be reduced by the action of the real food matrix complex, which in turn protects foodborne pathogens and spoilage bacteria [15]. Understanding the interactions and mechanisms between microbial hurdles could help find more precise and optimal approaches for overcoming these challenges. Interestingly, no antagonistic effect was observed in any of the included studies, i.e., biopreservative agents used in various combinations did not annihilate each other. A summarizing of the synergistic effects of applied solutions is presented on Figure 2.



**Figure 2.** Starter cultures, non-starter protective cultures, or other microbial metabolites can be applied in diverse combinations to meat to gain advantages related mainly to foodborne pathogens and spoilage bacteria inhibition (primary benefit) and lowering the dosage of antimicrobial agents (secondary benefit). Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com) (accessed on 27 February 2023).

In the case of starter cultures, it often happens that they are used together in mixtures of different strains and/or species. A combination of starter cultures seems to have a greater inhibitory effect on foodborne pathogens and spoilage bacteria, probably due to the rapid decrease in pH value. Fast acidification and growth of starter cultures are desirable to minimize the risk of spoilage and process failure.

Other types of natural antimicrobials that can be used for biopreservation are non-starter protective cultures, which are microorganism cultures that can inhibit the growth of pathogens or spoilage microbiota without changing the sensory, nutritional, and technological properties of food. The combination of protective cultures exerts its antimicrobial effects in various ways, including by competing for resources and generating antagonistic compounds (e.g., bacteriocins and organic acids).

Currently, the mechanism of action of bacteriocins is primarily envisaged in terms of disrupting the cytoplasmic membrane by causing pores or degrading the cell wall. Yet, the mechanism of action of bacteriocins, particularly those that act against Gram-negative bacteria, is still not fully understood [99]. For example, nisin has a limited antimicrobial effect on Gram-negative bacteria while exhibiting strong antimicrobial activity against an extensive range of Gram-positive foodborne pathogens. A pore is formed by nisin in the membrane of the target cell, resulting in the leakage of small molecules and abrupt cell death [15]. On the other hand, pediocin shows extremely strong inhibition activity against *L. monocytogenes* and acts similarly to nisin but the formation of pores is carried

out in a different manner [15]. In the case of enterocins, the matter is more complicated, because different enterocins can belong to completely different classes of bacteriocins. Thus, Liu et al. (2022) [15], for example, found that enterocin AS-48 exhibits its action by weakening the membrane to disrupt the bacterial electron transport system, thereby causing cell death. Concurrently, other enterocins enable certain cations such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , or  $\text{H}^+$  to pass through the membranes of their targets [15]. Consequently, combining the two bacteriocins could be beneficial since their different modes of action might exhibit synergistic and complementary effects against the target microorganism.

A variety of secondary microbial metabolites with other microbial hurdles were also used as biopreservatives in included studies. Each of them may have a different mechanism of action, and act in combination with another agent to enhance its effect.

In most of the articles, bacterial cultures in the form of starter cultures and non-starter protective cultures were directly incorporated into meat products. Fresh or lyophilized agents were used in either case. Different methods of biopreservative agents' incorporation into meat products have been employed, ranging from direct addition to fresh meat batter and dipping methods to surface spraying on fresh or ready-to-eat products. Direct incorporation into meat was also used in cases where the antimicrobial effect of purified/semi-purified secondary microbial metabolites was assessed within combined microbial hurdles. Yet another way of applying biopreservatives can be through incorporation in an active packaging structure or microencapsulation but such solutions were not used in the studies included in this review. Nevertheless, such methods could be valuable alternatives to the direct application of biopreservatives to overcome the weaknesses associated with this technique, through preventing degradation during storage and gradual release of the antimicrobial agent, for example.

Combining the knowledge gathered in the included studies and the available research data, it is concluded that the mixture of microbial hurdles for meat biopreservation may have a potential synergistic effect (Figure 2), mainly through increased antimicrobial activity. The combination of microbial hurdles could induce a stronger antimicrobial effect, expand the spectrum of antibacterial action, and prevent the regrowth of foodborne pathogens and spoilage bacteria. Due to this effect, reduction of the dosage of antimicrobial agents used may be possible, for both microbial or also chemical additives. Fewer additives will reduce the chance of adverse effects such as toxicity or unacceptable sensory properties of meat products caused by their high number or concentration. It will also allow for cost savings in food biopreservation. The approaches presented here thus qualify as an energy-saving and environment-friendly operation.

## 5. Conclusions

The review aimed to find the answers to three questions/problems, which were identified at the beginning of the work. Firstly, a positive effect of using a combination of various bacterial antimicrobials in inhibiting the growth of pathogenic and spoilage bacteria in meat products was shown in the majority of included studies. Secondly, the main mechanisms of action and/or compounds with the potential to be used in biopreservation have not been clearly identified and require further investigation. Modern proteomic, genomic, and transcriptomic tools may prove to be a great help in discovering the basic mechanisms behind the combined effect of various microbial hurdles. Although the use of various starter or bioprotective cultures in combination is not a new antimicrobial approach, as they have a long history of combined use, it is still necessary to seek to understand the mechanism behind such combined antimicrobial action, because it is not simply the sum of the effects of two separate factors. Thirdly, the application of the discussed solutions in the meat products industry is possible. Biopreservation is one of the most dynamically developing sustainable and promising approaches to enhance food safety, in particular, because it allows for reduction in or elimination of the use of chemical preservatives in food processing. However, the methods and doses of applications should be individually determined. This requires optimization and approvals from the authorities.

To sum up, there has been an increase in consumer demand for “clean label” products over the past few years. Microbial cultures and their bioactive metabolites used in various combinations are promising candidates as green and innovative strategies, providing several benefits—inhibition of food spoilage, minimizing food safety risk, satisfying the consumers, and maintaining economic and environmental resources, that can lead to a sustainable food industry, especially for meat and meat products.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K., P.S. and D.Z.; methodology, M.K.; investigation, M.K.; resources, M.K.; data curation, M.K.; validation, P.S. and D.Z.; writing—original draft preparation, M.K.; writing—review and editing, M.K., P.S. and D.Z.; visualization, M.K.; supervision, P.S. and D.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

AU, arbitrary units; BAs, biogenic amines; BLIS, bacteriocin-like inhibitory substance; CFS, cell-free supernatant; CFU, colony-forming unit; CNS, coagulase-negative staphylococci; EFSA, European Food Safety Authority; FDA, U.S. Food and Drug Administration; FIC, fractional inhibitory concentration; GRAS, generally recognized as safe; IU, international unit; LAB, lactic acid bacteria; MCBT, multiple combination bactericidal test; MIC, minimum inhibitory concentration; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; PgAFP, *Penicillium chrysogenum* antifungal protein; QPS, qualified presumption of safety; SLP, surface layer protein; STEC, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; TVC, total viable count; WHO, World Health Organization.

## References

1. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2022**, *20*, e07666. [CrossRef]
2. Centers for Disease Control and Prevention. Summary of Possible Multistate Enteric (Intestinal) Disease Outbreaks in 2017–2020. Available online: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/annual-summaries/annual-summaries-2017-2020.html> (accessed on 27 February 2023).
3. Bohrer, B.M. Review: Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *65*, 103–112. [CrossRef]
4. Doulgeraki, A.I.; Ercolini, D.; Villani, F.; Nychas, G.-J.E. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 130–141. [CrossRef] [PubMed]
5. Olmedilla-Alonso, B.; Jiménez-Colmenero, F.; Sánchez-Muniz, F.J. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Sci.* **2013**, *95*, 919–930. [CrossRef] [PubMed]
6. Gardini, F.; Özogul, Y.; Suzzi, G.; Tabanelli, G.; Özogul, F. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1218. [CrossRef] [PubMed]
7. Ockerman, H.W.; Basu, L. Preservation Methods of Animal Products. In *Encyclopedia of Meat Sciences*; Elsevier: London, UK, 2014; pp. 78–83.
8. Mani-López, E.; Palou, E.; López-Malo, A. Biopreservatives as Agents to Prevent Food Spoilage. In *Microbial Contamination and Food Degradation*; Elsevier: London, UK, 2018; pp. 235–270.
9. Barcenilla, C.; Ducic, M.; López, M.; Prieto, M.; Álvarez-Ordóñez, A. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Sci.* **2022**, *183*, 108661. [CrossRef] [PubMed]
10. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.M.A.P.; Harris, H.M.B.; Mattarelli, P.; O’Toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 2782–2858. [CrossRef] [PubMed]
11. Singh, V.P. Recent approaches in food bio-preservation—A review. *Open Vet. J.* **2018**, *8*, 104–111. [CrossRef]
12. U.S. Food and Drug Administration. Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). Available online: <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list> (accessed on 26 February 2023).

13. European Food Safety Authority. Management Board Members; Executive Director; Operational Management. Qualified Presumption of Safety (QPS). Available online: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps> (accessed on 26 February 2023).
14. Mukhopadhyay, S.; Gorris, L.G.M. Hurdle Technology. In *Encyclopedia of Food Microbiology*; Elsevier: London, UK, 2014; pp. 221–227.
15. Liu, G.; Nie, R.; Liu, Y.; Mehmood, A. Combined antimicrobial effect of bacteriocins with other hurdles of physicochemical and microbiome to prolong shelf life of food: A review. *Sci. Total Environ.* **2022**, *825*, 154058. [[CrossRef](#)]
16. Gragg, S.; Brashears, M. Microbiological Safety of Meat | Hurdle Technology. In *Encyclopedia of Meat Sciences*; Elsevier: London, UK, 2014; pp. 345–347. [[CrossRef](#)]
17. Ben Braïek, O.; Smaoui, S. Chemistry, Safety, and Challenges of the Use of Organic Acids and Their Derivative Salts in Meat Preservation. *J. Food Qual.* **2021**, *2021*, 6653190. [[CrossRef](#)]
18. Danielski, G.M.; Evangelista, A.G.; Luciano, F.B.; de Macedo, R.E.F. Non-conventional cultures and metabolism-derived compounds for bioprotection of meat and meat products: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 1105–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Laranjo, M.; Potes, M.E.; Elias, M. Role of Starter Cultures on the Safety of Fermented Meat Products. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 853. [[CrossRef](#)]
20. Martín, I.; Rodríguez, A.; Delgado, J.; Córdoba, J.J. Strategies for Biocontrol of *Listeria monocytogenes* Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites in Ready-to-Eat Meat- and Dairy-Ripened Products. *Foods* **2022**, *11*, 542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Rosario, D.K.A.; Rodrigues, B.L.; Bernardes, P.C.; Conte-Junior, C.A. Principles and applications of non-thermal technologies and alternative chemical compounds in meat and fish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 1163–1183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Silva, F.; Domingues, F.C.; Nerín, C. Trends in microbial control techniques for poultry products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 591–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Young, I.; Wilhelm, B.J.; Cahill, S.; Nakagawa, R.; Desmarchelier, P.; Rajić, A. A Rapid Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Slaughter and Processing Interventions to Control Nontyphoidal Salmonella in Beef and Pork. *J. Food Prot.* **2016**, *79*, 2196–2210. [[CrossRef](#)]
24. Yu, H.H.; Chin, Y.-W.; Paik, H.-D. Application of Natural Preservatives for Meat and Meat Products against Food-Borne Pathogens and Spoilage Bacteria: A Review. *Foods* **2021**, *10*, 2418. [[CrossRef](#)]
25. Collaboration for Environmental Evidence. CEE Critical Appraisal Tool—Environmental Evidence. Available online: <https://environmentalevidence.org/cee-critical-appraisal-tool/> (accessed on 26 February 2023).
26. Methley, A.M.; Campbell, S.; Chew-Graham, C.; McNally, R.; Cheraghi-Sohi, S. PICO, PICOS and SPIDER: A comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. *BMC Health Serv. Res.* **2014**, *14*, 579. [[CrossRef](#)]
27. Sato, H.; Kawaguti, H. (Eds.) Biotechnological Production of Organic Acids. In *Biotechnological Production of Natural Ingredients for Food Industry*; Bentham Science Publishers: Sharjah, United Arab Emirates, 2016; pp. 164–206.
28. Bramer, W.M.; De Jonge, G.B.; Rethlefsen, M.L.; Mast, F.; Kleijnen, J. A systematic approach to searching: An efficient and complete method to develop literature searches. *J. Med. Libr. Assoc.* **2018**, *106*, 531–541. [[CrossRef](#)]
29. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Akl, E.A.; Brennan, S.E.; et al. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *BMJ* **2021**, *372*, n71. [[CrossRef](#)]
30. Bonomo, M.G.; Ricciardi, A.; Salzano, G. Influence of autochthonous starter cultures on microbial dynamics and chemical-physical features of traditional fermented sausages of Basilicata region. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 137–146. [[CrossRef](#)]
31. Casaburi, A.; Aristoy, M.-C.; Cavella, S.; DI Monaco, R.; Ercolini, D.; Toldrá, F.; Villani, F. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Sci.* **2007**, *76*, 295–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Casquete, R.; Benito, M.J.; Martín, A.; Ruiz-Moyano, S.; Aranda, E.; Córdoba, M.D.G. Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. *Food Control* **2012**, *24*, 191–198. [[CrossRef](#)]
33. Chen, X.; Mi, R.; Qi, B.; Xiong, S.; Li, J.; Qu, C.; Qiao, X.; Chen, W.; Wang, S. Effect of proteolytic starter culture isolated from Chinese Dong fermented pork (Nanx Wudl) on microbiological, biochemical and organoleptic attributes in dry fermented sausages. *Food Sci. Hum. Wellness* **2021**, *10*, 13–22. [[CrossRef](#)]
34. Du, S.; Cheng, H.; Ma, J.-K.; Li, Z.-J.; Wang, C.-H.; Wang, Y.-L. Effect of starter culture on microbiological, physicochemical and nutrition quality of Xiangxi sausage. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 811–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Frece, J.; Kovačević, D.; Kazazić, S.; Mrvčić, J.; Vahčić, N.; Ježek, D.; Hruškar, M.; Babić, I.; Markov, K. Comparison of Sensory Properties, Shelf-Life and Microbiological Safety of Industrial Sausages Produced with Autochthonous and Commercial Starter Cultures. *Food Technol. Biotechnol.* **2014**, *52*, 307–316.
36. Iacumin, L.; Cappellari, G.; Colautti, A.; Comi, G. *Listeria monocytogenes* Survey in Cubed Cooked Ham Packaged in Modified Atmosphere and Bioprotective Effect of Selected Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms* **2020**, *8*, 898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kaban, G.; Kaya, M. Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. *Food Control* **2006**, *17*, 797–801. [[CrossRef](#)]

38. Lahti, E.T.; Johansson, T.; Honkanen-Buzalski, T.; Hill, P.; Nurmi, E. Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiol.* **2001**, *18*, 75–85. [CrossRef]
39. Lee, S.Y.; Lee, D.Y.; Kim, O.Y.; Hur, S.J. Analysis for change in microbial contents in five mixed Kimchi starter culture and commercial lactic acid bacterial-fermented sausages and biological hazard in manufacturing facilities. *Food Sci. Biotechnol.* **2018**, *28*, 787–794. [CrossRef]
40. Mafra, J.F.; Cruz, A.I.C.; de Santana, T.S.; Ferreira, M.A.; Araújo, F.M.; Evangelista-Barreto, N.S. Probiotic characterization of a commercial starter culture used in the fermentation of sausages. *Food Sci. Technol.* **2021**, *41*, 240–246. [CrossRef]
41. Muthukumarasamy, P.; Holley, R.A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 82–88. [CrossRef] [PubMed]
42. Najjari, A.; Boumaiza, M.; Jaballah, S.; Boudabous, A.; Ouzari, H. Application of isolated *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* strains as a probiotic starter culture during the industrial manufacture of Tunisian dry-fermented sausages. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 4172–4184. [CrossRef]
43. Olaoye, O.A.; Onilude, A.A. Investigation on the potential application of biological agents in the extension of shelf life of fresh beef in Nigeria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 1445–1454. [CrossRef]
44. Olaoye, O.A.; Onilude, A.A.; Idowu, O.A. Microbiological Profile of Goat Meat Inoculated with Lactic Acid Bacteria Cultures and Stored at 30 °C for 7 days. *Food Bioprocess Technol.* **2011**, *4*, 312–319. [CrossRef]
45. Olaoye, O.; Onilude, A.; Ubbor, S.C. Control of *Brochothrix thermosphacta* in Pork Meat Using *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I23 Isolated from Beef. *Appl. Food Biotechnol.* **2015**, *2*, 49–55. [CrossRef]
46. Pavli, F.G.; Argyri, A.A.; Chorianopoulos, N.G.; Nychas, G.-J.E.; Tassou, C.C. Effect of *Lactobacillus plantarum* L125 strain with probiotic potential on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of dry-fermented sausages. *Lebenson. Wiss. Technol.* **2020**, *118*, 108810. [CrossRef]
47. Pidcock, K.; Heard, G.; Henriksson, A. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *76*, 75–81. [CrossRef]
48. Sun, Q.; Chen, Q.; Li, F.; Zheng, D.; Kong, B. Biogenic amine inhibition and quality protection of Harbin dry sausages by inoculation with *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* **2016**, *68*, 358–366. [CrossRef]
49. Sun, Q.; Sun, F.; Zheng, D.; Kong, B.; Liu, Q. Complex starter culture combined with vacuum packaging reduces biogenic amine formation and delays the quality deterioration of dry sausage during storage. *Food Control* **2019**, *100*, 58–66. [CrossRef]
50. Szymański, P.; Łaszkiewicz, B.; Kern-Jędrychowska, A.; Siekierko, U.; Kołożyn-Krajewska, D. The Use of the Mixed Bacteria *Limosilactobacillus fermentum* and *Staphylococcus carnosus* in the Meat Curing Process with a Reduced Amount of Sodium Nitrite. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 904. [CrossRef]
51. Vatanyoopaisarn, S.; Prapatsornwattana, K. Potential use of lactic acid bacteria with bacteriocin-like activity against *Staphylococcus aureus* as dual starter cultures in Thai fermented sausage “Sai Krok Prew”. *Int. Food Res. J.* **2011**, *18*, 697–704. Available online: [http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(02\)%202011/\(32\)%20IFRJ-2010-238.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(02)%202011/(32)%20IFRJ-2010-238.pdf) (accessed on 23 July 2022).
52. Xiao, Y.; Liu, Y.; Chen, C.; Xie, T.; Li, P. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* on flavour development and bacterial communities in Chinese dry fermented sausages. *Food Res. Int.* **2020**, *135*, 109247. [CrossRef] [PubMed]
53. Zhao, L.; Jin, Y.; Ma, C.; Song, H.; Li, H.; Wang, Z.; Xiao, S. Physico-chemical characteristics and free fatty acid composition of dry fermented mutton sausages as affected by the use of various combinations of starter cultures and spices. *Meat Sci.* **2011**, *88*, 761–766. [CrossRef] [PubMed]
54. Amézquita, A.; Brashears, M.M. Competitive Inhibition of *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products by Lactic Acid Bacteria. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 316–325. [CrossRef]
55. Castellano, P.; Belfiore, C.; Vignolo, G. Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties. *Food Control* **2011**, *22*, 1461–1465. [CrossRef]
56. Chaillou, S.; Christieans, S.; Rivollier, M.; Lucquin, I.; Champomier-Vergès, M.; Zagorec, M. Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Sci.* **2014**, *97*, 332–338. [CrossRef]
57. Dortu, C.; Huch, M.; Holzapfel, W.; Franz, C.; Thonart, P. Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Let. Appl. Microbiol.* **2008**, *47*, 581–586. [CrossRef]
58. Gargi, A.; Sengun, I.Y. Marination liquids enriched with probiotics and their inactivation effects against food-borne pathogens inoculated on meat. *Meat Sci.* **2021**, *182*, 108624. [CrossRef]
59. Incili, G.K.; Karatepe, P.; Akgöl, M.; Güngören, A.; Koluman, A.; Ilhak, O.I.; Kanmaz, H.; Kaya, B.; Hayaloğlu, A.A. Characterization of lactic acid bacteria postbiotics, evaluation in-vitro antibacterial effect, microbial and chemical quality on chicken drumsticks. *Food Microbiol.* **2022**, *104*, 104001. [CrossRef]
60. Jones, R.; Wiklund, E.; Zagorec, M.; Tagg, J. Evaluation of stored lamb bio-preserved using a three-strain cocktail of *Lactobacillus sakei*. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 955–959. [CrossRef] [PubMed]
61. Katikou, P.; Ambrosiadis, I.; Georgantelis, D.; Koidis, P.; Georgakis, S. Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances’ producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 1303–1313. [CrossRef]
62. Koo, O.-K.; Eggleton, M.; O’Byrne, C.A.; Crandall, P.G.; Ricke, S.C. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on frankfurters formulated with and without lactate/diacetate. *Meat Sci.* **2012**, *92*, 533–537. [CrossRef]

63. Segli, F.; Melian, C.; Muñoz, V.; Vignolo, G.; Castellano, P. Bioprotective extracts from *Lactobacillus acidophilus* CRL641 and *Latilactobacillus curvatus* CRL705 inhibit a spoilage exopolysaccharide producer in a refrigerated meat system. *Food Microbiol.* **2021**, *97*, 103739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Segli, F.; Melian, C.; Vignolo, G.; Castellano, P. Inhibition of a spoilage exopolysaccharide producer by bioprotective extracts from *Lactobacillus acidophilus* CRL641 and *Latilactobacillus curvatus* CRL705 in vacuum-packaged refrigerated meat discs. *Meat Sci.* **2021**, *178*, 108509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Xu, M.M.; Kaur, M.; Pillidge, C.J.; Torley, P.J. Evaluation of the potential of protective cultures to extend the microbial shelf-life of chilled lamb meat. *Meat Sci.* **2021**, *181*, 108613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Xu, M.M.; Kaur, M.; Pillidge, C.J.; Torley, P.J. Culture-Dependent and Culture-Independent Evaluation of the Effect of Protective Cultures on Spoilage-Related Bacteria in Vacuum-Packaged Beef Mince. *Food Bioprocess Technol.* **2023**, *16*, 382–394. [[CrossRef](#)]
67. Gao, Y.; Li, D.; Liu, X. Effects of *Lactobacillus sakei* C2 and sakacin C2 individually or in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*, chemical and odor changes of vacuum-packed sliced cooked ham. *Food Control* **2015**, *47*, 27–31. [[CrossRef](#)]
68. Azevedo, P.O.D.S.D.; Converti, A.; Gierus, M.; Oliveira, R.P.D.S. Application of nisin as biopreservative of pork meat by dipping and spraying methods. *Braz. J. Microbiol.* **2019**, *50*, 523–526. [[CrossRef](#)]
69. Delgado, J.; Rodríguez, A.; García, A.; Núñez, F.; Asensio, M.A. Inhibitory Effect of PgAFP and Protective Cultures on *Aspergillus parasiticus* Growth and Aflatoxins Production on Dry-Fermented Sausage and Cheese. *Microorganisms* **2018**, *6*, 69. [[CrossRef](#)]
70. Castellano, P.; Peña, N.; Ibarreche, M.P.; Carduza, F.; Soteras, T.; Vignolo, G. Antilisterial efficacy of *Lactobacillus bacteriocins* and organic acids on frankfurters. Impact on sensory characteristics. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 689–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Vignolo, G.; Palacios, J.; Farías, M.E.; Sesma, F.; Schillinger, U.; Holzapfel, W.; Oliver, G. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* **2000**, *41*, 410–416. [[CrossRef](#)]
72. Sant’Anna, V.; Quadros, D.A.; Motta, A.S.; Brandelli, A. Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. *Braz. J. Microbiol.* **2013**, *44*, 1163–1167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Sun, Z.; Li, P.; Liu, F.; Bian, H.; Wang, D.; Wang, X.; Zou, Y.; Sun, C.; Xu, W. Synergistic antibacterial mechanism of the *Lactobacillus crispatus* surface layer protein and nisin on *Staphylococcus saprophyticus*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zhang, L.; Ben Said, L.; Diarra, M.S.; Fliss, I. Inhibitory Activity of Natural Synergetic Antimicrobial Consortia against *Salmonella enterica* on Broiler Chicken Carcasses. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 656956. [[CrossRef](#)]
75. García-Diez, J.; Saraiva, C. Use of Starter Cultures in Foods from Animal Origin to Improve Their Safety. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2544. [[CrossRef](#)]
76. Vignolo, G.; Fontana, C.; Fadda, S. Semidry and Dry Fermented Sausages. In *Handbook of Meat Processing*; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2010; pp. 379–398.
77. Krockel, L. The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products. In *Lactic Acid Bacteria—R & D for Food, Health and Livestock Purposes*; Kongo, M., Ed.; InTech: London, UK, 2013. [[CrossRef](#)]
78. Laranjo, M.; Elias, M.; Fraqueza, M.J. The Use of Starter Cultures in Traditional Meat Products. *J. Food Qual.* **2017**, *2017*, 9546026. [[CrossRef](#)]
79. Landeta, G.; Curiel, J.A.; Carrascosa, A.V.; Muñoz, R.; de Las Rivas, B. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat Sci.* **2013**, *93*, 387–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Flores, M.; Toldrá, F. Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 81–90. [[CrossRef](#)]
81. Shiling, L.; Xianna, H.; Yanbin, Y.; Baokun, L.; Chengjian, X.; Qingling, W. Proteolytic effect of starter culture during ripening of smoked horse sausage. *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, *26*, 1363–1369. [[CrossRef](#)]
82. Stavropoulou, D.A.; De Maere, H.; Berardo, A.; Janssens, B.; Filippou, P.; De Vuyst, L.; De Smet, S.; Leroy, F. Species Pervasiveness within the Group of Coagulase-Negative Staphylococci Associated with Meat Fermentation Is Modulated by pH. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Moradi, M.; Mardani, K.; Tajik, H. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus* spp. on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. *Lebenson. Wiss. Technol.* **2019**, *111*, 457–464. [[CrossRef](#)]
84. Hartmann, H.A.; Wilke, T.; Erdmann, R. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *146*, 192–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Prudêncio, C.V.; dos Santos, M.T.; Vanetti, M.C.D. Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: Relevance in food microbiology. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 5408–5417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Landete, J.M. A review of food-grade vectors in lactic acid bacteria: From the laboratory to their application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *37*, 296–308. [[CrossRef](#)]
87. Salminen, S.; Collado, M.C.; Endo, A.; Hill, C.; Lebeer, S.; Quigley, E.M.M.; Sanders, M.E.; Shamir, R.; Swann, J.R.; Szajewska, H.; et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *18*, 649–667. [[CrossRef](#)]
88. Hernández-Granados, M.J.; Franco-Robles, E. Postbiotics in human health: Possible new functional ingredients? *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109660. [[CrossRef](#)]
89. Moradi, M.; Kousheh, S.A.; Almasi, H.; Alizadeh, A.; Guimarães, J.T.; Yılmaz, N.; Lotfi, A. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 3390–3415. [[CrossRef](#)]
90. Cotter, P.D.; Ross, R.; Hill, C. Bacteriocins—A viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *11*, 95–105. [[CrossRef](#)]

91. Yang, E.; Fan, L.; Jiang, Y.; Doucette, C.; Fillmore, S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express* **2012**, *2*, 48. [[CrossRef](#)]
92. Dicks, L.M.T.; Dreyer, L.; Smith, C.; Van Staden, A.D. A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut–Blood Barrier? *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2297. [[CrossRef](#)]
93. O'Connor, P.M.; Kuniyoshi, T.M.; Oliveira, R.P.; Hill, C.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2020**, *61*, 160–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Cox, C.R.; Coburn, P.S.; Gilmore, M.S. Enterococcal Cytolysin: A Novel Two Component Peptide System that Serves as a Bacterial Defense against Eukaryotic and Prokaryotic Cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2005**, *6*, 77–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Ben Omar, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *120*, 51–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Holley, R.; Cordeiro, R. Microbiological Safety of Meat | *Listeria monocytogenes*. In *Encyclopedia of Meat Sciences*; Elsevier: London, UK, 2014; pp. 348–356. [[CrossRef](#)]
97. Leite, J.A.; Tulini, F.L.; dos Reis-Teixeira, F.B.; Rabinovitch, L.; Chaves, J.Q.; Rosa, N.G.; Cabral, H.; De Martinis, E.C.P. Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bacillus cereus*: Preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for inhibiting *Listeria monocytogenes* in pineapple pulp. *Lebenson. Wiss. Technol.* **2016**, *72*, 261–266. [[CrossRef](#)]
98. Bizani, D.; Morrissy, J.A.; Dominguez, A.P.; Brandelli, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *121*, 229–233. [[CrossRef](#)]
99. Pérez-Ramos, A.; Madi-Moussa, D.; Coucheney, F.; Drider, D. Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2107. [[CrossRef](#)]
100. Figueiredo, A.C.L.; Almeida, R.C. Antibacterial efficacy of nisin, bacteriophage P100 and sodium lactate against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat sliced pork ham. *Braz. J. Microbiol.* **2017**, *48*, 724–729. [[CrossRef](#)]
101. Kaur, G.; Singh, T.P.; Malik, R.K.; Bhardwaj, A.; De, S. Antibacterial efficacy of nisin, pediocin 34 and enterocin FH99 against *L. monocytogenes*, *E. faecium* and *E. faecalis* and bacteriocin cross resistance and antibiotic susceptibility of their bacteriocin resistant variants. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 233–244. [[CrossRef](#)]
102. Asare, P.T.; Zurfluh, K.; Greppi, A.; Lynch, D.; Schwab, C.; Stephan, R.; Lacroix, C. Reuterin Demonstrates Potent Antimicrobial Activity against a Broad Panel of Human and Poultry Meat *Campylobacter* spp. Isolates. *Microorganisms* **2020**, *8*, 78. [[CrossRef](#)]
103. Schaefer, L.; Auchtung, T.; Hermans, K.E.; Whitehead, D.; Borhan, B.; Britton, R.A. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* **2010**, *156*, 1589–1599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Pum, D.; Toca-Herrera, J.L.; Sleytr, U.B. S-Layer Protein Self-Assembly. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 2484–2501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Klotz, C.; Goh, Y.J.; O'Flaherty, S.; Barrangou, R. S-layer associated proteins contribute to the adhesive and immunomodulatory properties of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 248. [[CrossRef](#)]
106. Meng, J.; Gao, S.-M.; Zhang, Q.-X.; Lu, R.-R. Murein hydrolase activity of surface layer proteins from *Lactobacillus acidophilus* against *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *79*, 527–532. [[CrossRef](#)]
107. Rodríguez-Martín, A.; Acosta, R.; Liddell, S.; Núñez, F.; Benito, M.J.; Asensio, M.A. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides* **2010**, *31*, 541–547. [[CrossRef](#)]
108. Delgado, J.; Owens, R.A.; Doyle, S.; Núñez, F.; Asensio, M.A. Quantitative proteomics reveals new insights into calcium-mediated resistance mechanisms in *Aspergillus flavus* against the antifungal protein PgAFP in cheese. *Food Microbiol.* **2017**, *66*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Núñez, F.; Lara, M.S.; Peromingo, B.; Delgado, J.; Sánchez-Montero, L.; Andrade, M.J. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 114–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Kowalska-Krochmal, B.; Dudek-Wicher, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens* **2021**, *10*, 165. [[CrossRef](#)]
111. Orhan, G.; Bayram, A.; Zer, Y.; Balci, I. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 140–143. [[CrossRef](#)]
112. Eagly, A.H.; Wood, W. Using Research Syntheses to Plan Future Research. In *The Handbook of Research Synthesis*; Russell Sage Foundation: New York, NY, USA, 1994; pp. 485–500.
113. Mathur, H.; Field, D.; Rea, M.C.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1205. [[CrossRef](#)]
114. Meletiadis, J.; Pournaras, S.; Roilides, E.; Walsh, T.J. Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and In Vitro-In Vivo Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 602–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



# Novel synergistic combination of lactic acid and acetic acid bacteria cell-free extracts for enhanced food biopreservation

Marcelina Karbowiak<sup>1,A-F</sup>✉, Marcin Kruk<sup>1,B-C</sup>, Piotr Szymański<sup>2,A,F</sup>,  
Dorota Zielińska<sup>1,A,E-F</sup>✉

<sup>1</sup> Institute of Human Nutrition Sciences, University of Life Sciences, Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Department of Meat and Fat Technology, Waclaw Dąbrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology – State Research Institute, Warsaw, Poland

A – Research concept and design, B – Collection and/or assembly of data, C – Data analysis and interpretation, D – Writing the article, E – Critical revision of the article, F – Final approval of the article

Karbowiak M, Kruk M, Szymański P, Zielińska D. Novel synergistic combination of lactic acid and acetic acid bacteria cell-free extracts for enhanced food biopreservation. *Ann Agric Environ Med*. doi:10.26444/aaem/214500

## Abstract

**Introduction and Objective.** The aim of the study is to evaluate the synergistic biopreservative potential of cell-free extracts (CFEs) obtained from lactic acid bacteria (LAB: *Lactocaseibacillus paracasei* B1, *Lactiplantibacillus plantarum* O24) and acetic acid bacteria (AAB: *Gluconobacter oxydans* KNS32, *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1), and to assess their antimicrobial, antioxidant, and overall combined efficacy in food preservation.

**Materials and Method.** CFEs were analysed for organic acid and polyphenol content, and tested for antioxidant capacity using DPPH and ABTS assays. Antimicrobial activity was assessed by agar well-diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) assays against Gram-positive and Gram-negative indicator strains. Synergistic effects were evaluated by checkerboard microdilution. The combinations were applied to chicken meat inoculated with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis and stored for 7 days at 37 °C and 4 °C.

**Results.** LAB CFEs contained lactic, gluconic, and acetic acids, whereas AAB CFEs contained gluconic, acetic, and citric acids. MIC values ranged from 3.1 – 100 AU/mL, and several LAB–AAB combinations exhibited synergistic antibacterial activity. In the chicken model, CFEs reduced *S. Enteritidis* counts below the detection limit, and decreased total viable counts by more than 1 log CFU/g after 7 days.

**Conclusions.** The synergistic combination of LAB and AAB CFEs exhibited strong antimicrobial and antioxidant activities, indicating high potential as natural, microbially derived preservatives for safe food biopreservation.

## Key words

antioxidants, lactic acid bacteria, food safety, acetic acid bacteria, hurdle technology, synergistic antibacterial activity, microbial-derived preservatives

## INTRODUCTION

Despite the progress made in the food industry in recent years, some food-borne pathogens continue to pose significant public health challenges on a local, national, and international scale. In the European Union (EU), 77,486 salmonellosis cases were reported in 2023, corresponding to an EU notification rate of 18.0 cases per 100,000 people. This resulted in the highest number of hospitalizations (14,801 cases) among reported food-borne gastrointestinal infections [1]. On the other hand, increasing consumer health awareness and demand for safer and more natural food preservatives make new alternatives urgently necessary and desirable [2]. Biopreservation strategies align with these market trends by utilizing naturally derived antimicrobials. While much of the research has focused on microbial interactions and their inhibitory effects on spoilage and pathogenic bacteria, recent advancements have expanded to include novel bioprotective cultures, bacteriophages, postbiotics, organic acids, and

plant-derived compounds, all of which are gaining significant attention for their potential in food preservation [3].

Bacterial preparations refer to biologically active substances derived from microbial cultures commonly used for their antimicrobial, antioxidant, and preservative properties. These preparations can include cell-free supernatants, heat-killed bacterial cells, and neutralized supernatants, each exhibiting distinct bioactive profiles [4]. The supernatant is obtained by culturing bacteria in a nutrient medium, followed by centrifugation or filtration to remove the cells, leaving behind a liquid fraction rich in antimicrobial metabolites, such as organic acids, bacteriocins, and enzymes [5]. Unlike postbiotics, which are defined as preparations of inanimate microorganisms and/or their components that confer a health benefit on the host [6, 7], bacterial preparations may not necessarily contain inactivated cells, but instead, focus on extracellular metabolites with antimicrobial potential. Their application in biopreservation is particularly valuable as they offer a natural and sustainable alternative to synthetic preservatives, helping to inhibit foodborne pathogens, reduce spoilage, and extend shelf life [8, 9].

Bacterial preparations are primarily produced by lactic acid bacteria (LAB), often considered probiotics due to their health benefits [10]. LAB-derived preparations are valued for

✉ Address for correspondence: Marcelina Karbowiak, Dorota Zielińska, Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland  
E-mail: marcelina\_karbowiak@sggw.edu.pl; dorota\_zielinska@sggw.edu.pl

Received: 06.10.2025; accepted: 20.11.2025; first published: 05.12.2025

their antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory effects, making them promising for food preservation and human health [11]. Their antimicrobial activity results from bioactive compounds, including organic acids (lactic and acetic), bacteriocins, hydrogen peroxide, and diacetyl, which inhibit pathogens by lowering the pH, disrupting cell membranes, or interfering with essential metabolic processes [12]. LAB-derived bacterial preparations exhibit strong inhibitory effects against various microorganisms, including food-borne pathogens, as well as psychrophilic bacteria, yeasts, and moulds responsible for food spoilage [8, 9]. Beyond antimicrobial activity, they enhance food stability and quality through antioxidant effects that prevent lipid oxidation, modulation of microbial communities to extend shelf life and maintain sensory properties, and potential immunomodulatory effects that support functional food applications [13–15].

Another group of microorganisms with promising health-promoting properties are acetic acid bacteria (AAB) [16, 17]. AAB are Gram-negative strict aerobes, capable of incompletely oxidizing carbon sources into corresponding organic compounds, such as ethanol to acetic acid [18]. Additionally, AAB are capable of producing polysaccharides, of which bacterial cellulose and levan are the most widespread, and synthesizing many pro-health organic acids and miglitol [17, 18]. Due to their unique properties, AAB are used in many branches of the food industry, i.e., Kombucha and vinegar production. The utilization of AAB preparations as a cocktail of antimicrobial substances to ensure the safety and quality of food remains poorly studied [17].

Despite the growing demand for natural biopreservatives in the food industry, many existing options face limitations in terms of efficacy, stability, and the spectrum of antimicrobial activity. Traditional biopreservatives, such as bacteriocins and organic acids from well-characterized lactic acid bacteria, are often strain-specific and may not provide broad protection against diverse food-borne pathogens and spoilage microorganisms [19]. Additionally, while LAB-derived antimicrobial compounds, including lactic acid, hydrogen peroxide and diacetyl, have demonstrated efficacy in various food systems, their performance can be influenced by food composition, storage conditions, and interactions with native microbiota [12]. Similarly, the potential of acetic acid bacteria in food preservation remains under-explored, particularly in terms of their compatibility with LAB-based approaches [20, 21]. Furthermore, most studies focus on single-strain applications, which may limit the overall robustness of biopreservation strategies [22]. Research exploring multi-strain or cross-genus interactions remains scarce, despite the potential for synergistic effects between different microbial groups to enhance antimicrobial efficacy and broaden the spectrum of inhibition [21, 23]. Addressing these limitations is crucial for advancing natural biopreservation methods that are both effective and adaptable across various food matrices.

To the best knowledge of the authors, no studies have investigated the antimicrobial effectiveness of combining LAB and AAB preparations. Previously, only pure lactic and acetic acids have been tested together for food preservation [24–27]. Lactic acid has well-established inhibitory effects on various food-borne pathogens, and acetic acid from AAB offers complementary antibacterial properties that potentially enhance overall bioprotective efficacy [28]. On the other hand, in a study by Xia et al. (2022) [29], *in situ*

and *in vitro* approaches were employed to investigate the interaction between LAB and AAB during the solid-state fermentation of cereal vinegar. However, research remains limited to the combined use of LAB and AAB metabolites, particularly in real food matrices. A key advantage of the cocktail over individual organic acids lies in its enhanced efficacy, resulting from a combination of diverse organic acids, bacteriocins, hydrogen peroxide, proteins, peptides, and other molecules [19, 29].

Inspired by the unique health benefits of Kombucha, which features a distinctive consortium of acetic acid bacteria and lactic acid bacteria, this study aimed to evaluate the antimicrobial effects of bacterial extracts derived from environmental strains of LAB – *Lactocaseibacillus paracasei* and *Lactiplantibacillus plantarum*), and AAB – *Gluconobacter oxydans* and *Komagataeibacter saccharivorans* for innovative food biopreservation. The assessment was conducted individually and in pairs through *in vitro* experiments and within a food matrix. Additionally, the study evaluated the polyphenol content, antioxidant potential, and organic acids content. To our knowledge, no previous research has examined the efficacy of combining bacterial extracts from environmental strains of LAB and AAB, neither *in vitro* nor within a food matrix.

## MATERIALS AND METHOD

**Origin of lactic acid and acetic acid bacteria.** Two strains of *Lactocaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 were selected. The *L. paracasei* B1 strain was isolated from the Polish regional sheep's milk cheese 'Bundz' (GenBank Accession Nos: CP161807 and CP161808). According to previous research, this strain exhibits selected *in vitro* probiotic effects, and its properties are protected by patent (Patent No. P.426002) [30]. The *Lactiplantibacillus plantarum* O24 strain was isolated from traditionally fermented cucumber dill pickles (GenBank Accession No: CP157747-CP157755); its selected *in vitro* probiotic properties have been described previously [30–32]. Strains were stored at -80 °C with 20% glycerol v/v in MRS broth (deMan, Rogosa, and Sharpe, Neogen, Lansing, MI, USA).

Two strains of acetic acid bacteria were used in this study. The strain *Gluconobacter oxydans* KNS32 was isolated from a local Kombucha beverage (GenBank Accession No: OQ597203). The potential postbiotic properties and *in vitro* anticancer activity of the supernatant obtained from this strain were previously described by Neffe-Skocińska et al. [20]. Local artisanal honey vinegar was utilized as the source of the strain *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1 (GenBank Accession No: OQ594827). The strains were stored at -80 °C with 20% glycerol (v/v) in GC broth (Glucose Calcium Carbonate), prepared according to Neffe-Skocińska et al. (2022) [33].

The bacterial strains are maintained in the internal collection of microorganisms at the Department of Food Gastronomy and Food Hygiene, Institute of Human Nutrition Sciences, at the University of Life Sciences in Warsaw, Poland.

**Indicator strains.** The following indicator strains were used for the evaluation of antimicrobial activity: *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis*

ATCC 51299 (Gram-positive), and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 (Gram-negative). The strains were stored in glycerol stocks at  $-80^{\circ}\text{C}$ . To revive the strains, each one was plated onto appropriate agar media: *Listeria monocytogenes* was streaked on PALCAM agar (LabM, Heywood, UK), *Staphylococcus aureus* on Baird-Parker egg yolk tellurite agar (Oxoid, Basingstoke, UK), *Bacillus spizizenii*, *Enterococcus faecalis*, and *Pseudomonas fluorescens* on Nutrient Agar (Oxoid, Basingstoke, UK), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis on XLD Agar (Oxoid, Basingstoke, UK), and *Escherichia coli* on TBX agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Plates were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for approximately 24 hours. After incubation, single colonies of each indicator strain were selected and transferred to Mueller-Hinton (MH) broth (Oxoid, Basingstoke, UK). The cultures were incubated aerobically at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24 hours, either with gentle shaking or in a stationary incubator, depending on the strain. Once growth reached the desired turbidity (early stationary phase), the cultures were standardized to an optical density of 0.1 at 600 nm to ensure consistent inoculum sizes for antimicrobial testing.

**Preparation of LAB and AAB cell-free extracts.** The LAB strains were grown anaerobically in fresh MRS broth (De Man, Rogosa, and Sharpe broth) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 16–18 h to achieve a final concentration of approximately  $1 \times 10^9$  CFU/mL. Anaerobic conditions were established by placing inoculated MRS broth tubes in anaerobic jars equipped with AnaeroGen™ sachets (Oxoid, Basingstoke, UK). Half of the LAB cultures were separated and placed in a water bath at  $80^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Next, both types of bacterial cultures (crude and heat-killed) were centrifuged at  $3341 \times g$  for 15 minutes (Eppendorf SE, Hamburg, Germany) to remove the bacterial cells. The supernatants were then sterilized using  $0.22 \mu\text{m}$  syringe filters (AlfaChem, Poznań, Poland). Part of the LAB cell-free crude extract was left with its original pH value. The neutralized cell-free extract was obtained by adding 1 M NaOH to adjust the pH to approximately  $6.0 \pm 0.2$ . This adjustment neutralizes the organic acids produced, eliminating their antagonistic effects. Finally, 3 types of LAB preparations were assembled: cell-free crude extract (CFE), cell-free extract of heat-killed cells (hkCFE), and neutralized cell-free extract (nCFE).

The AAB strains were cultured aerobically at  $28^{\circ}\text{C}$  for 48 h in Hestrin and Shramm (HS) ( $1-5 \times 10^7$  CFU/mL) composed of 2 g/L glucose w/v (Neogen, Lansing, MI, USA), 0.5 g/L casein peptone w/v (BTL, Łódź, Poland), 0.5 g/L yeast extract w/v (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), 0.27 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  w/v (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), and 0.15 g/L citric acid w/v (Merck Life Science, Darmstadt, Germany). Based on preliminary studies indicating that AAB extracts lose their antibacterial activity following thermal inactivation and pH neutralization, only one preparation, cell-free crude extract (CFE), was obtained for this group of microorganisms, following the methodology described above. Samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for a maximum period of 14 days for further analysis. Table 1 summarizes the abbreviations applied in this manuscript for the tested strains and their corresponding cell-free extracts (CFEs) variants.

**pH value, organic acids and sugar content of CFEs.** All analyzed samples were diluted 10 times in standard MilliQ

**Table 1.** Abbreviations for cell-free extracts (CFEs) used in the study and their variants

B1 CFE	Crude CFE from <i>L. paracasei</i> B1
B1 hkCFE	Heat-killed CFE from <i>L. paracasei</i> B1
B1 nCFE	Neutralized CFE from <i>L. paracasei</i> B1
O24 CFE	Crude CFE from <i>L. plantarum</i> O24
O24 hkCFE	Heat-killed CFE from <i>L. plantarum</i> O24
O24 nCFE	Neutralized CFE from <i>L. plantarum</i> O24
KNS32 CFE	CFE from <i>G. oxydans</i> KNS32
KOM1 CFE	CFE from <i>K. saccharivorans</i> KOM1

water and centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5804 R, Hamburg, Germany) ( $16,323 \times g$  for 5 min). After that, 1 mL of each sample was filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  syringe PES filter into the vials (qpore-Bionovo, Legnica, Poland). Organic acids and sugars were analyzed with an HPLC system (Shimadzu, USA Manufacturing Inc, USA, 2 LC-20AD pumps, a CBM-20A controller, a CTD-20AC oven, a SIL-20AC autosampler, a RID-10A detector, and a UV/Vis SPD-20AV detector). An Aminex HPX-87H column ( $300 \times 7.8 \text{ mm}$ , Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at  $40^{\circ}\text{C}$  with a flow rate of 0.5 mL/min, using a mobile phase of 10 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Poch, Gliwice, Poland), was used to separate the compounds. Quantification was based on the detection at a 210 nm wavelength using UV/Vis, RI, and external standard curves, with a range of  $0.12-40 \mu\text{g}$  per injection. Triplicate analyses were conducted. Orion Star™ A211 pH meter (Thermo Fisher Scientific, Newington, NH, USA) was used to measure all pH values.

**Total phenolic content (TPC).** Total phenolic content in samples was assessed using a colorimetric method with Folin-Ciocalteu reagent. Samples were diluted in MilliQ water (HPL 20UV; Hydrolab; Straszyn, Poland), then mixed with Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) and 7.5% w/v sodium carbonate solution (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) in a 96-well plate (NEST Biotechnology, Wuxi, China). The mixture was incubated at room temperature ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) in the dark for 30 minutes with shaking at  $300 \times g$ . Absorbance at 750 nm was then measured using a SpectraMax iD3 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Results were expressed as gallic acid equivalent (GAE) in mg/100 mL, with a conversion based on a standard curve ( $R^2 = 0.999$ ). Eight biological replicates were analyzed.

**ABTS•+ radical scavenging activity.** The antioxidant capacity was determined using the ABTS•+ radical cation. ABTS•+ (Merck Life Science, Darmstadt, Germany) was prepared by mixing 7 mM ABTS•+ stock solution with 2.45 mM potassium persulfate ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) solution (Merck Life Science, Darmstadt, Germany). The mixture was incubated in the dark at room temperature for 24 hours to allow the generation of ABTS•+ radicals. Before testing, the ABTS•+ solution was diluted with phosphate-buffered saline (PBS) (Merck Life Science, Darmstadt, Germany) to achieve an absorbance of  $0.7 \pm 0.02$  at 734 nm. Sample solutions were prepared by diluting them in MilliQ water, and 100  $\mu\text{L}$  of each sample was added to 100  $\mu\text{L}$  of ABTS•+ solution in a microplate well. The plate was incubated at room temperature for 6 minutes, with gentle shaking. The absorbance at 734 nm was then measured using a SpectraMax iD3 microplate

reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Results were expressed as ascorbic acid equivalent (VCEAC), calculated based on a standard curve ( $R^2 = 0.998$ ). A total of 8 biological replicates were analyzed.

**DPPH radical scavenging activity.** The DPPH method was used to assess antioxidant activity by measuring the reduction of DPPH radical (Merck Life Science, Darmstadt, Germany) to its non-radical form (DPPH-H). The DPPH stock solution was prepared by dissolving DPPH in methanol (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) to a concentration of 0.1 mM. The DPPH solution was then diluted with methanol to achieve an absorbance of  $1.1 \pm 0.05$  at 517 nm. For the assay, sample solutions were prepared by diluting them in MilliQ water, and 100  $\mu$ L of each sample was added to 100  $\mu$ L of the DPPH solution in a 96-well microplate. The plate was incubated at room temperature for 30 minutes in the dark, with gentle shaking. After incubation, the absorbance at 517 nm was measured using a SpectraMax iD3 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Results were expressed as ascorbic acid equivalent (VCEAC), based on a standard curve ( $R^2 = 0.998$ ). A total of eight biological replicates were performed.

**Antibacterial properties.** The antimicrobial effectiveness of CFEs and their various combinations (1:1 mix) was verified visually using the agar-based well-diffusion method. A mixture of 20 mL MH agar (Merck Life Sciences, Darmstadt, Germany) and an 18-h culture of each indicator strain (1% inoculum), with a concentration of  $10^6$ , were poured separately into sterile Petri dishes. After solidification, wells of 5.5 mm diameter were cut out and filled (100  $\mu$ L) with CFEs. Plates were incubated at 37°C for 18 hours, and the diameters of the inhibition growth zones were measured using a Vernier caliper. According to the following formula ( $\bar{x} = D - d$ ), antimicrobial activity ( $\bar{x}$ ) was calculated, where D represents the inhibition zone diameter and d is the well diameter [34].

**Minimal inhibitory concentrations (MICs).** The methodology was based on EUCAST guidelines [35] with minor modifications. Overnight cultures of each indicator bacterium were subcultured in MH broth until an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.5 was obtained, as measured with a SpectraMax iD3 reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). The bacterial cells were standardized by inoculating 980  $\mu$ L of broth with 20  $\mu$ L of culture and aseptically transferring the suspension into each well of a 96-well polystyrene titration plate (NEST Biotechnology, Wuxi, China).

Each antimicrobial extract was prepared as a two-fold serial dilution of the solution of a given extract in sterile MH broth, starting at an initial concentration of 50%, and serially diluted down to 0.049%. To determine the minimum inhibitory concentration, 100  $\mu$ L of each serially diluted extract was added to the wells. This resulted in a total volume of 200  $\mu$ L per well, which also contained 100  $\mu$ L of bacterial suspension. In the next step, the antibacterial impact of CFEs was evaluated using the checkerboard microdilution assay, as described by Bellio et al. (2021) [36], with minor modifications. The resulting checkerboard on the plate contained a combination of a concentration gradient of 2 antimicrobial extracts in a 1:1 v/v ratio. Each well contained

100  $\mu$ L of the combination, achieving a total volume of 200  $\mu$ L per well. The plates were sealed and incubated aerobically for 18–24 hours at 37°C, and the optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) was measured.

The MIC of the tested individual extracts and their various combinations was defined as the lowest concentration of the given extract (in Arbitrary Units, AU/mL) that restricted indicator strain growth to an optical density <0.05. Positive and negative control assays were conducted. Positive control assays confirmed the antimicrobial activity, while negative controls ensured that observed effects were due to the activity of the extracts.

**Fractional inhibitory concentration (FIC) and synergistic activity.** MIC data of the tested combinations and MIC data of the individual extracts themselves were converted into fractional inhibitory concentration (FIC). The FIC for each antimicrobial extract is determined by dividing the MIC of each extract when used in combination by the MIC of the same extract when used alone [37]. Then, as a measure of synergy, the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated, i.e., the sum of the FIC of each tested antibacterial extract used in combination. FICI was reckoned as follows:

$$FICI = \frac{MIC \text{ of compound A in combination}}{MIC \text{ of compound A alone}} + \frac{MIC \text{ of compound B in combination}}{MIC \text{ of compound B alone}}$$

where A refers to the LAB CFE and B stands for the AAB-derived CFE.

Traditionally, synergism is defined as a FICI of 0.5 or less, additive interactions occur when FICI is in the 0.5–1.0 range, no interaction is observed in the 1.0–4.0 range, and antagonism is interpreted as a FICI of 4.0 or greater [37].

**Model food trials with a chicken meat sample.** *S. Enteritidis* ATCC 13076 was used to evaluate inhibitory activity under real-life conditions. The strain was cultured in MH broth at 37°C for 16 h under aerobic conditions, then diluted in fresh buffered peptone water (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) to obtain a final concentration of  $1 \times 10^5$  CFU/mL. For the *in vivo* test, fresh chicken breast fillets (Morliny, Animex, Kutno, Poland) were aseptically cut into ~5 g portions and placed on sterile Petri dishes. Each portion was inoculated with 10  $\mu$ L of the bacterial suspension, evenly spread using a sterile loop, resulting in an initial *S. Enteritidis* count of  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/g. The inoculated meat was left for 5–10 min to allow absorption. All previously tested CFEs were prepared in a final volume of 10 mL. Based on prior results demonstrating superior activity of the combined extracts, all 12 mixtures were included in the *in vivo* experiments. To prevent direct contact between the extract and meat, sterile tissue paper (LLG Labware, Meckenheim, Germany) was placed over the inoculated surface using sterile tongs. Subsequently, 200  $\mu$ L of the tested extract mixture was applied dropwise onto the tissue and left for 30 s to allow absorption. Negative controls included Milli-Q water (Hydrolab, Straszyn, Poland), MRS broth, and HS broth. Samples were incubated at 37°C for 24 h (optimal for *S. Enteritidis* growth), and at 4°C for 7 days

(typical refrigeration temperature for meat storage). Viable cell counts were determined by plate counting on Plate Count Agar (Merck Life Science, Darmstadt, Germany) for total bacteria and Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) (Oxoid, Basingstoke, UK) for selective enumeration of *S. Enteritidis*. Each test was performed in triplicate.

**Statistical analysis.** To conduct the statistical analysis, Statistica 13.1 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) was utilized. As part of the analysis, the Brown–Forsythe test was conducted to determine the homogeneity of variance, and the Shapiro–Wilk test was used to confirm the normality of the data. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Based on Tukey's test, significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between the data sets. Data were visualized in R software version 4.3.3 (R Core Team, Vienna, Austria).

## RESULTS

**Organic acids and sugar.** Table 2 shows the concentrations of sugar and organic acids in the CFEs and the pure control media broths used for their cultivation. Lactic acid concentrations in the LAB extracts ranged from 19.9–21.9 mg/mL, with statistically significant differences observed between the control media and CFEs ( $p < 0.05$ ). Additionally, hkCFEs exhibited significantly higher concentrations of propionic acid, but lower levels of gluconic, lactic and acetic acids, compared to the crude CFEs. For the AAB extracts, the bacteria significantly consumed citric acid and glucose during growth, as their concentrations were markedly higher in the HS control broth compared to the CFEs ( $p < 0.05$ ). The CFEs contained 2 distinctive organic acids – gluconic and acetic acids. The highest concentration of gluconic acid (15.4 mg/mL) was observed in KNS32 CFE. Acetic acid levels ranged from 1.9 to 2.4 mg/mL across the CFEs, with the highest concentration also recorded in KNS32 CFE ( $p < 0.05$ ).

**Total polyphenol content and antioxidant activity.** Table 3 illustrates the total polyphenol content and antioxidant activity of the CFEs. The total polyphenol content ranged from 27.7–120.0 GAE  $\mu\text{g/mL}$ , with the highest concentrations observed in B1 CFE (120.0 GAE  $\mu\text{g/mL}$ ) and O24 CFE (118.6 GAE  $\mu\text{g/mL}$ ). LAB CFEs exhibited significantly higher total polyphenol levels compared to AAB extracts ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Total polyphenol content, ABTS•+ radical scavenging activity, and DPPH radical scavenging activity in CFEs

Extracts	Total polyphenol content	ABTS•+ radical scavenging activity	DPPH radical scavenging activity
	GAE $\mu\text{g/mL}$	VCEAC/mL	
<b>O24 hkCFE</b>	91.2 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	6.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.7 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>
<b>O24 CFE</b>	118.6 $\pm$ 9.0 <sup>c</sup>	5.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.6 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>
<b>B1 hkCFE</b>	98.9 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>	5.5 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>
<b>B1 CFE</b>	120.0 $\pm$ 10.9 <sup>c</sup>	5.9 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
<b>KOM1 CFE</b>	29.7 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.0 <sup>ab</sup>	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
<b>KNS32 CFE</b>	27.7 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation; means followed by different letters (a-c) are statistically significantly different ( $p < 0.05$ )

The antioxidant activity, measured as the ability to scavenge ABTS•+ and DPPH radicals, ranged from 1.2–6.0 VCEAC/mL and 0.1–1.0 mg VCEAC/mL, respectively. Among the tested samples, the B1 CFE demonstrated the highest DPPH radical scavenging activity, significantly exceeding the values observed in AAB extracts ( $p < 0.05$ ). A similar trend was noted for ABTS•+ radical scavenging, where LAB extracts out-performed AAB ones.

Interestingly, the O24 hkCFE displayed the highest ABTS•+ radical scavenging capacity, significantly greater than that of KNS32 CFE ( $p < 0.05$ ). These findings highlight the superior antioxidant potential of LAB-derived extracts.

**Antibacterial properties.** The CFEs and their various combinations exhibited different pH values and distinct antagonistic activities against the indicator strains in the agar well-diffusion assay (Tab. 4). Among the Gram-positive bacteria, *L. monocytogenes* exhibited the highest susceptibility to growth inhibition, with inhibition zones ranging from 9.7–18.8 mm. In contrast, *E. faecalis* was the most resistant, with inhibition zones ranging from 7.7–13.3 mm. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between the antibacterial activity of individual extracts and their mixtures. Crude and heat-killed extracts showed stronger antimicrobial effects than those that had been neutralized, which were largely inactive. Moreover, AAB-derived extracts demonstrated greater activity than

**Table 2.** Concentration of sugar and organic acids in CFEs and the media broth (as a reference)

Extracts	Glucose	Citric acid	Gluconic acid	Acetic acid	Propionic acid	Pyruvic acid	Lactic acid	Formic acid
	mg/mL							
MRS	15.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 0.1	9.7 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	10.5 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.8 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	4.2 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
O24 hkCFE	0.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	nd	8.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	8.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	19.9 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
O24 CFE	0.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	nd	9.2 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	9.8 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	21.1 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
B1 hkCFE	0.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	nd	8.8 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	9.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	2.0 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	21.2 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	1.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
B1 CFE	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	nd	9.4 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	9.7 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	1.1 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.9 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	21.9 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	1.1 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
HS	26.7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	nd	1.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd
KOM1 CFE	16.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.6 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	10.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	0.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	nd	nd	nd
KNS32 CFE	12.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	3.1 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>	15.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	nd	nd	nd

Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Means followed by different letters (a-c) are statistically significantly different ( $p < 0.05$ ); LAB CFEs and AAB CFEs were statistically analyzed and compared separately.

MRS - deMan, Rogosa, and Sharpe broth; HS - Hestrin and Shramm broth; nd - not detected;

**Table 4.** Inhibitory effect of CFEs against indicator strains

Amount	Extracts	pH value	Gram-positive				Gram-negative			
			<i>Lm</i> 19111	<i>Sa</i> 25923	<i>Bs</i> 6633	<i>Ef</i> 51299	<i>SE</i> 13076	<i>Ec</i> 10536	<i>Pf</i> 2123	
Mean diameter of inhibition zones [mm] for indicator strains										
Individual, 100 µL	B1	CFE	4.10±0.04	12.2±1.0 <sup>bca</sup>	8.5±3.1 <sup>cdc</sup>	10.8±0.8 <sup>cdB</sup>	9.5±1.3 <sup>deBC</sup>	10.2±1.0 <sup>dB</sup>	12.7±1.9 <sup>CA</sup>	11.2±0.3 <sup>EB</sup>
		hkCFE	4.23±0.05	12.7±2.5 <sup>bca</sup>	8.8±3.6 <sup>cdc</sup>	11.0±1.3 <sup>dB</sup>	9.7±0.8 <sup>dBc</sup>	10.8±0.3 <sup>dB</sup>	12.8±2.0 <sup>CA</sup>	11.7±0.3 <sup>deAB</sup>
		nCFE	5.84±0.15	9.7±0.6 <sup>CA</sup>	6.7±1.2 <sup>dc</sup>	9.8±1.5 <sup>dA</sup>	7.7±1.0 <sup>eBC</sup>	8.2±1.4 <sup>eB</sup>	9.5±0.9 <sup>dAB</sup>	9.7±1.4 <sup>CA</sup>
	O24	CFE	3.87±0.06	11.8±1.3 <sup>b<sup>CA</sup>B</sup>	7.3±0.3 <sup>cdc</sup>	10.3±0.6 <sup>cdB</sup>	8.3±1.4 <sup>d<sup>EB</sup>BC</sup>	8.7±0.8 <sup>deBC</sup>	12.5±2.2 <sup>cdA</sup>	11.8±0.6 <sup>deAB</sup>
		hkCFE	4.02±0.08	12.8±1.0 <sup>bca</sup>	8.5±0.5 <sup>cdc</sup>	10.8±0.8 <sup>cdB</sup>	9.7±0.9 <sup>dBc</sup>	9.3±1.2 <sup>deBC</sup>	12.7±0.6 <sup>CA</sup>	12.0±0.9 <sup>dAB</sup>
		nCFE	5.91±0.13	10.2±1.9 <sup>CA<sup>B</sup></sup>	6.3±0.3 <sup>dc</sup>	9.7±0.3 <sup>dB</sup>	8.2±1.5 <sup>eBC</sup>	8.5±1.0 <sup>eBC</sup>	9.3±0.8 <sup>dBc</sup>	10.7±1.4 <sup>CA</sup>
	KOM1	CFE	3.08±0.03	13.5±0.5 <sup>bca</sup>	9.8±3.3 <sup>c</sup>	9.5±0.5 <sup>dc</sup>	10.2±0.3 <sup>cdBC</sup>	11.2±0.8 <sup>dB</sup>	12.8±1.0 <sup>CB</sup>	11.7±0.8 <sup>deAB</sup>
	KNS32	CFE	3.24±0.03	13.8±1.0 <sup>bca</sup>	10.0±2.7 <sup>c</sup>	10.7±1.2 <sup>cdBC</sup>	10.5±0.9 <sup>cdBC</sup>	11.8±1.6 <sup>cdB</sup>	13.3±1.5 <sup>b<sup>CA</sup>B</sup>	11.8±0.3 <sup>deB</sup>
	Combination, 50 µL + 50 µL (50% v/v)	B1 + KOM1	B1 CFE + KOM1 CFE	3.87±0.03	17.0±1.0 <sup>aba</sup>	12.8±0.8 <sup>bBC</sup>	11.8±0.8 <sup>b<sup>CC</sup></sup>	11.2±1.3 <sup>c</sup>	12.8±1.0 <sup>b<sup>CC</sup></sup>	14.2±0.3 <sup>bb</sup>
B1 hkCFE + KOM1 CFE			4.02±0.04	17.0±1.7 <sup>aba</sup>	12.8±2.0 <sup>b<sup>C</sup></sup>	12.2±1.0 <sup>b<sup>C</sup></sup>	12.2±0.8 <sup>b<sup>C</sup></sup>	13.3±1.2 <sup>b<sup>CB</sup></sup>	14.8±0.3 <sup>abAB</sup>	13.7±2.0 <sup>cb</sup>
B1 nCFE + KOM1 CFE			4.88±0.07	14.2±0.3 <sup>ba</sup>	10.3±0.8 <sup>b<sup>CC</sup></sup>	11.5±1.3 <sup>b<sup>CB</sup></sup>	11.2±1.6 <sup>c<sup>BC</sup></sup>	11.2±1.3 <sup>cdBC</sup>	13.5±1.5 <sup>b<sup>CA</sup>B</sup>	13.5±2.8 <sup>CB</sup>
B1 + KNS32		B1 CFE + KNS32 CFE	3.88±0.02	16.8±0.6 <sup>aba</sup>	13.5±1.3 <sup>abc</sup>	12.7±0.3 <sup>b<sup>C</sup></sup>	12.8±0.3 <sup>abc</sup>	13.7±1.2 <sup>b<sup>CB</sup></sup>	14.3±1.2 <sup>bb</sup>	15.3±1.8 <sup>AB</sup>
		B1 hkCFE + KNS32 CFE	4.11±0.02	16.3±0.6 <sup>ba</sup>	12.7±2.3 <sup>b<sup>C</sup></sup>	12.3±1.0 <sup>b<sup>C</sup></sup>	13.2±0.8 <sup>BC</sup>	14.8±1.3 <sup>ab</sup>	15.3±0.3 <sup>abAB</sup>	14.5±2.0 <sup>abB</sup>
		B1 nCFE + KNS32 CFE	5.04±0.07	14.3±0.3 <sup>ba</sup>	10.5±0.9 <sup>b<sup>CC</sup></sup>	11.2±1.0 <sup>b<sup>CC</sup></sup>	11.3±1.2 <sup>c</sup>	11.7±1.5 <sup>c<sup>BC</sup></sup>	13.3±0.6 <sup>b<sup>CA</sup>B</sup>	12.7±1.8 <sup>dB</sup>
O24 + KOM1		O24 CFE + KOM1 CFE	3.68±0.01	18.5±1.5 <sup>a</sup>	13.5±0.5 <sup>abc</sup>	12.8±1.0 <sup>abc</sup>	11.8±2.3 <sup>b<sup>CC</sup></sup>	13.8±1.3 <sup>abB</sup>	14.5±0.9 <sup>abAB</sup>	13.8±1.8 <sup>dB</sup>
		O24 hkCFE + KOM1 CFE	3.78±0.02	18.8±2.0 <sup>a</sup>	12.7±2.3 <sup>b<sup>C</sup></sup>	13.0±0.0 <sup>abBC</sup>	12.0±2.3 <sup>b<sup>C</sup></sup>	13.8±1.3 <sup>abB</sup>	14.8±1.0 <sup>abAB</sup>	14.7±1.6 <sup>abAB</sup>
		O24 nCFE + KOM1 CFE	4.37±0.04	16.2±1.0 <sup>ba</sup>	10.2±1.4 <sup>b<sup>CC</sup></sup>	11.0±0.9 <sup>c</sup>	11.3±1.8 <sup>c<sup>BC</sup></sup>	11.5±1.8 <sup>c<sup>BC</sup></sup>	12.3±0.6 <sup>cdB</sup>	13.2±2.8 <sup>cdAB</sup>
O24 + KNS32		O24 CFE + KNS32 CFE	3.61±0.03	18.0±0.9 <sup>a</sup>	13.0±1.0 <sup>abc</sup>	13.2±1.6 <sup>c</sup>	13.3±0.6 <sup>BC</sup>	14.0±1.0 <sup>abB</sup>	14.7±1.5 <sup>abAB</sup>	14.2±2.4 <sup>AB</sup>
		O24 hkCFE + KNS32 CFE	3.91±0.10	18.5±0.9 <sup>a</sup>	13.2±1.6 <sup>abBC</sup>	13.0±0.9 <sup>c</sup>	13.0±0.5 <sup>abc</sup>	14.3±0.6 <sup>ab</sup>	14.8±0.3 <sup>abAB</sup>	14.2±2.4 <sup>BB</sup>
		O24 nCFE + KNS32 CFE	4.48±0.09	16.3±0.3 <sup>ba</sup>	10.5±3.9 <sup>b<sup>CC</sup></sup>	11.0±1.8 <sup>c</sup>	10.5±1.0 <sup>cdc</sup>	11.7±2.0 <sup>c<sup>BC</sup></sup>	13.3±0.3 <sup>b<sup>CA</sup>B</sup>	12.8±3.0 <sup>dB</sup>

Values are expressed as mean ± standard deviation; means followed by different letters (a-d) for each column are statistically significantly different ( $p < 0.05$ ); means followed by different letters (A-C) between the indicator strains are statistically significantly different ( $p < 0.05$ );

*Lm* 19111 - *Listeria monocytogenes* ATCC 19111; *Sa* 25923 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bs* 6633 - *Bacillus spizizenii* ATCC 6633; *Ef* 51299 - *Enterococcus faecalis* ATCC 51299; *SE* 13076 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* ATCC 13076; *Ec* 10536 - *Escherichia coli* ATCC 10536; *Pf* 2123 - *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123

LABs when tested individually. For Gram-positive bacteria, significant synergistic effects ( $p < 0.05$ ) were observed when combining LAB and AAB extracts. For example, the mixture of O24 CFE and KOM1 CFE exhibited greater inhibition of *E. faecalis* than O24 CFE alone. Likewise, for *B. spizizenii*, the combination of LAB extracts with KOM1 CFE significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced antibacterial activity compared with the KOM1 CFE alone.

In the case of Gram-negative bacteria, the synergistic effect was even more pronounced. Many different combinations exhibited significantly ( $p < 0.05$ ) stronger inhibitory activity against *S. Enteritidis* than the individual LAB CFEs. Similarly, for *E. coli*, mixtures containing neutralized LAB extracts and AABs significantly ( $p < 0.05$ ) enhanced growth inhibition compared to LAB CFEs alone. Regarding the

pH analysis, pair-wise combinations of bacterial extracts showed pH values similar to those of the individual extracts, indicating limited interaction effects on acidity (Tab. 4). A moderate increase was noted only in mixtures containing the neutralized nCFEs.

**Minimal inhibitory concentrations (MICs) and fractional inhibitory concentration index (FICI).** The susceptibility of the studied indicator strains to LAB and AAB extracts was determined using the microdilution method. Table 5 presents the minimum inhibitory concentration (MIC) of individual LAB and AAB CFEs.

At relatively low MIC values, hkCFE B1 and hkCFE O24 exhibited inhibitory effects particularly against *L. monocytogenes* and *E. faecalis*. Similarly, AAB CFEs

**Table 5.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of individual CFEs

Indicator strain	B1 CFE	B1 hkCFE	B1 nCFE	O24 CFE	O24 hkCFE	O24 nCFE	KOM1 CFE	KNS32 CFE
<i>Lm</i> 19111	3.1	6.3	3.1	6.3	6.3	6.3	6.3	12.5
<i>Sa</i> 25923	12.5	12.5	12.50	25.0	25.0	50.0	12.5	12.5
<i>Bs</i> 6633	25.0	12.5	50.0	12.5	12.5	100.0	6.3	12.5
<i>Ef</i> 51299	3.1	6.3	3.1	6.3	6.3	6.3	6.3	12.5
<i>SE</i> 13076	50.0	6.3	100.0	6.3	6.3	25.0	3.1	6.3
<i>Ec</i> 10536	6.3	6.3	12.5	12.5	6.3	25.0	3.1	3.1
<i>Pf</i> 2123	25.0	12.5	12.5	25.0	6.3	25.0	3.1	6.3

*Lm* 19111 - *Listeria monocytogenes* ATCC 19111; *Sa* 25923 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bs* 6633 - *Bacillus spizizenii* ATCC 6633; *Ef* 51299 - *Enterococcus faecalis* ATCC 51299; *SE* 13076 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* ATCC 13076; *Ec* 10536 - *Escherichia coli* ATCC 10536; *Pf* 2123 - *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123; MIC - minimum inhibitory concentration

**Table S1.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of LAB CFEs and KOM1 CFE when used in combination, determined using the checkerboard method

Indicator strain	KOM1 CFE	B1 CFE	KOM1 CFE	B1 hkCFE	KOM1 CFE	B1 nCFE	KOM1 CFE	O24 CFE	KOM1 CFE	O24 hkCFE	KOM1 CFE	O24 nCFE
MIC [AU/mL]												
<i>Lm</i> 19111	1.6	1.6	0.8	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6	3.1
<i>Sa</i> 25923	12.5	6.3	6.3	6.3	25.0	12.5	12.5	3.1	12.5	3.1	6.3	12.5
<i>Bs</i> 6633	12.5	1.6	1.6	1.6	12.5	3.1	6.3	3.1	3.1	3.1	25.0	6.3
<i>Ef</i> 51299	0.8	1.6	0.8	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6	3.1	1.6	1.6	3.1
<i>SE</i> 13076	6.3	1.6	1.6	0.8	12.5	1.6	1.6	0.8	1.6	0.8	12.5	0.8
<i>Ec</i> 10536	1.6	0.8	1.6	0.8	3.1	1.6	6.3	1.6	1.6	1.6	3.1	1.6
<i>Pf</i> 2123	3.1	1.6	3.1	0.8	12.5	3.1	3.1	1.6	3.1	0.8	12.5	3.1

*Lm* 19111 - *Listeria monocytogenes* ATCC 19111; *Sa* 25923 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bs* 6633 - *Bacillus spizizenii* ATCC 6633; *Ef* 51299 - *Enterococcus faecalis* ATCC 51299; *SE* 13076 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076; *Ec* 10536 - *Escherichia coli* ATCC 10536; *Pf* 2123 - *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123; MIC - minimum inhibitory concentration

**Table S2.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of LAB CFEs and KNS32 CFE when used in combination, determined using the checkerboard method

Indicator strain	KNS32 CFE	B1 CFE	KNS32 CFE	B1 hkCFE	KNS32 CFE	B1 nCFE	KNS32 CFE	O24 CFE	KNS32 CFE	O24 hkCFE	KNS32 CFE	O24 nCFE
MIC [AU/mL]												
<i>Lm</i> 19111	1.6	3.1	1.6	1.6	1.6	6.3	1.6	3.1	3.1	1.6	6.3	6.3
<i>Sa</i> 25923	25.0	6.3	25.0	3.1	25.0	12.5	12.5	12.5	25.0	6.3	3.1	12.5
<i>Bs</i> 6633	12.5	3.1	6.3	1.6	12.5	3.1	6.3	3.1	6.3	3.1	25.0	6.3
<i>Ef</i> 51299	3.1	3.1	3.1	0.8	3.1	6.3	3.1	3.1	3.1	1.6	6.3	6.3
<i>SE</i> 13076	6.3	1.6	1.6	1.6	25.0	1.6	3.1	0.8	1.6	0.8	12.5	0.8
<i>Ec</i> 10536	3.1	1.6	1.6	1.6	6.3	1.6	3.1	1.6	1.6	1.6	6.3	1.6
<i>Pf</i> 2123	12.5	1.6	3.1	0.8	3.1	1.6	6.3	1.6	3.1	1.6	12.5	3.1

*Lm* 19111 - *Listeria monocytogenes* ATCC 19111; *Sa* 25923 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bs* 6633 - *Bacillus spizizenii* ATCC 6633; *Ef* 51299 - *Enterococcus faecalis* ATCC 51299; *SE* 13076 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076; *Ec* 10536 - *Escherichia coli* ATCC 10536; *Pf* 2123 - *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123; MIC - minimum inhibitory concentration

**Table 6.** FIC indexes and interaction types (FICI)

Indicator strain	Extracts	B1 CFE	B1 hkCFE	B1 nCFE	O24 CFE	O24 hkCFE	O24 nCFE
<i>Lm</i> 19111	KOM1 CFE	0.8	0.4	1.0	0.5	0.8	0.8
	KNS32 CFE	0.8	0.4	1.0	0.5	0.6	0.6
<i>Sa</i> 25923	KOM1 CFE	1.5	1.0	3.0	0.8	0.8	1.1
	KNS32 CFE	2.5	2.3	3.0	1.5	1.5	1.1
<i>Bs</i> 6633	KOM1 CFE	0.8	0.4	0.8	1.0	0.8	1.3
	KNS32 CFE	0.8	0.6	0.5	0.8	0.8	0.8
<i>Ef</i> 51299	KOM1 CFE	0.5	0.4	1.0	0.5	0.8	0.8
	KNS32 CFE	1.3	0.6	1.5	0.8	0.6	1.5
<i>SE</i> 13076	KOM1 CFE	0.6	0.5	0.6	0.5	0.5	0.8
	KNS32 CFE	0.4	0.5	0.5	0.6	0.4	0.6
<i>Ec</i> 10536	KOM1 CFE	0.5	0.5	0.8	1.0	0.8	0.6
	KNS32 CFE	1.0	0.8	1.0	0.8	0.8	0.8
<i>Pf</i> 2123	KOM1 CFE	0.6	0.5	2.0	0.6	0.8	1.5
	KNS32 CFE	0.8	0.4	0.5	0.5	0.8	1.0

FICI - fractional inhibitory concentration index; FICI ≤ 0.5 - synergistic; FICI > 0.5-1.0 - additive; FICI > 1.0-4.0 - no interaction; FICI > 4.0 - antagonistic; *Lm* 19111 - *Listeria monocytogenes* ATCC 19111; *Sa* 25923 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Bs* 6633 - *Bacillus spizizenii* ATCC 6633; *Ef* 51299 - *Enterococcus faecalis* ATCC 51299; *SE* 13076 - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076; *Ec* 10536 - *Escherichia coli* ATCC 10536; *Pf* 2123 - *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123

demonstrated strong antimicrobial activity, especially against *E. coli* and *S. Enteritidis*, with MIC values reaching the lowest levels among the tested extracts. In contrast, the highest MIC values were observed for *B. spizizenii* and *S. aureus*, requiring significantly higher concentrations to inhibit growth. Among all tested extracts, KNS32 CFE was the most effective, exhibiting the lowest MIC values against multiple indicator strains, which highlights its strong antimicrobial potential. Further studies investigating the effects of LAB combined with AAB extracts were conducted

using the checkerboard method (Tab. S1 and Tab. S2). Table 6 presents the fractional inhibitory concentration index (FICI) values, indicating the interactions between AAB and LAB extracts. The results suggest a range of interactions, from synergism to no interaction, depending on the combination and the indicator strain. Synergistic effects (FICI ≤ 0.5) were observed in certain combinations, such as B1 hkCFE with AAB extracts against *L. monocytogenes* and *S. Enteritidis*, as well as O24 hkCFE with KOM1 CFE for *S. Enteritidis*. Additive interactions (FICI > 0.5-1.0) were more frequently

noted, particularly for *E. faecalis* and *E. coli*, while no interaction (FICI > 1.0–4.0) was mostly recorded for *S. aureus* and *B. spizizenii*. Antagonistic effects (FICI > 4.0) were not observed in the tested combinations. Notably, the greatest number of cases of synergism between LAB and AAB extracts was observed against the pathogen *S. Enteritidis*, prompting further trials on a food model.

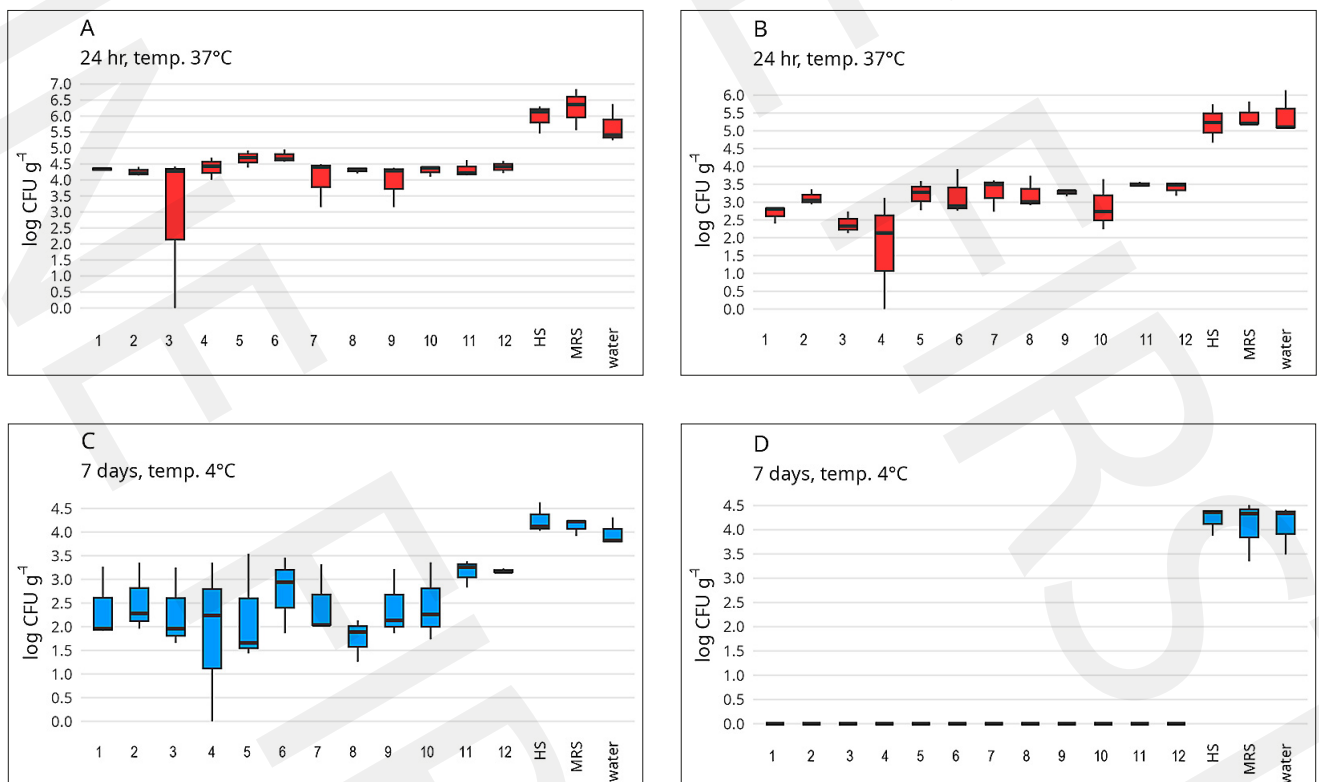
**Model food trials with a chicken meat sample.** Figure 1 presents the results of total viable counts and *S. Enteritidis* growth under the influence of the tested antimicrobial extracts on the surface of the chicken meat samples. The results demonstrate that the antimicrobial treatments effectively reduced the total bacterial load on chicken breast samples compared to the controls. After 24 hours of incubation at 37°C, control samples treated with water, MRS broth and HS broth, exhibited higher total aerobic viable counts, with averages of approximately 5.67, 6.25, and 5.97 log CFU/mL, respectively. In contrast, samples treated with combinations of LAB and AAB extracts showed considerably lower counts, ranging from 4.00–4.96 log CFU/mL (Fig. 1A). After 7 days of storage at 4°C, the controls still maintained relatively high counts (around 3.87–4.19 log CFU/mL), whereas the antimicrobial treatments further reduced the total viable counts, in some cases decreasing below the detection limit and not exceeding approximately 3.46 log CFU/mL (Fig. 1C). Similarly, *S. Enteritidis* counts were significantly lower in treated samples compared to controls. At 24 hours at 37°C, the controls displayed *S. Enteritidis* counts averaging around 5.21–5.44 log CFU/mL, while B1 CFE together with KOM1 CFE reduced these counts to a range of approximately 0–3.92

log CFU/mL (Fig. 1B). Notably, after 7 days at 4°C, no viable *S. Enteritidis* were detected in any of the antimicrobial-treated samples, in stark contrast to the controls, which maintained averages of approximately 4.03–4.19 log CFU/mL (Fig. 1D). Overall, these findings demonstrate that the antimicrobial treatments significantly inhibited total aerobic bacterial growth and *S. Enteritidis* survival, with a particularly pronounced effect observed after extended refrigerated storage.

## DISCUSSION

The study evaluated the antimicrobial properties of bacterial extracts obtained from LAB (*Lactocaseibacillus paracasei* B1, *Lactiplantibacillus plantarum* O24) and AAB (*Gluconobacter oxydans* KNS32, *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1), assessing their efficacy individually and in combination. While previous research has explored the antimicrobial activity of lactic and acetic acids in food preservation [26, 27], the current study extends to-date knowledge by investigating the biopreservative potential of non-living bacterial extracts. These treatments constitute complex mixtures of antimicrobial metabolites that extend beyond organic acids, including bacteriocins, peptides, and phenolic derivatives, as well as possible synergistic interactions between LAB- and AAB-derived components.

The study also identified organic acids, total phenolic content, and antioxidant properties of bacterial supernatants. Lactic acid was the most abundant substance in the LAB supernatants, which was the primary substance responsible



**Figure 1.** Viable counts on chicken breast samples treated with mixtures of antimicrobials and water, MRS broth, and HS broth (as controls) after 24 hours at 37°C and 7 days at 4°C (A and C – total aerobic viable counts; B and D – *S. Enteritidis* viable counts); Abbreviations: The combinations tested in this study are numbered from (1) to (12) as follows: (1) B1 CFE + KOM1 CFE; (2) B1 CFE + KNS32 CFE; (3) B1 hKCFE + KOM1 CFE; (4) B1 hKCFE + KNS32 CFE; (5) B1 nCFE + KOM1 CFE; (6) B1 nCFE + KNS32 CFE; (7) O24 CFE + KOM1 CFE; (8) O24 CFE + KNS32 CFE; (9) O24 hKCFE + KOM1 CFE; (10) O24 hKCFE + KNS32 CFE; (11) O24 nCFE + KOM1 CFE; (12) O24 nCFE + KNS32 CFE

for lowering the pH value of the broth medium, in line with other findings [38–40]. Similarly, AAB produce a diverse array of organic compounds during their metabolic processes. As a result of AABs extraordinary capacity to oxidize a variety of sugars, polyols, and alcohols, antioxidant products of AAB metabolism mainly comprise gluconic acid, l-sorbose, bacterial cellulose, and levan [41]. Analysis in the current study identified acetic and gluconic acids as the main metabolites in AAB-derived extracts. The metabolism pathway of *G. oxydans* relies on its ability to selectively oxidize a wide range of carbohydrates and alcohols. The *Komagataeibacter* genus is particularly noteworthy for its ability to synthesize organic acids [42, 43]. Additionally, a relatively low concentration of propionic acid was detected. Notably, although AAB do not typically produce propionic acid as a primary oxidative fermentation product, their metabolic activity may indirectly contribute to its formation, or that of its derivatives [44–46].

Phenolic compounds were identified in high concentrations in all tested cell-free extracts. LAB fermentation is known to enhance the production of phenolics and flavonoids, which contribute to antioxidant activity [47, 48]. The antioxidant properties of LAB extracts are attributed to bioactive compounds, including exopolysaccharides, bioactive peptides, antioxidant enzymes, and manganese ions [49]. The results obtained confirmed that LAB cell-free extracts exhibit strong antioxidant potential, with varying abilities to scavenge ABTS•+ and DPPH radicals. Research on LAB strains isolated from food has previously demonstrated their ability to enhance antioxidant properties, particularly in fermented beverages, in which selected strains have been shown to boost phenolic content and increase the capacity to neutralize free radicals [50, 51]. Although AAB extracts displayed lower antioxidant potential than LAB, they play a key role in modulating phenolic compounds through conjugation, thereby enhancing their bioavailability and stability in food products [17, 18, 52]. AAB also contribute to polyphenol stabilization and can improve antioxidant activity through aerobic oxidative fermentation [53]. However, rather than synthesizing phenolic compounds *de novo* when grown in laboratory media, AAB are more likely to modify and transform existing phenolic structures [18]. While the Folin-Ciocalteu assay is widely used for assessing total phenolic content, it is not entirely specific to phenolic compounds, as it can also react with other reducing substances, including peptides and sugars [54]. Despite this limitation, the observed trends suggest that both LAB and AAB extracts contain bioactive compounds that contribute to antioxidant activity. Further characterization using more specific analytical techniques, such as mass spectrometry, would be beneficial to confirm the precise composition of these extracts. Nevertheless, the results of the current study highlight the promising antioxidant potential of LAB and AAB extracts for applications in food technology.

In the agar-based well-diffusion test, all LAB and AAB extracts, as well as their combinations, exhibited antimicrobial properties, although their effectiveness varied between samples. The greater susceptibility of *L. monocytogenes* compared to *E. faecalis* suggests that Gram-positive bacteria may vary in their response to the metabolic compounds produced by LAB and AAB. This variation may be attributed to differences in cell wall composition and stress response mechanisms [55]. Neutralizing the

pH of the LAB extracts reduced, but did not completely eliminate, the antagonistic activity. The observed reduction in antimicrobial activity upon neutralization underscores the crucial role of organic acids in inhibiting pathogens, as they can penetrate bacterial membranes and disrupt glycolysis by inhibiting pH-sensitive enzymes [56]. These findings are consistent with previous reports indicating that neutralization diminishes antagonistic effects, confirming organic acids as key contributors to antimicrobial activity [57]. Interestingly, heating the bacterial culture to 80 °C enhanced the antibacterial activity of hkCFE, rather than reducing it. Results obtained in previous research indicate that the bacterial thermal inactivation process enables the maintenance of antimicrobial properties [58].

The current study also identified 2 types of interactions among LAB and AAB extracts – synergism and additivity – with synergistic combinations demonstrating the most potent antibacterial effects. These interactions may result from enhanced membrane permeability, metabolic disruption, or inhibition of microbial enzymes and pathways, thereby preventing the development of resistance mechanisms [19]. Notably, crude CFE and hkCFE combinations exhibited superior inhibitory effects at lower concentrations compared to individual strains, suggesting a broader antimicrobial spectrum with a lower risk of resistance development. Such findings align with studies showing that co-fermenting bacteria can produce a more diverse array of antimicrobial compounds than single-strain extract [59]. Given the challenge of antimicrobial resistance in foodborne pathogens, the combined use of LAB and AAB-derived extracts presents a promising strategy for food preservation. Multi-strain formulations not only enhance efficacy but also contribute to food safety and extended shelf life, offering a natural alternative to synthetic preservatives [60]. These results emphasize the potential of LAB-AAB mixtures as an innovative approach in food processing, warranting further exploration in real-world applications.

Recent studies have shown that many LAB extracts, in the form of cell-free supernatants, are effective in inhibiting or eliminating unfavourable microbiota in meat, and they possess properties that can be utilized as food [61–63]. For AAB, acetic acid is the main metabolite utilized in food preservation as a bactericidal compound [64]. The present study evaluated combinations in real-life conditions to determine their potential for use in meat preservation. Chicken breast meat was selected as the matrix for the analysis, as, according to the European Food Safety Authority (EFSA) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), it is a common source of salmonellosis outbreaks. *S. Enteritidis* was used as the indicator strain at a concentration of  $1 \times 10^3$  CFU/g, representing realistic contamination levels that remain detectable by standard plating methods. This concentration was chosen to balance practical detectability with biological relevance [65]. The results of the model food trial indicated that antimicrobial mixtures effectively inhibited the foodborne pathogen *S. Enteritidis* in the chicken breast after 24 h of incubation. Notably, all tested combinations exhibited bactericidal effects against *S. Enteritidis* after 7 days of refrigerated storage. Additionally, the longer the contaminated meat was exposed to bacterial preparations, the stronger the antimicrobial effects observed. Recent research has demonstrated that a combination of reuterin and lactic acid exhibits strong

bactericidal effects against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, reducing its viable counts to zero within 10 minutes of contact [66]. Similarly, the combination of essential oils with phage-derived endolysin (LysPB32) significantly reduced *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium counts in cooked ground beef to below the detection limit after 12 h of incubation, primarily through membrane disruption [67]. Additionally, Elbarbary et al. (2024) [68] and Łepecka et al. (2023) [69], found that acetic acid treatments in the form of apple cider vinegar significantly decreased *Salmonella* spp. populations in beef and wild boar loins, respectively. These findings align with the present study, reinforcing the efficacy of LAB- and AAB-derived preparations in controlling *S. Enteritidis* contamination in meat products.

The undoubted advantage of using bacterial preparations is that they contain a blend of antimicrobial substances. The utilization of single antimicrobial preparations, however, has some limitations. LAB-derived bacteriocins show limited activity against Gram-negative bacteria, and their purification is costly and labour-intensive. Their efficacy may also be reduced by interactions with food components or proteolytic enzymes [19]. Similarly, the use of organic acids, by-products of carbohydrate or oxidative fermentation, also has certain limitations. At higher concentrations, they can alter the sensory properties of food, and some microorganisms can develop tolerance to acidic conditions [70]. Compared with biopreservation methods that use a single antimicrobial agent, the utilization of a cocktail of bacterial preparations, especially their combination, is a promising strategy to overcome those obstacles.

Notwithstanding the promising results, further studies are required to confirm the effectiveness of the tested combinations. Previous research by Karbowski et al. (2025) [71] demonstrated that *Lacticaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 harbour multiple bacteriocin gene clusters located on both chromosomes and plasmids, producing proteinaceous antimicrobial compounds. Proteomic and spectroscopic analyses (SDS-PAGE, LC-MS/MS, and FT-IR) revealed novel bacteriocin-like proteins of approximately 10–15 kDa. These findings suggest that the bioactive effects observed in the present study may be associated with similar proteinaceous substances, emphasizing the need for further metabolomic and functional analyses to elucidate their underlying mechanisms.

Although strong inhibition of *S. Enteritidis* was demonstrated, further validation against a broader range of foodborne pathogens is necessary to confirm applicability across different food matrices. Another challenge lies in scaling up these antimicrobial preparations for industrial use, considering factors such as production cost, regulatory approval, and formulation stability. The potential impact on food quality must also be assessed since shelf life depends on the activity of spoilage microorganisms, enzymatic activity, and physicochemical changes. Future research should evaluate how these mixtures affect sensory properties, such as taste, texture, colour, and aroma. Given the potential sensory effects of organic acids and bacterial metabolites, consumer acceptance will be a crucial factor in determining the success of these products. Beyond meat preservation, the technology could also be applied to dairy and plant-based products. To optimize practical use, various delivery methods (e.g., spraying, dipping, or immersion) and encapsulation or

controlled-release systems should be explored to enhance stability and efficacy in food applications. [72]. Addressing these challenges will be crucial for fully harnessing the biotechnological potential of LAB and AAB-derived extracts in sustainable food preservation.

## CONCLUSIONS

The study provides new insights into mixtures of LAB (*Lacticaseibacillus paracasei* and *Lactiplantibacillus plantarum*) and AAB (*Gluconobacter oxydans* and *Komagataeibacter saccharivorans*) preparations, particularly regarding their antimicrobial properties. To date, no evidence has supported the use of combined LAB and AAB preparations in biopreservation, therefore this study helps to fill that knowledge gap. The findings revealed significant and novel outcomes that advance understanding of their potential applications, offering promising avenues for their use in food biopreservation. Post-cultivation preparations obtained from LAB and AAB exhibited notable antioxidant activity and can be regarded as sources of phenolic compounds. In addition, these preparations contained several organic acids, with lactic, acetic, and glucuronic acids identified as the most abundant. The results of *in vitro* and meat model tests indicate that combining the tested extracts in pairs (1:1) allowed for obtaining synergistic antimicrobial combinations at a lower dose than when used individually, reducing *S. Enteritidis* to below the detection limit within 7 days of chilling storage. No abolition or inhibition of their action was observed. Specifically, hkCFEs and extracts from AAB strains combined exhibited exceptional efficiency.

Future research should focus on identifying the specific bioactive compounds responsible for antimicrobial activity, validating the effectiveness of these preparations against a broader range of pathogens, optimizing application methods, and assessing their impact on food quality, including sensory attributes and industrial scalability.

## REFERENCES

1. The European Union One Health 2023 Zoonoses report. EFSA J. 2024;22(12). <https://doi:10.2903/j.efsa.2024.9106>
2. Muthuvelu KS, Ethiraj B, Pramnisk S, et al. Biopreservative technologies of food: an alternative to chemical preservation and recent developments. Food Sci Biotechnol. 2023;32(10):1337–50. <https://doi:10.1007/s10068-023-01336-8>
3. Sionek B, Szydłowska A, Kołożyn-Krajewska D. The Role of Microorganisms and Their Antibacterial Compounds in Food Biopreservation. Appl Sci. 2024;14(13):5557. <https://doi.org/10.3390/app14135557>
4. Dinglasan JLN, Otani H, Doering DT, et al. Microbial secondary metabolites: advancements to accelerate discovery towards application. Nat Rev Microbiol. 2025;1–17. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01141-y>
5. Liang M, Wang H, Zhou Z, et al. Antibacterial mechanism of *Lactiplantibacillus plantarum* SHY96 cell-free supernatant against *Listeria monocytogenes* revealed by metabolomics and potential application on chicken breast meat preservation. Food Chem. 2025;25:102078. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.102078>
6. Salminen S, Collado MC, Endo A, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(9):649–67. <https://doi:10.1038/s41575-021-00440-6>
7. Vinderola G, Sanders ME, Cunningham M, et al. Frequently asked questions about the ISAPP postbiotic definition. Front Microbiol. 2023;14:1324565. <https://doi:10.3389/fmicb.2023.1324565>

8. Arrijoa-Bretón D, Mani-López E, Palou E, et al. Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*. 2020;115:107286. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>
9. Rouhi A, Falah F, Azghandi M, et al. Investigating the effect of *Lactiplantibacillus plantarum* TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. *LWT*. 2024;191:115669. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115669>
10. Sarita B, Samadhan D, Hassan MZ, et al. A comprehensive review of probiotics and human health-current prospective and applications. *Front Microbiol*. 2025;15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1487641>
11. Moradi M, Kousheh SA, Almasi H, et al. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020;19(6):3390–415. <https://doi.org/10.1111/1541-4337>
12. Rathod NB, Phadke GG, Tabanelli G, et al. Recent advances in bio-preservatives impacts of lactic acid bacteria and their metabolites on aquatic food products. *Food Biosci*. 2021;44:101440. <https://doi.org/10.3390/foods10040773>
13. Yang H, Liu Y, Nychas G-JE, et al. Utilizing lactic acid bacteria and their metabolites for controlling *Listeria monocytogenes* in meat products: Applications, limitations, and future perspectives. *Trends Food Sci Technol*. 2024;104699. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104699>
14. Huang X, Nzekoue FK, Wang J, et al. A Study of Bioactivities and Composition of a Cocktail of Supernatants Derived from Lactic Acid Bacteria for Potential Food Applications. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2025. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10442-w>
15. Rocchetti MT, Russo P, De Simone N, et al. Immunomodulatory Activity on Human Macrophages by Cell-Free Supernatants to Explore the Probiotic and Postbiotic Potential of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains of Plant Origin. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2024;16(3):911–26. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10084-4>
16. Sionek B, Szydłowska A, Zielińska D, et al. Beneficial Bacteria Isolated from Food in Relation to the Next Generation of Probiotics. *Microorganisms*. 2023;11(7):1714. <https://doi.org/10.3390/foods11071714>
17. Neffe-Skocińska K, Karbowski M, Kruk M, et al. Polyphenol and antioxidant properties of food obtained by the activity of acetic acid bacteria (AAB)—A systematic review. *J Funct Foods*. 2023;107:105691. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105691>
18. Lynch KM, Zannini E, Wilkinson S, et al. Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2019;18(3):587–625. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440>
19. Liu G, Nie R, Liu Y, et al. Combined antimicrobial effect of bacteriocins with other hurdles of physicochemical and microbiome to prolong shelf life of food: A review. *Sci Total Environ*. 2022;825:154058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154058>
20. Neffe-Skocińska K, Długosz E, Szulc-Dąbrowska L, et al. Novel *Gluconobacter oxydans* strains selected from Kombucha with potential postbiotic activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2024;108(1):27. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12915-4>
21. Han D, Yang Y, Guo Z, et al. A Review on the Interaction of Acetic Acid Bacteria and Microbes in Food Fermentation: A Microbial Ecology Perspective. *Foods*. 2024;13(16):2534. <https://doi.org/10.3390/foods13162534>
22. Sharafi H, Divsalar E, Rezaei Z, et al. The potential of postbiotics as a novel approach in food packaging and biopreservation: a systematic review of the latest developments. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023;1–31. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2253909>
23. Mathur H, Field D, Rea MC, et al. Bacteriocin-Antimicrobial Synergy: A Medical and Food Perspective. *Front Microbiol*. 2017;8:1205. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01205>
24. Dan SD, Mihaiu M, Reget O, et al. Pathogens contamination level reduction on beef using organic acids decontamination methods. *B UASVM Vet Med*. 2017;74(2):212–217. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vet:0052>
25. Tirloni E, Bernardi C, Celandroni F, et al. Effectiveness of lactic and acetic acids on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in primo sale fresh cheese. *LWT*. 2021;151:112170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112170>
26. Sallam KI, Abd-Elghany SM, Hussein MA, et al. Microbial decontamination of beef carcass surfaces by lactic acid, acetic acid, and trisodium phosphate sprays. *Biomed Res Int*. 2020;2020(1):2324358. <https://doi.org/10.1155/2020/2324358>
27. Ramirez-Hernandez A, Brashears MM, Sanchez-Plata MX. Efficacy of lactic acid, lactic acid-acetic acid blends, and peracetic acid to reduce salmonella on chicken parts under simulated commercial processing conditions. *J Food Prot*. 2018;81(1):17–24. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-17-087>
28. Bangar SP, Suri S, Trif M, et al. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Biosci*. 2022;46:101615. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615>
29. Karbowski M, Szymanski P, Zielińska D. Synergistic Effect of Combination of Various Microbial Hurdles in the Biopreservation of Meat and Meat Products. *Foods*. 2023;12(7). <https://doi.org/10.3390/foods12071430>
30. Zielińska D, Marciniak-Lukasiak K, Karbowski M, et al. Effects of Fructose and Oligofructose Addition on Milk Fermentation Using Novel *Lactobacillus* Cultures to Obtain High-Quality Yogurt-like Products. *Molecules*. 2021;26(19). <https://doi.org/10.3390/molecules26195730>
31. Zielińska D, Lepecka A, Ołdak A, et al. Growth and adhesion inhibition of pathogenic bacteria by live and heat-killed food-origin *Lactobacillus* strains or their supernatants. *FEMS Microbiol Lett*. 2021;368(5). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab024>
32. Zielińska D, Długosz E, Zawistowska-Deniziak A. Functional Properties of Food Origin *Lactobacillus* in the Gastrointestinal Ecosystem—In Vitro Study. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019;11(3):820–9. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9458-z>
33. Neffe-Skocińska K, Kruk M, Ścibisz I, et al. The Novel Strain of *Gluconobacter oxydans* H32 Isolated from Kombucha as a Proposition of a Starter Culture for Sour Ale Craft Beer Production. *Appl Sci*. 2022;12(6):3047. <https://doi.org/10.3390/app12063047>
34. Ołdak A, Zielińska D, Rzepkowska A, et al. Comparison of Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Koryciński Cheese. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6820369. <https://doi.org/10.1155/2017/6820369>
35. Milk I. Milk Products: Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antibiotics Applicable to Bifidobacteria and Non-enterococcal Lactic Acid Bacteria. *ISO Stand*. 2010:10932, 2010.
36. Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*. 2021;8:101543. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101543>
37. Fatsis-Kavalopoulos N, Sánchez-Hevia DL, Andersson DI. Beyond the FIC index: The extended information from fractional inhibitory concentrations (FICs). *J Antimicrob Chemother*. 2024;79(9):2394–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac233>
38. Abubakar A, Fitri CA, Zulaini Z, et al. The Ability of *Lactobacillus plantarum* to Reduce the Growth of Bacteria in Beef Meat by the Differences in Temperature and Storage Time in Term of pH and Microbiological Tests. *International Conference on Improving Tropical Animal Production for Food Security (ITAPS 2021)*; 2022: Atlantis Press. <https://doi.org/10.2991/absr.k.220309.076>
39. Lepecka A, Okoń A, Szymański P, et al. The use of unique, environmental lactic acid bacteria strains in the traditional production of organic cheeses from unpasteurized cow's Milk. *Molecules*. 2022;27(3):1097. <https://doi.org/10.3390/molecules27031097>
40. Szymański P, Łaszkiwicz B, Kern-Jędrzychowska A, et al. The effect of the use of *Limosilactobacillus fermentum* S8 isolated from organic acid whey on nitrosyl pigment concentration and the colour formation of uncured cooked meat products. *Meat Sci*. 2023;196:109031. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.109031>
41. da Silva GAR, Oliveira SSS, Lima SF, et al. The industrial versatility of *Gluconobacter oxydans*: current applications and future perspectives. *World J Microbiol Biotechnol*. 2022;38(8):134. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03310-8>
42. Anguluri K, La China S, Brugnoli M, et al. Better under stress: Improving bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* K2G30 (UMCC 2756) using adaptive laboratory evolution. *Front Microbiol*. 2022;13:994097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.994097>
43. Pappenberger G, Hohmann HP. Industrial production of L-ascorbic Acid (vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2014;143:143–88. [https://doi.org/10.1007/10\\_2013\\_243](https://doi.org/10.1007/10_2013_243)
44. Zhu J, Xie J, Wei L, et al. Identification of the enzymes responsible for 3-hydroxypropionic acid formation and their use in improving 3-hydroxypropionic acid production in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Bioresour Technol*. 2018;265:328–33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.001>
45. He Y, Xie Z, Zhang H, et al. Oxidative Fermentation of Acetic Acid Bacteria and Its Products. *Front Microbiol*. 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.879246>
46. Švitel J, Šturdík E. n-Propanol conversion to propionic acid by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Technol*. 1995;17(6):546–50. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00088-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00088-9)

47. Filannino P, Bai Y, Di Cagno R, et al. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiol.* 2015;46:272–9. [https://doi:10.1016/j.fm.2014.08.018](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018)
48. Septembre-Malaterre A, Remize F, Poucheret P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Res Int.* 2018;104:86–99. [https://doi:10.1016/j.foodres.2017.09.031](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.031)
49. Łepecka A, Szymański P, Okoń A, et al. Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *LWT.* 2023;174:114440. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114440>
50. Kuo H-C, Kwong HK, Chen H-Y, et al. Enhanced antioxidant activity of *Chenopodium formosanum* Koidz. by lactic acid bacteria: Optimization of fermentation conditions. *PLOS ONE.* 2021;16(5):e0249250. [https://doi:10.1371/journal.pone.0249250](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249250)
51. Li T, Jiang T, Liu N, et al. Biotransformation of phenolic profiles and improvement of antioxidant capacities in jujube juice by select lactic acid bacteria. *Food Chem.* 2021;339:127859. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127859>
52. Okoń A, Łepecka A, Szymański P, et al. The Effect of the Use of the Beneficial Acetic Acid Bacteria Starter Cultures on the Microbiological and Physicochemical Quality of Raw Ripening Sausages. *Appl Sci.* 2024;15(1):263. <https://doi.org/10.3390/app15010263>
53. Yassunaka Hata NN, Surek M, Sartori D, et al. Role of Acetic Acid Bacteria in Food and Beverages. *Food Technol Biotechnol.* 2023;61(1):85–103. [https://doi:10.17113/ftb.61.01.23.7811](https://doi.org/10.17113/ftb.61.01.23.7811)
54. Pérez M, Dominguez-López I, Lamuela-Raventós RM. The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *J Agric Food Chem.* 2023;71(46):17543–53. [https://doi:10.1021/acs.jafc.3c04022](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022)
55. Mueller EA, Levin PA. Bacterial Cell Wall Quality Control during Environmental Stress. *mBio.* 2020;11(5). [https://doi:10.1128/mBio.02456-20](https://doi.org/10.1128/mBio.02456-20)
56. Stoyanova LG, Ustyugova EA, Netrusov AI. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Appl Biochem Microbiol.* 2012;48(3):229–43. [https://doi:10.1134/s0003683812030143](https://doi.org/10.1134/s0003683812030143)
57. da Costa WKA, de Souza GT, Brandão LR, et al. Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Res Int.* 2018;108:172–82. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.045>
58. Karbowski M, Gałek M, Szydłowska A, et al. The Influence of the Degree of Thermal Inactivation of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Their Postbiotics on Aggregation and Adhesion Inhibition of Selected Pathogens. *Pathogens.* 2022;11(11). [https://doi:10.3390/pathogens11111260](https://doi.org/10.3390/pathogens11111260)
59. Selegato DM, Castro-Gamboa I. Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation. *Front Microbiol.* 2023;14. [https://doi:10.3389/fmicb.2023.1117559](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1117559)
60. Singh S, Shalini R. Effect of Hurdle Technology in Food Preservation: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(4):641–9. [https://doi:10.1080/10408398.2012.761594](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761594)
61. Segli F, Melian C, Muñoz V, et al. Bioprotective extracts from *Lactobacillus acidophilus* CRL641 and *Lactobacillus curvatus* CRL705 inhibit a spoilage exopolysaccharide producer in a refrigerated meat system. *Food Microbiol.* 2021;97:103739. [https://doi:10.1016/j.fm.2021.103739](https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103739)
62. Wang J, Xu L, Gu L, et al. Cell-Free Supernatant of *Lactiplantibacillus plantarum* 90: A Clean Label Strategy to Improve the Shelf Life of Ground Beef Gel and Its Bacteriostatic Mechanism. *Foods.* 2023;12(22). [https://doi:10.3390/foods12224053](https://doi.org/10.3390/foods12224053)
63. Abouloifa H, Hasnaoui I, Ben Slima S, et al. Bio-preservation Effect of Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* S61 Against *Rhodotorula glutinis* and *Listeria monocytogenes* in Poultry Meat. *Curr Microbiol.* 2022;79(8):232. [https://doi:10.1007/s00284-022-02923-4](https://doi.org/10.1007/s00284-022-02923-4)
64. Saad SM, Hassanin FS, Salem AM, et al. Efficiency of some organic acids as decontaminants in sheep carcasses. *Benha Vet Med J.* 2020;38(2):116–9. [https://doi:10.21608/bvmj.2020.27504.1197](https://doi.org/10.21608/bvmj.2020.27504.1197)
65. Spanu C, Scarano C, Ibba M, et al. Microbiological Challenge Testing for *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Food: A Practical Approach. *Ital J Food Saf.* 2014;3(4). [https://doi:10.4081/ijfs.2014.4518](https://doi.org/10.4081/ijfs.2014.4518)
66. Zhang L, Ben Said L, Diarra M S, et al. Inhibitory Activity of Natural Synergetic Antimicrobial Consortia Against *Salmonella enterica* on Broiler Chicken Carcasses. *Front Microbiol.* 2021;12:656956. [https://doi:10.3389/fmicb.2021.656956](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656956)
67. Kim J, Kim S, Wang J, Ahn J. Synergistic antimicrobial activity of essential oils in combination with phage endolysin against *Salmonella Typhimurium* in cooked ground beef. *Food Control.* 2024;157:110187. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110187>
68. Elbarbary NK, Abdelmotilib NM, Salem-Bekhit MM, et al. Antibacterial efficiency of apple vinegar marination on beef-borne *Salmonella*. *Open Vet J.* 2024;14(1):274–83. [https://doi:10.5455/OVJ.2024.v14.i1.24](https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i1.24)
69. Łepecka A, Szymański P, Okoń A, et al. The Use of Apple Vinegar from Natural Fermentation in the Technology Production of Raw-Ripened Wild Boar Loins. *Foods.* 2023;12(21). [https://doi:10.3390/foods12213975](https://doi.org/10.3390/foods12213975)
70. Ben Braïek O, Smaoui S. Chemistry, Safety, and Challenges of the Use of Organic Acids and Their Derivative Salts in Meat Preservation. *J Food Qual.* 2021;2021:1–20. [https://doi:10.1155/2021/6653190](https://doi.org/10.1155/2021/6653190)
71. Karbowski M, Wójcicki M, Hyun JE, et al. Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived *Lactocaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. *LWT.* 2025;118597. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118597>
72. Hu X, Shou B, Yang L, et al. Antimicrobial photodynamic therapy encapsulation technology: Frontier exploration and application prospects of novel antimicrobial technology. *Chem Eng J.* 2023;146773. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146773>



# Novel antimicrobial compounds from fermented food-derived *Lacticaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 strains: Genomic and proteomic analysis

Marcelina Karbowskiak<sup>a,\*</sup>, Michał Wójcicki<sup>b</sup>, Jae-Eun Hyun<sup>c</sup>, Piotr Szymański<sup>d</sup>, Yan-Dong Niu<sup>c,\*\*</sup>, Dorota Zielińska<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Nowoursynowska 166, 02-787, Warsaw, Poland

<sup>b</sup> Bacteriophage Laboratory, Department of Phage Therapy, Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Weigla 12, 53-114, Wrocław, Poland

<sup>c</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, T2N 1N4, Canada

<sup>d</sup> Department of Meat and Fat Technology, Prof. Waclaw Dabrowski Institute of Agricultural and Food Biotechnology – State Research Institute, Rakowiecka 36, 02-532, Warsaw, Poland

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Lactic acid bacteria  
Bacteriocins  
Antimicrobial activity  
Food biopreservatives  
*Lacticaseibacillus paracasei*  
*Lactiplantibacillus plantarum*  
Biological characteristics

## ABSTRACT

This study investigated the genomic and functional characteristics of antimicrobial compounds produced by *Lacticaseibacillus paracasei* strain B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24, previously isolated from traditional Polish fermented foods. Whole-genome sequencing and bioinformatics analyses revealed multiple gene regions encoding bacteriocins, including lactococcins, plantaricins, and enterolysin A, with genes on both chromosomes and plasmids. Experimental validation confirmed the proteinaceous nature of the active antimicrobial substances, as evidenced by their sensitivity to proteolytic enzymes (trypsin, pepsin, and proteinase K) and their stability under heat (40–100 °C) and acidic pH conditions. Antimicrobial activity was observed against Gram-positive and Gram-negative bacteria, significantly inhibiting *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. Fourier-Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy assessed functional groups and active sites. Purification and molecular weight estimation via SDS-PAGE analysis identified protein bands of approximately 15 kDa and 10 kDa. LC-MS/MS analysis confirmed these results and indicated partial homology with previously reported bacteriocins, suggesting they may represent novel bacteriocins or bacteriocin-like inhibitory substances. These findings highlight the potential of food-origin lactic acid bacteria strains as a source of diverse and robust antimicrobial compounds, paving the way for food preservation and antimicrobial therapy applications.

## 1. Introduction

Food contamination with microorganisms remains a pressing problem in the modern world, posing significant risks to public health and the food industry. Despite advancements in food safety protocols and preservation techniques, the persistence of microbial contamination underscores the need for innovative and effective solutions (Thakali & MacRae, 2021). Traditional chemical preservatives, while effective, have raised concerns due to their potential health risks and environmental impact. Consequently, there is a growing demand for "green" and natural preservatives that can ensure food safety without compromising health or the environment (Pisoschi et al., 2018).

Lactic acid bacteria (LAB) are a diverse group of Gram-positive, non-sporulating, and microaerophilic microorganisms that primarily generate lactic acid through glucose fermentation. These bacteria are crucial as starter cultures or supplementary agents in developing desirable traits in food products (de Lira et al., 2023). LAB are renowned for their ability to produce a wide range of antimicrobial compounds, including organic acids, hydrogen peroxide, and bacteriocins. LAB are commonly found in fermented foods and have a long history of safe use in food preservation (Gajendran & Rajamani, 2024). Their potential to inhibit the growth of both spoilage and pathogenic microorganisms makes them invaluable in extending the shelf life of various food products (Marcelli et al., 2024). The significance of environmental LAB strains lies in their untapped biodiversity and adaptation to diverse

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl](mailto:marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl) (M. Karbowskiak), [dongyan.niu@ucalgary.ca](mailto:dongyan.niu@ucalgary.ca) (Y.-D. Niu).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118597>

Received 15 June 2025; Received in revised form 22 September 2025; Accepted 5 October 2025

Available online 8 October 2025

0023-6438/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Abbreviations

B1	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> strain B1
O24	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> strain O24
CFS	cell-free supernatant
nCFS	neutralized cell-free supernatant
LAB	lactic acid bacteria
PBS	phosphate-buffered saline
MRS	deMan, Rogosa, and Sharpe broth

ecological niches, such as traditional fermented foods, soil, and plants (Hernández-Velázquez et al., 2024). While many commercial strains also originate from natural environments, they are often standardized and used repeatedly across different applications, which can lead to reduced microbial diversity in food systems. In contrast, environmental strains offer a broader spectrum of metabolic capabilities and adaptive traits due to their exposure to varying and sometimes harsh conditions. This diversity makes them especially promising for the development of novel and effective antimicrobial agents (Łepecka et al., 2021).

Among the substances produced by LAB, antimicrobial peptides (AMPs) such as bacteriocins and bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) stand out for their potent antimicrobial properties. Bacteriocins are peptides synthesized by ribosomes with bactericidal properties, typically displaying a narrow spectrum of activity limited to species closely related to the producer strain (Abanoz & Kunduhoglu, 2018). They are classified into four classes – I, II, III, and IV, based on their structure, mechanisms of action, and genetic determinants. Their genomic and functional characteristics can be accessed through web-based platforms, such as BACTIBASE, BUR, BAGEL 4, and others. The effectiveness of bacteriocins in inhibiting foodborne pathogens and spoilage organisms has garnered significant attention in recent years (Liu et al., 2022). Despite their potential, only two bacteriocins, pediocin PA1 and nisin, are commercially available, in part due to regulatory hurdles such as the FDA's GRAS pathway in the U.S. and similar safety and authorization requirements in the European Union, which often demand comprehensive toxicity data that are lacking for less-studied bacteriocins (Duraisamy et al., 2023). The limited availability of commercial bacteriocins highlights the need for continued exploration and discovery of new bacteriocins from diverse LAB strains.

The search for new bacteriocins is driven by the need to address existing preservatives' limitations and combat the emergence of antimicrobial-resistant pathogens. Environmental LAB strains, with their diverse genetic backgrounds and unique metabolic profiles, represent a rich reservoir of potential bacteriocins. Identifying and characterizing novel bacteriocins from these strains could enrich food preservation and enhance food safety.

The purpose of this study was to assess the antimicrobial activity of two LAB strains previously isolated from traditional Polish fermented food products and verify the proteinaceous nature of antimicrobial compounds produced by these bacteria. Moreover, a comprehensive genome analysis of these strains, prediction of bacteriocin-related genes, and evaluation of the antimicrobial activity and stability of the produced compounds and physicochemical properties to facilitate the research and development of LAB's bacteriocin-related products have been made.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains, media, and culture conditions

Two LAB strains, *Lactocaseibacillus paracasei* strain B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24, were obtained from the Culture Collection of the Department of Food Gastronomy and Food Hygiene, Warsaw University of Life Sciences (WULS-SGGW), Poland. These

strains were initially isolated from traditional Polish fermented food products (strain B1 was isolated from Bundz cheese produced in the Carpathian region, whereas strain O24 was isolated from homemade dill pickles). The bacterial strains evaluated in this study were selected on the basis of results from previous research (Oldak et al., 2020; Zielińska et al., 2015, 2019). Strains were preserved at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in MRS broth (deMan, Rogosa, and Sharpe, Neogen, Lansing, MI, USA) with 20 % glycerol (v/v). Before each experiment, strains were subcultured in 10 mL MRS at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (pH 6.5).

### 2.2. Genome analysis of lactic acid bacteria strains

GenXone SA (Zlotniki, Poland) was commissioned to sequence the bacterial genomes. For this purpose, bacterial genetic material was isolated using the Genomic Mini AX Bacteria kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), according to the manufacturer's protocol. DNA libraries were prepared using Rapid Barcoding Kit reagents (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) per the manufacturer's instructions. A sequencing depth of at least  $50\times$  genome coverage was assumed. Next-generation sequencing (NGS) was performed in the nanopore technology on the GridION X5 sequencing device (Oxford Nanopore Technologies) under the control of MinKnow v22.10.5. Bases were called with Guppy v6.3.8 Basecaller (Oxford Nanopore Technologies), followed by barcode demultiplexing, also using Guppy Barcoder v6.3.8 (Oxford Nanopore Technologies), generating a fastq file for each barcode. *De novo* assembly of genomes was performed in Flye v2.8.1 software (Kolmogorov et al., 2019), annotation of bacterial genomes in Prokka 1.14.6 v1.1.1 software (Seemann, 2014), Bakta v1.8.2 software (Schwengers et al., 2021), and Reference Sequence (RefSeq) v6.7 database at National Center for Biotechnology Information (NCBI) (O'Leary et al., 2016). Proksee software (<https://proksee.ca/>) was used to visualize bacterial genomes. The RGI 6.0.3 v1.2.1 software was used to search for antibiotic resistance genes (ARGs) in bacterial genomes (Alcock et al., 2023). In this analysis, loose hits, nudged hits, and low-quality sequences are not included. Alien\_hunter 1.7 v1.1.0 software predicted putative horizontal gene transfer (HGT) events (Vernikos & Parkhill, 2006). Mobile genetic elements (MGEs) were searched in mobileOG-db (beatrix-1.6) v1.1.3 software (Brown et al., 2022). The following search criteria were used: minimum percent of identical matches to report an alignment: 60; minimum percent of query coverage to report an alignment: 80; and number of diamond alignments to report: 1. CRISPR arrays and their associated Cas proteins were analyzed in CRISPRCas-Finder 4.2.20 v1.1.0 software (Couvin et al., 2018). VirSorter 2.2.4 v1.1.1 (Guo et al., 2021) and Phigaro 2.3.0 v1.0.1 (Starikova et al., 2020) software were used to detect and characterize prophage regions in bacterial genomes. The BAGEL 4 web server (van Heel et al., 2018) was used to predict bacteriocin-related genes and other bacterial ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides. The LAB genomes were deposited in the GenBank database (accession numbers: CP161807 and CP161808 for strain B1; CP157747-CP157755 for strain O24).

### 2.3. Lactic acid bacteria preparations

The LAB strains were anaerobically cultured in fresh MRS broth at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 16–18 h to achieve a  $1 \times 10^9$  CFU/mL concentration. Aliquots of culture medium were centrifuged at  $6000\times g$  for 15 min, at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Eppendorf SE, Hamburg, Germany). Cell-free supernatants (CFSs) were adjusted to  $\text{pH } 6.5 \pm 0.2$  with a 1M NaOH solution to obtain the neutralized cell-free supernatants (nCFSs). Then, supernatants were filter sterilized ( $0.22\text{ }\mu\text{m}$ , AlfaChem, Poznań, Poland) and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The pH of the supernatant was measured. pH measurements were performed using an Orion Star™ A211 pH meter (Thermo Fisher Scientific, Newton, NH, USA).

## 2.4. Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was evaluated against indicator microorganisms: Gram-positive: *Listeria monocytogenes* strain ATCC 19111, *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923, *Bacillus spizizenii* (formerly *B. subtilis* subsp. *spizizenii*) strain ATCC 6633, and *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, and Gram-negative: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (S. Enteritidis) strain ATCC 13076, *Escherichia coli* O157:H7 strain ATCC 10536, and *Pseudomonas fluorescens* strain PCM 2123. *Salmonella enterica* was grown using Buffered Peptone Water (BPW) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). *Escherichia coli* O157:H7 was cultivated in Tryptone Soya Broth (TSB) (Sigma, Oakville, ON, Canada). The remaining bacterial strains were cultivated on Nutrient Agar (NA) (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) for enumeration. After incubation, a single colony from each strain was transferred to MH broth (Mueller Hinton, Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) and grown aerobically for 24–48 h at 37 °C to achieve a concentration of approximately  $1.4 \times 10^7$  CFU/mL. CFSs and nCFS were assessed for antimicrobial activity using the agar-well diffusion method according to Ren et al., 2023 with slight modifications (Ren et al., 2023). Bacterial preparations were placed in wells cut in Mueller-Hinton agar (MHA) plates, individually seeded with indicator stains, and dried for 15 min. The plates were incubated at 37 °C for 18 h and observed for the zone of inhibition around the wells.

## 2.5. Stability assays

CFS's sensitivity to heat, pH, and proteolytic enzymes was determined.

The effect of heat on the antimicrobial activity was tested by heating CFS at 60, 80, 100, or 121 °C for 20 min in the water bath (Thermo Fisher Scientific, Newington, NH, USA). The impact of pH on antimicrobial activity was evaluated by adjusting the pH of the CFS to a range from 2 to 11 using sterile 1 M NaOH or 1 M HCl. To assess the effect of enzymes on the antimicrobial activity of CFS, bacterial preparations were treated with trypsin, pepsin, and proteinase K (Merck Life Science, Darmstadt, Germany) at a concentration of 1 mg/mL. Enzymes were dissolved (0.2 %, wt/v) in 0.05 mol/L Tris buffer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). Next, enzyme solutions were filter sterilized through a 0.22 µm syringe filter. The CFS were incubated with each enzyme solution at 37 °C for 2 h.

Residual antimicrobial activity for all assays was evaluated using the agar well-diffusion method described above using *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *S. Enteritidis* as the indicator strains. The residual antimicrobial activity was calculated for each treatment according to the inhibition zone loss against the control (Twomey et al., 2021).

## 2.6. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy analysis

The functional and active groups in the preparations derived from *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 were characterized using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). The analysis was conducted on pure CFS extracts and supernatants subjected to heat inactivation. Heat inactivation was employed as a fixation method to preserve the stability of proteins while fully deactivating other components, such as organic acids. The CFS samples were prepared as described previously. The heat inactivation step involved placing the solutions in a water bath at 80 °C, with aliquots collected after 5, 15, and 30 min of treatment. The preparations were dried and pressed into potassium bromide (KBr) pellets approximately 1 mm thick. Infrared (IR) spectra were recorded across the absorbance range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  using a Nicolet 6700 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA).

## 2.7. Ammonium sulfate precipitation and partial purification

CFS of both strains and MRS broth as a control were precipitated using ammonium sulfate (Chempur, Piekary Śląskie, Poland) at 80 % saturation, according to (Mulyawati et al., 2019), with minor modifications. The salt-protein system was left at 4 °C with constant stirring for 24 h, after which the precipitates were collected by centrifugation at  $6000 \times g$  for 15 min, at 4 °C, and dissolved in 0.2 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). The suspensions were injected into the Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassette (Thermo Fisher Scientific, Newington, NH, USA) with a molecular weight cut-off of 2 kDa and then dialyzed against 0.05 M PBS (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) with stirring at 4 °C for 24 h. After dialysis, partially purified suspensions were stored at –20 °C.

The purification yield rate was determined using a serial double dilution method, according to Lei et al. (2020) (Lei et al., 2020), with minor modifications. *E. coli* O157:H7 was used as the indicator strain. After each purification step, the antibacterial activity results of the fractions were expressed in arbitrary units (AU/mL), and one AU was defined as the reciprocal of the highest serial two-fold dilution, showing a clear zone of growth inhibition of the indicator strain. Briefly, the neutralized cell-free supernatants were subjected to serial two-fold dilutions with sterile deionized water and dispensed into the wells. The activity (AU/mL) was determined from the formula:  $2^n \times 1000 \text{ mL}/x$ , where n was the highest dilution that could inhibit the indicator strain, and x represents the sample volume (mL) added into the wells.

The protein content was determined at each step using the Qubit® Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Newington, NH, USA).

## 2.8. Molecular weight estimation

After purification, the molecular weight of the proteinaceous substances in the suspensions was approximately estimated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using SurePAGE™ 8–16 % gels (GenScript, Piscataway, NY, USA) with PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) with a range of 10–250 kDa. The gel was subjected to 120 mV for 1.5 h and then stained with Coomassie blue (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) for visualization.

The target protein bands were cut from the lanes, stored at 4 °C, and provided to the Mass Spectrometry Laboratory at the Institute of Biochemistry and Biophysics PAS (Warsaw, Poland) for LC-MS/MS analysis.

## 2.9. Protein digestion

Samples were fragmented into smaller pieces and destained with 50 % acetonitrile (ACN) in 50 mM ammonium bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Gel pieces were dried with 100 % ACN and subjected to cysteine reduction with 10 mM DTT in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 30 min at 57 °C. Then cysteines were alkylated with 0.5 M iodoacetamide in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (45 min in a darkroom at room temperature ( $22 \pm 2$  °C)), and proteins were digested overnight (approximately 16–18 h) with 10 ng/µL trypsin in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Promega Corporation, Madison, WI, USA) at 37 °C. After digestion, peptides were extracted with a solution of 0.1 % TFA and 2 % ACN.

## 2.10. Mass spectrometry

40 µL of peptide mixture was injected into an LC-MS system composed of Evosep One (Evosep Biosystems, Odense, Denmark) directly coupled to an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Peptides were loaded onto disposable Evotips C18 trap columns (Evosep Biosystems, Odense, Denmark) according to the manufacturer's protocol with some modifications to prevent sample drying. Briefly, Evotips were activated with

25  $\mu\text{L}$  of Evosep solvent B (0.1 % formic acid in ACN) by 1 min centrifugation at 600 $\times g$ , followed by 2 min incubation in 2-propanol. After equilibration with 25  $\mu\text{L}$  of solvent A, 20  $\mu\text{L}$  of each sample solution was loaded onto the solid phase. Bound peptides were washed with 50  $\mu\text{L}$  and covered with 300  $\mu\text{L}$  of solvent A. Chromatography was carried out at a flow rate of 500 nL/min using the 44 min (30 samples per day) preformed gradient on EV1137 analytical column (Dr Maisch C18 AQ, 1.5  $\mu\text{m}$  beads, 150  $\mu\text{m}$  ID, 15 cm long, Evosep Biosystems, Odense, Denmark). Data was acquired in positive mode with a data-dependent method using the following parameters. MS1 resolution was set at 60,000 with a normalized AGC target of 300 %, Auto maximum inject time, and a scan range of 300–1500 m/z. For MS2, a resolution was set at 15,000 with a Standard normalized AGC target, Auto maximum inject time, and top 40 precursors within an isolation window of 1.4 m/z considered for MS/MS analysis. Dynamic exclusion was set at 20 s with an allowed mass tolerance of  $\pm 10$  ppm, the precursor intensity threshold at 5e3, and the Precursor Fit threshold at 70 %. Precursors were fragmented in HCD mode with a normalized collision energy of 32 %. The spray voltage was set to 2.1 kV, the funnel RF level at 40, and the heated capillary temperature at 275  $^{\circ}\text{C}$ .

### 2.11. Data analysis

Raw MS files were pre-processed with Mascot Distiller (v2.8.5, Matrixscience) and submitted to the Mascot Server (v2.8.3, Matrixscience) for protein identification. The following parameters were used: enzyme – Trypsin, missed cleavages – 1, instrument – HCD, fixed modifications – Carbamidomethyl (C), variable modifications – Oxidation (M). Offline mass recalibration was performed, with a resulting peptide mass tolerance of 5 ppm and fragment mass tolerance of 0.01 Da. The *Lactobacillales* protein database (3320745 sequences) derived from UniProt (v06\_2024), supplemented with a database of popular MS contaminants (115 sequences, Crap database), was used. A decoy-reversed database was used to compute FDR, which was kept below 5 %.

### 2.12. Statistical analysis

Statistica v13.1 software (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) was employed. The Brown-Forsythe test was used to assess the variance homogeneity, while the Shapiro-Wilk test verified data normality. A one-way ANOVA was conducted, and Tukey's test was applied to identify significant differences ( $p < 0.05$ ) between the data sets.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Genome analysis of lactic acid bacteria strains

Whole-genome sequencing was performed for the isolates. The fully assembled genomes of strain B1 (*L. paracasei*) and strain O24 (*L. plantarum*) were deposited in GenBank under accession numbers CP161807–CP161808 and CP157747–CP157755, respectively. The sequencing quality metrics for both bacterial isolates are provided in the Supplementary Materials (Table S1).

Bacteriocin-producing *L. plantarum* strains have previously been isolated from various sources, including fermented (Joishy et al., 2024; Zheng et al., 2024), dairy products (Gizachew & Engidawork, 2024; Sabri et al., 2024), and plant-derived fermented products (Rwubuzizi et al., 2023; Thuy et al., 2024). Similarly, bacteriocinogenic *L. paracasei* strains have been reported from food products (Haryani et al., 2023; Huang et al., 2024; Kiouisi et al., 2022). Both species are recognized as safe by regulatory authorities, holding GRAS status (USFDA) and QPS status (EFSA), with a long history of use in food (Gajendran & Rajamani, 2024).

As summarized in Table S2 and Fig. S1, the *L. paracasei* B1 genome consists of one chromosome (3,113,638 bp, 46.24 % G + C) and one plasmid (26,855 bp, 43.46 % G + C). A glycopeptide resistance gene

cluster (*vanT*) was identified in the chromosome, consistent with intrinsic vancomycin resistance known among LAB due to modified peptidoglycan precursors (Ammor et al., 2007). Unlike transferable vancomycin resistance genes (e.g., *vanA*, *vanB* in *Enterococcus*), the *vanT* cluster is chromosomally encoded and considered non-transferable, posing no safety concerns for probiotic or food-related applications. Sixty-two putative horizontal gene transfer (HGT) events and 159 mobile genetic element (MGE)-related regions were identified. Among these, 45 regions were phage-related, involving structural proteins, viral packaging systems, and lysogeny machinery. Transfer-associated genes included conjugation-related elements (e.g., type IV secretion systems), natural competence genes, and recombination machinery. Integration/excision regions featured site-specific recombinases, transposases, and regulatory elements. Additional MGE-associated regions were linked to replication/repair and host defense systems, including restriction-modification and CRISPR elements. A total of seven CRISPR arrays and four Cas genes were detected in the chromosome, including a complete type II-A CRISPR-Cas cluster (6142 bp). This system plays a key role in immunity against bacteriophages and plasmids, as well as maintaining genome stability by limiting HGT (Kadkhoda et al., 2024; Rostampour et al., 2024). Notably, type II systems use Cas9 endonucleases to target foreign DNA through recognition of short PAM sequences (Pujato et al., 2021). In *L. paracasei* B1, four prophage-related regions and 169 genes were also identified (Fig. S1A), including genes involved in integration. The B1 plasmid did not carry any ARGs or prophage genes but contained one predicted HGT event and seven MGE-related regions. One CRISPR array (145 bp) was detected, although Cas proteins were absent (Fig. S1B).

The genome of *L. plantarum* O24 consists of a chromosome (3,126,794 bp, 44.71 % G + C) and eight plasmids (Table S3–S4, Fig. S2). Two ARGs were identified in the chromosome: *vanH* and *vanY*, both associated with vancomycin resistance. Sixty-one putative HGT events and 125 MGE-related regions were predicted. Of these, 41 regions were phage-related, and others included conjugative elements, integrases, recombinases, and replication/repair proteins. These findings are within the expected range for *L. plantarum*, which is known for its genomic flexibility and ability to acquire and maintain MGEs under various environmental conditions (Aziz et al., 2023; Lv et al., 2025). A single CRISPR array (198 bp) was detected, but no Cas genes were found. Three prophage regions containing 95 genes were identified in the chromosome (Fig. S2A); interestingly, no integration-related genes were annotated, suggesting possible prophage decay or domestication. Among the plasmids, only pLplO24\_7 harbored prophage elements (10 genes), while pLplO24\_2 had one phage-associated region of unknown function. No CRISPR-Cas systems were detected on any of the plasmids.

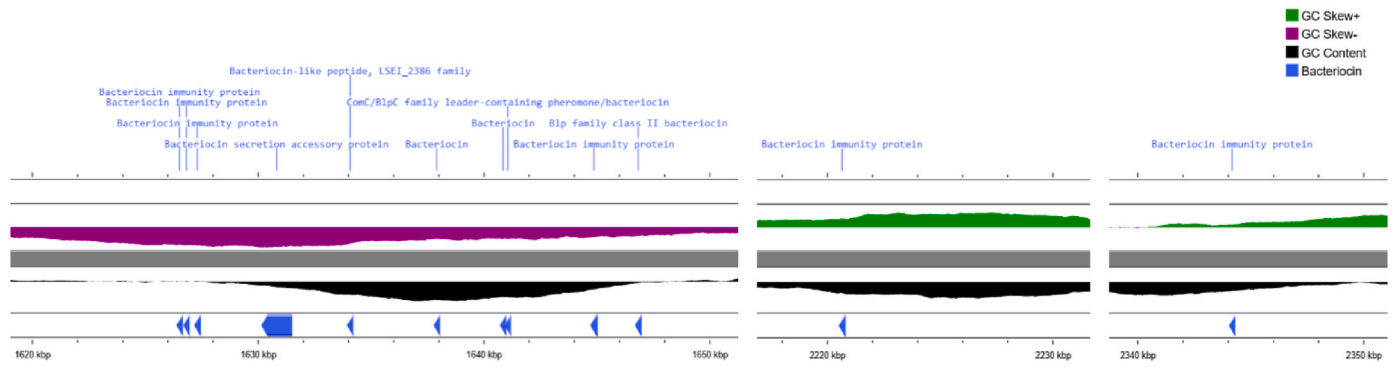
These results highlight genomic features relevant to food safety, phage resistance, and adaptation in complex microbial environments. The presence of CRISPR-Cas systems, particularly subtype II-A in *L. paracasei* B1, suggests evolutionary strategies for survival in phage-rich niches such as dairy fermentations. Additionally, the absence of transferable ARGs and the predominance of chromosomal, non-mobile resistance elements support the biosafety of these strains for food use.

### 3.2. Prediction of bacteriocin-related genes

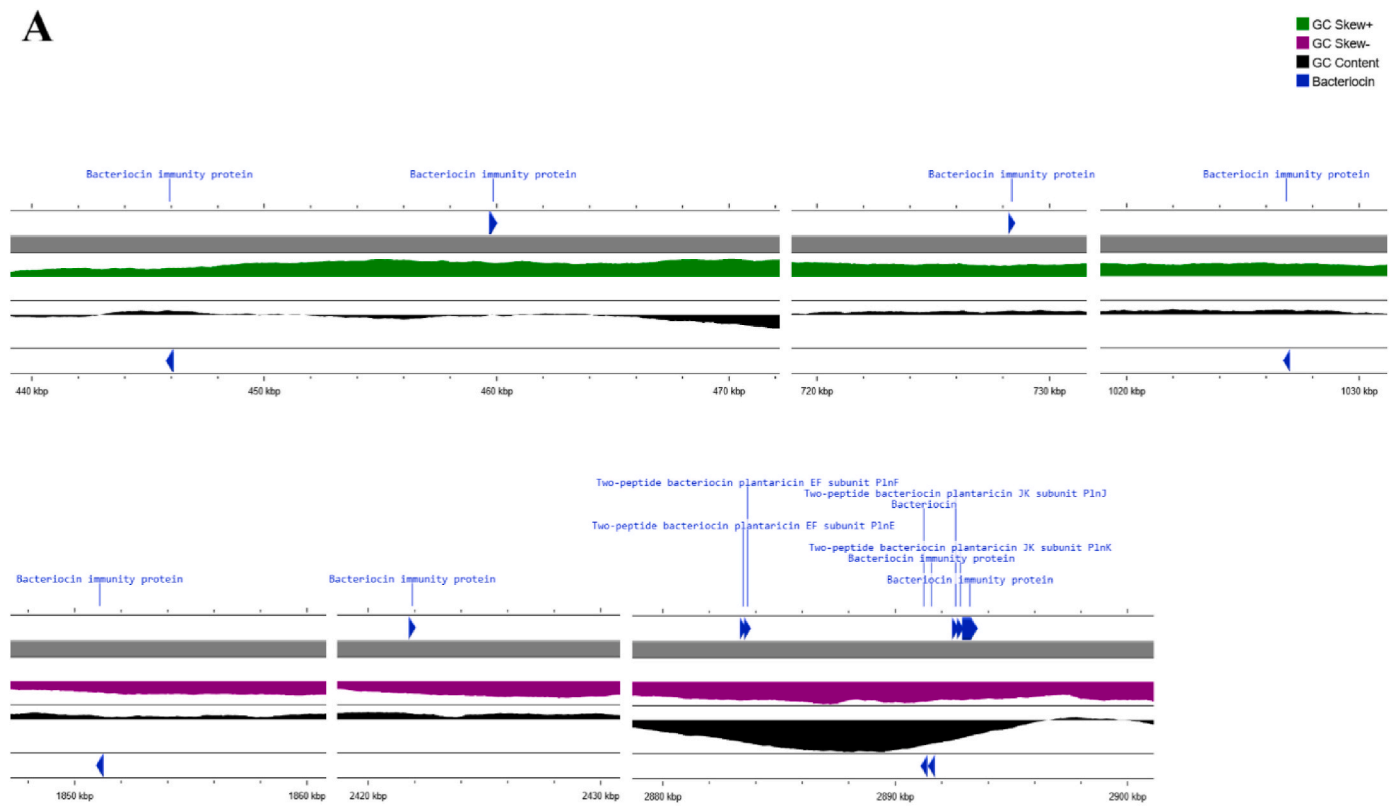
Regarding *L. paracasei* strain B1, analysis performed based on the RefSeq v6.7 (GCF) genome assembly revealed the presence of 12 gene regions in the chromosome whose protein products have bacteriocin properties (Table 1). The location of these regions in the genome of this strain is shown in Fig. 1. In turn, the BAGEL4 search predicted two Areas of Interest (AOIs) in which putative gene clusters for the biosynthesis of antibacterial substances are located in the *L. paracasei* strain B1 chromosome (Fig. 3). The first bacteriocin biosynthetic gene cluster (BBCG) is AOI\_1 (24,245 bp), which contains 76 ORFs with seven core peptides, while the second BBCG is AOI\_02 (20,180 bp), which comprises 45 ORFs with one core peptide (Table 2). Other predicted gene features in AOI\_1

**Table 1**  
Bacteriocins detected in *Lactocaseibacillus paracasei* strain B1 chromosome (based on RefSeq (GCF) genome assembly).

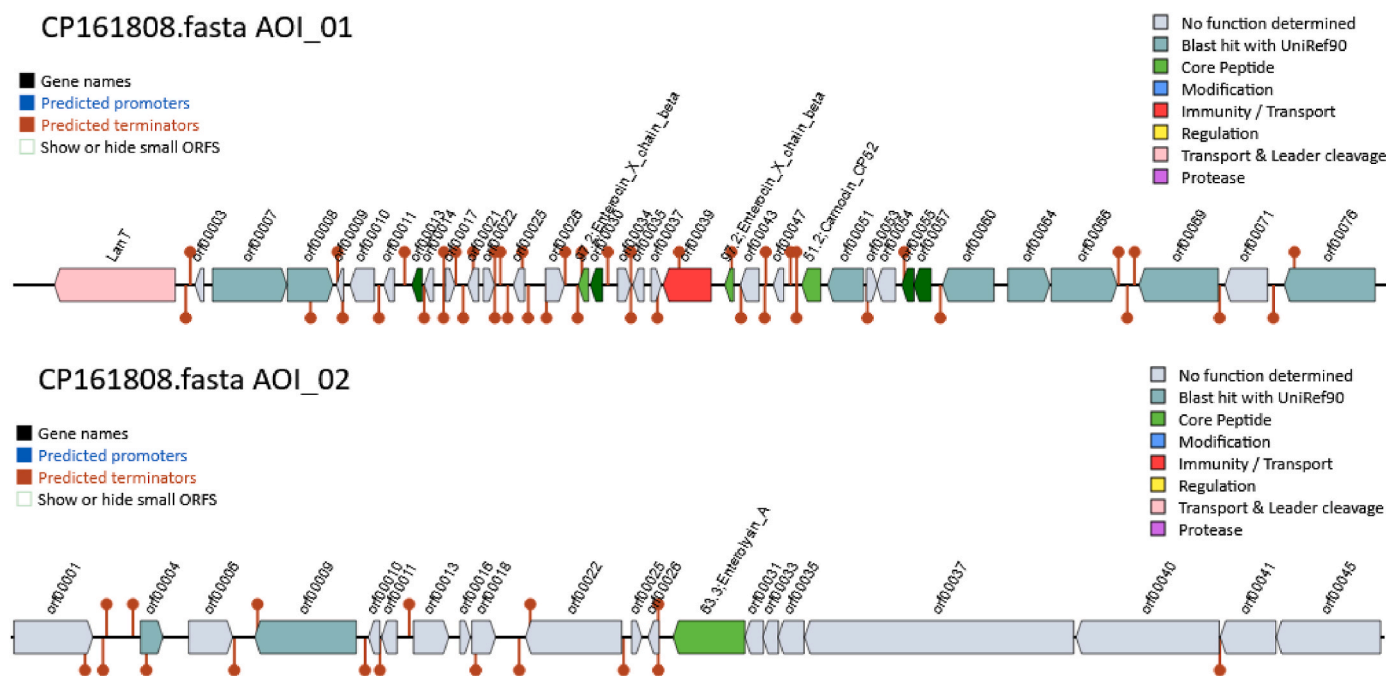
Protein ID	Locus Tag	Gene type	CDS location in the genome			Gene product	Length [amino acids]	Structural peptide/Amino acids sequence	Organism
			Orientation	Start	Stop				
WP_003567328.1	V8V89_RS08255	protein-coding	minus	1626374	1626652	bacteriocin immunity protein	92	MKKQETQLFEAIDVAYADPEIAKQDDLRKLLFTAQHLQN GDPYQMVAVKLNKSIRYVALHQLDAPDALNKLYMKIGP MDDRDWGLTQIFR	Lactobacillaceae
WP_003580845.1	V8V89_RS08260	protein-coding	minus	1626676	1626960	bacteriocin immunity protein	94	MGGKETRLFQAIDGAYNDAAVQSDDEIKRFLFESAQRLAS GDRFSYVAARLDSFIASYSQVHHFQYPSALEPVYKLVAGAS MRARGGGGLSVWL	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_013246034.1	V8V89_RS08265	protein-coding	minus	1627153	1627449	bacteriocin immunity protein	98	MSILKQWYAGGQDRAEQAISILTELVDLNLHNSQKQKPLQVQ LSDYIEALKRKESAVPFILSRMNLDISSALKNNQFVLTASES DKLDALMALANIRYGY	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_013246038.1	V8V89_RS08285	protein-coding	minus	1630123	1631502	bacteriocin secretion accessory protein	459	MIDLKLETTEFYNHRYRNFSTVIIIVPTAILFVLLLFLIFAK REVTVLTAAEIAPVKTAVTVQGTAAANRIVTNHMKEGKHV KRGDTLLVYHDVAHPAQLKVLEQQLATLKDQKAQLEVLN QSIANKNLFASPDKFGYQQVVRDYLQRVVELESEALH ATQGVADGKSKEIDQLQTSMQASEAKMTAIREAQTAIRT DRPLSDNHTYNYLYLQYKAEAKNADAANLNSLKGQYQSQ LQNLLTTEKETLASLRTQRINQKQADLSAQQTGQNEAKLA SLQSHMQQTMTAEQVKVQGTQEGEAKLAALKDESKNY QVKASASGVLHLEASLSGNKYIPAGTVLAQILPDLATQKEV ELKLVSPAEMISLKRQSVRLRAENVPSPMTLTGRIDAI DVAPTNAKVGNYFKVQARVPLSKQQRQTLHYGIAGQA AVITGTKTYWQYFVDKMFNHQ	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_013246040.1	V8V89_RS08295	protein-coding	minus	1633993	1634148	bacteriocin-like peptide, LSEI_2386 family	51	MNVKSKVKKETTTLMDQDYDLSLVR GGIRRPTEAFESLKKWLNLIQGKS	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_013246044.1	V8V89_RS08320	protein-coding	minus	1637819	1637998	bacteriocin	59	MINDKKIYLTDEEMANVSGSSEYDQYYKNKYKHGQELR KVVDAIGSIVNLIPIFFGKRA	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_013246049.1	V8V89_RS08345	protein-coding	minus	1640757	1640930	bacteriocin	57	MTNLKDKELSQTGGFAFVIPVAAILGFLASDAWHADEI ASGAKTGWEIANKHKIY	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_013246050.1	V8V89_RS08350	protein-coding	minus	1640969	1641142	ComC/BlpC family leader-containing pheromone/bacteriocin	57	MQQFMTLDNSSLEKIAGGNGGLWSILGLGLGFSARRAN SLFGSPPEMALDLISLKF	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_003576308.1	V8V89_RS08380	protein-coding	minus	1644700	1645035	bacteriocin immunity protein	111	MTDKRETLMSMLSKAYANPTIKAEPALRALIETNAKKVD EGDDDKAYVTAVTQLSHDISKYLIHHAHVPEELVA VFNYIKKDVPAAADIDAAHYRAQALAAGLIAPIVWGH	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_003567376.1	V8V89_RS08400	protein-coding	minus	1646677	1646910	Blp family class II bacteriocin	77	MSYNYRQLDDFQLSGVSGGKKKFDK AATFTGITAGIGSGTITGLAGGPFGLI GGAVVGGNLGAVGSAIKCLGDGMQ	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_003562546.1	V8V89_RS11165	protein-coding	minus	2220496	2220807	bacteriocin immunity protein	103	MVRGKAEIDDQTILSNLYDFVLNPDISDRERKIGLMAKAD LEKKRYDVAVVNQVIVSLQQEAMKNGLTPTASKFYDDLE PILIKIPFGTNLGNMLTHNSYLD	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
WP_003659135.1	V8V89_RS11765	protein-coding	minus	2344038	2344301	bacteriocin immunity protein	87	MKSKKSILSQLPELIADPTTTGSEILKHAETRROKGDNE EGIAFEIRTGLQPLAIGQKLSPKVVDFLTEIAAQYLGMSR GNIF	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>



**Fig. 1.** Bacteriocins localization in *Lactocaseibacillus paracasei* strain B1 chromosome (based on RefSeq (GCF) genome assembly and generated in the Proksee software (<https://proksee.ca/>)).



**Fig. 2.** Bacteriocins localization in *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24 genome (based on RefSeq (GCF) genome assembly and generated in the Proksee software (<https://proksee.ca/>)): A – bacterial chromosome; B – plasmid pLpIO24\_7.



**Fig. 3.** Schematic diagrams showing the two genomic AOIs in *Lactocaseibacillus paracasei* strain B1 chromosome, identified by BAGEL4 software. These regions were predicted to possess putative bacteriocin gene clusters. The AOI\_1 and AOI\_2 comprise 76 and 45 open reading frames (ORFs), respectively, but small open reading frames are hidden.

**Table 2**  
Functional annotation of gene clusters in *Lactocaseibacillus paracasei* strain B1 chromosome predicted by BAGEL4.

ORF	Length [amino acids]	Structural core peptide/Amino acids sequence	Functional
<b>AOI_1</b>			
orf00013	59	MINDKKIYLTDEEMANVSGSSEYDQYYKNSYKHGQELRKVVDAIGSIVNLIPFFGKRA	ggmotif; lactococcin
orf00029	60	MCTMTNLKDKELSQITGGFAFVIVPAAAILGFLASDAWSHADEIASGAKTGWEIFANKHKIY	ComC; lactococcin; bacteriocin_IIC; enterocin_X_chain_beta
orf00030	71	MFSNESLKENGGITMQFMTLDNSSLKFIAGGNGGLWSILGLGLGFSARRANSLFGPSPMALDLISLFLK	ComC; bacteriocin_IIC
orf00041	52	MHRIKNDLQMQMIEGITWRKFLTMLLGLIAIDAWSHSTTDQIIAGFLKGWQGM	enterocin_X_chain_beta
orf00049	111	MTDKRETLMSMLSKAYANPTIKAEALRALIETNAKKVDEGDDDKAYVTAVTQLSHDISKYLIHHAHVPEELVAVFNVIKDKVPAADIDAHAHYRQAALAAGLIAPIVWGH	carnocin
orf00055	71	MISKEVGITLKQHDVLVLIQGGAKRRNKPSGCIVSTIGGAVAGAAGLNPFTTVAGAAIGLSLCLSTNYIHPA	bacteriocin_IIC
orf00057	101	MYVKDSKVDLTQNNLLFEERRKHSINYRQLDDDFQLSGVSGGKKKFDCAATFVTGITAGIGSGTITGLAGGPFGIIGGAVVGGNLGAVGSAIKCLGDGMQ	bacteriocin_IIC
<b>AOI_2</b>			
orf00030	350	MSYTINKEFALGENEGSSQVANRLIYIHLHDVGAESGARANAAYFKNNIAAEIAYTAFVVDGGQVYVQVGEVYVWAGTVANANSPVQIELGHTSDPETFKDYAVYIELARDMAAKYGIPTSLDAGGAGTPGIKSHLWVTQHIWGDHTDPYGYLARWGISDKLAADLANGTTTVDASKSAPAQASARPQAAVSGKVVNSYGLHLLGVRWLDEVTNFGSGDNGFAGLPNYQHDLLYITVDHGSVKYRVHTVQSGWLPWVAKGDRNDTVNGCAGNTGEVIDGVQHIFLTPAGEPYKQAYYRSQTTQSRSGWLGVVCCDDGTSLPQYTDYAGMFGPELDRLLQIGISSNPF	enterolysin_A

Abbreviation: ORF – open reading frame.

and AOI\_2 included immunity proteins, transcription regulatory factors, kinases, oxidoreductases, hydratases, and metal cation transporters. In AOI\_1, several predicted peptides belong to known bacteriocin families. These include lactococcin-like peptides with double-glycine (GG) motifs (e.g., ORF00013), ComC-like bacteriocins (ORF00029 and ORF00030), and enterocin X (ORF00041). Enterocins are small bacteriocins with potential antimicrobial properties against Gram-positive bacteria,

especially *L. monocytogenes* (Hu et al., 2010). The analysis also identified ORF00049, which encodes carnocins, class IIa bacteriocins, notable for their heat stability and antimicrobial effectiveness, making them attractive candidates for applications in food preservation (Saint-Hubert et al., 2009). Additionally, bacteriocins IIC were identified in multiple ORFs, such as ORF00055 and ORF00057. These peptides are also associated with antimicrobial activity and environmental stability (Zhou

**Table 3**  
Bacteriocins detected in *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24 genome (based on RefSeq (GCF) genome assembly).

Protein ID	Locus Tag	Gene type	CDS location in the genome			Gene product	Length [amino acids]	Structural peptide/Amino acids sequence	Organism
			Orientation	Start	Stop				
WP_003642489.1	V8V90_RS02035	protein-coding	minus	445762	446091	bacteriocin immunity protein	109	MDVDAQKLFLLVDAAYNQFITNQPSDSYRQALLAA IDLNNNVSPQQVTIQLYQAYYRNVMVPMPLRQHRD LYQVHTQLQRLTRKEQRHMALGYGLIATHLTFGPLN	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003642473.1	V8V90_RS02105	protein-coding	plus	459678	460034	bacteriocin immunity protein	118	MQRESELRQQAEAIKGLIVRLSGWSDQSGDLLDIID VLMQVDKKITTTKNPEALVNRVNYRVAIKGRLHF PDEEEKLMIDLGIIGQKAGLNGAYMADFSDKSQFYG MLEEVPQH	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003642219.1	V8V90_RS03310	protein-coding	plus	728254	728511	bacteriocin immunity protein	85	MKSEVQGIQDLYQELAPTAANQEIRAALLKAHQQLK QAPQLDHALIKRLTNDVTYNIFTKQLRLTPTENLLVS ELLSVSHRLSA	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003642670.1	V8V90_RS04665	protein-coding	minus	1026733	1027014	bacteriocin immunity protein	93	MLKNENAIALIRAIIDVAYSDEPVRRAIPELQALAKAAQ DLDCVADHHQVASRLNQLLTTWGARHSQGPVLD QLYLITLKDGVDPVPCQVPYRA	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003640386.1	V8V90_RS08795	protein-coding	minus	1850914	1851234	bacteriocin immunity protein	106	MFGRITGKHQVDEQALLSQLVDFVLDPNLDRERKIG LMAKADLEHHRYSIAVLNKLVSFQMEALRNKGLSK AASNFDYDQIYPILVAAKPMGTNLGYIGMHSTYLD	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003641210.1	V8V90_RS11590	protein-coding	plus	2421718	2422047	bacteriocin immunity protein	109	MLYSHWGGINVNKNDKAKRLMQQIDVAYNDPEVKQ DAQVRADLLRYAMELDKNGNYLLIATKVNMGAMMRV MRDHMHQPLQAINLTLYQTARTSEYYWGVAASIF SGLW	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003641985.1	V8V90_RS13710	protein-coding	plus	2883377	2883547	two-peptide bacteriocin plantaricin EF subunit PlnE	56	MLQFEKLYSRLPQKKLAKISGGFNRRGGYNGFKSVR HVVDAIGSVAGIRGILKSIR	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003643811.1	V8V90_RS13715	protein-coding	plus	2883572	2883730	two-peptide bacteriocin plantaricin EF subunit PlnF	52	MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAV GPADWVISAVRGIHG	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003641975.1	V8V90_RS13750	protein-coding	minus	2891152	2891319	bacteriocin	55	MKSLDKIAGLGIEMAEKDLTTVEGGKNYSKTWWYKS LTLGKVAEGTSSAWHGLG	<i>Lactiplantibacillus</i>
WP_003641974.1	V8V90_RS13755	protein-coding	minus	2891447	2891647	bacteriocin immunity protein	66	MLERITGFHICFAIWQIYAYLAFKQVKVGNKSTSPF IALGVWSGLSFGILMVAFGIALAFNAI	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
WP_003641973.1	V8V90_RS13760	protein-coding	plus	2892509	2892676	two-peptide bacteriocin plantaricin JK subunit PlnJ	55	MTVNMKIKDLVDVDAFAPISNNKLNQVGGGAWKN FWSSLRKGFDGEAGRAIRR	Lactobacillaceae
WP_003641972.1	V8V90_RS13765	protein-coding	plus	2892707	2892880	two-peptide bacteriocin plantaricin JK subunit PlnK	57	MKIKLTVLNEFEELTADAENKISGRRSRKNGIGYAI YAFGAVERAVLGGSRDYNK	Lactobacillaceae
WP_003641971.1	V8V90_RS13770	protein-coding	plus	2892877	2893545	bacteriocin immunity protein	222	MIEIDFKEYYPLVLFVAGYMGAIPLNIYFDWLAML TAGHSLVMLYGFNLKLFQPLPSKWRIVVYVLLLL VLEVTAIVVIAINSHALLSFHNTLTTSTGRDYPLIER VWIAFTLLVSLVGEVGMASISLPLIRLLSQTLKKYA WPIINVLGCIVFACLHPLPHYFHNWIYPLIVGITRYPITAS WRSANTLRSGIYVHWISDAVLIIGTLI	Lactobacillaceae
WP_226319604.1	V8V90_RS16040	protein-coding	plus	42093	42428	garvicin Q family class II bacteriocin	111	MILTIPANSGLTQQIQEAQRIVDQFNEQAINNNVILD GESNPQSSITSPKFLMLAKQYRYTANGYEYRDKK GHWYHVVTKSPFEAAFGVALHGWEALGGSWKSG HEK	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
WP_349348289.1	V8V90_RS16045	protein-coding	plus	42444	42776	lactococin immunity protein	110	MRLFSKKNQTKIPSEVKLLTAIQEALADSPNTNEEKPI LQEAEQALKKKTYFPKILSDLQFFLNPLAVKGSSSPK VKVIYLNLSIDKYQTSTTGSIGMIFGFGSFGFGH	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

et al., 2025). In AOI\_2, a single core peptide encoded by ORF00030 was identified as enterolysin A. Enterolysin A is a large bacteriolytic protein classified as a class III bacteriocin. Unlike smaller bacteriocins that target bacterial membranes, enterolysin A functions by hydrolyzing the peptidoglycan in bacterial cell walls, leading to cell lysis. This bacteriocin displays broad-spectrum activity, particularly against Gram-positive bacteria, and is less susceptible to resistance mechanisms due to its enzymatic mode of action (Nigutová et al., 2008). The molecular masses of the predicted bacteriocins were anticipated based on their amino acid (AA) sequences. In AOI\_1, the peptides ranged from 52 to 111 AAs in length, corresponding to molecular masses up to 12 kDa. For example, enterocins and carnocins may exhibit predicted molecular weights of 4.5–5.5 kDa, respectively (Hu et al., 2010; Saint-Hubert et al., 2009). Class II bacteriocins usually have molecular weights between 5 and 10 kDa (Zhou et al., 2025). The enterolysin A peptide is considerably larger, with a length of 350 AAs and a predicted molecular mass of approximately 35 kDa (Nigutová et al., 2008). The diversity of bacteriocins identified in *L. paracasei* strain B1 highlights its ability to produce a wide range of antimicrobial peptides, which may provide a competitive advantage in microbial ecosystems. Combining small, pore-forming bacteriocins, such as lactococcins and bacteriocin IIc, with larger, bacteriolytic proteins like enterolysin A, suggests a versatile antimicrobial arsenal capable of targeting different bacterial species.

The *L. plantarum* strain O24 genome was also searched for genes related to bacteriocin production. Analysis performed based on RefSeq v6.7 (GCF) genome assembly revealed the presence of 13 gene regions in the chromosome and 2 gene regions (i.e., WP\_226319604.1: garvicin Q family class II bacteriocin and WP\_349348289.1: lactococin immunity protein) in the plasmid pLpO24\_7, whose protein products have bacteriocin properties (Table 3). The location of these regions in the genome of this strain is shown in Fig. 2. In turn, the BAGEL4 search predicted two AOIs in which putative gene clusters for the biosynthesis of antibacterial substances are located in the *L. plantarum* strain O24 genome, one in the bacterial chromosome and one in the plasmid pLpO24\_7 (Fig. 4). The first bacteriocin biosynthetic gene cluster is CP157747.fasta AOI\_1 (29,498 bp) contains 64 ORFs with six core peptides, while the second BCG is CP157754.fasta AOI\_01 (17,558 bp) contains 47 ORFs with one core peptide (Table 4). Other predicted gene features in CP157747.fasta AOI\_1, which includes immunity proteins (i.e. orf00043: putative bacteriocin immunity protein), transcription regulatory factors, kinase (i.e. orf00027: bacteriocin production related histidine kinase), and transporter (i.e. orf00013: LanT, bacteriocin ABC-transporter, ATP-binding and permease protein PInG). Furthermore, other predicted gene features in CP157754.fasta AOI\_1 included immunity proteins (i.e., orf00029: EntA\_Imm, bacteriocin immunity), transcription regulatory factors, transposases, dehydrogenases, reductases, and oxidoreductases. In the first bacteriocin biosynthetic gene cluster, plantaricin-related peptides were identified, such as plantaricin\_E (orf00015), plantaricin F (orf00017), plantaricin A (sORF1), plantaricin N (orf00036), plantaricin J (orf00041), and plantaricin K (orf00042). These bacteriocins are class II peptides characterized by their small size, thermostability, and ability to inhibit the growth of competing bacteria. The molecular weights of plantaricins are typically lower than 10 kDa, which is consistent with their classification as class II bacteriocins (Goel & Halami, 2023). According to Goel and Halami (2023), *L. plantarum* has different regulatory operons that control plantaricin production. Based on the regulatory operon, plantaricins produced by *L. plantarum* follow different biosynthesis mechanisms. The second cluster, CP157754.fasta AOI\_1 (17,558 bp), is located on the plasmid pLpO24\_7 and consists of 47 ORFs encoding one core peptide, bovicin\_255 (orf00027). Bovicin is a class II bacteriocin associated with antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, including pathogens (Garsa et al., 2019). The predicted molecular weight of bovicin 255 from CP157754.fasta AOI\_1 is larger than the expected size range of class II bacteriocins, approximately 11.8 kDa. The diversity of bacteriocins identified in *L. plantarum* strain O24 suggests its significant

potential for antimicrobial activity, particularly through the production of plantaricins and bovicin, which could play a crucial role in competitive survival and ecological adaptation.

Although direct sequence alignment was limited due to the unavailability of full-length published sequences, comparative analysis based on functional annotations and known gene homology suggests that several predicted bacteriocins in *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 may share similarity with peptides previously characterized in food-derived strains. For example, plantaricins E, F, J, and K identified in strain O24 have also been described in *L. plantarum* WCFS1 and EL2, which are known for their food-origin and antimicrobial activity (Goel & Halami, 2023; Zheng et al., 2024). Similarly, enterocins and carnocins found in *L. paracasei* strain B1 resemble bacteriocins previously identified in other *L. paracasei* strains (Hu et al., 2010; Saint-Hubert et al., 2009). However, the presence of multiple bacteriocin classes, including plasmid-encoded bovicin and chromosomal enterolysin A, underscores the unique combinatorial antimicrobial potential of our isolates, distinguishing them from previously reported strains (Campelo et al., 2011; Nigutová et al., 2008).

The identification of 12 bacteriocin-related regions in the *L. paracasei* strain B1 genome and 13 in the *L. plantarum* strain O24 chromosome reflects the genomic diversity often observed in LAB. Moreover, variations in bacteriocin production among strains are likely attributed to their prolonged adaptation to distinct natural environments (Chikindas et al., 2018). Similar findings were reported by Zheng et al. (2024), who analyzed the genome of *L. plantarum* EL2 and identified multiple bacteriocin-related gene clusters using BAGEL4, including genes encoding lantibiotics, immunity proteins, and transporters (Zheng et al., 2024). Furthermore, the localization of bacteriocin-related genes in both the chromosome and plasmids of *L. plantarum* strain O24 aligns with reports by Campelo et al. (2011), who found plasmid-encoded bacteriocins in other LAB strains, suggesting a potential horizontal gene transfer mechanism enhancing antibacterial capability (Campelo et al., 2011). These findings expand the known bacteriocin-producing potential of *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 and underline the importance of genomic prediction tools like BAGEL4. Further experimental studies are needed to validate the functional properties of these peptides and assess their practical applications in antimicrobial therapies and food preservation.

### 3.3. Physicochemical properties of bacterial preparations

#### 3.3.1. Antimicrobial spectrum of activity

The inhibition spectrum of the tested bacterial preparations was determined using the agar-well diffusion method. Indicator strains included Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria (Table 5).

All tested bacterial preparations exhibited inhibitory effects against Gram-positive and Gram-negative bacteria, in agreement with previous reports, where food-origin lactic acid bacteria strains were also investigated (Arrijoja-Bretón et al., 2020; Zhang et al., 2017). The cell-free supernatant (CFS) of *L. paracasei* strain B1 showed the most vigorous activity against *L. monocytogenes* ATCC 19111 and *E. coli* O157:H7 ATCC 10536, with inhibition zone diameters of  $12.2 \pm 1.0$  mm and  $12.7 \pm 1.9$  mm, respectively. The differences between CFS and nCFS within *L. paracasei* strain B1 preparations against these indicator strains were statistically significant ( $p < 0.05$ ), with CFS exhibiting more potent inhibitory activity. Similarly, the CFS of *L. plantarum* strain O24 demonstrated inhibitory activity against the same two pathogens. Additionally, *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 growth was effectively inhibited by the preparations from *L. paracasei* B1 and *L. plantarum* O24 (Table 5). The observed antimicrobial activity of the LAB preparations is likely due to the production of various metabolites, including organic acids (Bangar et al., 2022). Notably, even after the pH of the supernatants was adjusted to approximately 6.0 to neutralize the effect of organic acids, the nCFS samples retained inhibitory properties. This residual activity suggests the possible involvement of bacteriocin-like

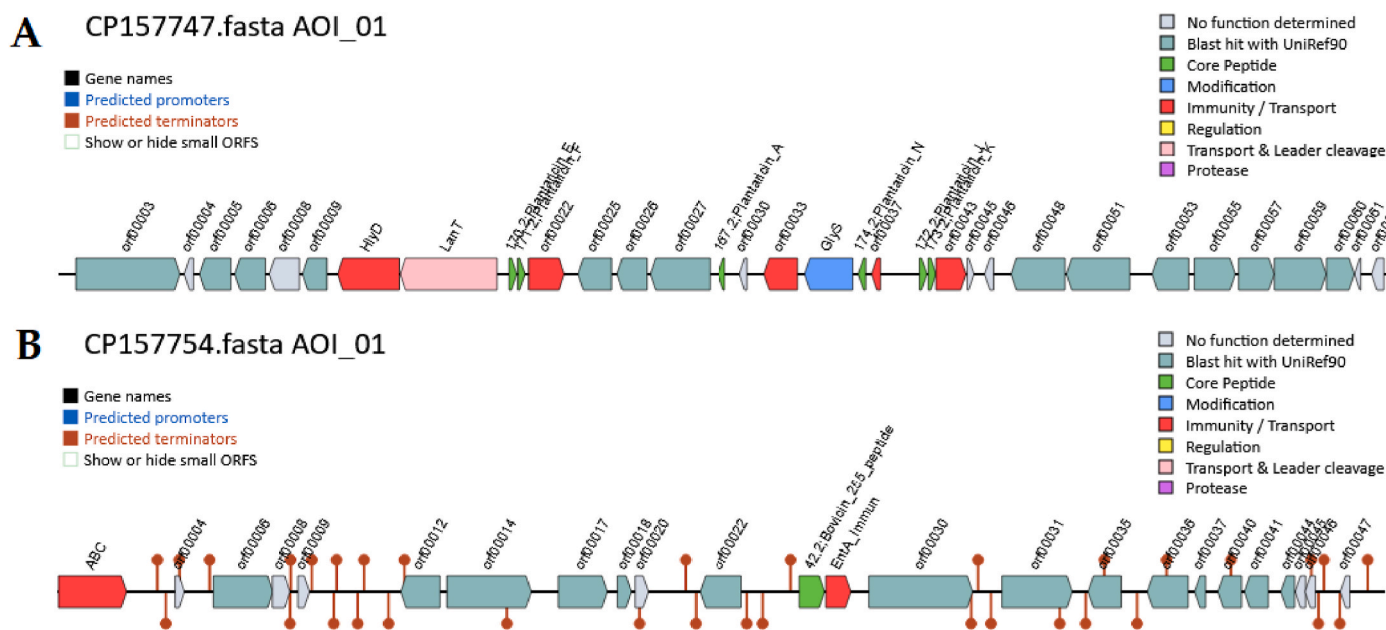


Fig. 4. Schematic diagrams showing the two genomic AOIs in *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24 genome, identified by BAGEL4 software: A – bacterial chromosome; B – plasmid pLpO24.7. These regions were predicted to possess putative bacteriocin gene clusters. The AOI\_1 and AOI\_2 comprise 64 and 47 ORFs, respectively, but small open reading frames are hidden.

Table 4  
Functional annotation of gene clusters in *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24 genome predicted by BAGEL4.

ORF	Length [amino acids]	Structural core peptide/Amino acids sequence	Functional
<b>CP157747.fasta AOI_1</b>			
orf00015	56	MLQFEKLYSRPQKKLAKISGGFNRRGGYFNGKSVRHVVDAIGSVAG IRGILKSIR	plantaricin_E
orf00017	52	MKKFLVLRDRELNAINSGVGFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAV RGIHFG	ggmotif; lactococcin; bacteriocin_IIc; plantaricin_F
sORF1	61	VIMSQLFLIRKRYAGAILKLTNAKLIRLAMTRLMNCLFECAITLYLFR MIYVLLDNFTLPQ	plantaricin_A
orf00036	55	MKSLDKIAGLGIEMAEDLTTVEGGKNYSKTWWYKSLTLGKVAEG TSSAWHGLG	bacteriocin_IIc; plantaricin_N
orf00041	55	MTVNKMIKDLDDVDAFAPISNNKLVGGGAWKNFWSSLRKGFY DGEAGRAIRR	plantaricin_J
orf00042	57	MKIKLTVLNEFEELTADAENISGGRRSRKNGIGYAIYAFGAVERAVL GGSRDYNK	ComC; bacteriocin_IIc; plantaricin_K
<b>CP157754.fasta AOI_1</b>			
orf00027	111	MILTIPANGLTTQQIQEAQRVDQFNEQAINNNVILDGESNPQSSITSPK FGLMLAKQYRYTANGYEYRDKKGGHWHYVVTKSPFEAAFVGLHGW EGALGGSWKSGHEK	bovicin_255_peptide

Abbreviation: ORF – open reading frame.

Table 5  
Antimicrobial activity of preparations of LAB (CFS and nCFS) against harmful foodborne pathogens and food spoilage microorganisms.

Symbol	pH value	Gram-positive				Gram-negative			
		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. spizizenii</i> ATCC 6633	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 10536	<i>P. fluorescens</i> PCM 2123	
The diameter of indicator strains inhibition growth zone [mm]									
B1	CFS	4.10 ± 0.04	12.2 ± 1.0 <sup>aAB</sup>	8.5 ± 3.1 <sup>aA</sup>	10.8 ± 0.8 <sup>aAB</sup>	9.5 ± 1.3 <sup>aAB</sup>	10.2 ± 1.0 <sup>aAB</sup>	12.7 ± 1.9 <sup>aB</sup>	11.2 ± 0.3 <sup>aAB</sup>
	nCFS	5.84 ± 0.15	9.7 ± 0.6 <sup>bA</sup>	6.7 ± 1.2 <sup>bA</sup>	9.8 ± 1.5 <sup>aA</sup>	7.7 ± 1.0 <sup>aA</sup>	8.2 ± 1.4 <sup>aA</sup>	9.5 ± 0.9 <sup>bA</sup>	9.7 ± 1.4 <sup>aA</sup>
O24	CFS	3.87 ± 0.06	11.8 ± 1.3 <sup>aAC</sup>	7.3 ± 0.3 <sup>aB</sup>	10.3 ± 0.6 <sup>aABC</sup>	8.3 ± 1.4 <sup>aB</sup>	8.7 ± 0.8 <sup>aAB</sup>	12.5 ± 2.2 <sup>aC</sup>	11.8 ± 0.6 <sup>aAC</sup>
	nCFS	5.91 ± 0.13	10.2 ± 1.9 <sup>aAC</sup>	6.3 ± 0.3 <sup>bB</sup>	9.7 ± 0.3 <sup>aABC</sup>	8.2 ± 1.5 <sup>aABC</sup>	8.5 ± 1.0 <sup>aABC</sup>	9.3 ± 0.8 <sup>aABC</sup>	10.7 ± 1.4 <sup>aAC</sup>

Abbreviations: B1 – preparation of the *L. paracasei* strain B1; O24 – preparation of the *L. plantarum* strain O24.

Note: Values with a different superscript letter are significantly different (p < 0.05) according to one-way ANOVA followed by Tukey’s HSD test; <sup>a, b</sup> – between CFS and nCFS within strain; <sup>A, B, C</sup> – between indicator strains within specific preparation.

compounds or other non-acidic antimicrobial metabolites, although further experimental and genomic analyses are required to confirm their presence and identity. Similar observations of non-acidic antimicrobial activity have been reported in LAB-derived supernatants, particularly from *L. plantarum* and *L. paracasei*, which correspond to the species analyzed in the present investigation (Arrijoja-Bretón et al., 2020; Daba et al., 2022; de Lira et al., 2023; Duraisamy et al., 2023; Ghanbari et al., 2013; Makhlouf et al., 2024).

### 3.3.2. Effect of heat, pH, and proteolytic enzymes on the antibacterial activity

The effects of heat, pH, and proteolytic enzymes on the antimicrobial activity of CFS from *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 are presented in Table 6.

All tested CFS demonstrated good thermal stability, retaining approximately 70 % of their residual antimicrobial activity after treatment at 100 °C for 20 min. However, significant activity loss was observed when samples were sterilized at 121 °C for 20 min. Similar findings were reported by Xue et al. (2024) and Heredia-Castro et al. (2015), where bacterial preparations from environmental strains of LAB, specifically *L. casei*, *L. fermentum*, *L. pentosus*, and *L. paracasei* subsp. *tolerans*, retained over 70 % of their antimicrobial activity after exposure to 100 °C for 30 min (Heredia-Castro et al., 2015; Xue et al., 2024). Sterilization, however, led to the inactivation of antimicrobial agents in most tested variants (Heredia-Castro et al., 2015). In numerous studies, antimicrobial agents that demonstrated heat stability contained bacteriocins or bacteriocin-like inhibitory substances, suggesting the proteinaceous nature of the active compounds in the tested bacterial CFS (Liu et al., 2022). In turn, variations in the thermal stability of bacteriocins and bacteriocin-like inhibitory substances across different strains, including food preparations, were determined using the agar-well diffusion method. Indicator strains included Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria (Table 5).

All tested bacterial preparations exhibited inhibitory effects against Gram-positive and Gram-negative bacteria, in agreement with previous reports, where food-origin lactic acid bacteria strains were also

investigated (Arrijoja-Bretón et al., 2020; Zhang et al., 2017). The cell-free supernatant (CFS) of *L. paracasei* strain B1 showed the most vigorous activity against *L. monocytogenes* ATCC.

The antibacterial activity of the tested CFS was eliminated after treatment with enzymes such as trypsin, pepsin, and proteinase K, suggesting that the active compounds present in the bacterial extracts possess a proteinaceous nature.

Ghanbari et al. (2013) demonstrated that the antimicrobial activity of cell-free supernatants from *L. casei* strain AP8 and *L. plantarum* strain H5 was effectively inactivated by proteolytic enzymes such as trypsin, papain, proteinase K, pronase E, and  $\alpha$ -amylase, indicating a proteinaceous nature of the bacteriocin-like inhibitory substances (Ghanbari et al., 2013).

The findings suggest that the antimicrobial substances produced by *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 are of a proteinaceous or peptidic nature rather than carbohydrate or lipid-based, aligning with numerous reports on bacteriocins (Heredia-Castro et al., 2015; Hu et al., 2017; Shentu et al., 2023; Xue et al., 2024).

### 3.4. Spectral analysis

Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy was performed to identify functional groups in the CFS preparations from *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 (Fig. S3; Fig. S4). Spectra were recorded over the range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  and included both crude CFS and samples heat-treated for 5, 15, and 30 min. A broad range of characteristic peaks was observed. For *L. paracasei* B1, broad absorption bands appeared between 3400.41  $\text{cm}^{-1}$  and 3386.34  $\text{cm}^{-1}$ ; for *L. plantarum* O24, similar peaks were observed between 3381.37  $\text{cm}^{-1}$  and 3373.69  $\text{cm}^{-1}$ . These bands are associated with hydrogen bonding and are likely linked to functional groups such as  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}$ , and  $-\text{COOH}$ . A comparable pattern was noted by Duraisamy et al. (2023) (Duraisamy et al., 2023), where N–H stretching vibrations and hydroxyl groups were identified near 3340.1  $\text{cm}^{-1}$  in bacteriocin spectra. Lorenz-Fonfria (2020) reported that such groups are fundamental to protein secondary and tertiary structure, contributing to hydrogen bonding

**Table 6**

Sensitivity to heat, pH, and proteolytic enzymes. Residual antimicrobial activity (%). Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

Conditions	B1 CFS			O24 CFS		
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076
<b>pH</b>						
2.0	121.9 $\pm$ 0.2 <sup>aC</sup>	103.3 $\pm$ 0.2 <sup>aA</sup>	111.9 $\pm$ 0.2 <sup>aB</sup>	123.3 $\pm$ 0.3 <sup>aC</sup>	106.6 $\pm$ 0.3 <sup>aAB</sup>	108.6 $\pm$ 0.3 <sup>aAB</sup>
3.0	108.5 $\pm$ 0.8 <sup>aBB</sup>	99.0 $\pm$ 1.1 <sup>aBA</sup>	104.6 $\pm$ 2.1 <sup>aBAB</sup>	100.0 $\pm$ 0.3 <sup>aBA</sup>	98.6 $\pm$ 1.0 <sup>aBA</sup>	102.3 $\pm$ 0.3 <sup>aBAB</sup>
4.0	96.8 $\pm$ 0.0 <sup>bcA</sup>	91.7 $\pm$ 3.4 <sup>bcA</sup>	92.6 $\pm$ 1.0 <sup>bcA</sup>	96.7 $\pm$ 0.3 <sup>ca</sup>	93.0 $\pm$ 0.2 <sup>ca</sup>	95.5 $\pm$ 0.4 <sup>ca</sup>
5.0	93.3 $\pm$ 0.2 <sup>ca</sup>	91.9 $\pm$ 0.2 <sup>bcA</sup>	91.0 $\pm$ 0.4 <sup>ca</sup>	93.3 $\pm$ 0.4 <sup>da</sup>	90.7 $\pm$ 0.5 <sup>da</sup>	92.1 $\pm$ 0.8 <sup>da</sup>
6.0	73.0 $\pm$ 0.2 <sup>dAB</sup>	67.5 $\pm$ 0.8 <sup>da</sup>	71.8 $\pm$ 0.8 <sup>da</sup>	77.8 $\pm$ 0.2 <sup>eb</sup>	70.0 $\pm$ 0.4 <sup>da</sup>	70.0 $\pm$ 2.0 <sup>da</sup>
7.0	50.9 $\pm$ 0.2 <sup>efB</sup>	49.6 $\pm$ 0.4 <sup>eb</sup>	49.5 $\pm$ 0.3 <sup>eb</sup>	46.0 $\pm$ 0.2 <sup>fAB</sup>	38.8 $\pm$ 5.2 <sup>deA</sup>	47.1 $\pm$ 0.2 <sup>eAB</sup>
8.0	15.7 $\pm$ 0.7 <sup>fA</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	11.7 $\pm$ 0.2 <sup>gB</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
9.0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
10.0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
11.0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
<b>Temperature</b>						
40 °C	94.6 $\pm$ 2.2 <sup>aA</sup>	81.3 $\pm$ 0.5 <sup>aB</sup>	90.0 $\pm$ 0.1 <sup>aA</sup>	95.9 $\pm$ 0.5 <sup>aA</sup>	90.4 $\pm$ 0.2 <sup>aA</sup>	89.1 $\pm$ 0.2 <sup>aA</sup>
60 °C	82.1 $\pm$ 0.9 <sup>aBA</sup>	80.2 $\pm$ 0.3 <sup>aA</sup>	83.3 $\pm$ 0.2 <sup>aBA</sup>	81.6 $\pm$ 0.2 <sup>aBA</sup>	82.0 $\pm$ 0.2 <sup>aBA</sup>	82.5 $\pm$ 0.4 <sup>aBA</sup>
80 °C	78.7 $\pm$ 0.3 <sup>ca</sup>	75.9 $\pm$ 0.5 <sup>baB</sup>	71.8 $\pm$ 0.8 <sup>cb</sup>	78.8 $\pm$ 0.8 <sup>bcA</sup>	72.6 $\pm$ 1.0 <sup>cb</sup>	73.4 $\pm$ 1.8 <sup>cb</sup>
100 °C	76.7 $\pm$ 0.3 <sup>ca</sup>	76.6 $\pm$ 0.3 <sup>ba</sup>	69.4 $\pm$ 0.4 <sup>db</sup>	76.0 $\pm$ 0.1 <sup>ca</sup>	76.5 $\pm$ 0.8 <sup>ca</sup>	71.0 $\pm$ 0.2 <sup>cb</sup>
121 °C	29.7 $\pm$ 0.1 <sup>da</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	30.0 $\pm$ 0.2 <sup>da</sup>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
<b>Enzymes</b>						
Trypsin	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Pepsin	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Proteinase K	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Note: Control – 100 %; Values with a different superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test; a, b, c, d, e, f, g – between each of the conditions within the sensitivity of one indicator strain; A, B – between indicator strains.

**Table 7**Summary of antimicrobial titre and protein concentration of preparations from *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 at various steps of purification.

Strain producer	Purification step	Volume (mL)	Activity (AU/mL)	Protein concentration (mg/mL)	Specific activity (AU/mg)	Total activity (AU)	Purification fold	Yield (%)
<i>L. paracasei</i> strain B1	CFS	2000	106.67	0.90 ± 0.07	119.05	213,333.33	1.00	100.00
	ASP	20	426.67	1.70 ± 0.19	251.47	8533.33	2.11	4.00
	Dialysis	2	3413.33	8.48 ± 0.95	402.67	6826.67	3.38	3.20
<i>L. plantarum</i> strain O24	CFS	2000	80.00	0.84 ± 0.05	95.47	160,000.00	1.00	100.00
	ASP	20	251.05	1.50 ± 0.35	167.36	5020.91	1.75	3.14
	Dialysis	2	2913.46	7.51 ± 1.73	387.94	5826.92	4.06	3.64

Notes: CFS – cell-free supernatant; ASP – ammonium sulfate precipitation; specific activity = activity/protein concentration; total activity = activity × volume; purification fold = specific activity/original CFS specific activity; yield = total activity/original CFS total activity.

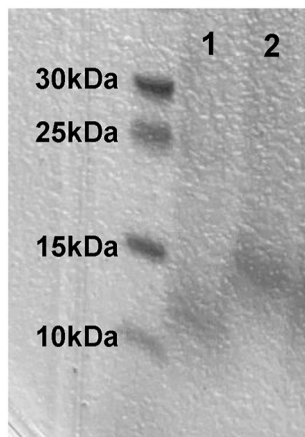
within and between peptide chains (Lorenz-Fonfria, 2020).

In addition, peaks between 1612.15 cm<sup>-1</sup> and 1608.41 cm<sup>-1</sup> in *L. paracasei* B1 preparations and between 1648.14 cm<sup>-1</sup> and 1645.92 cm<sup>-1</sup> in *L. plantarum* O24 were attributed to C=O stretching vibrations. These are characteristic of carbonyl groups in amides and consistent with the amide I band, a key protein indicator in FT-IR spectra (Benabbou et al., 2020). Similar findings were observed by Guo et al. (2024), who assigned a 1650 cm<sup>-1</sup> peak to amide groups in a novel bacteriocin (Guo et al., 2024).

An additional band near 2950 cm<sup>-1</sup> was detected in all CFS variants, indicating alkyl C–H stretch groups. This observation supports the presence of aliphatic chains within proteinaceous or peptide structures. Jiao et al. (2020) similarly found alkyl group-related peaks at 2928 cm<sup>-1</sup> in bacteriocins from *B. amyloliquefaciens*, reinforcing this interpretation (Jiao et al., 2020).

Comparative analysis of spectra before and after heat treatment revealed clear structural changes. Shifts in peaks around 3400 cm<sup>-1</sup> suggest alterations to the hydrogen bonding network and secondary structure of proteins (Peng et al., 2023). In thermally treated *L. plantarum* O24 samples, the absence of a C=O stretching peak in untreated CFS (Fig. S4A) may indicate a disordered protein state or low concentration below FT-IR detection limits (Blando et al., 2001). After heat exposure, the appearance and slight shift of peaks at 1648.14 cm<sup>-1</sup> (5 min), 1645.92 cm<sup>-1</sup> (15 min), and 1647.67 cm<sup>-1</sup> (30 min) likely reflect thermal reorganization or increased structural order (Kilimann et al., 2006).

These findings, in combination with the physicochemical properties described earlier, support the presence of thermally stable proteinaceous substances – possibly bacteriocins – in the tested CFS. This is consistent with prior reports highlighting the thermal resilience of such antimicrobial peptides (Guo et al., 2024), further supporting their potential use in food preservation.



**Fig. 5.** SDS-PAGE analysis of protein substances produced by tested strains, lane 1 – preparation of the *L. plantarum* strain O24; lane 2 – preparation of the *L. paracasei* strain B1.

### 3.5. Purification of protein substances and molecular weight estimation

The proteinaceous substances in the tested CFS were purified using a two-step strategy involving ammonium sulfate precipitation and dialysis. At each purification step, the activity, purification fold, and yield of the protein substances were assessed and are presented in Table 7.

The cell-free supernatants from *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 were subjected to ammonium sulfate precipitation, obtaining a crude extraction with a 4.00 % and 3.14 % recovery and a specific activity of 251.47 AU/mg and 167.36 AU/mg, respectively. Then, the crude extracts were further purified by dialysis with the antibacterial activity of 402.67 AU/mg and 387.94 AU/mg and a yield of 3.20 % and 3.64 %, which was a 3.38- and 4.06-fold increase compared to that in the original CFS, for extracts from *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24, respectively. Hence, *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 may produce multiple bacteriocins, offering substantial potential for utilization and practical applications. This result was by that of other studies with the use of LAB strains, such as *L. paracasei* strain F9-02 (Duraisamy et al., 2023) and *L. plantarum* strain zrx03 (Lei et al., 2020).

The molecular mass of potential bacteriocins was estimated using SDS-PAGE. The stained gels loaded with the preparation of *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24 showed single bands about 14–15 kDa and 10–11 kDa, respectively (Fig. 5). These two specific bands were then excised and subjected to a mass spectrometry analysis. Then, protein identification was performed using two frequently used databases: SwissProt and UniProt/Lactobacillales. As a result of the analysis, a Mascot database report was generated, providing lists of proteins identified in each band. Additionally, where applicable, detailed information on identified peptides and alternative proteins matching the same peptide sets was obtained. Based on a comprehensive data analysis, potential proteins were selected for further investigation. The predicted molecular weight of potential bacteriocins or bacteriocin-like inhibitory substances produced by *L. paracasei* strain B1 and *L. plantarum* strain O24, and analyzed by LC-MS/MS, were 15,079 Da and 10,815 Da, respectively, which were consistent with the electrophoretic results (Table 8, Fig. 6). The observed protein sequence coverage rate was 34 % for the *L. plantarum* strain O24 band and 43 % for the *L. paracasei* strain B1 band, with theoretical isoelectric points (pI) of 10.09 and 4.66, respectively. It was also determined, to the best of our knowledge, that the identified proteins exhibited partial homology with previously reported bacteriocins, suggesting they may represent novel bacteriocins or bacteriocin-like inhibitory substances. Nevertheless, further studies are required to evaluate the antimicrobial activity of the purified peptides and confirm their biological activity conclusively.

The observed protein sequence coverage rates fall within the expected range for mass spectrometry-based proteomics and are influenced by well-known factors such as peptide properties, digestion efficiency, and protein abundance (Ahrens et al., 2022; Tuli & Resson, 2009). Post-translational modifications can also reduce sequence coverage if not specifically accounted for during analysis. Similar coverage rates have been reported in related studies, such as 43 % in *Bacillus cereus* B4264 (Ahmad & Usup, 2021) and 52.4 % in another

**Table 8**

LC-MS/MS analysis of the protein bands extracted from the SDS-PAGE gel.

Band	Protein name	Protein ID in database	Theoretical mass (Da)	Score	Matches	Sequences	emPAI	pI	Protein sequence coverage (%)
1	Extracellular protein	A0A7Z6MQF3	10,815	405	6(6)	2(2)	1.14	10.09	34
2	Uncharacterized protein	A0A0C9PQH9	15,079	1427	17(17)	4(4)	2.94	4.66	43

Notes: band 1 – preparation of the *L. plantarum* strain O24; band 2 – preparation of the *L. paracasei* strain B1; score – calculated from the score values for peptides found in the protein; matches – number of MS/MS spectra assigned to protein; sequences – number of AA sequences assigned to a protein; emPAI – exponentially modified protein abundance index; pI – isoelectric point.

Preparation of the <i>L. plantarum</i> strain O24	
1	MVKMTKVKAM VTKMLGAMT VATLMATSAG ASAATVTSNV TAPEMAVVTT
51	<b>VKLDTHANTE IQPTKIHLKR VTKVISNQV QTAVDASALN LDQQHRDRQL</b>
101	K
Preparation of the <i>L. paracasei</i> strain B1	
1	MELDGKEIKE <b>NEQLTDAQLA DLHKQYEALW DKLKKDNYRT EHQFMEVLYE</b>
51	<b>EPDNSQNYEA AFFTYQIRKD</b> TGDNQFDQLT ITLNNKPTFH DQPDEFVFEI
101	SDYADMDALH KAIEEKAQPW IKAHKK

**Fig. 6.** Covered peptides using LC-MS/MS (matched peptides shown in bold red).

bacteriocin analysis (Yan et al., 2021).

The molecular weight of bacteriocins and bacteriocin-like inhibitory substances produced by *L. paracasei* and *L. plantarum* strains varies significantly. The bacteriocin produced by *L. paracasei* strain F9-02, as reported by Duraisamy et al. (2022), was characterized by a molecular weight of approximately 28 kDa, as determined by SDS-PAGE (Duraisamy et al., 2023). Similarly, *L. paracasei* strain CNCM I-5369 was found to produce five distinct bacteriocins with molecular weights ranging from 5035.80 to 14,088.07 Da (Madi-Moussa et al., 2021). In contrast, bacteriocins produced by *L. plantarum* generally exhibit smaller molecular weights, typically ranging from 1 to 10 kDa. For instance, studies have reported bacteriocins with molecular weights of <10 kDa (de Lira et al., 2023), 6.73 kDa (Zhang et al., 2018), and 1272.61 Da (Han et al., 2023). However, exceptions to this range have been documented. In a study by Makhoulouf et al. (2024) (Makhoulouf et al., 2024), SDS-PAGE analysis revealed a purified bacteriocin from *L. plantarum* with a molecular weight of approximately 12 kDa. This finding aligns with earlier studies reporting molecular weights for *L. plantarum* bacteriocins in the range of 10–15 kDa (Jiang et al., 2022; Suryani et al., 2023; Todorov & Dicks, 2005). These variations underscore the diverse nature of bacteriocins produced by different strains, reflecting their structural and functional diversity.

Despite the robust genomic prediction, discrepancies arose between the predicted bacteriocins and the proteins purified and identified experimentally by SDS-PAGE analysis and subsequent LC-MS/MS study. This mismatch could be attributed to several factors relevant to the studied strains. For example, the expression of bacteriocin-related genes is often regulated by environmental cues or stress signals that may not be replicated under standard *in vitro* conditions (Guinane et al., 2015). This is particularly true for *L. plantarum*, in which plantaricin biosynthesis is controlled by complex regulatory operons responsive to quorum sensing and environmental stimuli (Goel & Halami, 2023).

Post-translational modifications, commonly found in class I and modified class II bacteriocins, may alter the apparent molecular weight and hinder their detection (Xu et al., 2024). The purification process may also favor abundant or more stable proteins, leading to the underrepresentation of minor bacteriocins predicted genomically (Twomey et al., 2021). Technical limitations of SDS-PAGE and LC-MS/MS, such as incomplete protein recovery or ion suppression, may also contribute to selective detection (Kurnianto et al., 2022). Additional phenotypic verification, such as N-terminal amino acid sequencing, could provide further confirmation of the expressed bacteriocins and complement the genomic predictions.

The integration of genomic and proteomic analyses highlights the complexity of bacteriocin production in *L. paracasei* B1 and *L. plantarum*

O24. While BAGEL4 predictions revealed the genetic potential for multiple bacteriocins, experimental findings suggest that only a subset is expressed or detectable under the tested conditions. Identifying bacteriocin-like proteins with partial homology to known antimicrobial peptides supports the relevance of these strains as promising candidates for food applications.

Given their demonstrated thermal stability, antimicrobial activity, and clean-label potential, both strains are strong candidates for the biopreservation of various food products. Future studies should optimize growth and induction conditions and employ advanced purification techniques, such as chromatography, to isolate and fully characterize the active peptides. This would enable a more comprehensive assessment of their safety, functionality, and suitability for industrial use.

#### 4. Conclusions

In this study, two LAB strains – *L. paracasei* B1 and *L. plantarum* O24 – were isolated from traditional Polish fermented foods and exhibited broad-spectrum antimicrobial activity against common foodborne pathogens. Genomic analyses revealed multiple bacteriocin-related genes, while proteomic data confirmed the production of novel proteinaceous compounds, stable across a range of pH values and temperatures but sensitive to proteases. SDS-PAGE and LC-MS/MS identified distinct peptides showing partial homology to known sequences, suggesting they may represent new bacteriocins or bacteriocin-like substances. These findings highlight the biotechnological potential of both strains as sources of novel antimicrobial agents, warranting further purification and functional studies to support applications in food preservation and antimicrobial therapy.

#### CRedit authorship contribution statement

**Marcelina Karbowski:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Michał Wójcicki:** Writing – review & editing, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Jae-Eun Hyun:** Resources, Methodology. **Piotr Szymański:** Writing – review & editing, Supervision. **Yan-Dong Niu:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Funding acquisition. **Dorota Zielńska:** Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Conceptualization.

#### Ethical approval

This article contains no studies with human participants or animals

performed by the authors.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Mass Spectrometry Laboratory at the Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences (Warsaw, Poland), for performing the LC-MS/MS analysis. The authors would like to thank JiETING Lin and Yiran Ding from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, for their assistance with selected analyses. The authors would like to thank Grzegorz Nowicki and Jakub Grabowski from genXone S.A. for helping in the sequence analysis of whole bacterial genomes. Partial funding for the execution of the project was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), Canada.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.118597>.

## Data availability

Data will be made available on request.

## References

- Abanoz, H. S., & 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 Animal Resources*, 38(5), 1064.
- Ahmad, A., & Usup, G. (2021). Purification and partial characterisation of an antifungal bacteriocin from *Bacillus* sp. Sh10 associated with marine carpet clam (*Paphia textilis*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(6), e2513-e2513.
- Ahrens, C. H., Wade, J. T., Champion, M. M., & Langer, J. D. (2022). A practical guide to small protein discovery and characterization using mass spectrometry. *Journal of Bacteriology*, 204(1), Article e0035321. <https://doi.org/10.1128/jb.00353-21>
- Alcock, B. P., Huynh, W., Challil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., & McArthur, A. G. (2023). Card 2023: Expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690–d699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24(6), 559–570.
- Arrijoa-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*, 115, Article 107286.
- Aziz, T., Naveed, M., Shabbir, M. A., Sarwar, A., Ali Khan, A., Zhenai, Y., & Alasmari, A. F. (2023). Comparative genomics of food-derived probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* K25 reveals its hidden potential, compactness, and efficiency. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1214478. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1214478>
- Bangar, S. P., Suri, S., Trif, M., & Ozogul, F. (2022). Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Bioscience*, 46, Article 101615.
- Benabbou, R., Subirade, M., Desbiens, M., & Fliss, I. (2020). Divergicin M35-Chitosan film: Development and characterization. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(4), 1562–1570. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09660-9>
- Blando, J. D., Porcja, R. J., & Turpin, B. J. (2001). Issues in the quantitation of functional groups by FTIR spectroscopic analysis of impactor-collected aerosol samples. *Aerosol Science & Technology*, 35(5), 899–908.
- Brown, C. L., Mullet, J., Hindi, F., Stoll, J. E., Gupta, S., Choi, M., & Zhang, L. (2022). mobileOG-db: A manually curated database of protein families mediating the life cycle of bacterial mobile genetic elements. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(18), Article e0099122. <https://doi.org/10.1128/aem.00991-22>
- Campelo, A. B., Gaspar, P., Rocas, C., Rodríguez, A., Kok, J., Kuipers, O. P., & Martínez, B. (2011). The Lcn972 bacteriocin-encoding plasmid pBL1 impairs cellobiose metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21), 7576–7585. <https://doi.org/10.1128/aem.06107-11>
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23–28.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W246–w251. <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
- Daba, G. M., Mostafa, F. A., Saleh, S. A. A., Elkhateeb, W. A., Awad, G., Nomiya, T., & El-Dein, A. N. (2022). Purification, amino acid sequence, and characterization of bacteriocin GA15, a novel class IIa bacteriocin secreted by *Lactiplantibacillus plantarum* GGNRC\_GA15. *International Journal of Biological Macromolecules*, 213, 651–662. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.003>
- de Lira, F. M., Tanaka, F. Y. R., Rios, E. A., Carrilho, S. M., de Abreu, S. S., Ferreira, G. F., & Fagnani, R. (2023). Identification of lactic acid bacteria with anti-*Listeria* activity. Characterization and application of a bacteriocinogenic strain in the control of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Journal of Dairy Research*, 90(3), 318–323.
- Duraisamy, S., Sathyan, A., Balakrishnan, S., Subramani, P., Prahalthan, C., & Kumarasamy, A. (2023). Bacteriocidal and non-cytotoxic activity of bacteriocin produced by *Lactocaseibacillus paracasei* F9-02 and evaluation of its tolerance to various physico-chemical conditions. *Environmental Microbiology*, 25(12), 2882–2896. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16327>
- Gajendran, V. P., & Rajamani, S. (2024). Recent advancements in harnessing lactic acid bacterial metabolites for fruits and vegetables preservation. *Probiotics Antimicrob Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10392-3>
- Garsa, A. K., Choudhury, P. K., Puniya, A. K., Dhewa, T., Malik, R. K., & Tomar, S. K. (2019). Bovicins: The bacteriocins of streptococci and their potential in methane mitigation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(4), 1403–1413. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9502-z>
- Ghanbari, M., Jami, M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2013). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. *Food Control*, 32(2), 379–385.
- Gizachew, S., & Engidawork, E. (2024). Genomic characterization of *Lactiplantibacillus plantarum* strains: Potential probiotics from Ethiopian traditional fermented cottage cheese. *Genes*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/genes15111389>
- Goel, A., & Halami, P. M. (2023). Structural and biosynthetic diversity of plantaricins from *Lactiplantibacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(18), 5635–5649. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12692-0>
- Guinane, C. M., Piper, C., Draper, L. A., O'Connor, P. M., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2015). Impact of environmental factors on bacteriocin promoter activity in gut-derived *Lactobacillus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7851–7859. <https://doi.org/10.1128/aem.02339-15>
- Guo, J., Bolduc, B., Zayed, A. A., Varsani, A., Dominguez-Huerta, G., Delmont, T. O., & Sullivan, M. B. (2021). VirSorter2: A multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome*, 9, 1–13.
- Guo, X., Ma, L., Qiao, Z., Luo, L., Zhang, Y., Wang, X., & Lü, X. (2024). The antibacterial mechanism of the novel bacteriocin LpH25 and the synergistic preservation effect of this bacteriocin and Nisin in fresh milk. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 194, Article 115766.
- Han, X., Zhang, M., Peng, J., Wu, J., & Zhong, Q. (2023). Purification and characterization of a novel bacteriocin from *Lactiplantibacillus plantarum* Z057, and its antibacterial and antibiofilm activities against *Vibrio parahaemolyticus*. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 173, Article 114358.
- Haryani, Y., Halid, N. A., Guat, G. S., Nor-Khaizura, M. A. R., Hatta, A., Sabri, S., & Hasan, H. (2023). Characterization, molecular identification, and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from selected fermented foods and beverages in Malaysia. *FEMS Microbiology Letters*, 370. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnad023>
- Heredia-Castro, P. Y., Méndez-Romero, J. I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8285–8293.
- Hernández-Velázquez, R., Flörl, L., Lavrinienko, A., Sebechlebská, Z., Merk, L., Greppi, A., & Bokulich, N. A. (2024). The future is fermented: Microbial biodiversity of fermented foods is a critical resource for food innovation and human health. *Trends in Food Science & Technology*, Article 104569.
- Hu, Y., Liu, X., Shan, C., Xia, X., Wang, Y., Dong, M., & Zhou, J. (2017). Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics. *Food Control*, 77, 290–297.
- Hu, C. B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2010). Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4542–4545. <https://doi.org/10.1128/aem.02264-09>
- Huang, T., Li, Z., Qu, X., Yao, G., Kwok, L. Y., He, Q., & Zhang, H. (2024). Preliminary purification and partial characterization of a functional bacteriocin of *Lactocaseibacillus paracasei* Zhang and mining for its gene cluster. *Probiotics Antimicrob Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10249-9>
- Jiang, Y.-H., Xin, W.-G., Zhang, Q.-L., Lin, L.-B., & Deng, X.-Y. (2022). A novel bacteriocin against *Shigella flexneri* from *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from *Tilapia* intestine: Purification, antibacterial properties and antibiofilm activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 779315.
- Jiao, D., Liu, Y., Zeng, R., Hou, X., Nie, G., Sun, L., & Fang, Z. (2020). Preparation of phosphatidylcholine nanovesicles containing bacteriocin CAMT2 and their anti-*Listeria* activity. *Food chemistry*, 314, 126244.
- Joishy, T. K., Bhattacharya, A., Singh, C. T., Mukherjee, A. K., & Khan, M. R. (2024). Probiotic and anti-inflammatory properties of *Lactiplantibacillus plantarum* MKTJ24

- isolated from an artisanal fermented fish of North-east India. *N Biotechnol*, 83, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2024.07.005>
- Kadkhoda, H., Gholizadeh, P., Kafil, H. S., Ghotaslou, R., Pirzadeh, T., Rezaee, M. A., & Ahazadeh, M. (2024). Role of CRISPR-Cas systems and anti-CRISPR proteins in bacterial antibiotic resistance. *Heliyon*, 10(14), Article e34692.
- Kilimann, K. V., Doster, W., Vogel, R. F., Hartmann, C., & Gänzle, M. G. (2006). Protection by sucrose against heat-induced lethal and sublethal injury of *Lactococcus lactis*: An FT-IR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(7), 1188–1197.
- Kioudi, D. E., Efstathiou, C., Tegopoulos, K., Mantzourani, I., Alexopoulos, A., Plessas, S., & Galanis, A. (2022). Genomic Insight into *Lactocaseibacillus paracasei* SP5, reveals genes and gene clusters of probiotic interest and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 922689. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922689>
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37(5), 540–546.
- Kurmianto, M. A., Lioe, H. N., Chasanah, E., & Kusumaningrum, H. D. (2022). Purification, HR-LC-ESI-MS-MS identification, and peptide prediction of bacteriocin-like inhibitory substances produced by streptomyces sp. isolated from chanos chanos. *Int J Food Sci*, 2022, Article 8672643. <https://doi.org/10.1155/2022/8672643>
- Lei, S., Zhao, R., Sun, J., Ran, J., Ruan, X., & Zhu, Y. (2020). Partial purification and characterization of a broad-spectrum bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* zrx03 isolated from infant's feces. *Food Sciences and Nutrition*, 8(5), 2214–2222. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1428>
- Łepecka, A., Szymański, P., Rutkowska, S., Iwanowska, K., & Kolożyn-Krajewska, D. (2021). The influence of environmental conditions on the antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from fermented meat products. *Foods*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/foods10102267>
- Liu, G., Nie, R., Liu, Y., & Mehmood, A. (2022). Combined antimicrobial effect of bacteriocins with other hurdles of physicochemical and microbiome to prolong shelf life of food: A review. *Science of the Total Environment*, 825, Article 154058. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154058>
- Lorenz-Fonfria, V. A. (2020). Infrared difference spectroscopy of proteins: From bands to bonds. *Chemical Reviews*, 120(7), 3466–3576.
- Lv, R., Ma, W., Liu, R., Chen, Y., Wang, L., & Chen, X. (2025). Large-scale analysis of predicted phages in 1497 *Lactiplantibacillus plantarum* strains-unveiling the functional diversity and conservation of prophage genomes. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 216, Article 117334.
- Madi-Moussa, D., Coucheney, F., & Drider, D. (2021). Expression of five class II bacteriocins with activity against *Escherichia coli* in *Lactocaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, and in a heterologous host. *Biotechnology Reports*, 30, Article e00632.
- Makhlouf, F. Z., Bramki, A., Smati, M., Khaine, F., Merouane, F., & Barkat, M. (2024). Purification and characterization of Plantaricin PQ12: A novel bacteriocin from *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from fermented cucumbers, with inhibitory activity against foodborne pathogens. *ACS Food Science & Technology*, 4(12), 3088–3096.
- Marcelli, V., Osimani, A., & Aquilanti, L. (2024). Research progress in the use of lactic acid bacteria as natural biopreservatives against *Pseudomonas* spp. in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 196, Article 115129. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115129>
- Mulyawati, A. I., Ardyati, T., & Jatmiko, Y. D. (2019). Partial purification and characterization of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* SB7 and *Bacillus amyloliquefaciens* BC9 isolated from fermented Sumbawa mare's milk as food preservative candidates. In *AIP conference proceedings*.
- Nigutová, K., Serencová, L., Píknová, M., Javorský, P., & Pristas, P. (2008). Heterologous expression of functionally active enterolysin A, class III bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 60(1), 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.03.006>
- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., & Ako-Adjei, D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D733–D745.
- Oldak, A., Zielińska, D., Łepecka, A., Długosz, E., & Kolożyn-Krajewska, D. (2020). *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Polish regional cheeses exhibit anti-staphylococcal activity and selected probiotic properties. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3), 1025–1038. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09587-w>
- Peng, Z., Xu, X., Fan, P., Qiao, B., Xie, M., Huang, T., & Xiong, T. (2023). Identification and characterization of a novel pH and heat stable bacteriocin-like substance lactococcin036019 with food preserving potential. *Food Control*, 148, Article 109682.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuș, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922–935.
- Pujato, S., Galliani, V., Irazoqui, J. M., Amadio, A., Quiberoni, A., & Mercanti, D. (2021). Analysis of CRISPR systems of types II-A, IE and IC in strains of *Lactocaseibacillus*. *International Dairy Journal*, 118, Article 105027.
- Ren, Q., Zhang, M., Xue, R., Liu, T., & Yang, Z. (2023). Purification and characterization of a novel low-molecular-weight antimicrobial peptide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* NMGL2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 248, Article 125932. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125932>
- Rostampour, M., Panahi, B., & Masoumi Jahandizi, R. (2024). The CRISPR-Cas system in *Lactiplantibacillus plantarum* strains: Identification and characterization using a genome mining approach. *Frontiers in Microbiology*, 15, Article 1394756.
- Rwubuzizi, R., Carneiro, K. O., Holzapfel, W. H., Vaz-Velho, M., & Todorov, S. D. (2023). Bacteriocin and antioxidant production, a beneficial properties of lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables of Northwest Bulgaria. *Probiotics Antimicrob Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10140-z>
- Sabri, S. H., Esmaeili Mahani, S., Al-Shammari, A. M., Kadhum Luti, K. J., & Abbas Nejad, M. (2024). *Lactobacillus plantarum* and its derived Bacteriocin exhibits potent antitumor activity against esophageal cancer cells. *Int J Mol Cell Med*, 13(3), 286–302. <https://doi.org/10.22088/ijmcm.bums.13.3.286>
- Saint-Hubert, C., Durieux, A., Bodo, E., & Simon, J. P. (2009). Large scale purification protocol for carnocin KZ 213 from *Carnobacterium piscicola*. *Biotechnology Letters*, 31(4), 519–523. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9897-9>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11), Article 000685.
- Seemant, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069.
- Shentu, H., Ye, P., Zhou, Q., Li, P., & Gu, Q. (2023). Purification, characterization, and mode of action of Sakacin ZFM225, a novel bacteriocin from *Lactobacillus sakei* ZFM225. *Biochem Biophys Rep*, 35, Article 101494. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101494>
- Starikova, E. V., Tikhonova, P. O., Prianchnikov, N. A., Rands, C. M., Zdobnov, E. M., Ilina, E. N., & Govorun, V. M. (2020). Phigaro: High-throughput prophage sequence annotation. *Bioinformatics*, 36(12), 3882–3884.
- Suryani, E. M., Jatmiko, Y. D., & Mustafa, I. (2023). Detection of Plantaricin-Encoding gene and its partial purification in *Lactobacillus plantarum* BP102. *Jurnal Biodjati*, 8(2), 233–247. <https://doi.org/10.15575/biodjati.v8i2.27851>
- Thakali, A., & MacRae, J. D. (2021). A review of chemical and microbial contamination in food: What are the threats to a circular food system? *Environmental Research*, 194, Article 110635.
- Thuy, T. T. D., Lu, H. F., Bregente, C. J. B., Huang, F. A., Tu, P. C., & Kao, C. Y. (2024). Characterization of the broad-spectrum antibacterial activity of bacteriocin-like inhibitory substance-producing probiotics isolated from fermented foods. *BMC Microbiology*, 24(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03245-0>
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 45(4), 312–322.
- Tuli, L., & Resson, H. W. (2009). LC-MS based detection of differential protein expression. *J Proteomics Bioinform*, 2, 416–438. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000102>
- Twomey, E., Hill, C., Field, D., & Begley, M. (2021). Recipe for success: Suggestions and recommendations for the isolation and characterisation of bacteriocins. *The Internet Journal of Microbiology*, 2021, Article 9990635. <https://doi.org/10.1155/2021/9990635>
- van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: A user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W278–W281.
- Vernikis, G. S., & Parkhill, J. (2006). Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: Revisiting the Salmonella pathogenicity islands. *Bioinformatics*, 22(18), 2196–2203.
- Xu, Y., Reuekamp, R., & Kuipers, O. P. (2024). Biosynthesis of antimicrobial ormithine-containing lactacin 481 analogues by use of a combinatorial biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*, 13(12), 4209–4217. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.4c00650>
- Xue, X., Gao, Y., Liu, F., Du, P., Li, C., Liu, Y., & Liu, L. (2024). Purification, characterization, and identification of a novel bacteriocin produced by *Lactocaseibacillus casei* KLS1, and its antimicrobial mechanism against *Staphylococcus aureus*. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 200, Article 116207.
- Yan, H., Lu, Y., Li, X., Yi, Y., Wang, X., Shan, Y., & Lü, X. (2021). Action mode of bacteriocin BM1829 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Bioscience*, 39, Article 100794.
- Zhang, L., Wang, L., Yi, L., Wang, X., Zhang, Y., Liu, J., & Lü, X. (2017). A novel antimicrobial substance produced by *Lactobacillus rhamnosus* LS8. *Food Control*, 73, 754–760.
- Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., & Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2165.
- Zheng, X., Liang, Q., Zhao, B., Song, X., & Zhang, Y. (2024). Whole genome sequencing and analysis of probiotic characteristics for *Lactiplantibacillus plantarum* EL2 isolated from yak yogurt. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 198, Article 116039.
- Zhou, X., Wang, Y., Shinali, T. S., Gao, B., Yang, R., Li, P., & Shang, N. (2025). Purification, characterization, and mechanistic studies of Gassericin GA-3.1: A novel class IIC bacteriocin produced by *Lactobacillus gasserii* LG145. *International Journal of Biological Macromolecules*, Article 139811. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139811>
- Zielińska, D., Długosz, E., & Zawistowska-Denziak, A. (2019). Functional properties of food origin *Lactobacillus* in the gastrointestinal ecosystem—In vitro Study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(3), 820–829. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9458-z>
- Zielińska, D., Rzepkowska, A., Radawska, A., & Zieliński, K. (2015). In vitro screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Current Microbiology*, 70(2), 183–194. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0699-0>

## Supplementary Material

**Table S1. Statistical analysis of the obtained readings**

Bacterial strain	Mean read length	Mean read quality [phred score]	Median read length	Median read quality [phred score]	Number of reads	Read length	N50 Total bases
B1	7,038.3 bp	19.3	3,959 bp	19.9	48339	12,389 bp	340,222,704 bp
O24	4,102.3 bp	18.7	1,569 bp	19.2	172729	10,834 bp	708,594,065 bp

Abbreviations: B1 – *Lacticaseibacillus paracasei* strain B1; O24 – *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24

**Table S2. The *Lacticaseibacillus paracasei* strain B1 genome sequence details were obtained with Bakta v1.8.2 software (Schwengers et al., 2021)**

Genome (GenBank accession number)	Genome length	G+C content	CDS	tRNA	tmRNA	rRNA	ncRNA	ncRNA	Repeat	sORF	gap	oriC	oriV	oriT
Chromosome (CP161808)	3,113,638 bp	46.24%	2989	61	1	15	7	24	1	1	0	2	0	0
pLpaB1_1 (CP161807)	26,855 bp	43.46%	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbreviation: CDS – coding sequence.

**Table S3. The *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24 genome sequence details were obtained with Bakta v1.8.2 software (Schwengers et al., 2021)**

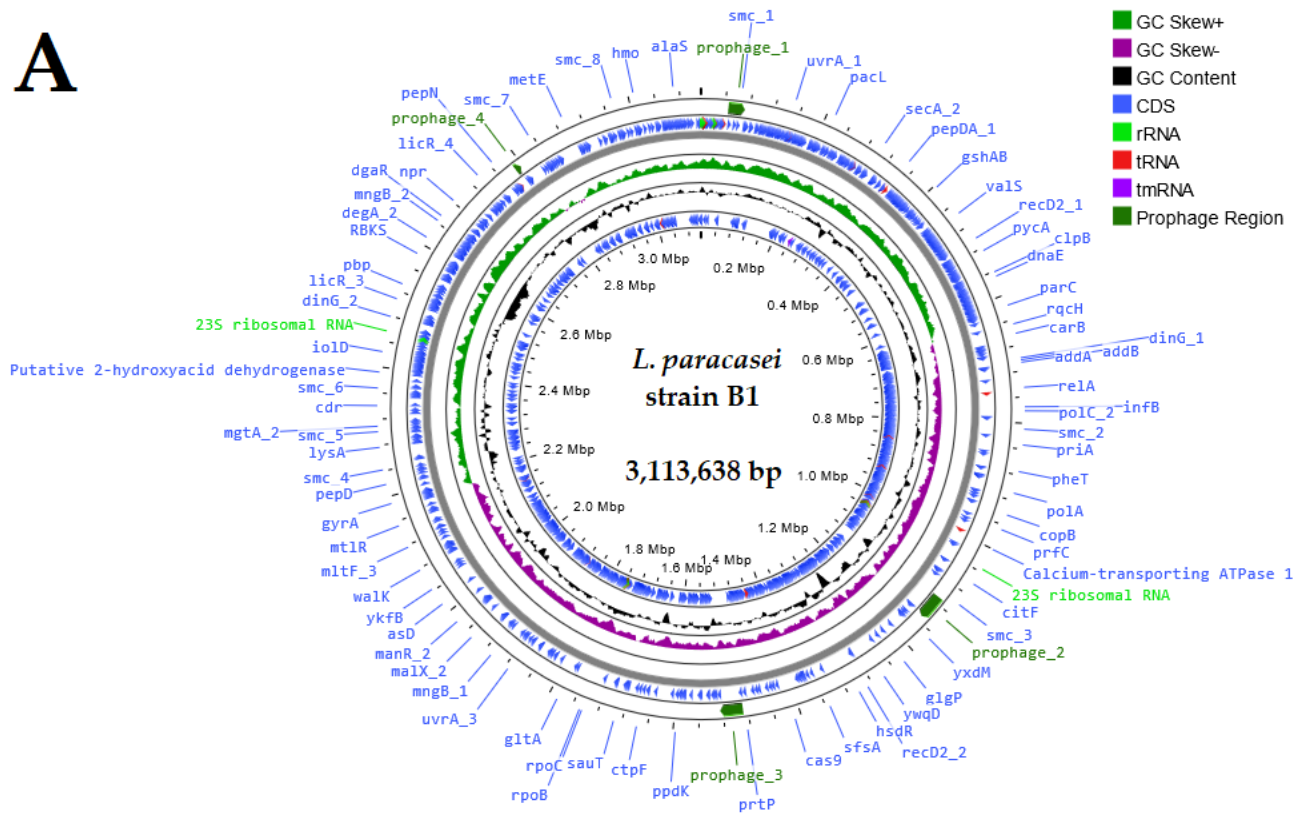
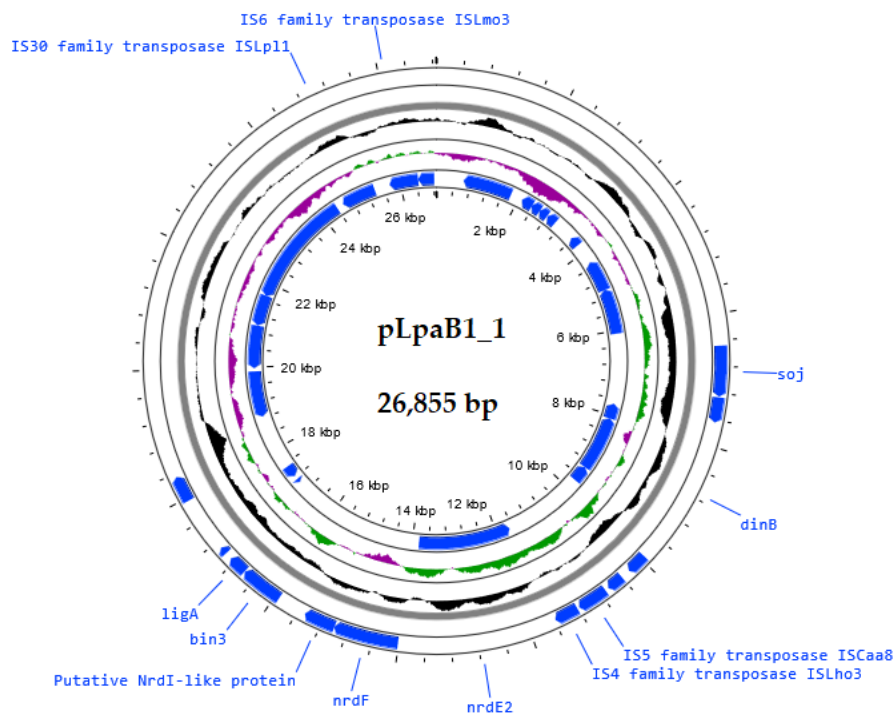
Genome (GenBank accession number)	Genome length	G+C content	CDS	tRNA	tmRNA	rRNA	ncRNA	ncRNA	Repeat	sORF	gap	oriC	oriV	oriT
Chromosome (CP157747)	3,126,794 bp	44.71%	2967	76	1	16	4	34	0	0	0	2	0	0
pLplO24_1 (CP157748)	40,755 bp	39.78%	47	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
pLplO24_2 (CP157749)	43,922 bp	39.41%	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pLplO24_3 (CP157750)	54,741 bp	41.09%	41	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
pLplO24_4 (CP157751)	40,985 bp	37.97%	48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pLplO24_5 (CP157752)	9220 bp	37.19%	11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
pLplO24_6 (CP157753)	15,301 bp	39.25%	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pLplO24_7 (CP157754)	49,834 bp	40.59%	52	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
pLplO24_8 (CP157755)	2117 bp	38.83%	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Abbreviation: CDS – coding sequence.

**Table S4. Presence of ARG, HGT, MOGs, CRISPR, and prophage in plasmids of the *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24**

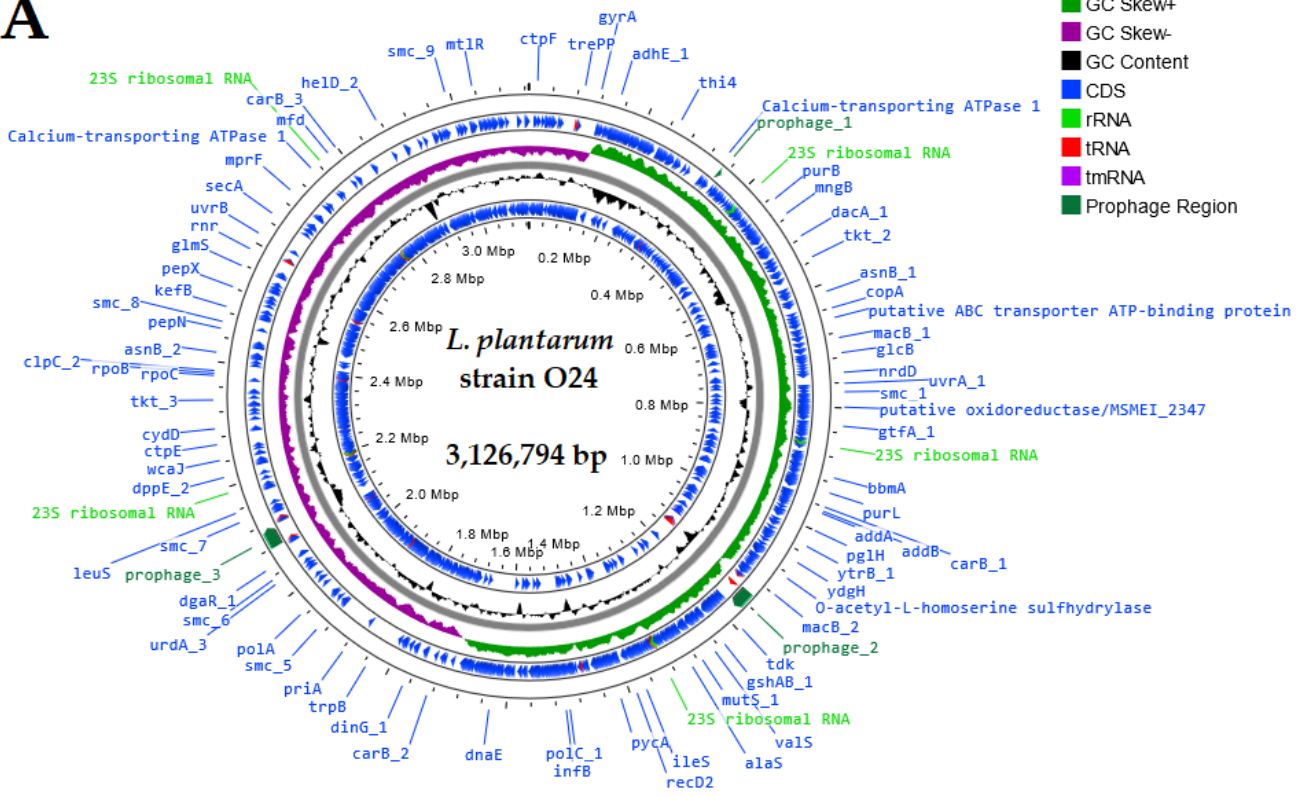
Plasmid	ARG	HGT	MGEs						CRISPR			Prophage	
			Total	IE	RRR	P	STD	T	Arrays	Cas gene	Cas cluster	Region	Gene
pLplO24_1 (CP157748)	0	2	17	11	1	0	2	3	0	0	0	0	0
pLplO24_2 (CP157749)	0	1	19	13	0	1	2	3	0	0	0	0	0
pLplO24_3 (CP157750)	0	3	15	11	2	0	0	2	0	0	0	0	0
pLplO24_4 (CP157751)	0	1	24	19	1	0	2	2	0	0	0	0	0
pLplO24_5 (CP157752)	0	0	7	4	0	0	2	1	0	0	0	0	0
pLplO24_6 (CP157753)	0	0	10	4	0	0	4	2	0	0	0	0	0
pLplO24_7 (CP157754)	0	2	15	8	2	0	2	3	0	0	0	1	10
pLplO24_8 (CP157755)	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

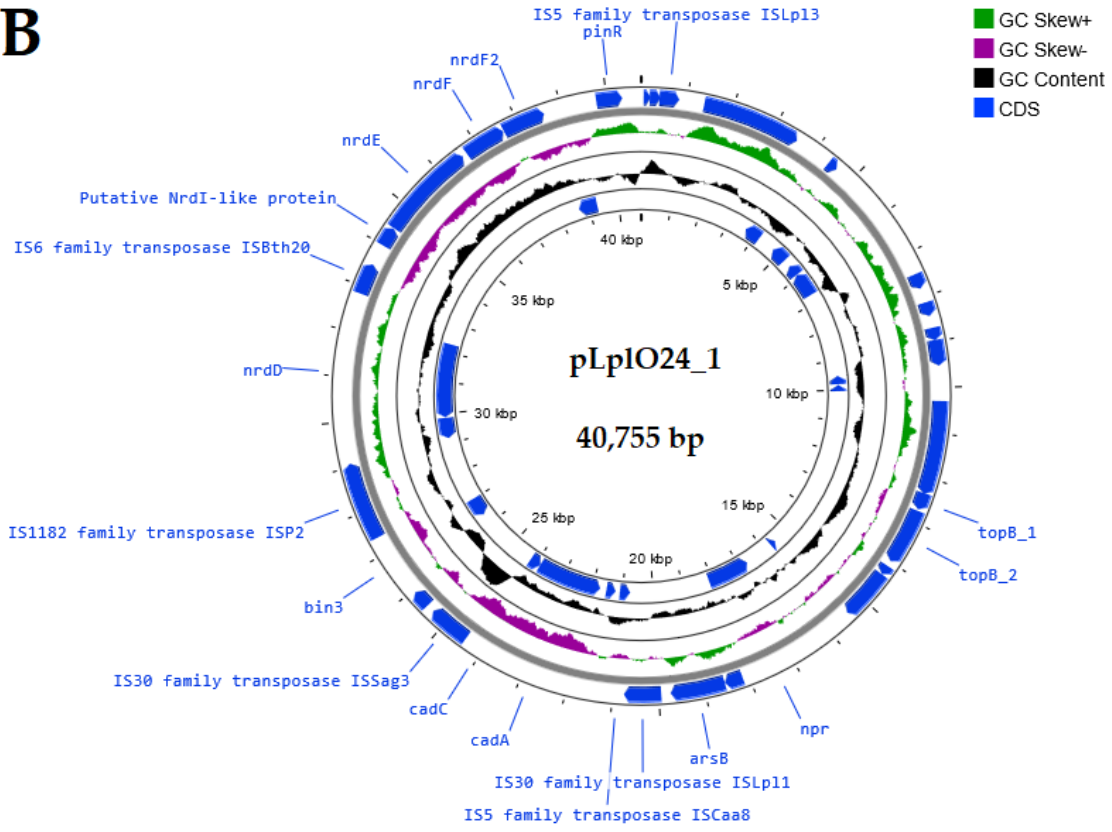
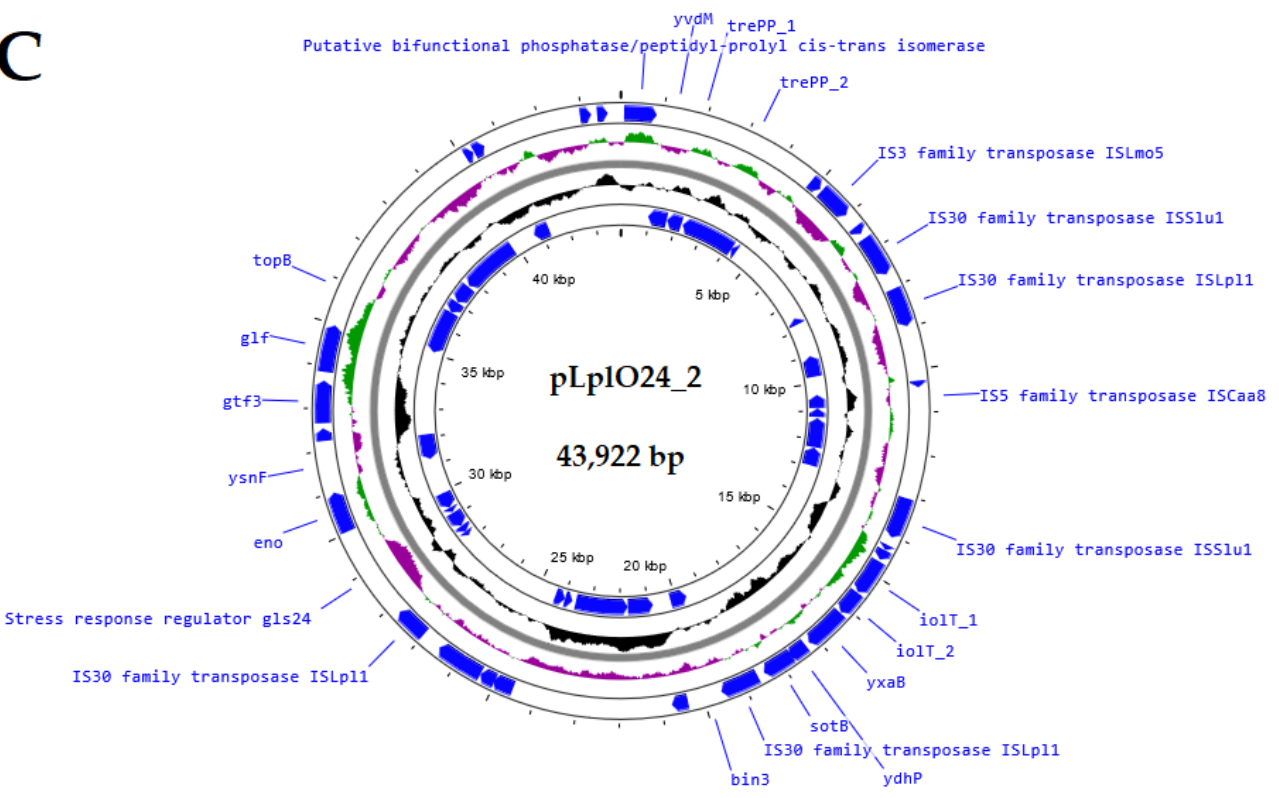
Abbreviations: ARG – antibiotic resistance gene; HGT – horizontal gene transfer; MGEs – mobile genetic elements; IE – regions related to integration/excision; RRR – regions related to replication/recombination/repair; P – regions related to phage; STD – regions related to stability/transfer/defense, T – regions related to transfer; CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats.

**A****B**

**Figure S1. Map of the genome organization of *Lacticaseibacillus paracasei* strain B1 generated using the Proksee software (<https://proksee.ca/>): A – bacterial chromosome; B – plasmid pLpaB1\_1**

# A



**B****C**



**F**

IS3 family transposase IS153

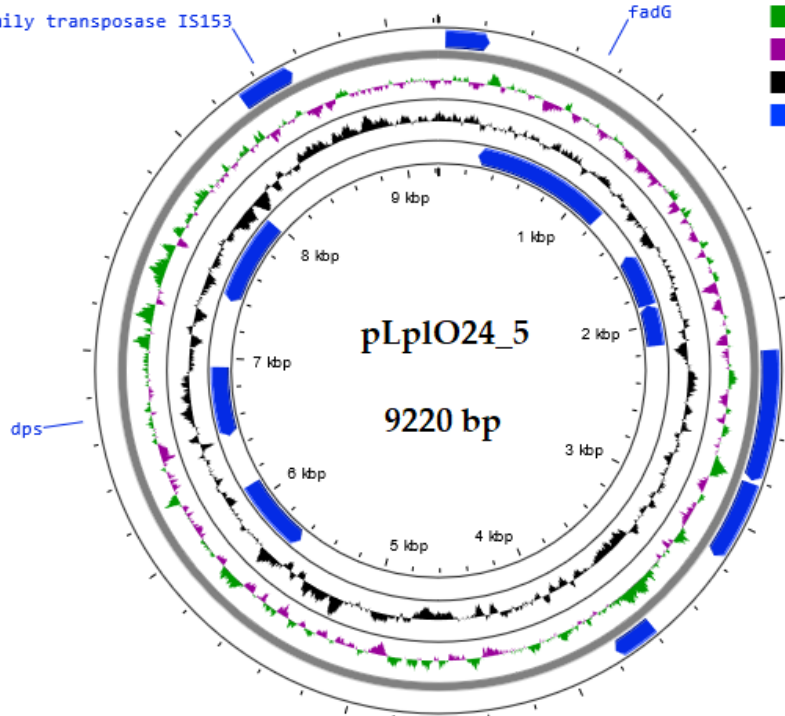
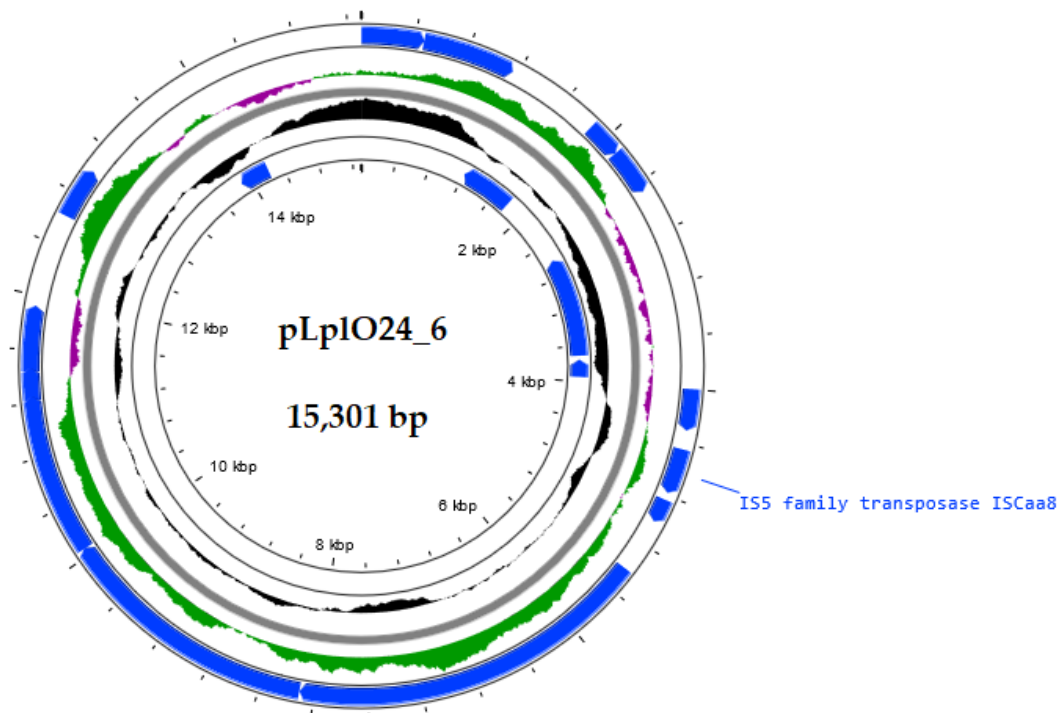
fadG

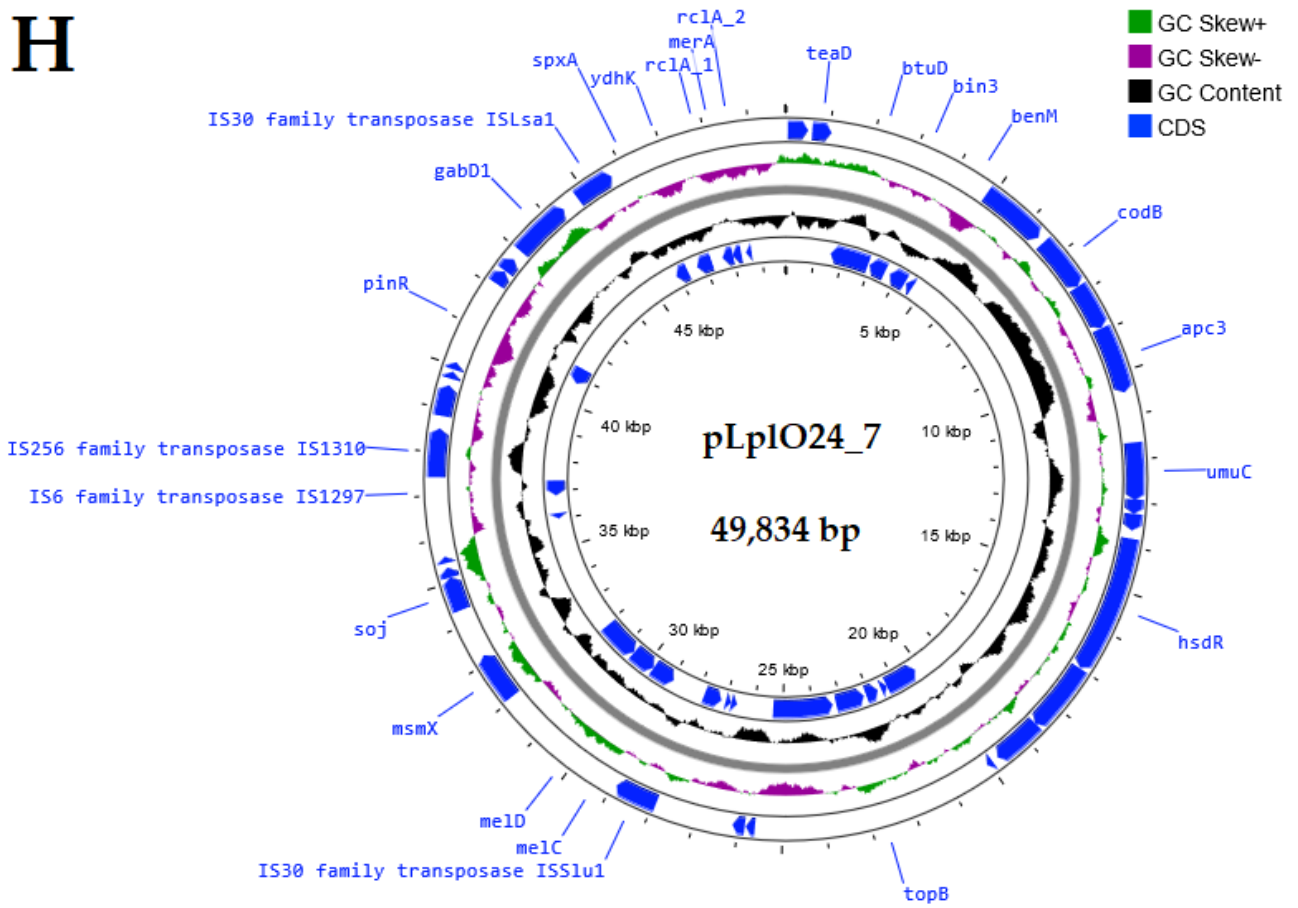
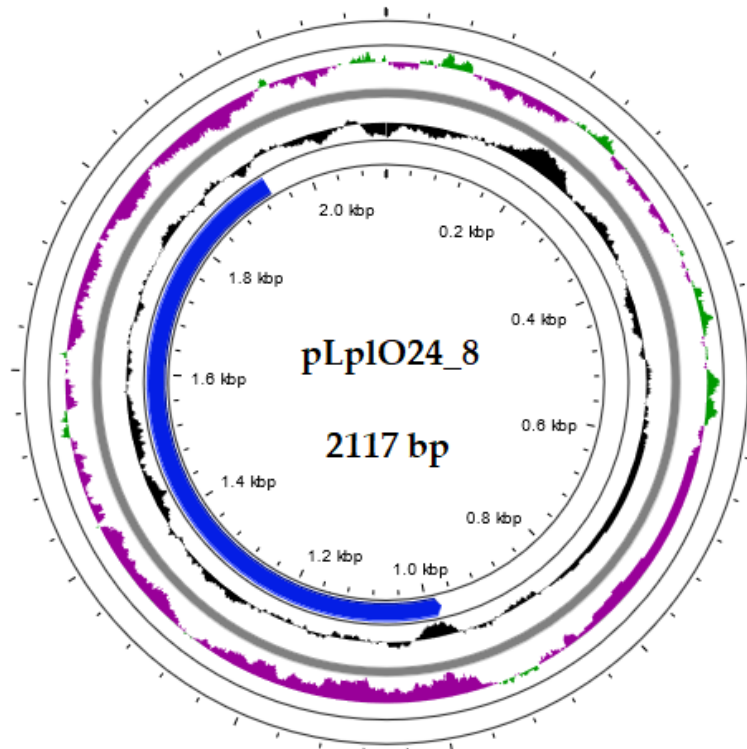
GC Skew+

GC Skew-

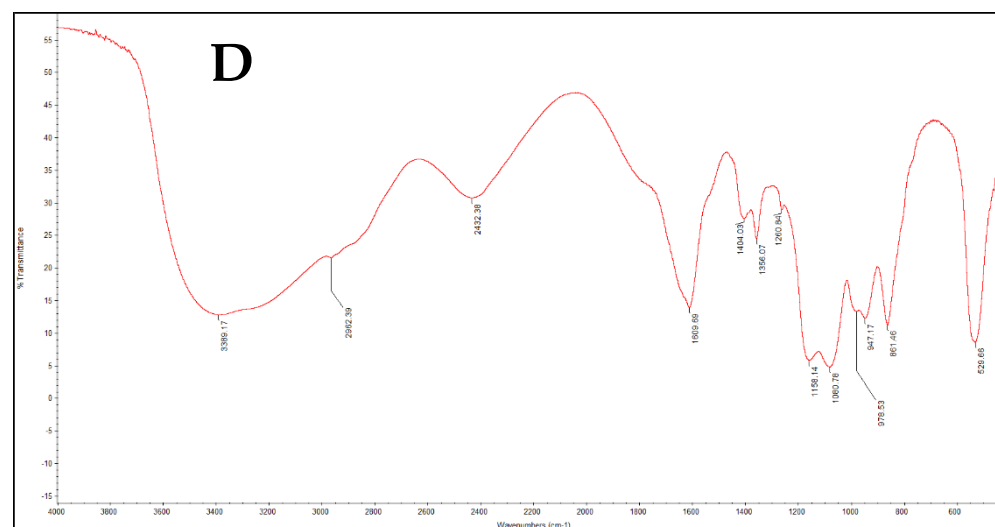
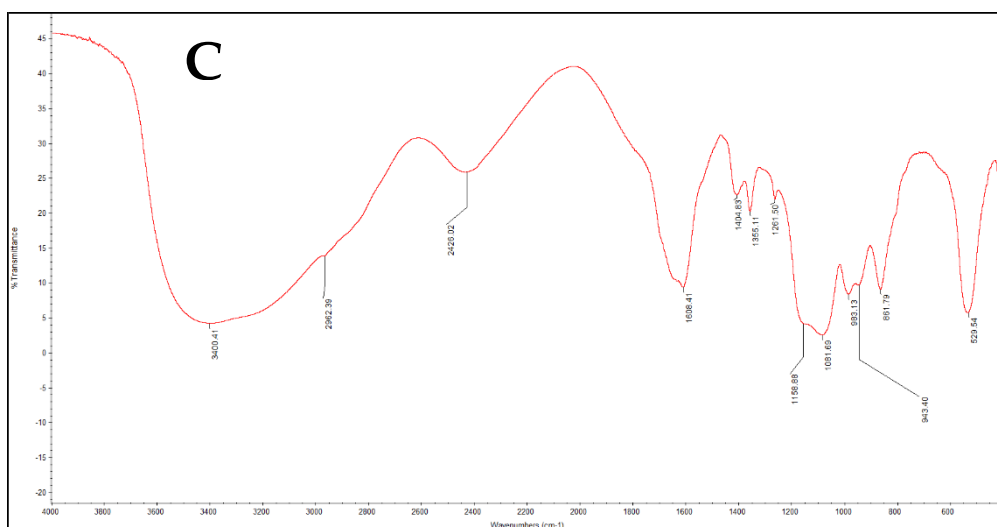
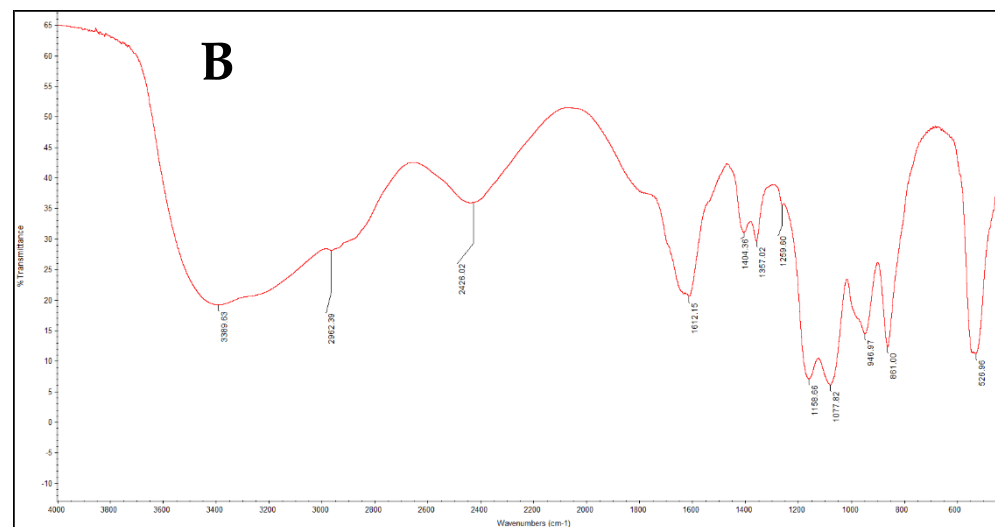
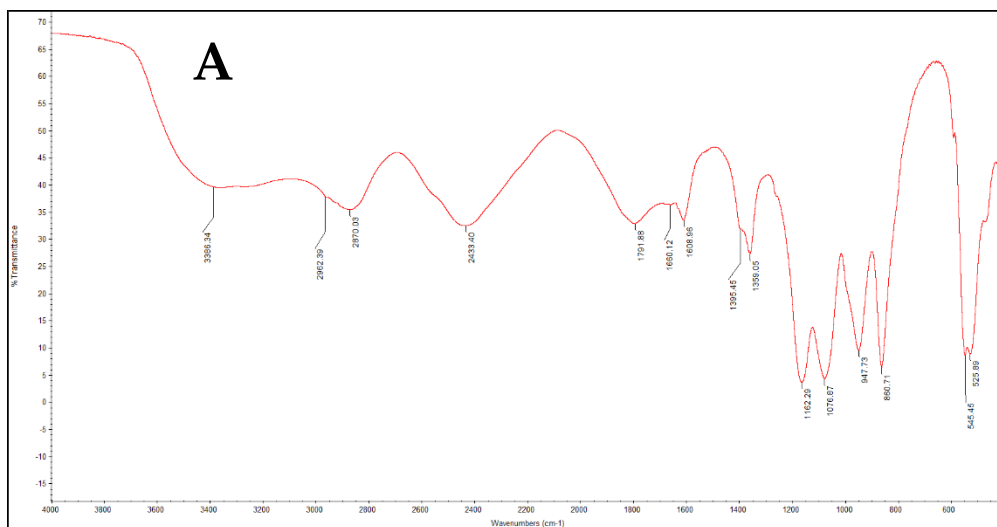
GC Content

CDS

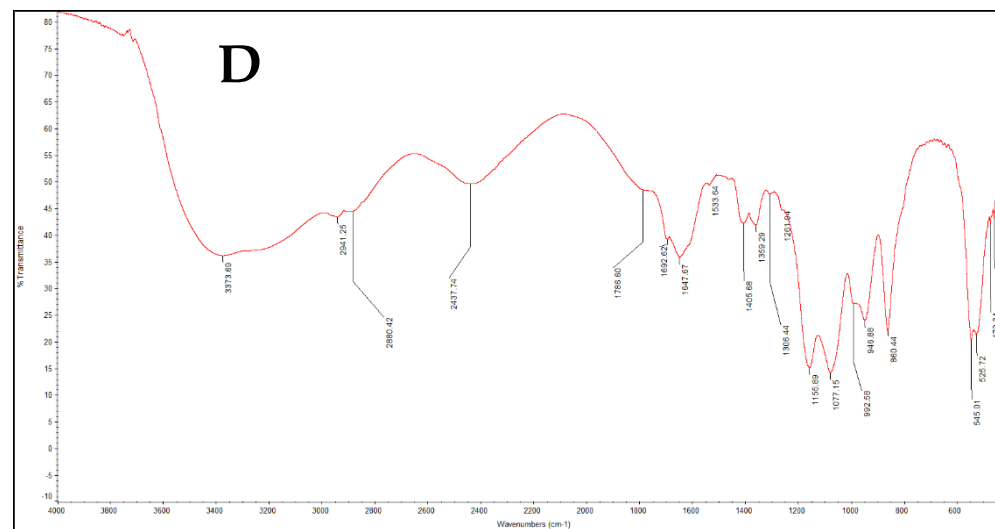
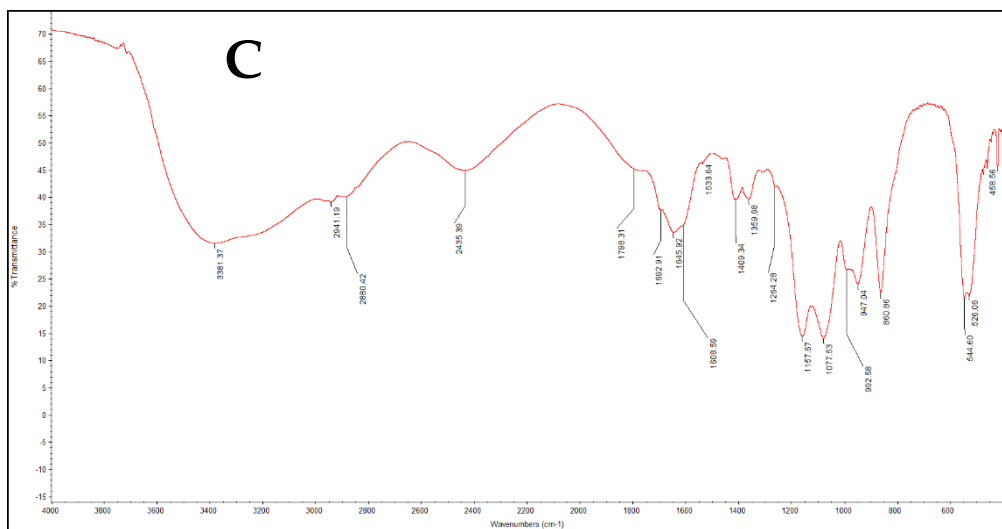
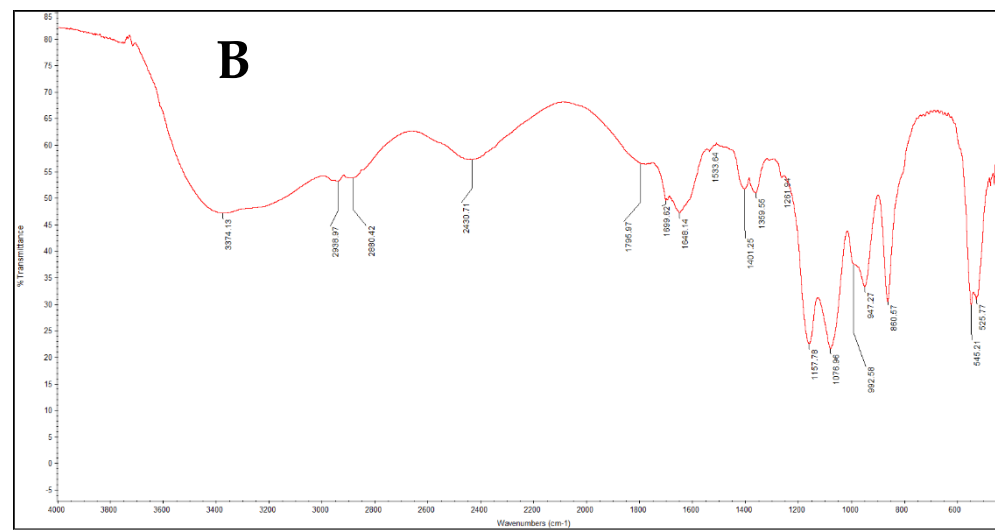
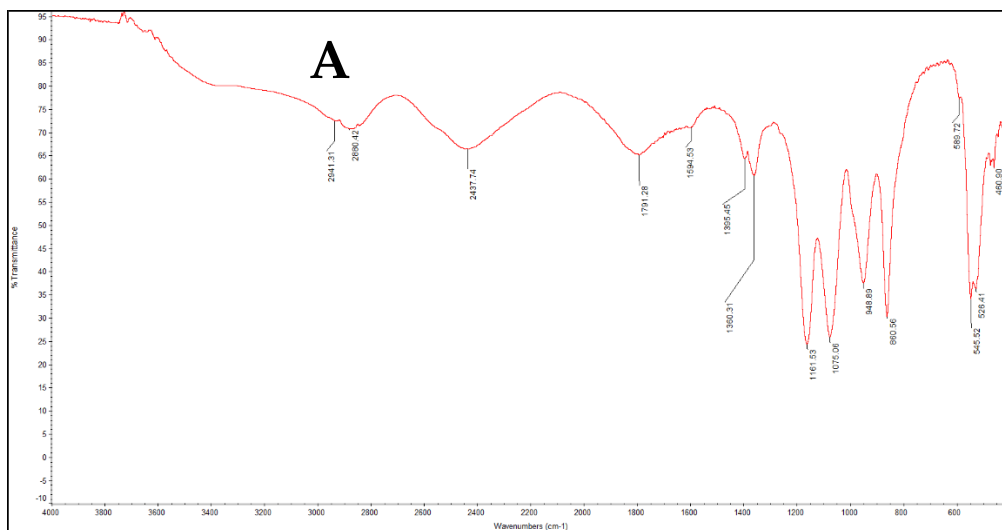
**G**

**H****I**

**Figure S2. Map of the genome organization of *Lactiplantibacillus plantarum* strain O24 generated using the Proksee software (<https://proksee.ca/>): A – bacterial chromosome; B – plasmid pLpIO24\_1; C – plasmid pLpIO24\_2; D – plasmid pLpIO24\_3; E – plasmid pLpIO24\_4; F – plasmid pLpIO24\_5; G – plasmid pLpIO24\_6; H – plasmid pLpIO24\_7; I – plasmid pLpIO24\_8**



**Figure S3. FT-IR spectra of various preparations from *L. paracasei* strain B1; A – CFS crude extract; B – CFS heat-inactivated for 5 min; C – CFS heat-inactivated for 15 min; D – CFS heat-inactivated for 30 min**



**Figure S4. FT-IR spectra of various preparations from *L. plantarum* strain O24 ; A – CFS crude extract; B – CFS heat-inactivated for 5 min; C – CFS heat-inactivated for 15 min; D – CFS heat-inactivated for 30 min**

## Reference

Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial genomics*, 7(11), 000685.

## Article

# Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork

Marcelina Karbowskiak <sup>1,\*</sup> , Anna Okoń <sup>2</sup> , Beata Łaszkiwicz <sup>2</sup> , Piotr Szymański <sup>2</sup>  and Dorota Zielińska <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Department of Meat and Fat Technology, Institute of Agricultural and Food Biotechnology—State Research Institute (IBPRS-PIB), Rakowiecka 36, 02-532 Warsaw, Poland; anna.okon@ibprs.pl (A.O.); beata.laszkiwicz@ibprs.pl (B.Ł.); piotr.szymanski@ibprs.pl (P.S.)

\* Correspondence: marcelina\_karbowskiak@sggw.edu.pl (M.K.); dorota\_zielinska@sggw.edu.pl (D.Z.)

**Abstract:** This study explored a novel application of bacterial preparations, derived from lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid (AAB), to preserve ready-to-cook minced pork. Two LAB and AAB cell-free supernatant mixtures were evaluated as raw meat additives during nine refrigerated storage days. Both treatments effectively stabilized the meat's pH (final values around 5.54) and oxidation reduction potential (final ORP values around 336–349 mV), while preserving color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) without significant degradation. Lipid oxidation, measured by TBARS, was significantly reduced in treated samples (0.34–0.37 mg MDA/kg) compared to the control (0.43 mg MDA/kg) by day 9. Microbial counts were markedly lower: total viable counts in treated samples did not exceed 3.2 log CFU/g, whereas the count in the control reached 4.6 log CFU/g. Exploratory factor analysis (EFA) revealed that microbial growth was the dominant factor affecting quality deterioration, while lipid oxidation and color stability formed distinct quality axes. Functional principal component analysis (FPCA) showed that among treatments, the combination of *Lactiplantibacillus plantarum* O24 and *Gluconobacter oxydans* KNS32 (T2) demonstrated the most effective biopreservation, achieving the best microbiological and oxidative stability. This study introduces the novel, synergistic use of LAB and AAB preparations as a clean-label biopreservation strategy for addressing minced meat products.

**Keywords:** biopreservation; lactic acid bacteria (LAB); acetic acid bacteria (AAB); meat shelf life; ready to cook; ground meat; pork; natural preservatives; food safety



Academic Editors: Yuemei Zhang and Changyu Zhou

Received: 29 April 2025

Revised: 23 May 2025

Accepted: 27 May 2025

Published: 29 May 2025

**Citation:** Karbowskiak, M.; Okoń, A.; Łaszkiwicz, B.; Szymański, P.; Zielińska, D. Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork. *Foods* **2025**, *14*, 1934. <https://doi.org/10.3390/foods14111934>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Meat, particularly in its raw and minimally processed forms, is among the most perishable food products due to its high moisture content, rich nutritional profile, and susceptibility to microbial contamination and oxidative degradation [1]. Despite advances in cold chain logistics and packaging, maintaining the quality and safety of meat throughout storage remains a significant challenge for the food industry. Spoilage-related changes compromise sensory and nutritional quality and reduce shelf life, posing economic and public health concerns [2]. In recent years, ready-to-cook meat products—such as pre-packaged minced meat—have gained popularity due to shifting consumer lifestyles, increased demand for convenience, and changing cooking habits [3]. Ready-to-cook minced meat offers the advantage of minimal preparation, but its high surface area and lack of thermal processing increase vulnerability to microbial proliferation and lipid oxidation [4]. As a result,

effective preservation strategies are crucial to ensure product safety and technological quality [5].

At the same time, consumer expectations are evolving, with a growing preference for “clean-label” products that contain fewer synthetic additives and more natural, recognizable ingredients [6]. This shift has intensified interest in alternative preservation strategies, particularly those based on natural antimicrobials such as plant extracts, essential oils, and microbial metabolites [6]. One promising response to these demands is the concept of biopreservation, which involves using natural or controlled microbiota—or their antimicrobial metabolites—to extend the shelf life and enhance the safety of foods [7]. Originating from traditional fermentation processes, biopreservation relies on inhibitory compounds such as organic acids, bacteriocins, and hydrogen peroxide, produced by beneficial microorganisms, mainly lactic acid bacteria (e.g., *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, and *Streptococcus*) and *Bifidobacterium* [2]. Unlike chemical preservatives, biopreservatives are typically recognized as safe and can offer dual benefits: protection against spoilage and the maintenance of nutritional or sensory quality [8,9]. The use of biopreservation has expanded in recent decades beyond fermented foods. It is now increasingly applied in minimally processed products, including fresh meats, seafood, and dairy, where it can serve as a clean-label alternative to synthetic additives [8,9]. Moreover, this approach supports the development of functional foods, products that offer health benefits beyond basic nutrition through bioactive compounds [3]. While the current study does not directly evaluate health benefits, incorporating bacterial metabolites, especially those associated with probiotic activity in traditional fermented foods like dairy products or kombucha, reflects the functional food philosophy and consumer interest in products with added biological value [10].

Among microbial sources, lactic acid bacteria (LAB) and their metabolites have received considerable attention due to their ability to inhibit spoilage and pathogenic microorganisms [11]. Acetic acid bacteria (AAB) have also emerged as a microbial group with promising technological potential, being traditionally recognized for their role in vinegar production and kombucha fermentation [12,13]. Similarly to LAB, AAB produce a diverse range of organic acids and redox-active compounds with documented antimicrobial properties [14]. Despite this, their use in meat systems remains limited, particularly in the form of cell-free supernatants or metabolic extracts [15]. In response to these trends, the combined application of metabolite-rich supernatants from both LAB and AAB strains represents an innovative biopreservation strategy, aligned with the demand for natural and effective methods in meat processing. While LAB-derived supernatants have been previously studied in meat products [16–19], the originality lies in the synergistic use of LAB and AAB metabolites, a concept inspired by the microbial interactions observed in kombucha, where these bacteria coexist in a symbiotic culture and jointly produce a spectrum of bioactive compounds that stabilize microbial ecosystems and enhance sensory properties [20]. However, despite growing interest in biopreservation, research exploring the combined application of LAB and AAB metabolites in meat systems remains scarce, particularly in the context of ready-to-cook products. It should also be noted that these LAB+AAB combinations have already been tested *in vitro* in preliminary studies (not yet published), indicating promising antimicrobial efficacy and potential for application in meat preservation. Although the antimicrobial properties of LAB-derived supernatants have been previously explored, the synergistic application of LAB and AAB metabolites for the preservation of minimally processed ready-to-cook meat remains largely under-investigated. This study pioneers the combined use of LAB and AAB cell-free supernatants, offering a novel, clean-label solution to enhance microbiological safety and oxidative stability in minced meat products.

In line with current trends toward natural meat preservation, this study aimed to develop a pioneering approach, utilizing food-grade bacterial preparations rich in antimicrobial metabolites, to enhance the safety and quality of ready-to-cook minced pork. Specifically, the research evaluated the effects of synergistic LAB and AAB cell-free supernatant mixtures on key technological and microbiological parameters during refrigerated storage. This study addresses a critical gap concerning the application of LAB+AAB bio-preservatives in minimally processed meat systems and proposes an innovative natural preservation strategy aligned with clean-label and functional food market demands.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial Strains, Culture Media, and Growth Conditions

Four bacterial strains were selected from the internal microorganism collection of the Institute of Human Nutrition Sciences, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), based on prior evidence of antimicrobial and functional activity. Two lactic acid bacteria (LAB) strains, *Lactocaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24, were initially isolated from Polish regional sheep's milk cheese (Bundz, GenBank accession no: CP161807, CP161808) and traditionally fermented cucumber dill pickles (GenBank accession no: CP157747-CP157755), respectively. Two acetic acid bacteria (AAB) strains, *Gluconobacter oxydans* KNS32 (GenBank accession no OQ597203) and *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1 (GenBank accession no OQ594827), were derived from a local kombucha beverage and artisanal honey vinegar, respectively. The strains have been previously tested and have shown in vitro probiotic and anti-cancer properties [21–24].

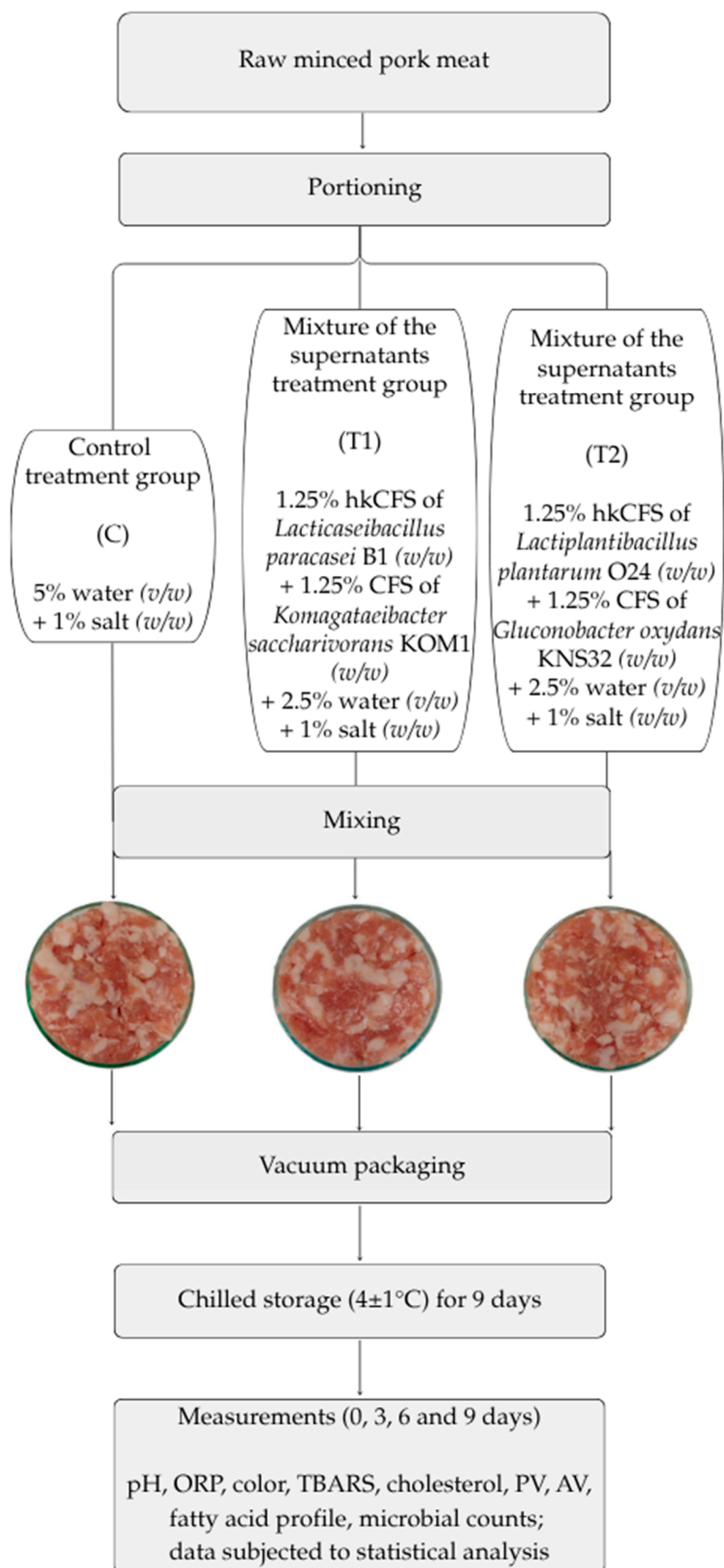
All strains were cryopreserved at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in their respective growth media, supplemented with 20% (*v/v*) glycerol. LAB strains were maintained in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth (Neogen, Lansing, MI, USA). In contrast, AAB strains were preserved in Glucose Calcium Carbonate (GC) broth composed of 2% (*w/v*) glucose (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), 0.7% (*w/v*) calcium carbonate (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), 0.3% (*w/v*) yeast extract (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), and 0.3% (*w/v*) casein peptone (Merck Life Science, Darmstadt, Germany).

For cultivation, LAB strains were grown anaerobically in freshly prepared MRS broth at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 16–18 h, reaching a final concentration of approximately  $1 \times 10^9$  CFU/mL. Anaerobic conditions were maintained using AnaeroGen™ sachets (Oxoid, Basingstoke, UK). Following incubation, LAB cultures were heat-treated in a water bath at  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min. AAB strains were cultivated aerobically in a Hestrin and Shramm (HS) medium at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h, achieving a bacterial density of  $1\text{--}5 \times 10^7$  CFU/mL. The HS medium contained 2% (*w/v*) glucose (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), 0.5% (*w/v*) casein peptone (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), 0.5% (*w/v*) yeast extract (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), 0.27% (*w/v*)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Pol-Aura, Morag, Poland), and 0.15% (*w/v*) citric acid (Merck Life Science, Darmstadt, Germany). Bacterial suspensions were centrifuged at  $3341 \times g$  for 15 min (Eppendorf SE, Hamburg, Germany) to separate bacterial cells. The supernatants were subsequently sterilized using  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  syringe filters (AlfaChem, Poznań, Poland) and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for up to 14 days before further analysis. To address potential variability, bacterial cultures were standardized by employing defined media, controlled incubation parameters, and consistent cell density. The same preparation procedure was applied across all replicates. Additionally, heat-treated, cell-free supernatants derived from defined strains were used to ensure batch-to-batch consistency and to eliminate the variability associated with ongoing microbial metabolism during storage. Finally, two types of preparations, LAB cell-free supernatants of heat-killed cells (hkCFS) and AAB cell-free supernatants (CFS), were assembled. The supernatants and their combination were selected based on previous

studies demonstrating their synergistic action in vitro and in situ. The physicochemical characteristics of these preparations were analyzed. The pH values of the LAB and AAB preparations ranged from 3.2 to 4.5, with the lowest values observed in LAB-derived cell-free supernatants. Among organic acids, lactic acid (approx. 8.3 mg/mL) and acetic acid (approx. 6.7 mg/mL) were predominant. Gluconic acid was particularly abundant in AAB preparations (approx. 5.9 mg/mL).

## 2.2. Meat Sample Preparation and Experimental Design

The raw material used for the study consisted of lean meat and fat from pork ham, minced using an 8 mm mesh. The meat was excised 48 h post-mortem from carcasses chilled at 2 °C. The raw material used had no quality defects. The chemical composition of the minced meat was as follows (mean values  $\pm$  SD for three batches of raw material): water content [%]— $60.95 \pm 1.83$ , total protein content [%]— $16.00 \pm 0.90$ , collagen content [%]— $1.36 \pm 0.22$ , and fat content [%]— $22.48 \pm 2.25$ . The meat was obtained from a local, medium-sized processing plant near Warsaw, Poland. Experimental production was conducted in the technical hall of the Department of Meat and Fat Technology at the Institute of Agricultural and Food Biotechnology in Warsaw (Poland). The meat was subdivided into uniform portions for analysis. Raw minced pork meat samples were randomly assigned to three experimental groups: two treatment groups (T1 and T2) and one control group (C). Treatment group T1 received a formulation containing 1.25% (*w/w*) heat-killed cell-free supernatant (hkCFS) of *Lactocaseibacillus paracasei* B1, 1.25% (*w/w*) cell-free supernatant (CFS) of *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1, 2.5% (*v/v*) distilled water, and 1% (*w/w*) salt. Treatment group T2 was supplemented with 1.25% (*w/w*) hkCFS of *Lactiplantibacillus plantarum* O24, 1.25% (*w/w*) CFS of *Gluconobacter oxydans* KNS32, 2.5% (*v/v*) distilled water, and 1% (*w/w*) salt. The control group (C) consisted of samples without any bacteria-derived supplementation and was formulated with 5% (*v/v*) distilled water and 1% (*w/w*) salt (Figure 1). The concentration of cell-free supernatants (CFS) in treatments T1 and T2 was set at 2.5% (*w/w*), supplemented with 2.5% (*v/v*) distilled water to maintain a total additive level of 5%. This proportion reflects standard practice when preparing ready-to-cook minced meat products, where up to 5% water is typically added to improve texture and processing characteristics [25]. Preliminary in-house trials indicated that higher CFS concentrations adversely affected product quality, while 2.5% provided a functional effect without compromising sensory attributes. Similar concentrations were reported as effective in other studies using bacteria-derived supernatants in meat matrices [19]. For each treatment condition, the respective components were thoroughly mixed with a batch of raw pork meat to obtain a homogeneous mixture, which was then aseptically transferred into sterile polyethylene bags and vacuum-sealed into plastic casings to produce three ( $n = 3$ ) individual replicates per group. This procedure used three pork meat batches (lots) on separate days. Samples were stored at  $4 \pm 1$  °C in a controlled cold room environment and analyzed at 0, 3, 6, and 9 days post-processing to evaluate changes over time. Time and storage conditions were established based on preliminary research. Time-zero samples were analyzed approximately two hours after processing. Figure 1 shows an overview of the experimental design and model appearance of the study's minced pork samples after preparation.



**Figure 1.** Illustration of experimental procedure and photos of tested products after mixing. ORP—oxidation reduction potential; TBARS—thiobarbituric acid reactive substance; PV—peroxide value; AV—acid value.

### 2.3. Physicochemical Analyses

#### 2.3.1. The pH Measurement

The pH measurement was performed according to the methodology described by Łaszkiwicz et al. (2021) [26]. The 10 g meat product samples were mixed with 50 mL distilled water and homogenized (14,000 RPM) for 1 min with an 800 W blender (MSM 66120, BSH Hausgeräte GmbH, Munich, Germany). To determine the pH value, we used a digital pH meter (Mettler Delta 350, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) with the automatic compensation of temperature and a glass calomel in a Lab Cool electrode (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

#### 2.3.2. Oxidation Reduction Potential (ORP) Measurement

To determine the ORP value, the 10 g meat product samples were mixed with 50 mL distilled water and homogenized (14,000 RPM) for 1 min with an 800 W blender (MSM 66120, BSH Hausgeräte GmbH, Munich, Germany). The redox potential was assessed using a digital pH meter (Mettler Delta 350, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland) equipped with an In Lab Redox Pro electrode (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). The results obtained were transformed into the value of ORP in relation to the standard hydrogen electrode EH (mv). The ORP value of the reference electrode at a temperature of 20 °C— $E_{ref} = 207$  mV was summed with the value obtained with the equipment.

#### 2.3.3. Color Measurement

A spherical CR-300 spectrophotometer (Konica Minolta, Tokyo, Japan), with a measuring hole 25.4 mm in diameter, was used to determine the color. The measurement was performed in a laboratory at 24 °C ± 2 °C. Computed trio-chromatic coordinates were expressed in the CIE  $L^* a^* b^*$  system, where  $L^*$  means lightness,  $a^*$  means chromaticity from green to red, and  $b^*$  means chromaticity from blue to yellow. For the measurement of the color, the standard CIE observer was used. This has the following parameters: 2°, illuminant D65, and 8 mm measuring area. The white tiling standard ( $L^* = 95.87$ ,  $a^* = -0.49$ ,  $b^* = 2.39$ ) was used as a reference source. Six measurements were carried out for each of the three replicate treatments.

### 2.4. Microbiological Analysis

Bacterial enumeration and pathogen detection were performed at 0, 3, 6, and 9 days of refrigerated storage. For each sample, 10 g or 25 g of meat was aseptically transferred into a sterile Stomacher bag and diluted with 90 mL or 225 mL of sterile buffered peptone water (Oxoid, Basingstoke, UK) to obtain an initial 10-fold dilution. Samples were blended at 230 rpm using a Stomacher 400 instrument (IUL Instruments, Königswinter, Germany) for 2 min, followed by serial decimal dilutions and plating on selective media. The total viable count (TVC) was determined using Plate Count Agar (PCA) (Merck Life Science, Darmstadt, Germany), incubated at 30 °C for 48 h. Lactic acid bacteria (LAB) were enumerated on MRS agar (Neogen, Lansing, MI, USA) and incubated at 37 °C for 48 h. *Escherichia coli* was detected using Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX) agar (Oxoid, Basingstoke, UK), incubated at 44 °C for 18–24 h. Enterobacteriaceae were plated on Violet Red Bile Glucose (VRBG) agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and incubated at 37 °C for 24 h. Coagulase-positive *Staphylococcus* were detected using a Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF) (Biokar Diagnostics, Allonne, France) medium incubated at 37 °C for 18–24 h. *Salmonella* spp. detection involved enrichment in Müller–Kauffman's tetrathionate broth with novobiocin (Oxoid, Basingstoke, UK), followed by plating on XLD agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and Rambach chromogenic medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), incubated at 37 °C for 24 h. *Listeria monocytogenes* was enriched in Half Fraser and Fraser broths

with the X211 supplement (Neogen, Lansing, MI, USA) followed by plating on *Listeria* chromogenic agar with  $\times 10$  and  $\times 72$  supplements (Neogen, Lansing, MI, USA) and Palcam agar (Neogen, Lansing, MI, USA), incubated at 37 °C for 24–48 h. Bacterial counts were calculated and expressed as  $\log_{10}$  CFU/g. In cases where no colonies were observed on the plate corresponding to the lowest dilution, a value of one colony was assumed for calculation purposes.

### 2.5. Lipid Oxidation and Fatty Acid Analysis

Lipid oxidation was assessed by determining thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), following the methods of Pikul et al. (1989) [27] and Szymański et al. (2025) [28]. For each sample, 10 g of meat was homogenized with 34.25 mL of 4% cold perchloric acid and 750  $\mu$ L of a 0.01% ethanolic BHT solution using a Bamix m200 blender (ESGE AG, Mettlen, Switzerland) for 1 min. The resulting homogenate was filtered, and 1 mL of the filtrate was combined with 1 mL of 0.02 M aqueous 2-thiobarbituric acid. The mixture was then incubated at 100 °C for 60 min. After cooling to approximately 20 °C, absorbance was measured at 532 nm using a U-2900 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan). A blank sample of 1 mL of 4% perchloric acid and 1 mL of 0.02 M thiobarbituric acid solution served as the reference. TBARS values were expressed as milligrams of malondialdehyde (MDA) per kilogram of sample.

Cholesterol content was determined using a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (HP/Agilent 6890 II-FID) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), following the IBPRS-PIB laboratory's internal procedure (PA/04, Issue 7, dated 8 June 2021) [29], with results expressed in mg per 100 g of product.

The fatty acid composition was determined by gas chromatography using ISO 12966-1:2014 [30]. The analytical procedures followed methods similar to those described by [28]. Gas chromatographic analysis was performed using a flame ionization detection system (HP 6890 II-FID; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a BPX 70 column (Trajan Scientific and Medical, Ringwood, VIC, Australia) featuring a highly polar stationary phase. The column specifications were as follows: a length of 100 m, a film thickness of 0.20  $\mu$ m, and an internal diameter of 0.25 mm. Heneicosanoic acid (C21:0; H5149, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as an internal standard. Individual fatty acids were identified by comparing retention times with the certified reference material Supelco 37-Component FAME Mix (CRM47885, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The resulting data are given in g/100 g total fatty acid.

### 2.6. Statistical Analysis

This study tested parameters across four time points: baseline (day 0), day 3, day 6, and day 9. Performance results were reported as medians with interquartile ranges. The Friedman test was applied to assess the effect of storage duration, while the Kruskal–Wallis test was used to evaluate treatment effects, both at a significance level of  $\alpha = 0.05$ . Nonparametric tests were chosen due to the violation of the normality assumption in the dataset. Pairwise median comparisons were performed using the Durbin–Conover test and the Dunn–Sidak correction factor (DSCF). For multivariate exploratory analysis, exploratory factor analysis (EFA) was employed. Due to deviations from the normal distribution, the principal axis factoring method was applied, with Oblimin rotation used to account for correlations among factors. We determined the number of factors using the eigenvalue  $> 1$  criterion, and factor loadings above 0.50 were considered significant. Analyses were performed for days 0 and 9, as complete data were available for these storage time points. To observe changes in the values of the studied parameters over time, functional principal component analysis (FPCA) was conducted. FPCA is a statistical method used to analyze

data that changes continuously (e.g., over time). The aim of FPCA was to identify the main patterns of variability within functions (continuous variables). These patterns, called functional principal components, allow for a simplified representation and understanding of the changes occurring in the data. Suppose that the secured stochastic process  $X(t)$  is subject to the period  $[0, T]$  and that, for this process, I use the covariance  $c(s, t)$  for  $s, t \in T$ . Theoretically, the process  $X(t)$  can be applied as follows:

$$X(t) = \sum_{j=1}^{\infty} \varepsilon_j c_j(t), \quad (1)$$

where  $c_j(t)$  is a basis in the space of square-integrable functions defined on the interval  $[0, T]$   $L^2[0, T]$ , and  $\varepsilon_j$  are random variables [31].

The main goal is to choose the appropriate basis  $\mathbf{b}_j(t)$  and random variables  $\eta_j$  in the following way:

$$\int_0^T \mathbf{b}_j^2(t) dt = 1, \quad \int_0^T \mathbf{b}_j(t) \mathbf{b}_k(t) dt = 0 \quad (j \neq k) \quad (2)$$

The variances were non-decreasing ( $D_{\eta_1}^2 > D_{\eta_2}^2 > \dots$ ). The elements of this basis are called functional principal components [31].

Since the parameters describing the individual properties of the meat samples were expressed in different units, data standardization was performed. Furthermore, missing data were supplemented using linear interpolation.

Statistical calculations were performed using Jamovi (The Jamovi Project, version 2.6.26) and RStudio 2024.12.1-563 (Posit, Boston, MA, USA).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Determination of pH and Oxidation Reduction Potential (ORP) Measurement

Table 1 presents the pH and ORP values of minced pork samples during storage.

At the beginning of storage (day 0), the pH values of the treated samples (T1 and T2) were comparable to those of the control group ( $p > 0.05$ ), indicating that the addition of LAB+AAB supernatants did not cause any immediate or significant acidification. Despite the presence of antimicrobial organic acids such as lactic, acetic, and gluconic acids in the supernatants [21,32], treated samples exhibited a moderate, gradual pH decline up to day 6, reaching minimum values around 5.38. After day 6, a slight pH increase was observed in all samples. This was probably associated with proteolytic and enzymatic activities linked to ongoing microbial metabolism [33]. Notably, the dynamics of pH changes remained closely aligned with those observed in the control group, indicating that the antibacterial supernatants exerted their preservative action without substantially altering the physicochemical balance of the meat. This observation is important from a technological standpoint, as it preserves the isoelectric point of meat proteins, maintaining water-holding capacity and preventing excessive fluid losses during thermal processing [34]. In contrast, conventional preservation methods based on the direct addition of organic acids often trigger a substantial pH decline, which, although effective against spoilage microorganisms, can impair protein functionality and result in higher economic losses due to reduced cooking yields [35,36]. This controlled acidification likely results from the absence of viable acid-producing bacteria and possible interactions between bioactive metabolites and the meat matrix, leading to a buffered effect [6]. Nevertheless, throughout the storage period, the treated samples maintained pH values comparable to the control, supporting the conclusion that LAB+AAB supernatants can extend shelf life without negatively impacting essential technological properties. These findings are consistent with previous research reporting that biopreservatives based on bacterial metabolites

can effectively maintain microbial safety while preserving functional and sensory meat quality [17,19].

**Table 1.** pH changes in ready-to-cook minced pork samples during storage.

Parameter	Time [Days]	Treatment		
		T1	T2	C
pH	0	6.02 ± 0.03 <sup>aA</sup>	6.00 ± 0.04 <sup>aA</sup>	6.03 ± 0.07 <sup>aA</sup>
	3	5.91 ± 0.04 <sup>bA</sup>	5.91 ± 0.06 <sup>bA</sup>	5.91 ± 0.02 <sup>bA</sup>
	6	5.54 ± 0.04 <sup>cA</sup>	5.38 ± 0.02 <sup>cB</sup>	5.65 ± 0.10 <sup>cA</sup>
	9	5.56 ± 0.09 <sup>cA</sup>	5.55 ± 0.02 <sup>cA</sup>	5.54 ± 0.10 <sup>cA</sup>
ORP (mV)	0	333.50 ± 9.63 <sup>aA</sup>	331.50 ± 8.00 <sup>aA</sup>	335.50 ± 11.50 <sup>aA</sup>
	3	336.50 ± 7.88 <sup>aA</sup>	334.00 ± 9.63 <sup>aA</sup>	339.50 ± 12.75 <sup>abA</sup>
	6	358.00 ± 21.63 <sup>bA</sup>	362.00 ± 29.50 <sup>bA</sup>	348.00 ± 15.38 <sup>bA</sup>
	9	349.50 ± 16.25 <sup>cA</sup>	336.50 ± 9.88 <sup>cA</sup>	374.50 ± 32.75 <sup>cA</sup>

The values are expressed as median ± Q. <sup>a,b,c</sup>—the median, marked with lowercase letters, differs significantly between times ( $p < 0.05$ ). <sup>A,B</sup>—the median, marked with uppercase letters, differs significantly between treatments ( $p < 0.05$ ).

In all samples, a general increase in ORP was observed from day 0 to day 6, indicating progressive oxidation within the meat matrix. In the treated samples T1 and T2, which contained antibacterial supernatants, ORP values peaked on day 6 and significantly ( $p < 0.05$ ) declined by day 9. This pattern may suggest some modulation of oxidative processes by the supernatant-derived compounds, possibly due to their antioxidant or microbial-inhibitory effects [37]. In contrast, the control sample exhibited a significant ( $p < 0.05$ ) increase in ORP by day 9, reaching the highest recorded median (374.5 mV). This trend is consistent with typical oxidative processes during chilled storage, as oxygen availability and microbial metabolism can shift the redox balance toward more oxidizing conditions [38]. This sharp rise could reflect enhanced oxidative stress, likely driven by intensified microbial activity and associated metabolic byproducts such as peroxides or reactive oxygen species [39]. The absence of any antimicrobial intervention in the control sample may have allowed for the more rapid progression of spoilage and oxidation [40]. The ORP trends observed in this study align with previous findings linking microbial growth and oxidative deterioration in meat products during storage [41]. The less pronounced ORP changes in treated samples suggest the potential mitigating effect of the culture supernatants on redox instability [42].

### 3.2. Color Assessment

The color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) of minced pork samples showed dynamic changes over storage time, with significant shifts mainly associated with storage duration rather than treatment type (Table 2). The  $L^*$  values (lightness) generally increased from day 0 to day 9, particularly in sample T1 and the control sample, suggesting slight surface lightening during storage. However, no significant differences were noted between treated and control samples throughout the period, indicating that the antibacterial mixtures did not markedly affect surface lightness. Redness ( $a^*$  values) increased slightly by day 3 in all samples, likely due to oxymyoglobin formation during the initial storage, followed by stabilization or a minor decline, consistent with known myoglobin oxidation pathways under chilled conditions [40]. The sample with the T2 addition mixture showed slightly lower  $a^*$  values on day 9, though the differences remained statistically insignificant. Similarly,  $b^*$  values (yellowness) rose somewhat in all samples over time, likely reflecting pigment oxidation or mild lipid degradation, as reported in other studies on fresh and cured meats [43]. The lack of significant differences between treated and control samples across all color parameters is consistent with findings from Stadnik et al. (2022) [44], who reported that bioactive compounds from bacterial cultures did not negatively influence meat color. Similarly, Yang

et al. (2023) [45] found that beef steaks treated with *Latilactobacillus sakei* RS-25 showed improved lightness and delayed color degradation during storage without adverse effects on general quality parameters. Similar results were reported by Incili et al. (2022) [46], who observed that applying postbiotics had no significant impact on chicken drumstick samples'  $L^*$ ,  $a^*$ , or  $b^*$  color parameters. These findings suggest that such treatments help maintain color stability, or at the very least do not negatively impact visual quality. While no significant improvement in color was observed, the results indicate that the supernatants had no adverse effect on color. This is favorable from a technological and consumer standpoint, as color stability plays a crucial role in meat acceptability at the point of sale [47,48].

**Table 2.** Color changes in ready-to-cook minced pork samples during storage.

Color Parameters	Time [Days]	Treatment		
		T1	T2	C
$L^*$	0	56.37 ± 0.85 <sup>aA</sup>	57.89 ± 1.18 <sup>aA</sup>	56.74 ± 0.59 <sup>aA</sup>
	3	56.10 ± 1.24 <sup>bA</sup>	56.46 ± 1.98 <sup>bA</sup>	55.88 ± 1.39 <sup>aA</sup>
	6	58.44 ± 0.50 <sup>cA</sup>	56.92 ± 0.59 <sup>cAB</sup>	56.49 ± 0.77 <sup>aB</sup>
	9	58.07 ± 0.51 <sup>dA</sup>	57.45 ± 0.50 <sup>acA</sup>	57.81 ± 1.02 <sup>bA</sup>
$a^*$	0	3.96 ± 0.35 <sup>aA</sup>	4.05 ± 0.36 <sup>aA</sup>	4.69 ± 0.77 <sup>aA</sup>
	3	6.61 ± 0.33 <sup>bA</sup>	6.41 ± 0.72 <sup>bAB</sup>	5.83 ± 0.34 <sup>bB</sup>
	6	6.12 ± 0.32 <sup>cA</sup>	6.46 ± 0.29 <sup>bA</sup>	5.90 ± 0.41 <sup>cB</sup>
	9	6.13 ± 0.18 <sup>cA</sup>	5.45 ± 0.64 <sup>cA</sup>	6.01 ± 0.32 <sup>cA</sup>
$b^*$	0	9.15 ± 0.16 <sup>aA</sup>	9.25 ± 0.36 <sup>aA</sup>	8.16 ± 0.31 <sup>aB</sup>
	3	9.40 ± 0.28 <sup>bA</sup>	9.15 ± 0.25 <sup>bA</sup>	8.43 ± 0.28 <sup>bB</sup>
	6	10.19 ± 0.26 <sup>cA</sup>	10.25 ± 0.28 <sup>cA</sup>	9.32 ± 0.23 <sup>cB</sup>
	9	9.87 ± 0.26 <sup>dA</sup>	10.06 ± 0.12 <sup>dA</sup>	9.72 ± 0.42 <sup>dA</sup>

$L^*a^*b^*$ —color parameters. The values are expressed as median ± Q. <sup>a,b,c,d</sup>—the median marked with lowercase letters differs significantly between times ( $p < 0.05$ ); <sup>A,B</sup>—the median marked with uppercase letters differs significantly between treatments ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Microbiological Quality

The microbial analysis of minced meat samples during 9 days of refrigerated storage revealed clear temporal patterns and treatment-related differences (Table 3, Figure S1). As expected, all samples exhibited a gradual increase in total viable counts (TVCs) throughout storage, characteristic of microbial proliferation under chilled conditions [49]. However, samples treated with antibacterial culture supernatants (mixtures T1 and T2) maintained significantly lower TVC levels compared to the untreated controls at all time points ( $p < 0.05$ ). By day 9, the control sample reached 4.55 log CFU/g, while samples with addition mixtures T1 and T2 remained below 3.2 log CFU/g, suggesting that the added supernatants effectively delayed microbial proliferation. The image of TVC agar plates after incubation at a given temperature and the time for the three tested samples from one of the storage periods is presented in Figure S2 in the Supplementary Materials. Lactic acid bacteria (LAB) counts followed a similar trend. By the end of storage, LAB counts in the control group had significantly increased to 4.26 log CFU/g ( $p < 0.05$ ), whereas in samples treated with mixtures T1 and T2, levels remained below 2.5 log CFU/g. Enterobacteriaceae and *Escherichia coli* counts exhibited comparable behavior. While all samples steadily increased over time, the control consistently displayed higher levels, especially by day 9. In contrast, treated samples showed significantly restricted growth of these Gram-negative bacteria, with Enterobacteriaceae not exceeding 3.01 log CFU/g and *E. coli* remaining below the detection limit of 2 log CFU/g. Coagulase-positive staphylococci levels remained below the detection limit of 2 log CFU/g across all treatments and time points. Notably, no presence of *L. monocytogenes* or *Salmonella* spp. was detected in any sample throughout the study.

This confirms the hygienic safety of the initial meat batches and suggests that the storage conditions were not conducive to the proliferation of these pathogens.

**Table 3.** Microbial quality in ready-to-cook minced pork samples during storage.

Analyses	Time [Days]	Treatment		
		T1	T2	C
TVC (log CFU/g)	0	2.48 ± 0.15 <sup>aA</sup>	2.43 ± 0.10 <sup>aB</sup>	3.03 ± 0.12 <sup>aC</sup>
	3	2.50 ± 0.12 <sup>bA</sup>	2.63 ± 0.17 <sup>bB</sup>	2.92 ± 0.17 <sup>bC</sup>
	6	2.80 ± 0.19 <sup>cA</sup>	2.95 ± 0.15 <sup>cB</sup>	3.28 ± 0.15 <sup>cC</sup>
	9	2.98 ± 0.11 <sup>dA</sup>	3.11 ± 0.19 <sup>dB</sup>	4.55 ± 0.12 <sup>dC</sup>
LAB (log CFU/g)	0	1.52 ± 0.15 <sup>aA</sup>	1.31 ± 0.15 <sup>aB</sup>	2.05 ± 0.11 <sup>aC</sup>
	3	1.52 ± 0.12 <sup>abA</sup>	1.93 ± 0.14 <sup>bB</sup>	1.44 ± 0.19 <sup>AC</sup>
	6	1.95 ± 0.13 <sup>cA</sup>	1.91 ± 0.16 <sup>cB</sup>	2.40 ± 0.18 <sup>cC</sup>
	9	2.45 ± 0.15 <sup>dA</sup>	2.34 ± 0.11 <sup>dB</sup>	4.26 ± 0.14 <sup>dC</sup>
ENT (log CFU/g)	0	2.31 ± 0.107 <sup>aA</sup>	2.28 ± 0.20 <sup>aB</sup>	2.69 ± 0.17 <sup>aC</sup>
	3	2.29 ± 0.132 <sup>bA</sup>	2.46 ± 0.16 <sup>bB</sup>	2.78 ± 0.14 <sup>bC</sup>
	6	2.52 ± 0.16 <sup>cA</sup>	2.84 ± 0.13 <sup>cB</sup>	3.13 ± 0.14 <sup>cC</sup>
	9	2.83 ± 0.19 <sup>dA</sup>	3.01 ± 0.13 <sup>dB</sup>	4.01 ± 0.17 <sup>dC</sup>
EC (log CFU/g)	0	<2.00	<2.00	2.13 ± 0.13 <sup>aC</sup>
	3	<2.00	<2.00	2.11 ± 0.12 <sup>bC</sup>
	6	2.11 ± 0.11 <sup>cA</sup>	2.18 ± 0.14 <sup>cB</sup>	2.41 ± 0.11 <sup>cC</sup>
	9	<2.00	<2.00	<2.00
STA (log CFU/g)	0	<2.00	<2.00	<2.00
	3	<2.00	<2.00	<2.00
	6	<2.00	<2.00	<2.00
	9	<2.00	<2.00	<2.00
LM (log CFU/g)	0	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd
	6	nd	nd	nd
	9	nd	nd	nd
SAL (log CFU/g)	0	nd	nd	nd
	3	nd	nd	nd
	6	nd	nd	nd
	9	nd	nd	nd

Explanatory notes: TVC—total viable count; LAB—lactic acid bacteria; ENT—bacteria Enterobacteriaceae family; EC—*Escherichia coli*; STA—coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species); LM—*Listeria monocytogenes*; SAL—*Salmonella* spp.; nd—not detected; CFU—colony-forming unit. The values are expressed as median ± Q. <sup>a,b,c,d</sup>—the median marked with lowercase letters differ significantly between times ( $p < 0.05$ ); <sup>A,B,C</sup>—the median marked with uppercase letters differ significantly between treatments ( $p < 0.05$ ).

Although LAB are commonly present in meat and can contribute to spoilage under extended refrigeration [9], their growth was more gradual in treated samples. These results suggest that the supernatants not only suppressed spoilage organisms but also modulated the growth of LAB, potentially delaying quality loss [8]. Although Enterobacteriaceae are typically present in low numbers on fresh, intact meat, their spoilage potential is substantial due to their ability to produce discoloration and undesirable sulfurous or putrid odors [50]. These findings are in line with previous studies, such as Xu et al. (2023) [50], who reported significant reductions in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. in vacuum-packed ground beef treated with mixed protective cultures containing *Lactilactobacillus sakei* and *Staphylococcus carnosus*. Similarly, Trabelsi et al. (2019) [3] observed a decrease in Enterobacteriaceae in probiotic-treated vacuum-packed beef, further supporting the antimicrobial potential of protective cultures against spoilage-associated Gram-negative microorganisms. In addition to *Listeria monocytogenes* and members of the Enterobacteriaceae family, other microorganisms, such as *Brochothrix thermosphacta* and *Clostridium* spp., also

represent significant concerns regarding the microbiological quality of meat. Although these species were not included in the present analysis due to the defined scope of the study, their relevance to meat spoilage and public health is well recognized and will be addressed in future, more comprehensive investigations.

The antimicrobial efficacy of the LAB and AAB supernatants used in pairs in this study is likely attributed to their production of organic acids (e.g., lactic, gluconic, and acetic acids), hydrogen peroxide, and bacteriocin-like compounds. These metabolites acidify the environment and disrupt microbial cell membrane integrity, which does not necessarily have to result in a statistically significant change in the pH value of the entire meat matrix. This phenomenon could reduce the viability of spoilage and pathogenic microorganisms over the storage period. Organic acids create an unfavorable environment by lowering the intracellular pH and interfering with nutrient transport across bacterial membranes [51,52]. Moreover, hydrogen peroxide exhibits oxidative activity against microbial membranes, enhancing the antimicrobial spectrum. The combined effects of LAB and AAB supernatants observed in this study may thus provide a synergistic barrier against spoilage bacteria, as supported by previous research evaluating fermented antimicrobial metabolites in meat systems [17,19,53].

In summary, the antibacterial mixtures demonstrated strong bioprotective potential by effectively inhibiting the growth of spoilage microorganisms throughout refrigerated storage. Their application could represent a promising strategy with which to enhance microbiological safety and extend the shelf life of fresh minced meat products.

#### 3.4. TBARS and Lipid Oxidation Measurements

The TBARS assay was also employed to evaluate lipid peroxidation levels in minced meat samples over a 9-day refrigerated storage period (Table 4). Lipid oxidation is a critical factor affecting meat quality, leading to rancidity and off-flavors, thereby diminishing consumer acceptability [43]. By day 3, a significant increase ( $p < 0.05$ ) in TBARS values was observed across all samples, signifying the initiation of lipid oxidation processes. This trend aligns with findings by Kaczmarek et al. (2021), who reported a similar early rise in TBARS values in ground pork during chilled storage [43]. This increase can be attributed to the susceptibility of unsaturated fatty acids to oxidative reactions upon exposure to oxygen and pro-oxidant factors inherent in meat matrices [43]. Between days 3 and 6, TBARS values continued to rise, albeit at a reduced rate, suggesting a progression in lipid oxidation. This phase may involve accumulating secondary oxidation products, such as aldehydes and ketones, contributing to off-flavors and odors in meat products [54]. Interestingly, by day 9, a decline in TBARS values was noted in all samples. This reduction could be due to the decomposition of malondialdehyde (MDA) or its interaction with other meat components, leading to less detectable free MDA. Such interactions may involve MDA binding to proteins or participation in further chemical reactions, resulting in less measurable MDA [55]. Samples treated with antibacterial supernatants (T1 and T2) consistently exhibited lower TBARS values than the control throughout the storage period. This observation suggests that compounds in the supernatants may exert antioxidative effects, possibly by scavenging free radicals or chelating metal ions that catalyze lipid oxidation [44]. These findings are consistent with Stadnik et al. (2022) [44], who demonstrated that lactic acid bacteria fermentation can enhance oxidative stability in dry-cured meats.

Table 4 also shows lipid stability in raw pork meat on days 0 and 9. All treatments significantly reduced cholesterol content after 9 days of storage ( $p < 0.05$ ). The control sample demonstrated the smallest decrease in cholesterol levels ( $43.50 \pm 1.11$  mg/100 g), compared to the fall of  $41.80 \pm 0.400$  mg/100 g in T1 and  $40.22 \pm 0.04$  mg/100 g in T2. This suggests a potential antioxidative role of the antibacterial mixtures, contributing to

reduced cholesterol oxidation. Cholesterol degradation is known to be influenced by both oxidative stress and microbial enzymatic activity, particularly under prolonged storage, and reductions in its content may reflect lipid peroxidation processes [56].

**Table 4.** TBARS and lipid stability parameters in ready-to-cook minced pork samples during storage.

Parameter	Time	Treatment		
		T1	T2	C
TBARS (mg MDA/kg of product)	0	0.52 ± 0.13 <sup>aA</sup>	0.46 ± 0.13 <sup>aA</sup>	0.49 ± 0.09 <sup>aA</sup>
	3	0.69 ± 0.17 <sup>bA</sup>	0.69 ± 0.19 <sup>bA</sup>	0.70 ± 0.21 <sup>bA</sup>
	6	0.40 ± 0.14 <sup>cA</sup>	0.45 ± 0.10 <sup>cA</sup>	0.40 ± 0.09 <sup>cA</sup>
	9	0.34 ± 0.05 <sup>dA</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>cA</sup>	0.43 ± 0.09 <sup>dA</sup>
Cholesterol (mg/100 g)	0.	53.22 ± 1.03 <sup>aA</sup>	53.95 ± 1.45 <sup>aA</sup>	53.42 ± 0.35 <sup>aA</sup>
	9	41.80 ± 0.40 <sup>bA</sup>	40.22 ± 0.04 <sup>bB</sup>	43.50 ± 1.11 <sup>bC</sup>
Peroxide value (mg/100 g)	0	0.55 ± 0.10 <sup>aA</sup>	0.62 ± 0.09 <sup>aA</sup>	0.94 ± 0.18 <sup>aA</sup>
	9	5.10 ± 0.41 <sup>bA</sup>	2.35 ± 0.32 <sup>bAB</sup>	1.29 ± 0.24 <sup>aB</sup>
Acid value (mg/100 g)	0	0.91 ± 0.06 <sup>aA</sup>	1.35 ± 0.15 <sup>aA</sup>	0.70 ± 0.04 <sup>aA</sup>
	9	1.20 ± 0.05 <sup>bA</sup>	1.11 ± 0.09 <sup>aA</sup>	1.01 ± 0.07 <sup>bA</sup>

TBARS—thiobarbituric acid reactive substance; MDA—malondialdehyde. The values are expressed as median ± Q. <sup>a,b,c,d</sup>—the median values, marked with lowercase letters, differ significantly between times ( $p < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup>—the median marked with uppercase letters differ significantly between treatments ( $p < 0.05$ ).

Peroxide values (PVs), indicators of primary lipid oxidation, increased significantly in all samples over time ( $p < 0.05$ ). On day 9, sample T1 showed the highest PV ( $5.10 \pm 0.41$  mg/100 g), followed by T2 ( $2.35 \pm 0.32$  mg/100 g), while the control (C) had the lowest ( $1.29 \pm 0.24$  mg/100 g). Although T1 and T2 showed higher PVs than the control, this may be due to the early-stage accumulation of oxidation products or initial interactions between reactive components in the treatments and lipid substrates. This apparent rise in PV does not necessarily negate antioxidant potential, as further degradation or stabilization might occur at later stages. Additional studies are required to better understand the long-term oxidative behavior of these treatments.

Acid values (ACs), markers of hydrolytic rancidity, increased slightly in all samples without significant differences at day 9 ( $p > 0.05$ ). The similar ACs in T1, T2, and the control suggest that the antibacterial mixtures did not accelerate lipid hydrolysis, aligning with Arrijoja et al. (2020), who reported similar protective effects in beef [53]. While acid values increased in both the control (C) and T1 samples by day 9, a decrease was observed in the T2 sample, indicating that the specific antibacterial mixture used in T2 may have been more effective in limiting hydrolytic rancidity than T1. To better understand the underlying mechanisms, it is essential to consider that lipid degradation in meat during storage involves both oxidative and hydrolytic processes, which may be inversely modulated depending on treatment [57]. PV reflects early lipid oxidation, while AV indicates the hydrolysis of triglyceride into free fatty acids [57].

The parallel suppression of microbial growth and lipid oxidation observed in this study supports the multifunctional role of LAB and AAB-derived supernatants as biopreservative agents. Similar dual effects were reported by Papadochristopoulos et al. (2021) [58], who found that natural antimicrobials not only reduced microbial load in raw meat but also limited lipid peroxidation, leading to improved shelf life. Yu et al. (2021) [59] also demonstrated that bioactive compounds from microbial fermentation, such as organic acids and bacteriocins, exerted both bacteriostatic and antioxidative properties in pork sausages. Likewise, Domínguez et al. (2019) [56] and Wu et al. (2022) [60] observed a correlation between lower microbial counts and reduced TBARS values in meat systems treated with natural

preservatives, suggesting the existence of a mechanistic link where microbial inhibition reduces the enzymatic and oxidative degradation of lipids. This relationship is particularly relevant given that some spoilage microorganisms (e.g., Enterobacteriaceae) produce pro-oxidative metabolites and enzymes that can accelerate lipid degradation. Therefore, the combined reduction in both microbial load and lipid oxidation in treated samples may indicate a synergistic preservation effect, where the inhibition of microbial metabolism also indirectly enhances oxidative stability. These findings reinforce the value of multi-target preservation strategies in extending the quality and safety of chilled meat products.

### 3.5. Fatty Acid Profile

The fatty acid composition of minced meat samples treated with antimicrobial mixtures (T1 and T2) and a control (C) was analyzed at two time points—on day 0 and day 9—of refrigerated storage at  $4 \pm 1$  °C (Table 5). The main fatty acid classes analyzed included saturated (SFAs), monounsaturated (MUFAs), and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). Saturated fatty acids were the most abundant, particularly palmitic (C16:0) and stearic acid (C18:0). Their levels remained relatively stable across all treatments, with minor increases observed on day 9. These trends are consistent with findings by Coombs et al. (2018) [61], suggesting that storage-related lipid oxidation had a minimal impact on SFA stability in lamb meat. In the MUFA category, oleic acid (C18:1cis9) was dominant, starting at 39% and remaining stable or decreasing slightly in treated samples (T1 and T2). At the same time, a marginal increase was noted in the control. This stability aligns with the results that Horbańczuk et al. (2019) [62] reported, indicating that vacuum packaging may help to preserve MUFA levels during short-term chilled storage. PUFAs, particularly linoleic (C18:2) and  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3n3), showed slight decreases over time, which were more pronounced in the control. After 9 days, C18:2 dropped by 0.5% across all treatments. Still, the most minor reduction was observed in samples T1 and T2, suggesting that the antimicrobial mixtures may offer mild protective effects against oxidative degradation [56]. Similarly,  $\alpha$ -linolenic acid remained relatively stable in the treated groups, whereas a slight decrease was recorded in the control. This preservation is consistent with the previous work by Okoń et al. (2025) [15], who reported that natural antimicrobial treatments could delay PUFA oxidation in meat products. Adding antimicrobial mixtures T1 and T2 did not adversely affect the fatty acid composition and may have contributed to the better preservation of PUFAs. These findings suggest the potential of such treatments to maintain lipid quality in vacuum-packed minced meat during chilled storage.

**Table 5.** Individual fatty acid content [g/100 g total fatty acid] in ready-to-cook minced pork samples during storage.

Category	Fatty Acids	Time [Days]	Treatment			
			T1	T2	C	
SFA	Capric acid	10:0	0	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
SFA	Lauric acid	12:0	0	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
SFA	Myristic acid	14:0	0	1.25 ± 0.01 <sup>aA</sup>	1.27 ± 0.02 <sup>aAB</sup>	1.32 ± 0.01 <sup>aC</sup>
			9	1.28 ± 0.01 <sup>bA</sup>	1.27 ± 0.02 <sup>aA</sup>	1.28 ± 0.01 <sup>bA</sup>
SFA	Pentadecanoic acid	15:0	0	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
SFA	Palmitic acid	16:0	0	23.42 ± 0.11 <sup>aA</sup>	23.35 ± 0.14 <sup>aA</sup>	23.55 ± 0.11 <sup>aA</sup>
			9	23.58 ± 0.10 <sup>bA</sup>	23.53 ± 0.14 <sup>aA</sup>	23.58 ± 0.11 <sup>bA</sup>
MUFA	Palmitoleic acid	16:1	0	2.70 ± 0.01 <sup>aA</sup>	2.62 ± 0.04 <sup>aA</sup>	2.65 ± 0.03 <sup>aA</sup>
			9	2.68 ± 0.01 <sup>bA</sup>	2.65 ± 0.03 <sup>bA</sup>	2.73 ± 0.03 <sup>bA</sup>

Table 5. Cont.

Category	Fatty Acids	Time [Days]	Treatment			
			T1	T2	C	
SFA	Heptadecanoic acid	17:0	0	0.35 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.33 ± 0.02 <sup>aA</sup>
			9	0.35 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>bA</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>bA</sup>
MUFA	Heptadecenoic acid	17:1	0	0.30 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.30 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.30 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.30 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.30 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.30 ± 0.00 <sup>aA</sup>
SFA	Stearic acid	18:0	0	12.52 ± 0.03 <sup>aA</sup>	12.52 ± 0.10 <sup>aA</sup>	12.65 ± 0.03 <sup>aA</sup>
			9	12.83 ± 0.14 <sup>aA</sup>	12.78 ± 0.11 <sup>bA</sup>	12.67 ± 0.06 <sup>bA</sup>
MUFA	Elaidic acid (trans isomer of oleic)	18:1trans	0	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>
MUFA	Oleic acid	18:1cis9	0	39.03 ± 0.18 <sup>aA</sup>	39.34 ± 0.10 <sup>aAB</sup>	38.70 ± 0.03 <sup>aAC</sup>
			9	38.83 ± 0.11 <sup>aA</sup>	39.07 ± 0.04 <sup>bA</sup>	39.22 ± 0.02 <sup>bA</sup>
MUFA	Vaccenic acid	18:1cis11	0	2.97 ± 0.02 <sup>aA</sup>	2.93 ± 0.02 <sup>aA</sup>	2.90 ± 0.01 <sup>aA</sup>
			9	2.95 ± 0.01 <sup>aA</sup>	2.85 ± 0.03 <sup>aA</sup>	3.00 ± 0.01 <sup>aA</sup>
MUFA	Other positional isomers of oleic acid	18:1 c other	0	0.23 ± 0.02 <sup>aA</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>aA</sup>
			9	0.22 ± 0.01 <sup>bA</sup>	0.22 ± 0.09 <sup>aA</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>aA</sup>
PUFA	Linoleic acid (n-6)	18:2	0	13.05 ± 0.03 <sup>aA</sup>	13.41 ± 0.16 <sup>aA</sup>	13.17 ± 0.11 <sup>aA</sup>
			9	12.83 ± 0.12 <sup>aA</sup>	12.87 ± 0.21 <sup>bA</sup>	12.58 ± 0.16 <sup>aA</sup>
PUFA	Alpha-linolenic acid (ALA, n-3)	18:3 n3	0	0.92 ± 0.03 <sup>aA</sup>	0.95 ± 0.03 <sup>aA</sup>	0.95 ± 0.03 <sup>aA</sup>
			9	0.93 ± 0.05 <sup>aA</sup>	0.95 ± 0.06 <sup>aA</sup>	0.90 ± 0.05 <sup>bA</sup>
PUFA	Conjugated linoleic acid (CLA, PUFA variant)	18:2c9t11	0	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
SFA	Arachidic acid	20:0	0	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>aA</sup>
MUFA	Gadoleic acid	20:1	0	0.90 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.90 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.90 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.90 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.90 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.90 ± 0.00 <sup>aA</sup>
PUFA	Eicosadienoic acid	20:2	0	0.62 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.633 ± 0.017 <sup>aBA</sup>	0.58 ± 0.01 <sup>aC</sup>
			9	0.58 ± 0.01 <sup>bA</sup>	0.567 ± 0.017 <sup>bA</sup>	0.57 ± 0.02 <sup>bA</sup>
PUFA	Dihomo-γ-linolenic acid (DGLA, n-6)	20:3n6	0	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
PUFA	Arachidonic acid (AA, n-6)	20:4n6	0	0.43 ± 0.03 <sup>aA</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>aA</sup>	0.42 ± 0.06 <sup>aA</sup>
			9	0.38 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.40 ± 0.00 <sup>bB</sup>	0.40 ± 0.00 <sup>aBC</sup>
PUFA	Adrenic acid (n-6)	22:4n6	0	0.12 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>aA</sup>
			9	0.12 ± 0.01 <sup>bA</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>aA</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>bA</sup>
PUFA	Docosapentaenoic acid (DPA, n-3)	22:5n3	0	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>
			9	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>aA</sup>

SFA—saturated fatty acids; MUFA—monounsaturated fatty acids; PUFA—polyunsaturated fatty acids. The values are expressed as median ± Q. <sup>a,b</sup>—the median marked with lowercase letters differ significantly between times ( $p < 0.05$ ). <sup>A,B,C</sup>—the median marked with uppercase letters differ significantly between treatments ( $p < 0.05$ ).

### 3.6. Exploratory Factor Analysis (EFA)

Exploratory factor analysis (EFA) was conducted to identify latent structures that explain the variability among meat quality parameters in samples treated with a mixture of antimicrobial agents.

On day 0 (Tables 6 and 7, Figure S3, Table S1), three factors were extracted, explaining a cumulative variance of 75.38%. The first factor, “Microbiology” (32.88%), included ENT, TVC, LAB, EC,  $b^*$ , and STA, reflecting microbial activity and associated changes in yellow color. The second factor, “Oxidation–Color” (27.58%), comprised ORP, TBARS,  $a^*$ ,  $L^*$ ,  $b^*$ , and pH, indicating oxidative processes and color parameters. The third factor, “Lipids” (14.92%), included cholesterol, acid value, and peroxide value, representing lipid degradation. A weak negative correlation was observed between microbiological counts and the “Oxidation–Color” factor ( $r = -0.025$ ), while lipid degradation showed positive correlations with both microbiological counts ( $r = 0.147$ ) and “Oxidation–Color” ( $r = 0.167$ ).

**Table 6.** Factor loadings for day 0 of storage.

Components [Day 0]	Factors			Specificity Factor
	1	2	3	
ENT	1.005			−0.014
TVC	0.974			0.041
LAB	0.900			0.180
EC	0.779			0.384
<i>b</i> *	−0.778	0.537		0.086
STA	−0.579			0.657
ORP		0.919		0.172
TBARS		0.902		0.187
<i>a</i> *		0.826		0.202
<i>L</i> *		0.787		0.266
pH		0.747		0.385
cholesterol			0.885	0.235
peroxide value			0.783	0.297
acid value			−0.717	0.368

ENT—Enterobacteriaceae; TVC—total viable count; STA—Staphylococcus aureus; LAB—lactic acid bacteria count; EC—Escherichia coli count; ORP—oxidative reduction potential; TBARS—thiobarbituric acid reactive substances; *L*\**a*\**b*\*—color parameters.

**Table 7.** Level of variance explanation for day 0 of storage.

Factors	Total	% of Variance	Cumulative %
1	4.603	32.877	32.877
2	3.861	27.576	60.453
3	2.089	14.922	75.375

A comparable factor structure was observed on day 9 (Tables 8 and 9, Figure S4, Table S2), explaining 80.17% of the total variance. The “Microbiology” factor (39.79%) consisted of TVC, LAB, ENT, EC, and STA. The “Color–Oxidation” factor (28.62%) comprised pH, TBARS, ORP, *L*\*, *a*\*, and *b*\*. The “Lipids” factor (11.77%) included cholesterol, acid value, and peroxide value. On day 9, microbial load positively correlated with the “Color–Oxidation” factor ( $r = 0.139$ ), whereas lipid degradation was weakly and negatively correlated with both microbial load ( $r = -0.039$ ) and “Color–Oxidation” ( $r = -0.128$ ). The factor structures obtained reflect the multifaceted nature of meat quality deterioration during storage.

**Table 8.** Factor loadings for day 9 of storage.

Components [Day 9]	Factors			Specificity Factor
	1	2	3	
ENT		−0.689		0.531
TVC		0.924		0.105
LAB		0.804		0.217
EC		0.922		0.040
<i>b</i> *		0.753		0.445
STA		0.758		0.250
ORP	0.997			−0.004
TBARS	0.978			0.027
<i>a</i> *	0.992			0.007
<i>L</i> *	0.988			0.016
pH	0.931			0.112
cholesterol			0.664	0.362
peroxide value			0.727	0.235
acid value			0.682	0.434

ENT—Enterobacteriaceae; TVC—total viable count; STA—Staphylococcus aureus; LAB—lactic acid bacteria count; EC—Escherichia coli count; ORP—oxidative-reduction potential; TBARS—thiobarbituric acid reactive substances; *L*\**a*\**b*\*—color parameters.

**Table 9.** Level of variance explanation for day 9 of storage.

Factors	Total	% of Variance	Cumulative %
1	5.570	39.787	39.787
2	4.006	28.615	68.402
3	1.648	11.768	80.170

The dominance of the “Microbiology” factor at both time points aligns with previous research, emphasizing microbial growth as a primary determinant of spoilage in stored meat [63]. The increasing influence of this factor over time suggests that microbial proliferation becomes more critical in shaping overall quality as storage progresses. The “Oxidation–Color” factor captures the interplay between oxidative degradation and visual quality, which are closely linked to consumer perception. The association between microbial activity and increased oxidation, especially on day 9, supports findings that microbial metabolism may accelerate lipid oxidation and pigment degradation [64]. Interestingly, the “Lipids” factor showed only modest contributions to the overall variance but revealed meaningful interactions with the other two factors. The weak negative correlation between lipid degradation and microbial or oxidative parameters could suggest that antimicrobial treatments provide some protection against lipid oxidation, consistent with prior studies highlighting the synergistic effects of antimicrobial and antioxidant agents in meat preservation [65,66]. These findings emphasize the interdependent roles of microbial activity, oxidative stability, and lipid degradation in determining meat quality. Antimicrobial agents appear to modulate these interactions, potentially delaying spoilage and preserving sensory attributes during storage [67,68].

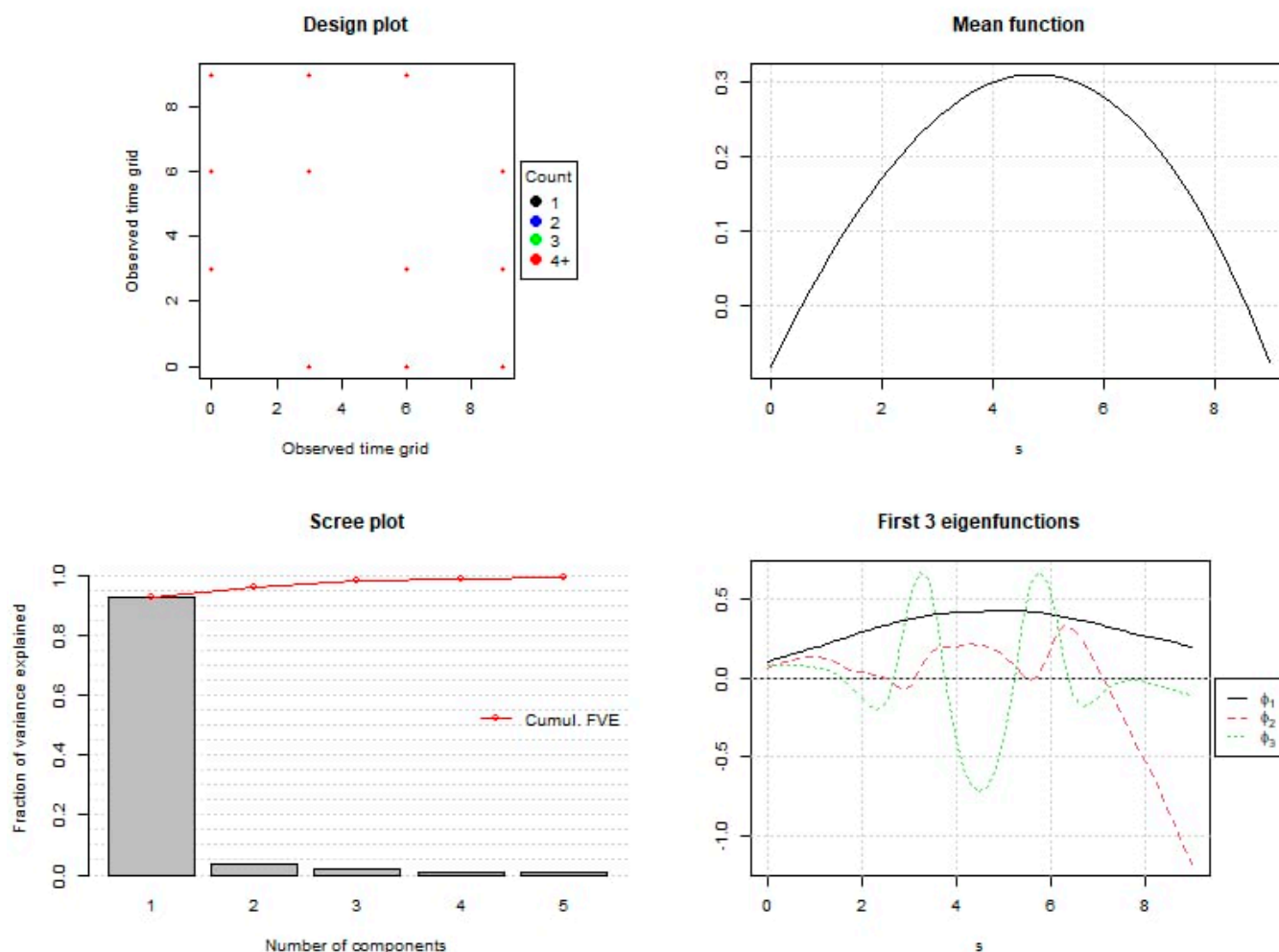
### 3.7. Functional Principal Component Analysis (FPCA)

In this study, ready-to-cook minced meat samples were subjected to functional principal component analysis (FPCA) to investigate the effect of storage time on various parameters, including pH, ORP, color, and microbiological quality. For this purpose, measurements were collected at 0, 3, 6, and 9 days of refrigerated storage. To the best of our knowledge, the use of FPCA for the dynamic evaluation of meat quality during storage has been limited, underscoring the innovative nature of the present study.

The scree plot analysis (Figure 2) indicated that two functional principal components were sufficient to capture approximately 95.90% of the total variance observed in the dataset. The first component (PC1) explained 92.44% of the total variance, while the second component (PC2) accounted for an additional 3.46%.

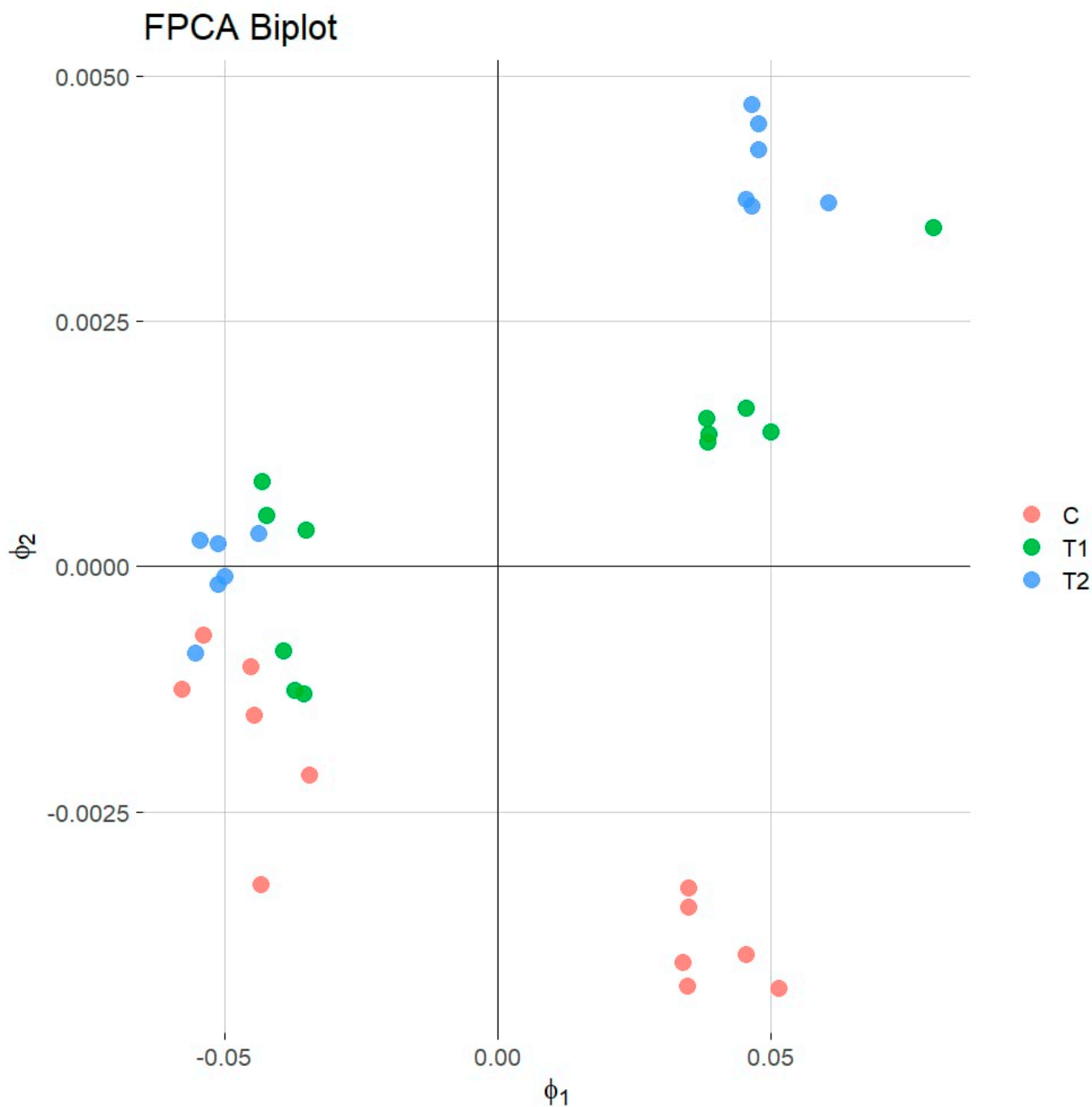
PC1 mainly reflected the overall mean levels of the studied parameters across the storage period. The FPCA shows that higher PC1 values indicated above-average quality characteristics and were observed between the 4th and 6th day of storage. The analysis of PC1 values demonstrated that samples associated with the T2 treatment and samples related to the T1 treatment located in the upper right corner had the highest scores, suggesting the superior maintenance of quality attributes. Conversely, the control group samples displayed lower PC1 values, indicating faster deterioration in quality. Although PC2 accounted for a small proportion of the total variance (3.46%), it appeared to reflect differences in the timing of quality parameter changes. Positive PC2 values suggested that the samples were approaching or had passed their maximum quality peak, typically observed between days 4th and 6th, while negative values indicated that the samples were at their peak quality state.

The biplot of PC1 and PC2 further confirmed that the samples treated with T2 and T1 generally maintained better quality characteristics for a longer duration than the control group (Figure 3).



**Figure 2.** Summary of functional principal component analysis. Different colors represent different numbers of observations, but in this case, only red points are shown because all observations are concentrated on dates with sample size  $\geq 4$ . No points are shown for dates with no observations.

Among the tested variants, the T2 treatment was the most effective in preserving meat quality over the storage period, followed by T1, while the untreated control samples exhibited the most rapid decline in quality parameters. These findings align with previous studies employing principal component analysis (PCA) to assess meat quality. For instance, Cañeque et al. (2004) utilized PCA to evaluate carcass and meat quality in light lambs, identifying key variables such as pH, color, and water-holding capacity as significant contributors to meat quality differentiation [69]. Similarly, Hu et al. (2007) applied PCA to pork quality assessment, highlighting the importance of pH, color, moisture, and intramuscular fat in distinguishing quality traits [70]. While these studies focused on static measurements, the current research extends the application by incorporating the temporal aspect through FPCA, offering a more dynamic understanding of quality changes during storage. The superior performance of the T2 treatment in preserving meat quality over time suggests its potential efficacy as a preservative agent. The ability of FPCA to effectively capture and differentiate the temporal quality trajectories among treatments underscores its utility in meat science research. The insights gained through FPCA could aid in developing improved preservation strategies and quality monitoring systems for the meat industry, ultimately extending shelf life and reducing food waste. Future studies could further explore the application of FPCA in conjunction with other analytical techniques to enhance the monitoring and prediction of meat quality changes during storage [71].



**Figure 3.** Biplot functional principal component analysis.

#### 4. Conclusions

This study confirmed that cell-free supernatants derived from *Lacticaseibacillus paracasei* B1, *Lactiplantibacillus plantarum* O24, *Gluconobacter oxydans* KNS32, and *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1 can serve as effective biopreservative agents for ready-to-cook minced pork. Their application enhances the following:

- (1) Microbiological safety by inhibiting spoilage-related microbial growth;
- (2) Oxidative stability, through a reduction in lipid oxidation;
- (3) Technological quality, by maintaining parameters such as pH and color during refrigerated storage.

The synergistic use of lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB) preparations presents a novel, natural alternative to synthetic preservatives, aligning with current consumer demand for clean-label food products.

Among the tested formulations, the mixture containing *Lactiplantibacillus plantarum* O24 and *Gluconobacter oxydans* KNS32 proved particularly effective in slowing down spoilage processes. Multivariate analyses, including exploratory factor analysis (EFA) and functional principal component analysis (FPCA), indicated that microbial growth control was the key to overall quality preservation. At the same time, oxidative and color parameters acted as secondary quality indicators. The findings emphasize the importance of microbiological stability in extending shelf life, particularly in minimally processed meat products vulnerable to rapid spoilage.

While promising, the study was conducted under controlled laboratory conditions and did not simulate real-world factors such as temperature variation or transport. We believe that the research should be continued to expand the range of possible solutions and conditions, and include more food samples.

Future research should address the following factors:

- (1) Sensory evaluation (flavor, aroma, texture) and consumer acceptance;
- (2) Validation under industrial conditions, including logistical stressors;
- (3) Broader formulation testing to confirm scalability and robustness.

Given their demonstrated antimicrobial activity, ease of preparation, and cell-free nature, these supernatants offer a feasible and scalable approach for commercial application in meat processing environments. In conclusion, this study highlights the synergistic potential of LAB and AAB preparations as innovative natural preservatives for minimally processed meat products, providing a strong basis for further development toward industrial application.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods14111934/s1>. Figure S1. Growth of tested microorganisms in ready-to-cook minced meat samples during storage; A—TVC, total viable count; B—LAB, lactic acid bacteria; C—ENT, bacteria Enterobacteriaceae family; D—EC, *Escherichia coli*. Figure S2. The photos of TVC agar plates after incubation at a given temperature and time for the three tested samples from one of the storage periods; C—control sample; T1—sample with the addition hxCFS of *Lactocaseibacillus paracasei* B1 and CFS of *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1; T2—sample with the addition hxCFS of *Lactiplantibacillus plantarum* O24 and CFS of *Gluconobacter oxydans* KNS32. Table S1. Correlations between factors for day 0 of storage. Figure S3. Scree plot for the components on day 0 of storage. Table S2. Correlations between factors on day 9 of storage. Figure S4. Scree plot for the components on day 9 of storage.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.K., P.S. and D.Z.; data curation, M.K.; formal analysis, M.K., A.O. and B.Ł.; funding acquisition, P.S. and D.Z.; investigation, M.K.; methodology, M.K., A.O. and B.Ł.; resources, P.S. and D.Z.; software, M.K.; supervision, P.S. and D.Z.; validation, M.K., A.O. and B.Ł.; visualization, M.K.; writing—original draft, M.K.; writing—review and editing, M.K., B.Ł., P.S. and D.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Materials, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

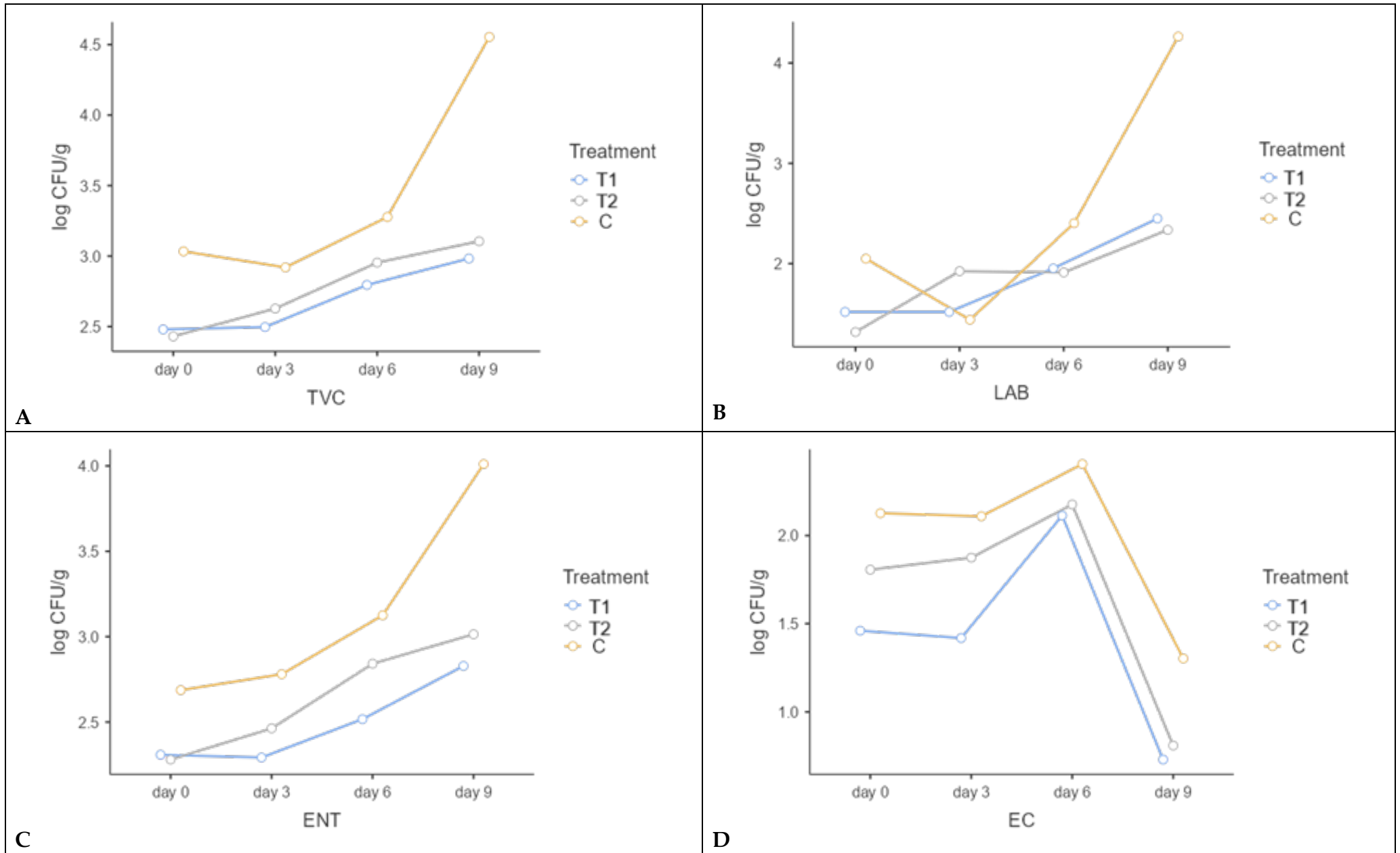
## References

1. Arokiyaraj, S.; Dinakarkumar, Y.; Shin, H. A comprehensive overview on the preservation techniques and packaging of processed meat products: Emphasis on natural derivatives. *J. King Saud Univ.-Sci.* **2024**, *36*, 103032. [[CrossRef](#)]
2. Xu, M.M.; Kaur, M.; Pillidge, C.J.; Torley, P.J. Evaluation of the potential of protective cultures to extend the microbial shelf-life of chilled lamb meat. *Meat Sci.* **2021**, *181*, 108613. [[CrossRef](#)]
3. Trabelsi, I.; Ben Slima, S.; Ktari, N.; Triki, M.; Abdehedi, R.; Abaza, W.; Moussa, H.; Abdeslam, A.; Ben Salah, R. Incorporation of probiotic strain in raw minced beef meat: Study of textural modification, lipid and protein oxidation and color parameters during refrigerated storage. *Meat Sci.* **2019**, *154*, 29–36. [[CrossRef](#)]
4. Śmiecińska, K.; Daszkiewicz, T.; Krajewska, A.; Kubiak, D. Effect of the addition of different forms of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on the quality of vacuum-packed minced pork. *J. Vet. Res.* **2024**, *68*, 419–426. [[CrossRef](#)]
5. Sharafi, H.; Divsalar, E.; Rezaei, Z.; Liu, S.Q.; Moradi, M. The potential of postbiotics as a novel approach in food packaging and biopreservation: A systematic review of the latest developments. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *64*, 12524–12554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Smaoui, S.; Echegaray, N.; Kumar, M.; Chaari, M.; D'Amore, T.; Shariati, M.A.; Rebezov, M.; Lorenzo, J.M. Beyond conventional meat preservation: Saddling the control of bacteriocin and lactic acid bacteria for clean label and functional meat products. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2024**, *196*, 3604–3635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sionek, B.; Szydłowska, A.; Kołożyn-Krajewska, D. The Role of Microorganisms and Their Antibacterial Compounds in Food Biopreservation. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 5557. [[CrossRef](#)]
8. Marcelli, V.; Osimani, A.; Aquilanti, L. Research progress in the use of lactic acid bacteria as natural biopreservatives against *Pseudomonas* spp. in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* **2024**, *196*, 115129. [[CrossRef](#)]
9. Barcenilla, C.; Ducic, M.; López, M.; Prieto, M.; Álvarez-Ordóñez, A. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Sci.* **2022**, *183*, 108661. [[CrossRef](#)]
10. Abedin, M.; Chourasia, R.; Phukon, L.C.; Sarkar, P.; Ray, R.C.; Singh, S.P.; Rai, A.K. Lactic acid bacteria in the functional food industry: Biotechnological properties and potential applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2024**, *64*, 10730–10748. [[CrossRef](#)]
11. Moradi, M.; Kousheh, S.A.; Almasi, H.; Alizadeh, A.; Guimarães, J.T.; Yilmaz, N.; Lotfi, A. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 3390–3415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Padureanu, C.; Maier, A.; Padureanu, V.; Nedelcu, A.; Lupu, M.; Badarau, C. The total content of polyphenols and the antioxidant properties of several berry vinegars. *Bull. Transilv. Univ. Bras. Ser. II For. Wood Ind. Agric. Food Eng.* **2022**, *15*, 145–156. [[CrossRef](#)]
13. Gramza-Michałowska, A.; Kulczyński, B.; Xindi, Y.; Gumienna, M. Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage? s antiradical capacity and sensory value. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2016**, *15*, 447–457. [[CrossRef](#)]
14. Neffe-Skocinska, K.; Karbowiak, M.; Kolozyn-Krajewska, D.; Zielinska, D. Polyphenol and antioxidant properties of food obtained by the activity of acetic acid bacteria (AAB)—A systematic review. *J. Funct. Foods* **2023**, *107*, 105691. [[CrossRef](#)]
15. Okoń, A.; Łepecka, A.; Szymański, P.; Neffe-Skocińska, K. The Effect of the Use of the Beneficial Acetic Acid Bacteria Starter Cultures on the Microbiological and Physicochemical Quality of Raw Ripening Sausages. *Appl. Sci.* **2024**, *15*, 263. [[CrossRef](#)]
16. Abouloifa, H.; Hasnaoui, I.; Ben Slima, S.; Rokni, Y.; Gaamouche, S.; Trabelsi, I.; Bellaouchi, R.; Ghabbour, N.; Ben Salah, R.; Jaouadi, B.; et al. Bio-preservation Effect of Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* S61 Against *Rhodotorula glutinis* and *Listeria monocytogenes* in Poultry Meat. *Curr. Microbiol.* **2022**, *79*, 232. [[CrossRef](#)]
17. Moradi, M.; Tajik, H.; Mardani, K.; Ezati, P. Efficacy of lyophilized cell-free supernatant of *Lactobacillus salivarius* (Ls-BU2) on *Escherichia coli* and shelf life of ground beef. *Vet. Res. Forum* **2019**, *10*, 193–198. [[PubMed](#)]
18. Liang, M.; Wang, H.; Zhou, Z.; Huang, Y.; Suo, H. Antibacterial mechanism of *Lactiplantibacillus plantarum* SHY96 cell-free supernatant against *Listeria monocytogenes* revealed by metabolomics and potential application on chicken breast meat preservation. *Food Chem. X* **2025**, *25*, 102078. [[CrossRef](#)]
19. Wang, J.; Xu, L.; Gu, L.; Lv, Y.; Li, J.; Yang, Y.; Meng, X. Cell-Free Supernatant of *Lactiplantibacillus plantarum* 90: A Clean Label Strategy to Improve the Shelf Life of Ground Beef Gel and Its Bacteriostatic Mechanism. *Foods* **2023**, *12*, 4053. [[CrossRef](#)]
20. de Miranda, J.F.; Ruiz, L.F.; Silva, C.B.; Uekane, T.M.; Silva, K.A.; Gonzalez, A.G.M.; Fernandes, F.F.; Lima, A.R. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *J. Food Sci.* **2022**, *87*, 503–527. [[CrossRef](#)]
21. Neffe-Skocińska, K.; Długosz, E.; Szulc-Dąbrowska, L.; Zielińska, D. Novel *Gluconobacter oxydans* strains selected from Kombucha with potential postbiotic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2024**, *108*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zielińska, D.; Rzepkowska, A.; Radawska, A.; Zieliński, K. In Vitro screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. *Curr. Microbiol.* **2015**, *70*, 183–194. [[CrossRef](#)]
23. Zielińska, D.; Długosz, E.; Zawistowska-Deniziak, A. Functional Properties of Food Origin *Lactobacillus* in the Gastrointestinal Ecosystem—In Vitro Study. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2019**, *11*, 820–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zielińska, D.; Łepecka, A.; Ołdak, A.; Długosz, E.; Kołożyn-Krajewska, D. Growth and adhesion inhibition of pathogenic bacteria by live and heat-killed food-origin *Lactobacillus* strains or their supernatants. *FEMS Microbiol. Lett.* **2021**, *368*, fnab024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

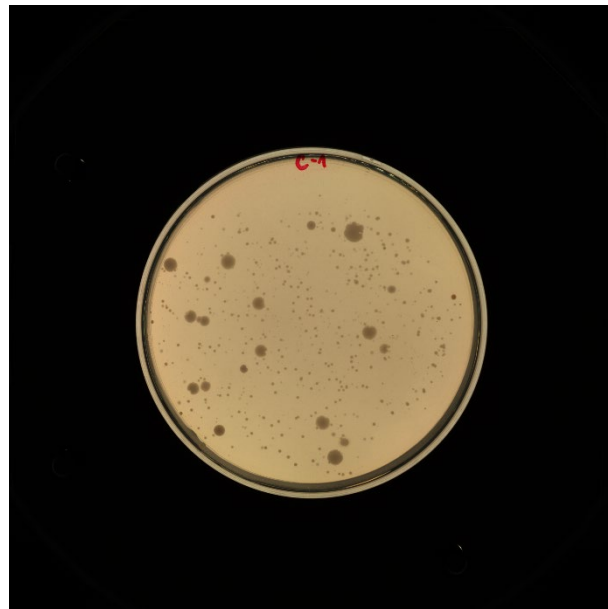
25. Toldrá, F.; Reig, M. Innovations for healthier processed meats. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, 517–522. [[CrossRef](#)]
26. Łaszkiewicz, B.; Szymański, P.; Zielińska, D.; Kołożyn-Krajewska, D. Application of Lactiplantibacillus plantarum SCH1 for the bioconservation of cooked sausage made from mechanically separated poultry meat. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1576. [[CrossRef](#)]
27. Pikul, J.; Leszczynski, D.E.; Kummerow, F.A. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1309–1313. [[CrossRef](#)]
28. Szymański, P.; Okoń, A.; Zielińska, D.; Łaszkiewicz, B.; Kołożyn-Krajewska, D.; Dolatowski, Z.J. Use of Selected Environmental Lactic Acid Bacteria During Industrial Production of Heat-Treated Nitrite-Free Organic Sausage. *Foods* **2025**, *14*, 1028. [[CrossRef](#)]
29. Tomasevic, I.; Djekic, I.; Font-I-Furnols, M.; Terjung, N.; Lorenzo, J.M. Recent advances in meat color research. *Curr. Opin. Food Sci.* **2021**, *41*, 81–87. [[CrossRef](#)]
30. *ISOP 12966-1: 2014; Animal and Vegetable Fats and Oils. Gas Chromatography of Fatty Acid Methyl Esters—Part 1: Guidelines on Modern Gas Chromatography of Fatty Acid Methyl Esters.* International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2014.
31. Wojnar, J.; Zieliński, W. Analiza wskaźnika zatrudnienia w krajach nowej UE z wykorzystaniem FPCA. *Metod. Ilościowe W Badaniach Ekon.* **2018**, *19*, 183–191. [[CrossRef](#)]
32. Okoye, C.O.; Gao, L.; Wu, Y.; Li, X.; Wang, Y.; Jiang, J. Identification, characterization and optimization of culture medium conditions for organic acid-producing lactic acid bacteria strains from Chinese fermented vegetables. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2024**, *54*, 49–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kumar, D.; Tanwar, V.K. Effects of incorporation of ground mustard on quality attributes of chicken nuggets. *J. Food Sci. Technol.* **2011**, *48*, 759–762. [[CrossRef](#)]
34. Barbut, S. Measuring water holding capacity in poultry meat. *Poult. Sci.* **2024**, *103*, 103577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Warner, R.D. The eating quality of meat: IV—Water holding capacity and juiciness. In *Lawrie's Meat Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2023; pp. 457–508.
36. Zduńczyk, W.; Modzelewska-Kapituła, M.; Tkacz, K. Influence of Oxygen and Carbon Dioxide Content in Modified Atmosphere Packaging on the Colour and Water-Holding Capacity of Pork Loin. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 3420. [[CrossRef](#)]
37. Łepecka, A.; Szymański, P.; Okoń, A.; Zielińska, D. Antioxidant activity of environmental lactic acid bacteria strains isolated from organic raw fermented meat products. *LWT* **2023**, *174*, 114440. [[CrossRef](#)]
38. Domínguez, R.; Pateiro, M.; Munekata, P.E.S.; Zhang, W.; Garcia-Oliveira, P.; Carpena, M.; Prieto, M.A.; Bohrer, B.; Lorenzo, J.M. Protein oxidation in muscle foods: A comprehensive review. *Antioxidants* **2021**, *11*, 60. [[CrossRef](#)]
39. Estévez, M. Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Sci.* **2011**, *89*, 259–279. [[CrossRef](#)]
40. Falowo, A.B.; Fayemi, P.O.; Muchenje, V. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 171–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Muzolf-Panek, M.; Kaczmarek, A.; Tomaszewska-Gras, J.; Cegielska-Radziejewska, R.; Majcher, M. Oxidative and microbiological stability of raw ground pork during chilled storage as affected by Plant extracts. *Int. J. Food Prop.* **2019**, *22*, 111–129. [[CrossRef](#)]
42. Mitacek, R.; Ramanathan, R.; VanOverbeke, D.; Mafi, G.; Brennecke, K.; Poulson, J. Effects of Packaging, Antioxidants, and Nadh on Ground Beef Color and Oxidation Reduction Potential. *Meat Muscle Biol.* **2018**, *1*, 163. [[CrossRef](#)]
43. Kaczmarek, A.M.; Muzolf-Panek, M. Predictive modelling of TBARS changes in the intramuscular lipid fraction of raw ground pork enriched with plant extracts. *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 1756–1768. [[CrossRef](#)]
44. Stadnik, J.; Keška, P.; Gazda, P.; Siłka, Ł.; Kołożyn-Krajewska, D. Influence of LAB fermentation on the color stability and oxidative changes in dry-cured meat. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 11736. [[CrossRef](#)]
45. Yang, H.; Luo, X.; Zhu, L.; Liang, R.; Mao, Y.; Yang, X.; Niu, L.; Zhang, Y.; Dong, P. The biological effect of a beef-derived *Lactobacillus sakei* on beef steaks during chilled storage. *Food Sci. Nutr.* **2023**, *11*, 1059–1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. İncili, G.K.; Karatepe, P.; Akgöl, M.; Güngören, A.; Koluman, A.; İlhak, O.I.; Kanmaz, H.; Kaya, B.; Hayaloğlu, A.A. Characterization of lactic acid bacteria postbiotics, evaluation in-vitro antibacterial effect, microbial and chemical quality on chicken drumsticks. *Food Microbiol.* **2022**, *104*, 104001. [[CrossRef](#)]
47. Cardona, M.; Izquierdo, D.; Barat, J.M.; Fernández-Segovia, I. Intrinsic and extrinsic attributes that influence choice of meat and meat products: Techniques used in their identification. *Eur. Food Res. Technol.* **2023**, *249*, 2485–2514. [[CrossRef](#)]
48. Feuz, R.; Norwood, F.B.; Ramanathan, R. Do consumers have an appetite for discolored beef? *Agribusiness* **2020**, *36*, 631–652. [[CrossRef](#)]
49. Hultman, J.; Johansson, P.; Björkroth, J. Longitudinal metatranscriptomic analysis of a meat spoilage microbiome detects abundant continued fermentation and environmental stress responses during shelf life and beyond. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e01575-20. [[CrossRef](#)]
50. Xu, M.M.; Kaur, M.; Pillidge, C.J.; Torley, P.J. Culture-dependent and culture-independent evaluation of the effect of protective cultures on spoilage-related bacteria in vacuum-packaged beef mince. *Food Bioprocess Technol.* **2023**, *16*, 382–394. [[CrossRef](#)]
51. Ibrahim, S.A.; Ayivi, R.D.; Zimmerman, T.; Siddiqui, S.A.; Altemimi, A.B.; Fidan, H.; Esatbeyoglu, T.; Bakhshayesh, R.V. Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods* **2021**, *10*, 3131. [[CrossRef](#)]

52. Tong, Y.; Abbas, Z.; Zhang, J.; Wang, J.; Zhou, Y.; Si, D.; Wei, X.; Zhang, R. Antimicrobial activity and mechanism of novel postbiotics against foodborne pathogens. *LWT* **2025**, *217*, 117464. [[CrossRef](#)]
53. Arrijoja-Bretón, D.; Mani-López, E.; Palou, E.; López-Malo, A. Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control* **2020**, *115*, 107286. [[CrossRef](#)]
54. Al-Dalali, S.; Li, C.; Xu, B. Effect of frozen storage on the lipid oxidation, protein oxidation, and flavor profile of marinated raw beef meat. *Food Chem.* **2022**, *376*, 131881. [[CrossRef](#)]
55. Wazir, H.; Chay, S.Y.; Ibadullah, W.Z.W.; Zarei, M.; Mustapha, N.A.; Saari, N. Lipid oxidation and protein co-oxidation in ready-to-eat meat products as affected by temperature, antioxidant, and packaging material during 6 months of storage. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 38565–38577. [[CrossRef](#)]
56. Domínguez, R.; Pateiro, M.; Gagaoua, M.; Barba, F.J.; Zhang, W.; Lorenzo, J.M. A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products. *Antioxidants* **2019**, *8*, 429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tatiyaborworntham, N.; Oz, F.; Richards, M.P.; Wu, H. Paradoxical effects of lipolysis on the lipid oxidation in meat and meat products. *Food Chem. X* **2022**, *14*, 100317. [[CrossRef](#)]
58. Papadochristopoulos, A.; Kerry, J.P.; Fegan, N.; Burgess, C.M.; Duffy, G. Natural Anti-Microbials for Enhanced Microbial Safety and Shelf-Life of Processed Packaged Meat. *Foods* **2021**, *10*, 1598. [[CrossRef](#)]
59. Yu, H.H.; Chin, Y.W.; Paik, H.D. Application of Natural Preservatives for Meat and Meat Products against Food-Borne Pathogens and Spoilage Bacteria: A Review. *Foods* **2021**, *10*, 2418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Wu, H.; Richards, M.P.; Undeland, I. Lipid oxidation and antioxidant delivery systems in muscle food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2022**, *21*, 1275–1299. [[CrossRef](#)]
61. Coombs, C.E.O.; Holman, B.W.B.; Ponnampalam, E.N.; Morris, S.; Friend, M.A.; Hopkins, D.L. Effects of chilled and frozen storage conditions on the lamb *M. longissimus lumborum* fatty acid and lipid oxidation parameters. *Meat Sci.* **2018**, *136*, 116–122. [[CrossRef](#)]
62. Horbańczuk, O.K.; Moczowska, M.; Marchewka, J.; Atanasov, A.G.; Kurek, M.A. The Composition of Fatty Acids in Ostrich Meat Influenced by the Type of Packaging and Refrigerated Storage. *Molecules* **2019**, *24*, 4128. [[CrossRef](#)]
63. Ercolini, D.; Russo, F.; Torrieri, E.; Masi, P.; Villani, F. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4663–4671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Papuc, C.; Goran, G.V.; Predescu, C.N.; Nicorescu, V. Mechanisms of oxidative processes in meat and toxicity induced by postprandial degradation products: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 96–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Akhter, R.; Masoodi, F.; Wani, T.A.; Rather, S.A.; Hussain, P.R. Synergistic effect of low dose  $\gamma$ -irradiation, natural antimicrobial and antioxidant agents on quality of meat emulsions. *Radiat. Phys. Chem.* **2021**, *189*, 109724. [[CrossRef](#)]
66. Ricardo-Rodrigues, S.; Rouxinol, M.I.; Aguilheiro-Santos, A.C.; Potes, M.E.; Laranjo, M.; Elias, M. The antioxidant and antibacterial potential of thyme and clove essential oils for meat preservation—An overview. *Appl. Biosci.* **2024**, *3*, 87–101. [[CrossRef](#)]
67. Rood, L. Shelf-Life Extension, Spoilage Community, High Spoilage Potential, Meat pH. Ph.D. Thesis, University of Tasmania, Hobart, Australia, 2022.
68. Zhu, Y.; Wang, W.; Li, M.; Zhang, J.; Ji, L.; Zhao, Z.; Zhang, R.; Cai, D.; Chen, L. Microbial diversity of meat products under spoilage and its controlling approaches. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 1078201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Cañeque, V.; Pérez, C.; Velasco, S.; Díaz, M.T.; Lauzurica, S.; Álvarez, I.; De Huidobro, F.R.; Onega, E.; De la Fuente, J. Carcass and meat quality of light lambs using principal component analysis. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 595–605. [[CrossRef](#)]
70. Hu, Y.; Suzuki, T.; Noguchi, G.; Li, Y.; Kitamura, Y.; Satake, T. Study on evaluation of carcass traits and pork quality using principal component analysis. *J. Soc. Agric. Struct. Japan* **2007**, *37*, 173–182.
71. Kopuzlu, S.; Onenc, A.; Bilgin, O.; Esenbuga, N. Determination of meat quality through principal components analysis. *J. Anim. Plant Sci.* **2011**, *21*, 151–156.

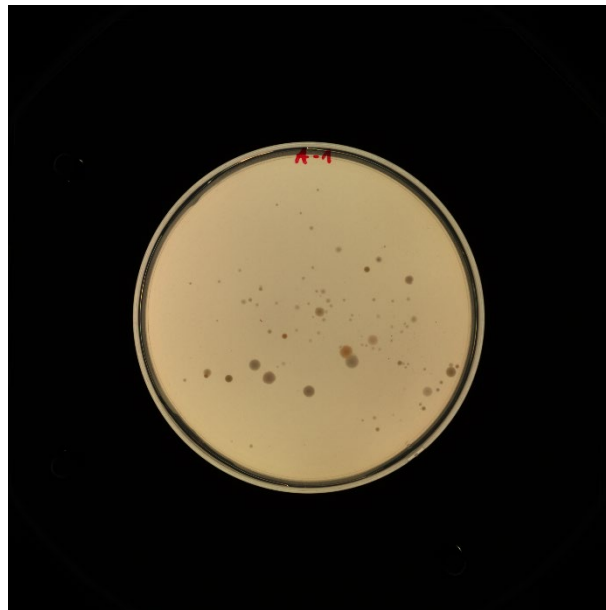
**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



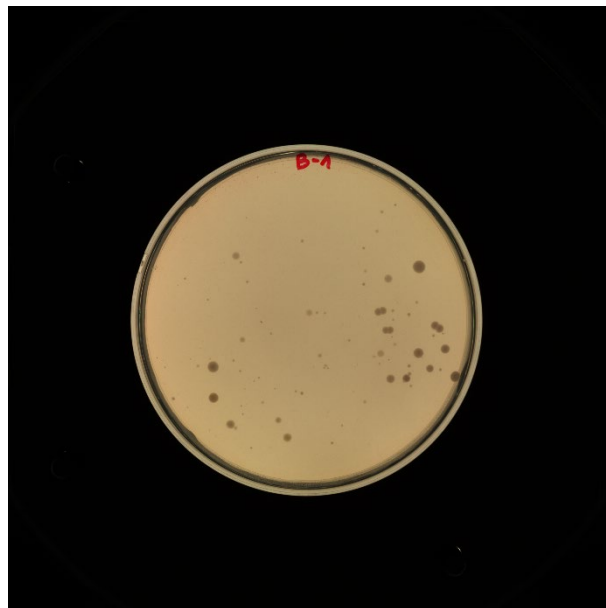
**Figure S1.** Growth of tested microorganisms in ready-to-cook minced meat samples during storage; A—TVC, total viable count; B—LAB, lactic acid bacteria; C—ENT, bacteria Enterobacteriaceae family; D—EC, *Escherichia coli*;



C



T1

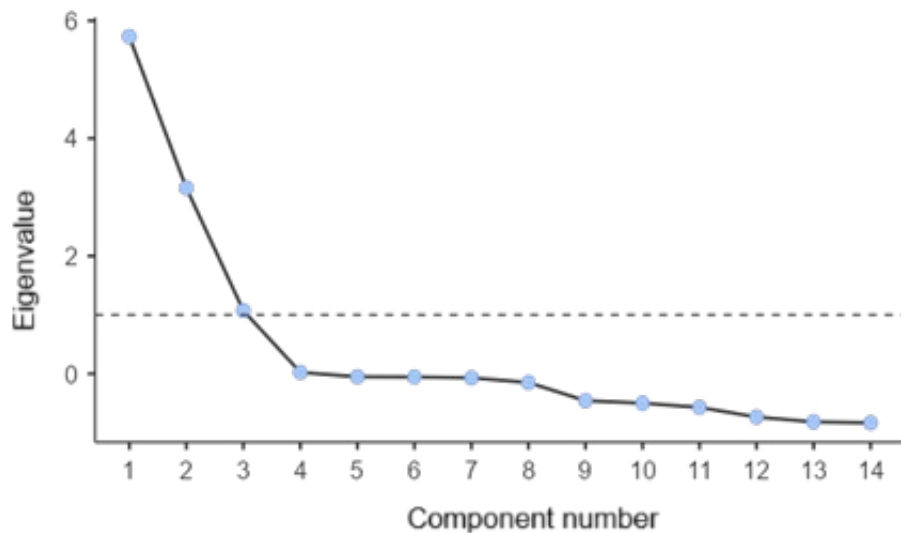


T2

**Figure S2.** The photos of TVC agar plates after incubation at a given temperature and time for the three tested samples from one of the storage periods; C—control sample; T1—sample with the addition hkCFS of *Lacticaseibacillus paracasei* B1 and CFS of *Komagataeibacter saccharivorans* KOM1; T2—sample with the addition hkCFS of *Lactiplantibacillus plantarum* O24 and CFS of *Gluconobacter oxydans* KNS32

**Table S1.** Correlations between factors for day 0 of storage

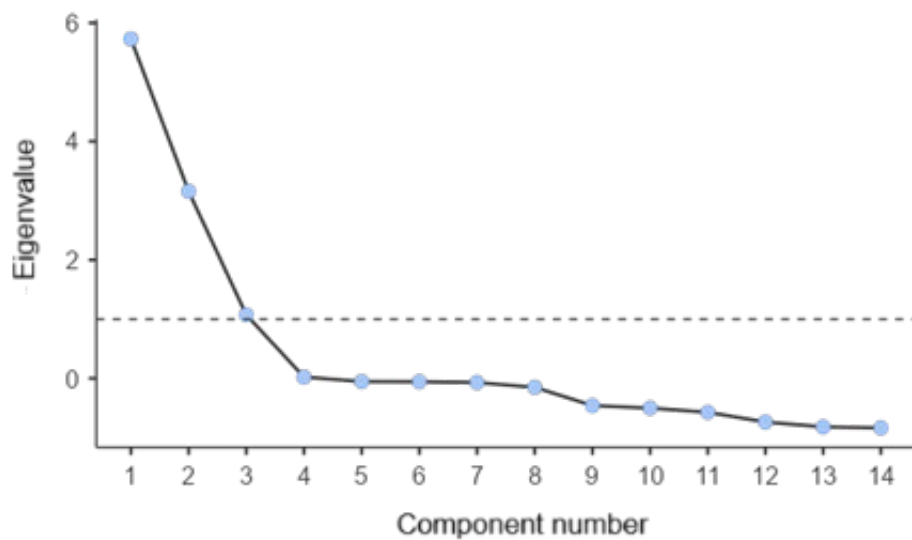
	1	2	3
1	—	-0.025	0.147
2		—	0.167
3			—



**Figure S3.** Scree plot for the components on day 0 of storage

**Table S2.** Correlations between factors on day 9 of storage

	1	2	3
1	—	0.139	-0.039
2		—	-0.128
3			—



**Figure S4.** Scree plot for the components on day 9 of storage

Warszawa, 21 sierpnia 2025 r.

mgr Marcelina Karbowskiak  
[marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl](mailto:marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowskiak, M., Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2023). Synergistic effect of combination of various microbial hurdles in the biopreservation of meat and meat products – systematic review. *Foods*, 12(7), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji publikacji, dokonaniu przeglądu dostępnej literatury, przygotowaniu i analizie danych, wizualizacji danych, napisaniu publikacji, edycji publikacji oraz pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

*Marcelina Karbowskiak*

Warszawa, 21 sierpnia 2025 r.

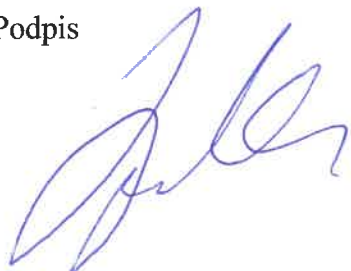
dr inż. Piotr Szymański  
[piotr.szymanski@ibprs.pl](mailto:piotr.szymanski@ibprs.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M., Szymański, P., & Zielińska, D. (2023). Synergistic effect of combination of various microbial hurdles in the biopreservation of meat and meat products – systematic review. *Foods*, 12(7), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji, recenzji maszynopisu artykułu oraz pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis



Piotr Szymański

Warszawa, 21 sierpnia 2025 r.

dr hab. inż. Dorota Zielińska, prof. SGGW  
[dorota\\_zielińska@sggw.edu.pl](mailto:dorota_zielińska@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M., Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2023). Synergistic effect of combination of various microbial hurdles in the biopreservation of meat and meat products – systematic review. *Foods*, 12(7), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji, recenzji maszynopisu artykułu, zapewnieniu zasobów do realizacji prac, nadzorze nad realizacją postawionych założeń oraz pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

  
Podpis

Warszawa, 10 grudnia 2025 r.

mgr Marcelina Karbowskiak  
[marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl](mailto:marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowskiak, M.\*, Kruk, M., Szymański, P. & Zielińska, D\*. (2025). Novel synergistic combination of lactic acid and acetic acid bacteria cell-free extracts for enhanced food biopreservation. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, mój indywidualny udział w powstaniu publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań i metodyki, przeprowadzeniu części doświadczalnej, opracowaniu oraz weryfikacji uzyskanych danych, analizie formalnej i opracowaniu statystycznym, przygotowaniu wizualizacji danych, zarządzaniu danymi badawczymi, zapewnieniu niezbędnych zasobów do realizacji badań, napisaniu manuskryptu oraz udziale w jego redakcji i w pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

*Marcelina Karbowskiak*

Warszawa, 10 grudnia 2025 r.

dr inż. Marcin Kruk  
[marcin\\_kruk@sggw.edu.pl](mailto:marcin_kruk@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\*, Kruk, M., Szymański, P. & Zielińska, D\*. (2025). Novel synergistic combination of lactic acid and acetic acid bacteria cell-free extracts for enhanced food biopreservation. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu części analiz, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu wizualizacji danych oraz współudziale w opracowaniu manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 10 grudnia 2025 r.

dr inż. Piotr Szymański  
[piotr.szymanski@ibprs.pl](mailto:piotr.szymanski@ibprs.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\*, Kruk, M., Szymański, P. & Zielińska, D\* (2025). Novel synergistic combination of lactic acid and acetic acid bacteria cell-free extracts for enhanced food biopreservation. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, mój indywidualny udział w powstaniu publikacji polegał na nadzorze merytorycznym i redakcji manuskryptu.

Podpis



Warszawa, 10 grudnia 2025 r.

dr hab. inż. Dorota Zielińska, prof. SGGW  
[dorota\\_zielinska@sggw.edu.pl](mailto:dorota_zielinska@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywnienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\*, Kruk, M., Szymański, P. & Zielińska, D\*. (2025). Novel synergistic combination of lactic acid and acetic acid bacteria cell-free extracts for enhanced food biopreservation. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zapewnieniu zasobów do realizacji prac, nadzorze nad realizacją eksperymentów, recenzji maszynopisu artykułu oraz pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis



Warszawa, 20 listopada 2025 r.

mgr Marcelina Karbowskiak  
[marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl](mailto:marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowskiak, M.\*, Wójcicki, M., Hyun, J. E., Szymański, P., Niu, Y. D.\*, & Zielińska, D. (2025). Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived *Lactiseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. *LWT*, 118597, mój indywidualny udział w powstaniu publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań i metodyki, przeprowadzeniu części doświadczalnej, opracowaniu oraz weryfikacji uzyskanych danych, analizie formalnej i opracowaniu statystycznym, przygotowaniu wizualizacji danych, zarządzaniu danymi badawczymi, zapewnieniu niezbędnych zasobów do realizacji badań, napisaniu manuskryptu oraz udziale w jego redakcji i w pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

*Marcelina Karbowskiak*

Wrocław, 16 października 2025 r.

dr inż. Michał Wójcicki  
[michal.wojcicki@hirszfeld.pl](mailto:michal.wojcicki@hirszfeld.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\*, Wójcicki, M., Hyun, J. E., Szymański, P., Niu, Y. D.\*, & Zielińska, D. (2025). Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived *Lacticaseibacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. *LWT*, 118597, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodyki badań, przeprowadzeniu części analiz, opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników, przygotowaniu wizualizacji danych, współudziale w opracowaniu manuskryptu oraz w pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis



Calgary, AB, Canada October 17<sup>th</sup> 2025  
*place, date*

Jae-Eun Hyun, MSc  
[jaceun.hyun@alumni.ucalgary.ca](mailto:jaceun.hyun@alumni.ucalgary.ca)  
[jaceun.hyun@ucalgary.ca](mailto:jaceun.hyun@ucalgary.ca)

**Food and Nutrition Technology Discipline Council  
of the Warsaw University of Life Sciences**

### **Co-authorship Statement**

I hereby represent that in the paper: Karbowiak, M.\*, Wójcicki, M., Hyun, J. E., Szymański, P., Niu, Y. D.\*, & Zielińska, D. (2025). Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived Lacticaseibacillus paracasei B1 and Lactiplantibacillus plantarum O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. LWT, 118597, my individual contribution to the preparation of the publication involved developing and refining the research methodology as well as providing the necessary materials, equipment, and technical resources required for the completion of the study.



Warszawa, 20 listopada 2025 r.

dr inż. Piotr Szymański  
[piotr.szymanski@ibprs.pl](mailto:piotr.szymanski@ibprs.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\*, Wójcicki, M., Hyun, J. E., Szymański, P., Niu, Y. D.\*, & Zielińska, D. (2025). Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived Lacticaseibacillus paracasei B1 and Lactiplantibacillus plantarum O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. *LWT*, 118597, mój indywidualny udział w powstaniu publikacji polegał na nadzorze merytorycznym i redakcji manuskryptu.

Podpis



\_\_\_ Calgary, Canad \_\_\_, \_\_\_ October-17-2025 \_\_\_  
*place, date*

Dongyan Xu Niu, PhD MSc  
[dongyan.niu@ucalgary.ca](mailto:dongyan.niu@ucalgary.ca)

**Food and Nutrition Technology Discipline Council  
of the Warsaw University of Life Sciences**

### **Co-authorship Statement**

I hereby represent that in the paper: Karbowiak, M.\*, Wójcicki, M., Hyun, J. E., Szymański, P., Niu, Y. D.\*, & Zielińska, D. (2025). Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived Lacticaseibacillus paracasei B1 and Lactiplantibacillus plantarum O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. LWT, 118597, my individual contribution to the preparation of the publication involved supervising the research process, providing essential resources necessary for conducting the study, securing funding for the project, and participating in the critical review and editing of the manuscript.



Signature

Warszawa, 20 listopada 2025 r.

dr hab. inż. Dorota Zielińska, prof. SGGW  
[dorota\\_zielinska@sggw.edu.pl](mailto:dorota_zielinska@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywnienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\*, Wójcicki, M., Hyun, J. E., Szymański, P., Niu, Y. D.\*, & Zielińska, D. (2025). Novel Antimicrobial Compounds from Fermented Food-Derived *Lactobacillus paracasei* B1 and *Lactiplantibacillus plantarum* O24 Strains: Genomic and Proteomic Analysis. *LWT*, 118597, mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przeprowadzeniu części analiz, zapewnieniu zasobów do realizacji prac, nadzorze nad realizacją eksperymentów, recenzji maszynopisu artykułu oraz pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis



Warszawa, 21 sierpnia 2025 r.

mgr Marcelina Karbowskiak  
[marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl](mailto:marcelina.karbowskiak@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowskiak, M.\*, Okoń, A., Łaszkiewicz, B., Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2025). Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork. *Foods*, 14(11), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu części doświadczalnej, przygotowaniu danych do dalszych analiz, analizie danych, wizualizacji danych, analizie formalnej, opracowaniu statystycznym, napisaniu publikacji oraz pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

*Marcelina Karbowskiak*

Warszawa, 21 sierpnia 2025 r.

dr inż. Anna Okoń  
[anna.okon@ibprs.pl](mailto:anna.okon@ibprs.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\* , Okoń, A., Łaskiewicz, B., Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2025). Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork. *Foods*, 14(11), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodyki oraz przeprowadzeniu części doświadczeń laboratoryjnych.

Podpis

Anna Okoń

Warszawa, 21 sierpnia 2025 r.

dr inż. Beata Łaszkiewicz  
[beata.laszkiewicz@ibprs.pl](mailto:beata.laszkiewicz@ibprs.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\* , Okoń, A., Łaszkiewicz, B., Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2025). Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork. *Foods*, 14(11), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu metodyki, przeprowadzeniu części analiz laboratoryjnych, recenzji maszynopisu artykułu oraz wizualizacji wybranych danych.

Podpis



Warszawa, 21 sierpnia 2025 r.

dr inż. Piotr Szymański  
[piotr.szymanski@ibprs.pl](mailto:piotr.szymanski@ibprs.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\*, Okoń, A., Łaskiewicz, B., Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2025). Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork. *Foods*, 14(11), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zapewnieniu zasobów do realizacji prac, nadzorze nad realizacją eksperymentów, recenzji maszynopisu artykułu oraz pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.

Podpis

Piotr Szymański

Warszawa, 21 sierpnia 2025 r.

dr hab. inż. Dorota Zielińska, prof. SGGW  
[dorota\\_zie\\_inska@sggw.edu.pl](mailto:dorota_zie_inska@sggw.edu.pl)

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności  
i Żywienia  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: Karbowiak, M.\*, Okoń, A., Łaszkiewicz, B., Szymański, P., & Zielińska, D\*. (2025). Novel Applications of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Preparations in Shaping the Technological and Microbiological Quality of Ready-to-Cook Minced Pork. *Foods*, 14(11), mój indywidualny udział w jej powstaniu polegał na opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zapewnieniu zasobów do realizacji prac, nadzorze nad realizacją eksperymentów, recenzji maszynopisu artykułu oraz pracy związanej z odpowiedziami w procesie recenzji.



Podpis