

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno – biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij biotehnologije**

**Mattea Živković**

7055/BT

**Određivanje optimalne temperature i pH vrijednosti bakterija mliječne kiseline  
izoliranih iz proizvoda akvakulture**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul : Mikrobiologija**

**Mentor : prof.dr.sc. Jadranka Frece**

**Zagreb, 2017.**

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij biotehnologije

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

### ODREĐIVANJE OPTIMALNE TEMPERATURE I PH VRIJEDNOSTI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ PROIZVODA AKVAKULTURE

Mattea Živković 0058206419

#### Sažetak

Bakterije mliječne kiseline se zbog svojih poželjnih karakteristika i sinteze korisnih metabolita, intenzivno koriste kao starter kulture u različitim proizvodnim procesima, a ponajprije u proizvodnji fermentirane hrane. Kako bi neki bakterijski soj postao starter kultura potrebno je provesti niz istraživanja i dokazati da je ta kultura sigurna za primjenu, tehnološki učinkovita, a njena primjena prihvatljiva s ekonomskog stajališta. Određivanje optimalnih parametara za uzgoj bakterijskih sojeva je od iznimne važnosti za njihovo buduće korištenje u proizvodnim procesima te je stoga cilj ovog rada bio odrediti optimalnu temperaturu i optimalnu pH vrijednost autohtone mikrobne populacije bakterija mliječne kiseline izoliranih iz riba i školjkaša Jadranskog mora. Utvrđeno je da je za rast sojeva *Lactobacillus plantarum* D1 i *Lactobacillus plantarum* K4 optimalna temperatura 28°C a za *Lactobacillus plantarum* O1, *Lactobacillus helveticus* O9 i *Leuconostoc mesenteroides* L4A 37°C. Optimalna pH vrijednost za *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9 i *L. mesenteroides* iznosi 6.0, dok *L. plantarum* O1 najbolje preživljava pri pH 4.0.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, parametri rasta, proizvodi akvakulture

**Rad sadrži:** 23 stranice, 5 slika, 4 tablice, 50 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof.dr.sc. Jadranka Frece

**Pomoć pri izradi :** Iva Čanak, mag. inž.

**Rad predan:** 7. Srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

### DETERMINATION OF OPTIMAL TEMPERATURE AND PH OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM AQUACULTURE PRODUCT

Mattea Živković 0058206419

#### Abstract

The lactic acid bacteria, due to their desirable characteristics and synthesis of useful metabolites, are intensely used as starter cultures in different production processes, and above all in fermented food production. In order for some bacterial strain to become a starter culture, it is necessary to conduct a series of researches and prove that this culture is safe for use, technologically efficient and its application is acceptable from an economic point of view. Determination of optimal parameters for cultivation of bacterial strains is very important for their future use in production processes and therefore the purpose of this paper was to determine the optimal temperature and optimum pH value of the autochthonous microbial population of lactic acid bacteria isolated from fish and shellfish. It was found that optimal temperature for growth of *Lactobacillus plantarum* D1 and *Lactobacillus plantarum* K4 is 28 °C and for *Lactobacillus plantarum* O1, *Lactobacillus helveticus* O9 and *Leuconostoc mesenteroides* L4A is 37 °C. The optimal pH value for *Lactobacillus plantarum* D1, *Lactobacillus plantarum* K4, *Lactobacillus helveticus* O9 and *Leuconostoc mesenteroides* is 6.0, while *L. plantarum* O1 survives at pH 4.0.

**Keywords:** aquaculture products, growth parameters, lactic acid bacteria,

**Thesis contains:** 23 pages, 5 figures, 4 tables, 50 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Prof. Jadranka Frece, PhD

**Technical support and assistance:** Iva Čanak, B.Sc

**Thesis delivered:** July 7<sup>th</sup> 2017

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Teorijski dio .....	2
2.1. Bakterije mliječne kiseline .....	2
2.1.1. Rod Lactobacillus .....	3
2.1.2. Rod Leuconostoc .....	5
2.2.1. Zahtjevi za izbor starter kultura .....	6
2.3. Funkcionalne starter kulture .....	8
3. Eksperimentalni dio .....	10
3.1. Materijali .....	10
3.1.1. Mikroorganizmi .....	10
3.1.2. Hranjive podloge .....	10
3.1.3. Pribor i oprema .....	10
3.2.1. Čuvanje mikroorganizama .....	11
3.2.2. Uzgoj mikroorganizama .....	11
3.2.3. Određivanje optimalne temperature za rast bakterija mliječne kiseline .....	11
3.2.4. Priprava bakterija mliječne kiseline za određivanje optimalne pH vrijednosti .....	11
3.2.5. Određivanje optimalne pH vrijednosti za rast bakterija mliječne kiseline .....	11
3.2.6. Određivanje broja kolonija indirektnom metodom .....	11
4. Rezultati i rasprava .....	12
5. Zaključci .....	18
6. Popis literature .....	19

## 1. Uvod

Sojevi bakterija mliječne kiseline danas se intenzivno koriste u industrijskim procesim za proizvodnju fermentirane hrane i pića jer doprinose poboljšanju arome i teksture proizvoda, sprječavaju kvarenje namirnica, inhibiraju patogene, produžuju vijek trajanja proizvoda, a njihovom konzumacijom pozitivno utječu na crijevnu mikrofloru i imunološki sustav. Neki od primjera su jogurtne starter kulture *Lactobacillus delbruecki* i *Streptococcus thermophilus*, AB (acidophilus bifido) starter kulture *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium longum* te starter kultura *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* koja se koristi u proizvodnji lantibiotika nisina, prirodnog biokonzervansa.

Osim navedenog bakterije mliječne kiseline nalaze primjenu u bikonzerviranju hrane, posebice one koje su izolirane iz morskih organizama, a nalaze se u njihovom gastrointestinalnom traktu kao prirodna mikroflora. Koriste se za očuvanje kvalitete i zdravstvene ispravnosti fermentirane hrane, morskih prehrambenih proizvoda koji su nutritivno bogati i za očuvanje hrane koja se jede bez termičke obrade. Razlog njihova korištenja je odmak od tradicionalnih načina zaštite hrane koji su se pokazali štetnima za organoleptička i nutritivna svojstva iste te potencijalno opasnima za zdravlje potrošača (Frece, 2014).

Da bismo mogli proizvesti starter kulturu nije dovoljno otkriti mikroorganizam pogodan za željeni bioproces već je potrebno putem istraživanja saznati optimalne parametre za njegov rast te produkciju primarnih i sekundarnih produkata kao konačnih proizvoda bioprocasa. U svrhu toga za mikroorganizam kao potencijalnu starter kulturu potrebno je poznavati taksonomiju, fiziološke i morfološke karakteristike, u detalje metabolizam pojedinog supstrata te mogućnost primjene metaboličkog i genetičkog inženjerstva kako bi se poboljšale njegove karakteristike (Šušković, 2008). Isto tako, da bi postao starter kulturom, mora zadovoljiti kriterij sigurnosti, tehnološke učinkovitosti i ekonomičnosti. U skladu s tim, cilj ovog rada bio je odrediti optimalnu pH i temperaturu odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz akvakulture i potencijalnih starter kultura.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su se na planeta Zemlji pojavile prije otprilike tri milijarde godina, u periodu prelaska ostalih anaerobnih organizama u aerobne organizme. Ove bakterije rastu u mikroaerofilnim ili isključivo anaerobnim uvjetima kao posljedica nemogućnosti sinteze hemoproteina. Naime, evolucijski one nikada nisu stekle sposobnost sinteze ove ključne komponente citokroma premda posjeduju sve potrebne gene za sintezu respiratornih proteina i enzima uljučenih u procese fermentacije. Stoga, zbog nemogućnosti sinteze hemoproteina, respiratorni metabolizam ovih bakterija iskazuje se jedino u prisutnosti egzogenog izvora te one ne mogu proizvoditi peroksidaze i katalaze koje bi ih učinile manje osjetljivijima na toksično djelovanje kisika. Mikroaerofilnima se definiraju zbog činjenice da mogu intracelularno akumulirati velike količine magnezija, selena i cinka koji mogu preuzeti ulogu spomenutih enzima i katabolizirati kisik radikale u stanici (Todar, 2012). S obzirom da točna definicija ovih bakterija ne postoji one se opisuju tako da im se navode značajne karakteristike. Bakterije mliječne kiseline (BMK) su gram-pozitivne, nesporgne, katalaza – negativne bakterije prirodno prisutne na supstratima poput mlijeka, mesa, razgradnih biljnih materijala kao izvora najbitnijih hranjivih sastojaka te ih se isto tako pronalazi i u humanom gastrointestinalnom traktu. Prema FDA američkoj upravi za hranu i lijekove imaju GRAS (Generally Regarded As Safe) status. To je iznimno bitno jer se onda mogu koristiti kao starter kulture u proizvodnji fermentirane hrane i pića. Takvi proizvodi mogu biti dobiveni samo pomoću bakterija mliječne kiseline, mliječno kiselom fermentacijom ili uz pomoć nekih drugih mikrobioloških sojeva (Šušković, 2005; Hammes, 1990). Nadalje, pri opisu se navodi i kako nemaju citokrome, anaerobne su i aerobno tolerantne, izbirljive prema medijima rasta, kiselo tolerantne te da stvaraju mliječnu kiselinu kao krajnji produkt fermentacije ugljikohidrata. Morfološki, BMK se pojavljuju u oblicima kao što su koki, kokobacili ili bacili. Najčešće se razmnožavaju binarnom diobom te u optimalnim uvjetima rastu i razmnožavaju se u kratkom generacijskom vremenu od 30 do 90 minuta. Metabolizam BMK s obzirom na krajnji produkt može biti homofermentativan ili heterofermentativan pri čemu osim mliječne kiseline proizvode i octenu kiselinu, CO<sub>2</sub> i etanol. Homofermentativna skupina iz laktoze stvara između 70% i 90% mliječne kiseline (Hammes i Vogel, 1995). S obzirom na optimalnu temperaturu rasta postoje mezofilni sojevi koji najbolje rastu na temperaturi između 25 i 30°C te termofilni sojevi s optimalnom temperaturom od 40 do 44°C.

Kako bi se provelo filogenetsko proučavanje svih vrsta bakterija provedena su istraživanja nad visoko konzerviranim molekulama čiji geni sadrže konzervirane i varijabilne regije koje su

prisutne u svim mikroorganizmima. Usporedbom sekvenci 16S rRNK molekule koja sadrži takve gene utvrđeno je da sve gram-pozitivne bakterije kojima pripadaju i BMK imaju jaku filogenetsku povezanost i pripadaju među jedanaest glavnih bakterijskih filogenetskih grana. Na temelju 16S i 23S rezultata sekvencioniranja utvrđeno je da gram-pozitivne bakterije tvore dvije linije potomstva. Jedna linija se sastoji od gram-pozitivnih bakterija s DNK koja posjeduje manje od 50% G + C (gvanin – citozin) parova, grana *Clostridium*, u koju su smještene BMK. Druga grana *Actinomyces* obuhvaća one sojeve čija DNK sadrži više od 50% G + C parova, kao primjerice bifidobakterije koje nalikuju bakterijama mliječne kiseline jer proizvode mliječnu i octenu kiselinu kao krajnje produkte fermentacije ugljikohidrata (Leboš Pavunc, 2012). Prema današnjim filogenetskim spoznajama i prema analizi temeljenoj na 232 gena iz 28 bakterijskih genoma pokazuje da BMK čine dvije velike skupine. Prva skupina uljučuje porodice *Enterococcaceae* i *Streptococcaceae*, a druga skupina porodice *Lactobacillaceae* i *Leuconostocaceae*. Između rodova koji čine taksonomsku skupinu BMK, glavnima se smatraju sljedeći : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*.

#### 2.1.1. Rod *Lactobacillus*

Taksonomski, rod *Lactobacillus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Lactobacillaceae*. Bakterije tog roda su gram-pozitivne, nespivotvorne i pojavljuju se u obliku bacila ili kokobacila. Katalaza su negativne, iako je kod nekih vrsta prisutna pseudokatalazna aktivnost. Široko su rasprostranjene te ih se može naći na hrani, u respiratornom i probavnom sustavu čovjeka i životinja, u silaži i drugom biljnom materijalu. Iznimno su kiselo tolerantni te sudjeluju u spontanim fermentacijama. Do sada je poznato i opisano 150 različitih vrsta. Kako bi se međusobno razlikovale vrste unutar roda *Lactobacillus* proučava se fermentacija ugljikohidrata, konfiguracija mliječne kiseline, uvjeti i temperatura rasta i razmnožavanja pojedinih vrsta, odnosno rade se molekularni testovi za potpuniju klasifikaciju. Prvu skupinu ovog roda čine obligatni homofermentativni laktobacili koji fermentiraju isključivo heksoze do mliječne kiseline Embden-Meyerhof-Parnasovim putem jer nemaju enzim fosfoketolazu koja bi im omogućila previranje pentoza ili glukonata (Kleerebezem i sur., 2003). Drugu skupinu čine fakultativno heterofermentativni laktobacili koji također prevode heksoze u mliječnu kiselinu na jednak način kao i prva skupina. Iznimka ove skupine je posjedovanje fosfoketolaze i aldolaze i mogućnost previranja pentoza i glukonaza. Trećoj skupini pripadaju obligatni heterofermentativni laktobacili koji fosfoketolaznim ili pentoza-fosfatnim putem razgrađuju heksoze do mliječne kiseline, etanola

ili octene kiseline i ugljikovog dioksida. U tablici 1 navedena je podjela bakterija roda *Lactobacillus* (Tannock, 1999b).

**Tablica 1.** Podjela bakterija roda *Lactobacillus* (Tannock, 1999b)

<b>Filogenetička skupina A</b>		
<b>Obligatno homofermentativne vrste</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>L. acidophilus</i></li> <li>• <i>L. amylophilus</i></li> <li>• <i>L. amylovorus</i></li> <li>• <i>L. crispatus</i></li> <li>• <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>*</li> <li>• <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i></li> <li>• <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i></li> <li>• <i>L. gallinarum</i>*</li> <li>• <i>L. gasseri</i>*</li> <li>• <i>L. helveticus</i></li> <li>• <i>L. johnsonii</i>*</li> <li>• <i>L. kefiranofaciens</i></li> <li>• <i>L. kefirgranum</i></li> </ul>	<b>Fakultativno heterofermentativne vrste</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>L. acetotolerans</i></li> <li>• <i>L. hamsteri</i>*</li> </ul>	
<b>Filogenetička skupina B</b>		
<b>Obligatno homofermentativne vrste</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>L. aviarius</i> subsp. <i>aviarius</i>*</li> <li>• <i>L. aviarius</i> subsp. <i>araffinosus</i></li> <li>• <i>L. farciminis</i></li> <li>• <i>L. ruminis</i>*</li> <li>• <i>L. mali</i></li> <li>• <i>L. salvarius</i> subsp. <i>salicinius</i>*</li> <li>• <i>L. salvarius</i> subsp. <i>salivarius</i>*</li> <li>• <i>L. sharpae</i></li> </ul>	<b>Fakultativno heterofermentativne vrste</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>L. agilis</i>*</li> <li>• <i>L. alimentarius</i></li> <li>• <i>L. casei</i>*</li> <li>• <i>L. bifementas</i></li> <li>• <i>L. cornyformis</i> subsp. <i>cornyformis</i></li> <li>• <i>L. cornyformis</i> subsp. <i>torquens</i></li> <li>• <i>L. curvatus</i></li> <li>• <i>L. gramins</i></li> <li>• <i>L. homohiochii</i></li> <li>• <i>L. intestinalis</i>*</li> <li>• <i>L. murinus</i>*</li> <li>• <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i></li> <li>• <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i></li> <li>• <i>L. pentosus</i></li> <li>• <i>L. plantarum</i>*</li> <li>• <i>L. rhamnosus</i></li> <li>• <i>L. sake</i></li> </ul>	<b>Obligatno heterofermentativne vrste</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>L. brevis</i>*</li> <li>• <i>L. buchneri</i></li> <li>• <i>L. collinoides</i></li> <li>• <i>L. fermentum</i></li> <li>• <i>L. fructivorans</i></li> <li>• <i>L. hilgardii</i></li> <li>• <i>L. kefir</i></li> <li>• <i>L. malefermentas</i></li> <li>• <i>L. oris</i></li> <li>• <i>L. panis</i></li> <li>• <i>L. parabuchneri</i></li> <li>• <i>L. parakefir</i></li> <li>• <i>L. pontis</i></li> <li>• <i>L. reuteri</i>*</li> <li>• <i>L. suebicus</i></li> <li>• <i>L. sanfrancisco</i></li> <li>• <i>L. vaccinostercus</i></li> <li>• <i>L. vaginalis</i></li> </ul>
<b>Filogenetička skupina C</b>		
		<b>Obvezno heterofermentativne vrste</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>L. fructosus</i></li> </ul>



### 2.1.2. Rod *Leuconostoc*

Taksonomski, rod *Leuconostoc* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Leuconostocaceae*. Na temelju morfoloških svojstava rod *Leuconostoc* je srodan sa streptokokima te zbog toga pripada skupini mezofilnih heterofermentativnih koka. Do sada je poznato i opisano petnaest vrsta. *Leuconostoc* spp. su mezofilne (25 °C), gram-pozitivne bakterije s manje od 55 mol % G + C parova u svojim DNK molekulama. One su nepokretne, fakultativno anaerobne, katalaza negativne i vankomicin rezistentne. Neki bakterijski sojevi tvore egzopolisaharide. Izgled i oblik leukonostoka ovisi o mediju na kojem rastu; dolaze u formi bacila ili tvore nakupine, odnosno u formi koka ili tvore kratke lance (Siezen i Vlieg, 2011). Za svoj rast zahtjevaju bogatu podlogu koja sadrži vitamine B kompleksa, minerale, osobito magnezij i mangan, te aminokiseline: aspartat, glutamat, valin, leucin, izoleucin, histidin, metionin, triptofan, arginin i cistein. Zbog nedostatka funkcionalnih citokroma i nekih enzima Krevsovog ciklusa, pripadnici ovog roda energiju dobivaju fermentacijom ugljikohidrata u mliječnu, octenu kiselinu, CO<sub>2</sub> i etanol.

## 2.2. Starter kulture

Spontana, prirodna fermentacija događa se djelovanjem mikroorganizama prirodno prisutnima na sirovinama. Nekada su se fermentacijski procesi koristili za očuvanje hrane od kvarenja. U doba Pasteura, u devetnaestom stoljeću, bilo je poznato da autohtona mikroflora prisutna na namirnici uzrokuje fermentaciju te namirnice. Christian Hansen je 1890. godine prvi izolirao poseban kvasac koji je koristio u pivarskoj industriji, prvu starter kulturu (Šušković, 2005). Spontane fermentacije su puno jeftinije i jednostavnije za provođenje od onih kontroliranih, ali ukoliko želimo dobiti ujednačen i standardiziran konačni proizvod neophodno je fermentaciju u velikom mjerilu provoditi sa odgovarajućim starter kulturama. U tu se svrhu najčešće koriste odabrani sojevi kvasaca i plijesni koji zadovoljavaju određene kriterije. Bakterije mliječne kiseline najvažnije su starter kulture pri fermentaciji hrane jer brzo zakiseljavaju prehrambeni proizvod, poboljšavaju mu aromu, teksturu i nutritivni sastav (Upadrasta i sur., 2001).

Prema definiciji starter kulture su pripravci koji sadrže žive mikroorganizme, a primjenjuju se za dobivanje različitih fermentiranih namirnica s krajnjim ciljem oplemenjivanja tih namirnica s različitim proizvodima metabolizma upotrebljenih starter kultura (Šušković, 2005).

Priravnici upotrebljeni kao starter kulture klasificirani su u tri kategorije :

1. „Nedefinirane starter kulture“ u mljekarstvu nazvane kulture mješovitih sojeva, a zasnivaju se na korištenju fermentiranog supstrata koji je rezultirao dobrom kvalitetom konačnog proizvoda
2. Starter kulture koje sadrže jedan soj
3. Starter kulture koje su sastavljene od više sojeva

Osim navedenih postoje i „back slopping“ kulture u fermentacijskim tehnologijama. Kod ovog procesa se nova šarža inokulira sa proizvodom iz prethodne šarže. U tablici 2 navedene su starter kulture koje se koriste u proizvodnji pojedinih fermentiranih namirnica (Šušковиć 2005; Hammes 1990).

**Tablica 2.** Tipovi starter kultura koji se koriste u različitim fermentacijama (Šušковиć, 2005; Hammes, 1990)

<b>Fermentirani proizvod</b>	<b>Starter kulture koje sadrže jedan soj</b>	<b>Starter kulture koje sadrže više sojeva</b>	<b>Kulture mješovitih sojeva</b>	<b>„Back slopping“</b>
Kiseli kupus	+	-	-	+
Različito povrće	+	-	-	-
Sok od povrća	+	-	-	-
Sojini proizvodi	+	-	-	-
Vina	+	+	-	-
Suha kobasica	+	+	-	+
Mliječni proizvodi	+	+	+	-
Kiselo tijesto	+	+	+	+

-, ne koristi se; + koristi se

### 2.2.1. Zahtjevi za izbor starter kultura

Sigurnost, tehnološka učinkovitost i ekonomičnost osnovni su parametri za izbor starter kultura (Tablica 3). Prilikom odabira starter kultura treba sagledati aspekte poput karakteristika sirovine, primjena tehnologija, željena metabolička aktivnost i željene karakteristike konačnog proizvoda (Šušковиć, 2008).

**Tablica 3.** Opći kriterij za izbor starter kultura (Šušković, 2008)

<b>1. Sigurnost</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Starter kulture ne smiju imati patogeno ili toksično djelovanje</li><li>• Priprava starter kultura mora biti provedena pod strogo kontroliranim aseptičnim uvjetima</li></ul>
<b>2. Tehnološke karakteristike</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Starter mikroorganizmi moraju dominirati nad spontanom mikroflorom</li><li>• Starter mikroorganizmi provode određenu metaboličku aktivnost</li><li>• Tijekom tehnološkog postupka proizvodnje starter kultura ne dođe do kontaminacije</li></ul>
<b>3. Ekonomičnost</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Uzgoj starter kultura mora biti lako izvediv s ekonomske točke gledišta</li><li>• Čuvanje starter kultura može biti provedeno metodama smrzavanja ili liofilizacije s minimalnim gubitkom metaboličke aktivnosti kulture</li><li>• Važna svojstva starter kultura moraju biti stabilna pod definiranim uvjetima čuvanja kroz nekoliko mjeseci</li><li>• Rukovanje starter kulturama mora biti olakšano koliko god je moguće</li></ul>

### 2.3. Funkcionalne starter kulture

Funkcionalne starter kulture definiraju se kao kulture koje posjeduju barem jedno funkcionalno svojstvo čiji je cilj poboljšanje kvalitete konačnog proizvoda koji će imati pozitivan učinak na zdravlje i fiziologiju potrošača (Šušковиć, 2005). Funkcionalnost može doprinijeti mikrobiološkoj ispravnosti namirnica, ili kao posljedicu može imati poboljšanje organoleptičkih, tehnoloških, nutricionističkih i zdravstvenih svojstava hrane. Poželjno je koristiti one BMK koje proizvodne antimikrobne agense (organske kiseline, CO<sub>2</sub>, vodikov peroksid, diacetil, etanol, bakteriocine, reuterin i reuteričikline), šećerne polimere koji doprinose teksturi proizvoda (egzopolisaharidi) te aromatske tvari koje daju karakterističan miris i okus (diacetil, acetaldehid).

### 2.4. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz proizvoda akvakulture

Poznato je da su bakterije mliječne kiseline dio prirodne mikroflore gastrointestinalnog trakta riba od samog početka njihova života (Yang i sur., 2007; Ringo, 2008). BMK su izolirane iz atlantskog lososa (*Salmo salar*) (Ringo i sur., 1997), aljaške kolje (*Gadus chalcogrammus*) (Schroder i sur., 1980), jezerske zlatovčice (*Salvelinus alpinus*) (Ring oi sur., 1998) i bakalara (*Gadus* sp.) (Strom i Olafsen, 1990) te lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Bourouni i sur., 2012).

Soj bakterije *Carnobacterium maltaromaticum* (nekada *pisicola*) osim iz prethodno navedenih vrsta riba, izoliran je i iz kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) (Jöborn i sur., 1999; Ringo i sur., 2001; Huber i sur., 2004) te je utvrđeno da je rod *Carnobacterium* dominantna kultura u probavilu mladog atlantskog lososa (Ringo i sur., 1997) i bakalara (Strom i Olafsen, 1990). Prema mnogim autorima, kao dio prirodne mikroflore riba pojavljuju se i sljedeći sojevi BMK: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Streptococcus* spp., i *Weissella* spp. (Wallbanks i sur., 1990; Williams i sur., 1990; Ringo i Strom, 1994; Ringo i sur., 1998; Liu i sur., 2009; Matamoros i sur., 2009b). Na prisustvo pojedinog soja BMK u probavilu riba, veliki utjecaj ima stanište u kojem domaćin obitava, odnosno slanost vode i stres. Tako je dokazano da je broj laktobacila puno manji u gastrointestinalnom traktu atlantskog lososa uzgojenog u slanoj vodi od onog uzgojenog u kopnenim vodama (Ringo i Strom, 1994).

Iako su se do sada bakterije mliječne kiseline većinom spominjale u pozitivnom kontekstu, pokazalo se da one uzrokuju i oboljenja riba. Soj bakterije *Lactococcus garvieae* je odgovoran za sepsu, krvarenja i upale očiju, a virulentnost soja *C. maltaromaticum*

potvrđena je nakon što su, u eksperimentalne svrhe, njime zaražene kalifornijska pastrva i prugasti grgeč (*Morone saxatilis*) (Baya i sur., 1991).

Kako je već spomenuto, bakterije mliječne kiseline dio su prirodne mikroflore riba i školjkaša. One su iznimno kompetitivne u donosu na druge pripadnike mikroflore jer izlučuju antimikrobne metabolite što ih čini odličnim kandidatom za primjenu u tehnikama biokonzerviranja. Na taj se način održavaju higijenski standardi hrane, minimalno se utječe na njenu organoleptiku i nutritivna svojstva te se sprječava propadanje lakokvarljivih morskih proizvoda poput školjkaša (Cortesi i sur., 2009; Soomro i sur., 2007).

S obzirom da postoje dokazi da određeni kemijski konzervansi hrane mogu biti toksični, da fizikalne tehnike očuvanja hrane (zagrijavanje, zamrzavanje, visoki hidrostatski tlak, ionizirajuće zračenje, ozon, ultrazvuk i drugi) značajno utječu na nutritivna svojstva i organoleptiku te s obzirom na trend konzumacije minimalno procesirane hrane bez dodataka soli, masti, kiselina, šećera i aditiva, potrebno je bilo okrenuti se biokonzerviranju kao metodi očuvanja hrane od kvarenja i kontaminacije spomenutim bakterijama.

Bakterije mliječne kiseline koje su izolirane iz akvakulture i koje pokazuju antimikrobnu aktivnost protiv sojeva bakterija poput *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* i *Bacillus* spp. odličan su izbor za očuvanje hrane (Brillet i sur., 2008; Pinto i sur., 2009; Leroi, 2010).

Razlog tomu je tolerancija na temperature zamrzavanja, tolerancija na različite tlakove pri pakiranju proizvoda, podnošljivost niskih pH vrijednosti, visokih koncentracija soli i prisustva mliječne kiseline, octene kiseline i etanola kao aditiva hrane. U navedenim uvjetim BMK mogu rasti i razvijati se. Nadalje, one su se pokazale korisnima za potrošača posebice one upotrebene u fermentiranoj hrani i morskim proizvodima koji se konzumiraju bez termičke obrade (Ghanbari i Jami, 2013).

### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu izolirani su i identificirani u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobijologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u sklopu istraživanja autohtone mikrobne populacije riba i školjkaša Jadranskog mora. Osim izoliranih sojeva u radu je korišten i standard *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433. Sojevi nose oznake po uzorku iz kojih su izolirani (npr. O1. – orada, uzorak 1).

##### 3.1.2. Hranjive podloge

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline :

- MRS (Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2;  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05; Na -acetat 5; agar 13. pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15 min.
- MRS (Man, Rogos i Sharpe) bujon je istog sastava kao MRS – agar, samo bez dodanog agara.

##### 3.1.3. Pribor i oprema

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- vibracijska mješalica (Tehnica, Slovenija)
- centrifuga Z 206 A (Hermle, Labortechnik GmbH, Njemačka)
- inkubator MEMMERT BE 600 (Mermert GmbH + Co. KG, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- tehnička vaga (Sartorius, Njemačka)
- pH – metar (Mettler Toledo, Švicarska)
- spektrofotometar (Thermo Scientific, SAD)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz riba i školjkaša čuvaju se na +4°C u MRS bujonu. Svi su sojevi trajno pohranjeni na - 70°C uz dodatak 30% (v/v) glicerola

### 3.2.2. Uzgoj mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline uzgojeni su u aerobnim uvjetima preko noći u MRS bujonu pri 37 °C.

### 3.2.3. Određivanje optimalne temperature za rast bakterija mliječne kiseline

Izolirani sojevi bakterija mliječne kiseline nacijspljeni su u MRS bujon i uzgojeni pri različitim temperaturama (13°C, 28°C, 37°C, 45°C, 60°C) tijekom 24 h. Broj poraslih kolonija određen je indirektnom metodom.

### 3.2.4. Priprava bakterija mliječne kiseline za određivanje optimalne pH vrijednosti

Kulture bakterija mliječne kiseline (*L. plantarum* O1, *L. helveticus* O9, *L. mesenteroides* L4A, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4 i *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433) uzgojene su preko noći u MRS bujonu i centrifugirane 15 minuta pri 6000 rpm. Dobiveni talog je ispran s 0.5% sterilne fiziološke otopine i resuspendiran u 600 µL iste otopine.

### 3.2.5. Određivanje optimalne pH vrijednosti za rast bakterija mliječne kiseline

Pripremljena suspenzija stanica je dodana u 4.5 mL 0.5% sterilne fiziološke otopine određene pH vrijednosti (2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0) te su uzorci inkubirani preko noći na 37 °C. Broj poraslih kolonija određen je indirektnom metodom.

### 3.2.6 Određivanje broja kolonija indirektnom metodom

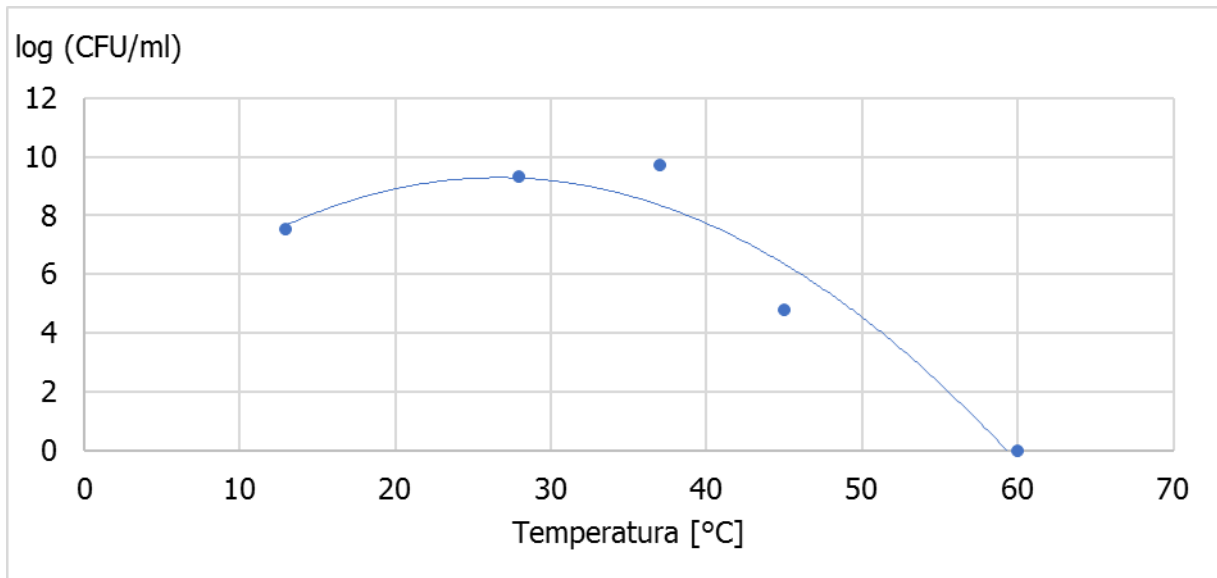
Iz uzoraka koji su sadržavali bakterijske stanice pripremljena su decimalna razrijeđenja i nacijspljena na MRS agar. Nakon inkubacije od 48h na 37°C izbroje se porasle kolonije, a ukupan se broj odredi kao CFU/ml

## 4. Rezultati i rasprava

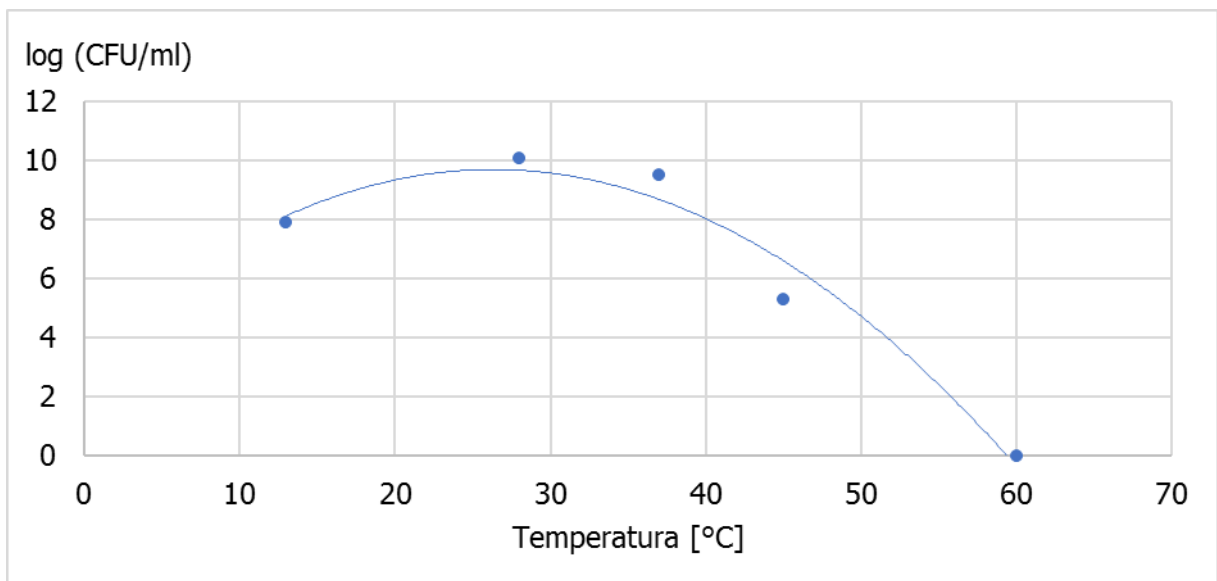
Do sada su napravljena brojna istraživanja u čijem su fokusu određivanje optimalnih parametara za uzgoj i metaboličku aktivnost bakterija kao budućih industrijskih mikroorganizama. Najčešće se određuje optimalni sastav hranjive podloge, temperatura, pH vrijednost, utjecaj kisika i drugih faktora za postizanje najvećih prinosa u proizvodnji koja koristi mikroorganizme kao biokatalizatore. Također, obzirom na rastući trend korištenja hrane koja je minimalno tretirana te bez dodanih kemijskih agenasa, sve veću primjenu u prehrambenoj industriji pronalaze starter kulture. Obzirom da upotreba komercijalnih starter kultura doprinosi standardiziranim organoleptičkim karakteristikama, ali se njenom primjenom gube tipična svojstva tradicionalnog proizvoda koja su rezultat autohtone mikroflore, sve je veći naglasak na primjeni autohtonih starter kultura (Frece i sur., 2010a, b,c,d; Markov i sur., 2010a; Babić i sur., 2011). Budući da bakterije mliječne kiseline imaju dugu tradiciju i GRAS (Generally Regarded As Safe) status prema US FDA odnosno QPS (Qualified Presumption of Safe) status prema zakonodavstvu Europske unije, najčešće su korištene starter kulture u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda, mesa i povrća. BMK proizvode mliječnu kiselinu i organske kiseline, bakteriocine te na taj način inhibiraju rast patogenih mikroorganizama te poboljšavaju organoleptička svojstva, sigurnost i trajnost proizvoda. Obzirom da su u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica bakterije mliječne kiseline izolirane iz riba i školjkaša te identificirane, cilj ovog istraživanja bio je odrediti optimalnu temperaturu rasta i pH vrijednost izoliranih sojeva u svrhu njihove potencijalne primjene kao autohtonih starter kultura. S obzirom na njihovu optimalnu temperaturu rasta bakterije mliječne kiseline su mezofilne ili termofilne. U industrijskim procesima, poput zamrznutog skladištenja starter kultura, sazrijevanja sira ili hlađenog skladištenja fermentiranih proizvoda, BMK su izložene temperaturama daleko ispod njihove optimalne temperature rasta. Optimalno preživljavanje BMK tijekom zamrzavanja i pri niskim temperaturama pridonosi znatno boljoj industrijskoj primjeni sojeva. Bolje razumijevanje odgovora na niske temperature i zamrzavanje može pridonijeti optimizaciji fermentacijskih procesa, skladištenja proizvoda i uvjeta očuvanja (van de Guchte i sur., 2002). Optimalna temperatura rasta izoliranih sojeva BMK određena je prekonocnim rastom pri različitim temperaturama (13 °C, 28°C, 37°C, 45°C i 60°C). Broj stanica izražen je kao log CFU/ml i prikazan slikama 1-5. Sojevi *L. plantarum* D1 i *L. plantarum* K4 najbolje preživljavaju pri temperaturi od 28°C, a *L. plantarum* O1, *L. helveticus* O9 i *L. mesenteroides* L4A pri temperaturi od 37°C. Broj živih stanica je ostao isti u odnosu na početni koje je iznosio 10<sup>9</sup> CFU/ml. Daljnjim povećanjem temperature na 45°C broj stanica se smanjio na 10<sup>5</sup> CFU/ml, dok pri temperaturi od 60°C nije zabilježen rast ni kod jednog soja. Pri temperaturi uzgoja od



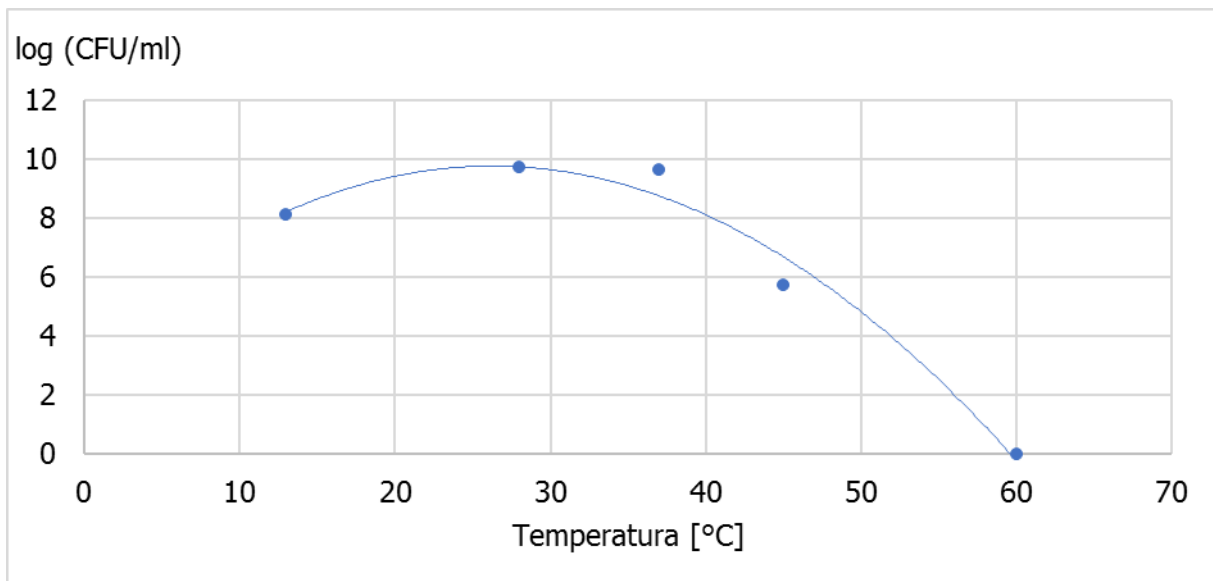
13°C broj stanica je bio između  $10^7$  i  $10^8$  CFU/ml iz čega se da zaključiti kako BMK rastu bolje pri višim temperaturama. Ovakvi rezultati su u skladu s literaturom (Ahmed i sur., 2006; Grosu-Tudor i sur., 2016) gdje je navedena optimalna temperatura rasta bakterija mliječne kiseline između 30°C i 40°C. Ovisno o vrsti, BMK mogu rasti i pri niskim temperaturama (5°C) i visokim (53°C).



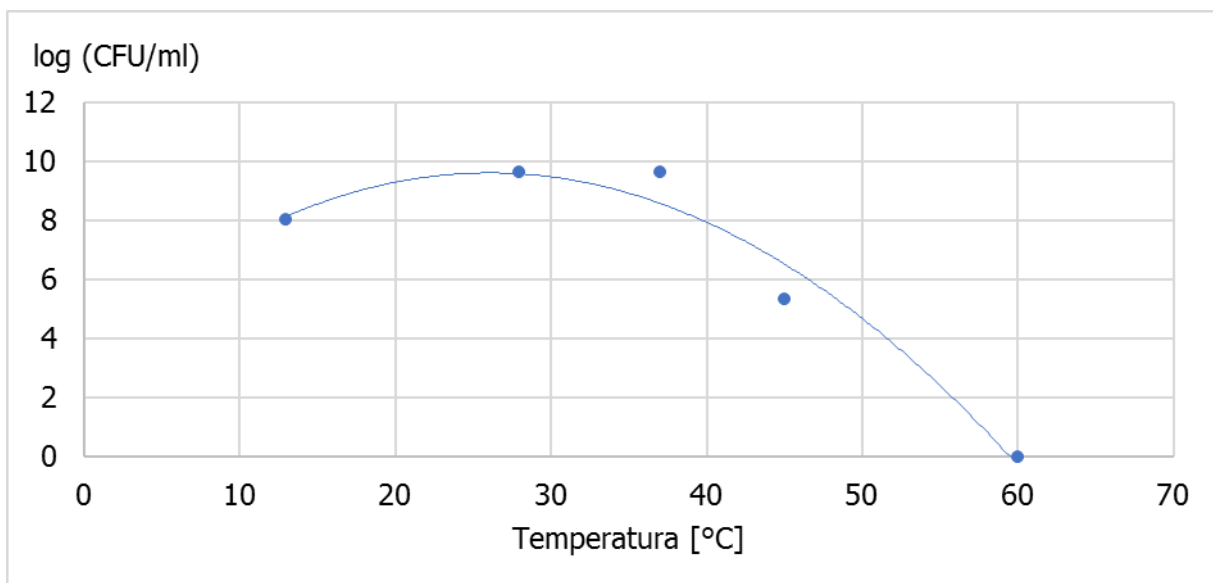
**Slika 1.** Ovisnost log (CFU/ml) o temperaturi [°C] za soj *Lactobacillus plantarum* (O1)



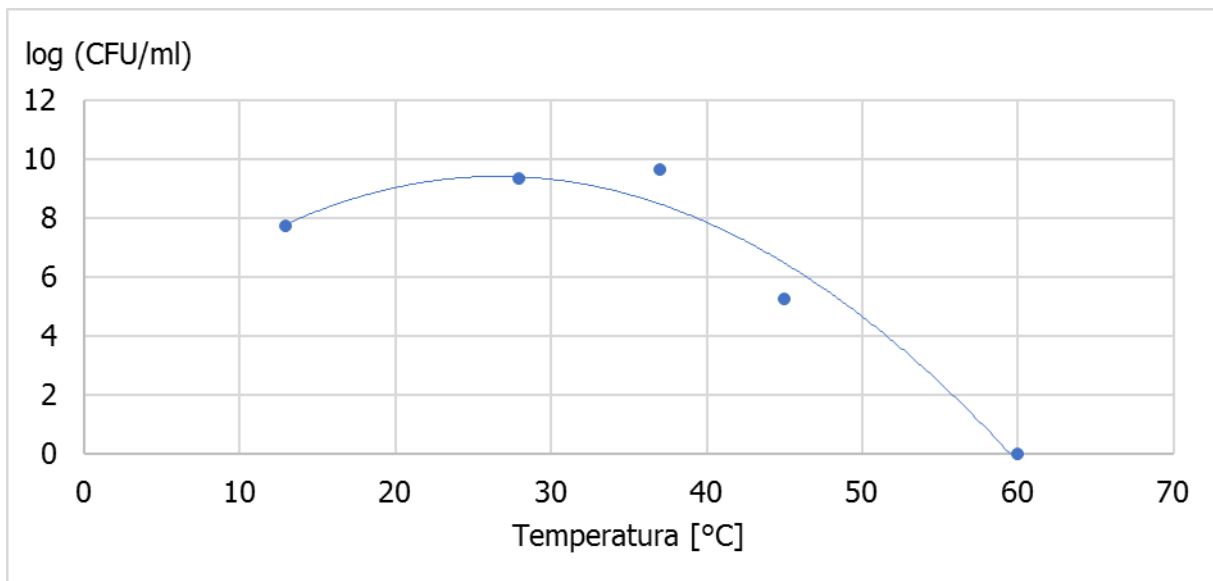
**Slika 2.** Ovisnost log (CFU/ml) o temperaturi [°C] za soj *Lactobacillus plantarum* (D1)



**Slika 3.** Ovisnost log (CFU/ml) o temperaturi [°C] za soj *Lactobacillus plantarum* (K4)



**Slika 4.** Ovisnost log (CFU/ml) o temperaturi [°C] za soj *Lactobacillus helveticus* (O9)



**Slika 5.** Ovisnost log (CFU/ml) o temperaturi [°C] za soj *Leuconostoc mesenteroides* (L4A)

Temperatura i pH su ključni okolišni parametri koji utječu na proces fermentacije i određuju optimalnu brzinu mikrobnog rasta i proizvodnju mliječne kiseline. Među bakterijama mliječne kiseline koje se koriste kao mliječni starteri, samo laktobacili pokazuju optimalni rast pri kiselim pH, pri čemu do maksimalnog rasta dolazi pri pH 5.0 do 6.0, iako neki sojevi mogu rasti i pri niskom pH (4.4) (Von Wright i Axelsson, 2011). Ne samo da većina bakterija mliječne kiseline raste sporije pri niskom pH, već uslijed djelovanja kiseline dolazi do oštećenja i gubitka vijabilne sposobnosti. Na temelju pH optimuma, većina BMK sojeva ima visoku aktivnost kisele fosfataze u pH rasponu između pH 4.0 – 6.0 s optimalnom pH vrijednosti od 5.0 (Haros i sur., 2008; Tham i sur., 2010; Palacios i sur., 2005; Akuzawa i Fox, 2004). Stoga je pH jedan od važnih aspekata koji je potrebno uzeti u obzir s ciljem optimalnog rasta i bolje funkcionalnosti. Optimalna pH vrijednost izoliranih sojeva BMK određena je prekonoćnim uzgojem pri različitim pH vrijednostima (2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0). Broj stanica je izražen kao CFU/ml i prikazan je u tablici 4.

**Tablica 4.** Preživljavanje izoliranih sojeva BMK pri različitom pH

Sojevi	Početni broj	CFU/ml					
		pH2	pH4	pH6	pH8	pH10	pH12
<i>L. plantarum</i> O1	$1.1 \times 10^9$	$4 \times 10^6$	$8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$3.6 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	$4 \times 10^6$
<i>L. plantarum</i> D1	$4 \times 10^9$	$1.4 \times 10^5$	$2.3 \times 10^7$	$1.5 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$5 \times 10^7$
<i>L. plantarum</i> K4	$5 \times 10^9$	$2 \times 10^6$	$7 \times 10^7$	$5.5 \times 10^7$	$5.5 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$2 \times 10^7$
<i>L. helveticus</i> O9	$3 \times 10^9$	$5 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7$	$4.4 \times 10^8$	$4.4 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$5 \times 10^6$
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> L4A	$4 \times 10^9$	$6.2 \times 10^4$	$1.4 \times 10^7$	$2.7 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$5 \times 10^6$

Prema dobivenim rezultatima izolati *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9 i *L. mesenteroides* pokazuju najbolje preživljavanje pri pH 6.0, dok *L. plantarum* O1 najbolje preživljava pri pH 4.0. Ovakvi rezultati se podudaraju s rezultatima von Wright i Axelsona (2011) koji navode da se maksimalni rast bakterija postiže pri pH 5.0 - 6.0 s mogućim iznimkama ovisno o soju. Iz tablice 3 također se može uočiti kako i pri niskom (2) i visokom (8, 10, 12) pH izolirani sojevi BMK relativno dobro preživljavaju što je važno budući da prilikom industrijske proizvodnje različitih fermentiranih proizvoda, starter kulture često budu izložene različitim nepovoljnim uvjetima kao što su visoke koncentracije soli, niske ili visoke

vrijednosti pH i temperature te nedostupnost kisika (Frece i sur., 2014; Grosu-Tudor i sur., 2016). Preživljavanje pri višim pH vrijednostima je ipak nešto veće ( $10^6$ -  $10^8$  CFU/ml) u odnosu na preživljavanje pri nižim ( $10^5$ - $10^7$  CFU/ml). Obzirom na dobivene rezultate odnosno određene optimalne parametre rasta, može se zaključiti kako sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz riba i školjkaša Jadranskog mora mogu biti potencijalne starter kulture. Naravno, s ciljem njihove definicije kao autohtonih starter kultura potrebno je zadovoljiti sve opće kriterije za izbor (Šušković, 2008).

## 5. Zaključci

1. Optimalna temperatura rasta za sojeve *L. plantarum* D1 i *L. plantarum* K4 je 28°C, a za *L. plantarum* O1, *L. helveticus* O9 i *L. mesenteroides* L4A 37°C.
2. Optimalna pH vrijednost za rast sojeva *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9 i *L. mesenteroides* iznosi 6.0, dok *L. plantarum* O1 najbolje preživljava pri pH 4.0
3. Sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz riba i školjkaša Jadranskog mora imaju potencijalnu primjenu kao autohtone starter kulture.

## 6. Popis literature

Ahmed, T., Kanwal R., Ayub, N. (2006) Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from Camel Milk. *Biotechnology*, 5: 481-488.

Akuzawa, R., Fox, P. F. (2004) Acid Phosphatase in Cheese; *Animal Science Journal*, **75**: 385-391.

Babić I., Markov K., Kovačević D., Trontel A., Slavica A., Đugum J., Čvek D., Svetec I.K., Posavec S., Frece J. (2011) Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from Croatian "brand" product "Slavonski kulen". *Meat science*, **88**: 517-524.

Bourouni O.C., El Bour M., Calo-Mata P., Mraouna R., Abedellatif B., Barros-Velázquez J. (2012) Phylogenetic analysis of antimicrobial lactic acid bacteria from farmed seabass *Dicentrarchus labrax*. *Canadian Journal of Microbiology*, **58** (4):463-474.

Brillet A., Pilet M.F., Prévost H., Cardinal M., Leroi F. (2005) Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **104**: 309-324.

Cortesi M.L., Panebianco A., Giuffrida A., Anastasio A. (2009) Innovations in seafood preservation and storage. *Veterinary Research Communications*, **1**: S15-S23.

Françoise, L. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products; *Food Microbiology* **27**, 698-709.

Frece J., Markov K., Kovačević D. (2010a) Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso*, **12** (2): 92-98.

Frece J., Čvek D., Kovačević D., Gobin I., Tihana K., Markov K. (2010b) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz „slavonskog kulena“ kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso*, **12** (4): 208-214.

Frece J., Markov K., Čvek D., Kovačević, D. (2010c) Stafilokoki kao potencijalne izvorne starter kulture iz slavonskog kulena. *Meso*, **12** (3): 156-160.

- Frece J., Pleadin J., Markov K., Perši N., Dukić V., Čvek D., Delaš F. (2010d) Mikrobna populacija, kemijski sastav i mikotoksini u kobasicama s područja Varaždinske županije. *Veterinarska stanica*, **41** (3): 189-198.
- Frece J., Kovačević Dragan., Kazazić S., Mrvčić J., Vahčić N., Delaš F., Ježek D., Hruškar M., Babić I., Markov K. (2014) Comparison of Sensory Properties, Shelf Life and Microbiological Safety of Industrial Sausages Produced with Autochthonous and Commercial Starter Cultures (Starter Cultures for Sausages Production). *Food technology and biotechnology*, **52**: 307-316.
- Gavrilović A., Frece J., Markov K., Jug-Dujaković J. (2016) Development and evaluation of marinade on the basis of bitter orange with *Lactobacillus plantarum* O1 for biopreservation and flavouring of sea food. Proceedings of the 46<sup>th</sup> WEFTA CONFERENCE "From Local Fish to Global DISH". Vidaček S., ur., Faculty of Food Technology and Biotechnology, university of Zagreb, Croatia, str: 47-50
- Ghanbari M., Jami M. (2013) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: a promising approach to seafood biopreservation. U: Lactic Acid Bacteria – R & D for food, Health and Livestock Purposes, Kongo M., ur., *InTech Publication*, str. 382- 404.
- Grosu-Tudor S.S., Ștefan I.R., Zamfir M. (2016) Growth/survival of some functional lactic acid bacteria under different stress conditions. *AgroLife Scientific Journal*, 5 (2): 71-78.
- Hammes W.P. (1990) Bacterial starter cultures in food production. *Food Biotechnology*, **4**: 383-397.
- Hammes W.P., Vogel R.F. (1995) The genus *Lactobacillus*. U: The genera of lactic acid bacteria, Wood B.J.B., Holzapfel W.H. ur., 2. izd., *Blackie academic & professional*, str. 19-49
- Haros M., Bielecka M., Honke J., Sanz, Y. (2008) Phytate degrading activity in lactic acid bacteria. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **58** (1): 33-40.
- Huber I., Spanggaard B., Appel K.F., Rossen L., Nielsen T., Gram L. (2004) Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of applied microbiology*, **96**: 117-132.
- Jöborn A., Dorsch M., Christer Olsson Z.J., Westerdahl A., Kjelleberg S. (1999) *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**: 1891-1898.
- Kleerebezem M., Hugenholtz J. (2003) Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, **14** (2) : 232-237.



- Kos, B. (2001) Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Doktorska disertacija. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet
- Leboš Pavunc A. (2012) Fenotipska i genotipska karakterizacija sojeva bakterija mliječne kiseline u svrhu proizvodnje probiotika i funkcionalnih starter kultura. Doktorska disertacija. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Leroi F. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, **27**: 698-709.
- Liu J.Y., Li A.H., Ji C., Yang W.M. (2009) First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary Microbiology*, **136**: 314–320.
- Markov K., Frece J., Čvek D., Trontel A., Slavica A., Kovačević D. (2010a) Dominantna mikroflora fermentiranih kobasica od konjskog mesa. *Meso*, **12** (4): 217-221.
- Matamoros S., Pilet M.F., Gigout F., Prévost H., Leroi F. (2009b) Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*, **26** (6): 638-644.
- Mataragas M., Metaxopoulos J., Galiotou M., Drosinos E.H (2003) Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, **64** (3): 265-271.
- Palacios M. S., Haros M., Rosell C. M., Sanz, Y. (2005) Characterization of an Acid Phosphatase from *Lactobacillus pentosus*. Regulation and Biochemical Properties. *Journal of Applied Microbiology*, **98** (1): 229-237.
- Pinto A.L., Fernandes M., Pinto C., Albano H., Castilho F., Teixeira P., Gibbs P.A. (2009) Characterization of anti- *Listeria* bacteriocins isolated from shellfish. *Int.J.Microbiol.* **129**: 50-58
- Ringø E. (2008) The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquaculture Research*, **39**: 171-180.
- Ringø E., Gatesoupe F.J. (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. *Agriculture* **160**, 177-203.
- Ringø E., Wesmajervi M.S., Bendiksen H.R., Berg A., Olsen R.E., Johnsen T., Mikkelsen H., Seppola M., Strøm E., Holzaphel W. (2001) Identification and Characterization of

Carnobacteria Isolated from Fish Intestine. *Systematic and Applied Microbiology*, **24**: 183–191.

Ringø E., Olsen R.E., Øverli Ø., Løvik F. (1997) Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture Research*, **28**: 901-904.

Ringø E., Strøm E. (1994) Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquaculture and Fisheries Management*, **25**: 623-629.

Samardžija D. (2015) Fermentirana mlijeka. Sveučilište u Zagrebu – Agronomski fakultet. Hrvatska mljekarska udruga

Schroder K., Clausen E., Sandberg A.M., Raa J. (1980) Fishing News Books, London. U: Connell, J.J. (Ed.), Psychrotrophic *Lactobacillus plantarum* from fish and its ability to produce antibiotic substances. *Adv. Fish. Sci. Technol.*, pp. 480-483

Siezen R.J, van Hylckama Vlieg J.ET. (2011) Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*, **10** (1): 1-13

Soomro A.H., Masud T., Anwaar K. (2002) Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health—A review. *Pakistan Journal of Nutrition*, **1** (1): 20-24

Strøm E., Olafsen J.A. (1990) The indigenous microflora of wild-captured juvenile cod in net-pen rearing. *Microbiology in Poecilotherms*, 181-185.

Šušković J. (2008) Starter kulture – temelj fermentativne i funkcionalne hrane , predavanja iz kolegija "Probiotici, prebiotici i starter kulture".

Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., NG J., Munro K., Alatossava T. (1999) Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yogurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and environmental microbiology*, **65**(9): 4264-4267.

Tham S., Chang C., Huang H., Lee Y., Huang T., Chang C.C. (2010) Biochemical characterization of an acid phosphatase from *Thermus thermophilus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74** (4): 727-735.

Todar K. (2012) Kenneth Todar, Ph.D. – Home Page

<<http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>> Pristupljeno 01. lipnja 2017.

Upadrasta A., Stanton C., Hill C., Fitzgerald G.F., Paul Ross R. (2001) Improving the Stress Tolerance of Probiotic Cultures: Recent Trends and Future Directions U: Stress responses of lactic acid bacteria, Tsakalidou E., Papadimitriou K. Greece, ur., Springer, str : 395-438.

Van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D., Maguin E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**: 187–216.

Von Wright A., Axelsson L. (2011) Lactic Acid Bacteria: An Introduction U: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Lahtinne S., Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A., ur., CRC Press, str. 1-17.

Wallbanks S., Martinez-Murcia A.J., Fryer J.L., Phillips B.A, Collins M.D. (1990) 16S rRNA sequence determination for members of the genus Carnobacterium and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 224-230.

Williams A.M., Fryer J.L., Collins M.D. (1990) *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters*, **68**: 109-114.

Yang G., Baolong B., Peatman E., Huirong L., Huang L., Ren D. (2007) Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus*. *Agriculture*, **262**: 183-191.

## Izjava o izvornosti

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



---

Ime i prezime studenta