

Određivanje probiotičkog potencijala odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline

Novak, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:364270>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-08**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Marina Novak

7423/PT

**ODREĐIVANJE PROBIOTIČKOG POTENCIJALA
ODABRANIH SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE
KISELINE**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija namirnica

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

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Određivanje probiotičkog potencijala odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline

Marina Novak, 0058210754

Sažetak: Probiotici su živi mikroorganizmi čijom se uporabom u prehrani, u odgovarajućim količinama, javljaju pozitivni učinci kod korisnika. Potrebno je prilikom karakterizacije bakterija mliječne kiseline (BMK) kao probiotika ispitati niz selekcijskih kriterija koje moraju zadovoljiti kako bi bili djelotvorni. Kriteriji obuhvaćaju održivost bakterija u gastrointestinalnom sustavu te njihovu sigurnost i djelotvornost u organizmu. Cilj ovog rada bila je izolacija i karakterizacija dvaju sojeva BMK kao probiotika, te je u tu svrhu ispitano nekoliko selekcijskih kriterija. Izmjeren je stupanj preživljenja u simuliranom soku želuca i tankog crijeva, sposobnost formiranja biofilma, sposobnost autoagregacije, te hemolitička aktivnost. Izmjeren je i antioksidativni kapacitet preko sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala i određivanjem ukupne unutarstanične koncentracije glutaciona.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, laktobacili, probiotici, selekcijski kriteriji

Rad sadrži: 30 stranica, 10 slika, 2 tablice, 53 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: Deni Kostelac, mag.ing.

Datum obrane: 18. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology**

Determination of probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains

Marina Novak, 0058210754

Abstract: Probiotics are living microorganisms that are used in diet and who, in an appropriate concentration, bring positive effects for the user. When characterizing lactic acid bacteria (LAB) as probiotics, they have to satisfy a number of selection criteria in order to be effective. The criteria include viability of bacteria in the gastrointestinal system, their safety and their effectiveness in an organism. The aim of this study was to isolate and characterize two strains of LAB as probiotics. Several selection criteria were tested for this purpose. The degree of survival in simulated gastric and small intestinal juice, biofilm-forming ability, autoaggregation ability and hemolytic activity were measured. Antioxidant capacity was measured through the ability to remove DPPH free radicals and by determining total intracellular glutathione concentration.

Keywords: lactic acid bacteria, lactobacilli, probiotics, selection criteria

Thesis contains: 30 pages, 10 figures, 2 tables, 53 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Prof. Jadranka Frece, PhD

Technical support and assistance: Deni Kostelac, MSc

Defence date: September 18, 2019.

SADRŽAJ

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. Bakterije mliječne kiseline	2
2.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	4
2.2. Probiotičke bakterije	5
2.2.1. Seleksijski kriteriji za probiotičke bakterije.....	6
3.MATERIJALI I METODE	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Mikroorganizam	11
3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizama.....	11
3.1.3. Aparatura i pribor	12
3.1.4. Kemikalije	12
3.2. Metode rada	13
3.2.1. Uzgoj mikroorganizama	13
3.2.2. Priprema bakterijske suspenzije	13
3.2.3. Određivanje broja BMK u suspenziji.....	13
3.2.4. Preživljenje odabranih sojeva BMK u simuliranom soku želuca	13
3.2.5. Određivanje broja MO u simuliranom soku tankog crijeva.....	14
3.2.6. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala	14
3.2.7. Priprema unutarstaničnog sadržaja sojeva BMK.....	14
3.2.8. Određivanje ukupne koncentracije glutationa	14
3.2.9. Kvantifikacija biofilma	15
3.2.10. Autoagregacija	16
3.2.11. Hemolitička aktivnost BMK	16
4.REZULTATI I RASPRAVA	18
5.ZAKLJUČAK	25
6.POPIS LITERATURE	26

1. UVOD

Probiotici su živi mikroorganizmi koji imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina kada se unose u odgovarajućim količinama (Frece i sur., 2005). Kontroliraju sastav crijevne mikroflore na način da inhibiraju rast potencijalno patogenih bakterija proizvodnjom antimikrobnih tvari, natječu se za hranjive tvari i za mjesto za vezanje. Istovremeno, probiotici potiču rast korisnih, poželjnih vrsta crijevne mikroflore (Frece i sur., 2009; Quigley, 2018). Osim djelovanja na ostale mikroorganizme, probiotici posjeduju sposobnost modifikacije metaboličkih procesa u probavnom sustavu i stimulacije imunološkog sustava domaćina. Njihova aktivnost i broj može se povećati uporabom neprobavljivih oligosaharida, prebiotika (Šušković, 1998; Frece i sur., 2005).

Kao probiotici se koriste bakterije mliječne kiseline (BMK) koje su prirodni stanovnik ljudskog i životinjskog gastrointestinalnog trakta. Općenito BMK uključuju 40 rodova bakterija okruglog i štapićastog oblika, a rodovi koji se koriste kao probiotici su *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Lactococcus* i *Streptococcus* (Salminen i sur., 2004).

Probiotički mikroorganizmi moraju zadovoljiti velik broj kriterija koji se dijele na opće, tehnološke i funkcionalne. U tu svrhu provode se testovi izoliranih mikroorganizama u kojima se istražuje njihova otpornost na nepovoljne uvjete u gastrointestinalnom traktu, procesne stresove i njihov utjecaj na zdravlje domaćina (Frece i sur., 2005; de Melo Pereira i sur., 2018).

Cilj ovog rada je djelomična probiotička karakterizacija dvaju sojeva BMK: *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9. Ispitano je njihovo preživljenje u uvjetima želuca i tankog crijeva, antioksidativni kapacitet preko sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala i preko ukupne unutarstanične koncentracije glutaciona, sposobnost formiranja biofilma i autoagregacije, te hemolitička aktivnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline

BMK su gram-pozitivne bakterije, okruglog ili štapićastog oblika, nesporogene, mezofilne, kemoorganotrofi, katalaza-negativne, nemaju citokroma, ne sintetiziraju porfirine, a rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama. S obzirom na toleranciju prema kisiku su anaerobne ili mikroaerofilne. Kod aerotolerantnih vrsta prisutne su velike količine enzima NAD-oksidadze i NAD-peroksidaze koji omogućuju uklanjanje kisika iz međustaničnog prostora. Karakterizira ih sposobnost fermentacije heksoza u mliječnu kiselinu, acidotolerantne su, te posjeduju niski udio gvanina i citozina u molekuli DNA (Tripathi i Giri, 2014). Poznati rodovi su *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* kao predstavnici bakterija štapićastog oblika. Svi ostali rodovi BMK su okruglog oblika, a neki od njih su *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Streptococcus*. Među okruglastim BMK, rodovi *Aerococcus*, *Pediococcus* i *Tetragenococcus* stvaraju tetrade, odnosno skupine od četiri bakterije povezane u cjelinu. Rod *Bifidobacterium* se također ubraja u BMK, iako im nije filogenetski srodan, te ga karakterizira specifičan način fermentacije šećera (Salminen i sur., 2004).

Prema načinu metaboliziranja heksoza, postoje homofermentativni i heterofermentativni put. Homofermentativni put karakterizira nastajanje mliječne kiseline kao primarnog produkta, te takve bakterije posjeduju enzim aldolazu koja omogućuje pretvaranje glukoze izravno u mliječnu kiselinu tijekom Embden-Mayerhof-Parnas metaboličkog puta. U heterofermentativnom metaboličkom putu prisutan je pentoza-fosfatni put koji omogućuje pretvorbu heksoze u pentozu, te uz mliječnu kiselinu nastaju ugljikov dioksid, octena kiselina, etanol, aldehidi i diacetil (Makarova i sur., 2006; De Melo Pereira i sur., 2018). U homofermentativne mikroorganizme spadaju bakterije roda *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus*, a u heterofermentativne bakterije roda *Leuconostoc* i *Betabacteria* (Carr i sur., 2002).

Mliječna kiselina, kao krajnji produkt metabolizma, u prehrambenim proizvodima produljuje rok trajanja, poboljšava okus i nutritivnu vrijednost, te doprinosi teksturi hrane.

BMK imaju široku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji. U prehrambenoj industriji koriste se u proizvodnji jogurta, sira, kruha, kiselog kupusa, krastavaca, piva, vina i drugih fermentiranih namirnica. Mogu proizvesti niz funkcionalnih oligosaharida koji pokazuju pozitivan učinak na zdravlje. BMK kao probiotici su pokazale učinkovitost protiv probavnih problema, alergija, intolerancije na laktozu, te učinkovitosti pri

stimulaciji imuniteta (Corsetti i Settanni 2007). Stoga se takva hrana smatra funkcionalnom, zahvaljujući pozitivnom učinku na jednu ili više ciljanih funkcija u organizmu, mogućnosti poboljšanja zdravlja i prevencije bolesti, te u konačnosti, mogućnosti smanjenja upotrebe antibiotika (Šušković i sur., 2001).

BMK se upotrebljavaju kao starter kulture u proizvodnji fermentirane hrane te mogu biti dodane ili već prirodno prisutne u sirovini. Sudjeluju u procesima fermentacije i konzerviranja zbog sposobnosti proizvodnje antimikrobnih tvari kao što su organske kiseline (mliječna, octena i mravlja kiselina), vodikov peroksid, antifungalni peptidi, bakteriocini, ugljikov dioksid, diacetil i etanol. Octena kiselina doprinosi mirisu i sprječava pojavu plijesni. Bakteriocini su peptidi niske molekulske mase ili proteini antibakterijskog učinka koji djeluju na Gram-pozitivne bakterije. Mnogi bakteriocini su učinkoviti protiv patogena koji se prenose hranom kao što su *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes*, te stoga pokazuju inhibirajuće djelovanje na kvarenje koje je pokazano kod fermentiranih kobasica, povrća, maslina i mliječnih proizvoda. Od ostalih antimikrobnih agensa, *Lactobacillus reuteri* proizvodi reuterin koji je učinkovit prema širokom spektru bakterija, plijesni i kvasaca (Leroy i De Vuyst, 2004). Zbog biokonzervirajućeg djelovanja, BMK se mogu koristiti kao zamjena za sintetske konzervanse i ostale aditive koji su danas nepoželjni u prehrambenim proizvodima od strane konzumenata. Navedeno pozitivno djelovanje nije ograničeno samo na prehrambene proizvode, već se razmatraju kao alternativa za tradicionalne antibiotike u svrhu kontrole antimikrobne rezistencije koja predstavlja problem za zdravlje ljudi i životinja (Rahmeh i sur., 2019).

Osim navedenog antimikrobnog učinka, BMK utječu na okus, aromu i teksturu fermentiranih proizvoda. S obzirom na to da metaboliziraju šećer u mliječnu kiselinu preko piruvata, piruvat može dovesti do stvaranja acetata, etanola, diacetila, acetaldehida i ostalih hlapljivih tvari koje su zaslužne za karakterističan okus. Utjecaj na teksturu prisutan je kao posljedica proizvodnje polisaharida koji povećavaju viskoznost i čvrstoću (Leroy i De Vuyst, 2004).

Zbog vremenski duge primjene BMK bez štetnog utjecaja na zdravlje ljudi, nalaze se na GRAS (Generally Regarded As Safe) listi prema US FDA, odnosno na listi QPS (Qualified Presumption of Safety) prema legislativi Europske Unije (Frece i sur., 2010).

2.1.1. *Lactobacillus plantarum*

Rod *Lactobacillus* obuhvaća veliki broj različitih vrsta među kojima je vidljiv visoki stupanj raznolikosti. Ovom rodu pripada više od 50 različitih vrsta, te su najraširenija skupina BMK. Karakterizira ih visok stupanj preživljenja u uvjetima niskog pH, te sprječavanje rasta patogena kroz kompeticiju za adheziju i za hranjivim tvarima. Međutim, samo je nekoliko vrsta uključenih u fermentaciju hrane i u regulaciju crijevne mikroflore kao što su *L. crispatus*, *L. gasseri* i *L. plantarum*. Sojevi laktobacila koji se koriste kao probiotici su nepatogeni i netoksični, te imaju visoku sposobnost adhezije na crijevnu sluznicu (De Vries i sur., 2006; Vivek i sur., 2019).

Među njima, *Lactobacillus plantarum* je vrsta koja se nalazi u različitim okolišnim nišama, uključujući mliječne proizvode, meso, te fermentirano voće i povrće, a uz to, prirodni je stanovnik ljudskog i životinjskog gastrointestinalnog trakta. U životinjama količina može varirati ovisno o životinjskoj vrsti, starosti ili specifičnom mjestu unutar probavnog sustava. Štapičasta je, Gram-pozitivna bakterija s probiotičkim svojstvima kao što su otpornost na biološke barijere, antimikrobna aktivnost i osjetljivost na antibiotike. Mnoga istraživanja su pokazala da korištenje *L. plantarum* kao probiotika kod korisnika ima pozitivan učinak zbog inhibicije patogenih mikroorganizama kao što su *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* i *Clostridium difficile*, sposobnosti snižavanja kolesterola u krvi te pokazuje pozitivan učinak kod pojedinaca s intolerancijom na laktozu (Manzoor i Tayyeb, 2019).

Spada u skupinu fakultativno heterofermentativnih BMK što znači da ima sposobnost metaboliziranja šećera do mliječne kiseline na homofermentativni i heterofermentativni način. Može provoditi metaboličku razgradnju glikolizom i fosfoketolaznim putem, a sudbine piruvata mogu biti različite, tj. različiti način fermentacije rezultira različitim krajnjim produktima. Genom joj je sekvencioniran te je jedan od najvećih među BMK (Kleerebezem i sur., 2003).

Veliki broj površinski smještenih proteina ukazuju na mogućnost adhezije na mnogo različitih površina, a velik broj regulatornih gena upućuju na sposobnost prilagodbe različitim uvjetima što je posljedica prisutnosti ove bakterije u različitim okolišnim nišama. Haller i sur. (2001) su pokazali toleranciju različitih sojeva *L. plantarum* na uzastopnu izloženost klorovodičnoj kiselini i žučnim solima.

2.2. Probiotičke bakterije

Probiotici su, prema definiciji Organizacije za hranu i poljoprivredu (engl. FAO – Food and Agricultural Organization) i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. WHO – World Health Organization), živi mikroorganizmi koji imaju pozitivan učinak na domaćina kad se unose u odgovarajućim količinama. U tom slučaju reguliraju imunološki sustav, održavaju zdravu crijevnu mikrofloru, reduciraju hipertenziju, snižuju razinu kolesterola u krvi, sudjeluju u prevenciji dijareje, smanjuju pojave upalnih bolesti crijeva i mokraćno-spolnih infekcija, omogućuju smanjenu potrebu za antibioticima, te povoljno djeluju u organizmima sa smanjenom tolerancijom na laktozu. Kao probiotici se koriste bakterije roda *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Lactococcus*, *Streptococcus* te nekoliko sojeva kvasaca. S obzirom na njihovu dugotrajnu upotrebu bez štetnog učinka na domaćina, brojne od tih vrsta posjeduju GRAS, odnosno QPS status (Angmo i sur., 2016; Rajoka i sur., 2017). Među BMK, *Lactobacillus* je najranije otkriveni probiotik kojeg karakterizira široka industrijska primjena kao što je primjena u obliku konzervansa, sredstva za zakiseljavanje i arome za hranu (De Melo Pereira i sur., 2018).

Zbog pozitivnih učinaka na zdravlje sve su više uključeni u fermentirane proizvode. Uporaba probiotičkih kultura stimulira rast poželjnih mikroorganizama, a inhibira rast potencijalno štetnih bakterija, te povećava obrambeni mehanizam tijela (Saarela i sur., 2000). U svrhu osiguravanja zdravstvenih učinaka, predložena koncentracija probiotičkih bakterija iznosi 10^6 – 10^8 CFU po gramu ili mililitru proizvoda. Međutim, potrebno je pratiti održivost probiotika u proizvodima na koju, primjerice, mogu utjecati kiseline i vodikov peroksid proizveden od strane ostalih bakterija (npr. jogurtnih u jogurtu), te kisik koji se već nalazi u proizvodu ili koji je difundirao kroz ambalažu (Shah, 2000).

Djelovanje probiotika može biti izraženo kroz tri aspekta: inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama, modifikacija metaboličkih procesa u probavnom sustavu i stimulacija imunološkog sustava domaćina (Frece i sur., 2005). Probiotici inhibiraju rast ostalih mikroorganizama antimikrobnim djelovanjem, kompeticijom za hranjivim tvarima i za mjesta vezanja u probavnom sustavu. Modifikacija metaboličkih procesa uključuje povećanje aktivnosti pogodnih ili smanjenje aktivnosti kancerogenih enzima. Stimulacija imunološkog sustava provodi se povećanjem razine protutijela i makrofagne aktivnosti (Šušković, 1998).

Način kojim se povećava broj i aktivnost probiotika jest uporaba prebiotika, neprobavljivih oligosaharida koji stimuliraju autohtone i alohtone-probiotičke bakterije, te je stoga u posljednjih nekoliko godina pozornost dana korištenju kombinacije probiotika i prebiotika.

Prebiotik ulazi u debelo crijevo, te služi kao supstrat endogenim bakterijama, čime osigurava domaćinu esencijalne makronutrijente, potrebne metaboličke supstrate i energiju. Njihovo sinergističko djelovanje, kao što je primjerice kombinacija laktilola ili laktuloze s laktobacilima, utječe na povećanje ukupnog broja laktobacila, bifidobakterija, te na smanjenje patogenih mikroorganizama i stabilizaciju probiotičkog učinka (Šušković i sur., 2001). Nisu svi ugljikohidrati iz prehrane prebiotici, već oni moraju zadovoljavati kriterije kao što su otpornost na želučanu kiselinu, hidrolitičke enzime, fermentaciju crijevne mikroflore, te moraju posjedovati sposobnost selektivne stimulacije rasta i aktivnosti poželjnih mikroorganizama (Schrezenmeir i de Vrese, 2001; Roberfroid, 2007).

2.2.1. Seleksijski kriteriji za probiotičke bakterije

Probiotički sojevi se mogu koristiti i biti aktivni unutar domaćina samo ako ispunjavaju veliki broj kriterija. Seleksijski kriteriji za probiotičke bakterije rezultat su ispitivanja istraživačkih institucija i sveučilišta zajedno s prehrambenom industrijom (Šušković i sur., 2001). Seleksijski kriteriji se dijele na opće, tehnološke i funkcionalne.

U opće kriterije pripadaju točna taksonomska identifikacija, ljudsko podrijetlo, netoksičnost i nepatogenost, genetička stabilnost, te otpornost prema žučnim kiselinama i niskim pH vrijednostima (Frece i sur., 2010).

Za procjenu sigurnosti neophodna je ispravna taksonomska identifikacija koja omogućuje povezivanje sa srodnim vrstama, može dati informacije o tehnološkim karakteristikama, a nepovoljna identifikacija utječe na povjerenje kod potrošača. Identifikacija se posljednjih godina temelji na proučavanju sekvenci, posebice 16S rRNA gena, a ova metoda može se kombinirati s biokemijskim metodama kao što su katalaza, nitrat-reduktaza i ureaza testovi (Coeuret i sur., 2004; Sanders i sur., 2010). Identifikacija na razini soja moguća je pomoću gel elektroforeze u pulsirajućem polju. Preporučeno je dodijeliti ime probioticima prema međunarodnoj nomenklaturi kako bi se osiguralo razumijevanje (FAO/WHO, 2001). Poželjno je da sojevi koji se koriste kod ljudi imaju i ljudsko podrijetlo, odnosno da su izolirani iz ljudskog i zdravog gastrointestinalnog trakta. Razlog tome je što probiotički soj može bolje funkcionirati u sličnom okruženju iz kojeg je izoliran (Saarela i sur., 2000). Da bi se ispitala netoksičnost i nepatogenost WHO je predložila niz testova kojima se provjerava proizvodnja toksina, metabolička aktivnost te hemolitički potencijal (Sotoudegan i sur., 2019). Neki od mikroorganizama koji ne zadovoljavaju navedeni kriterij su bakterije roda *Enterococcus* koje mogu uzrokovati bolesti kao što su endokarditis, bakterijemija, te infekcije abdominalnog,

mokraćnog i središnjeg živčanog sustava. Također, za bakterije roda *Bacillus*, posebice *B. cereus* je poznato da proizvode enterotoksine (Anadón i sur., 2016). Sljedeći opći kriterij govori da probiotici ne smiju posjedovati gene koji omogućuju rezistenciju na antibiotike te su prenosivi. Neki *Lactobacillus* sojevi pokazuju široki raspon otpornosti na antibiotike, ali u većini slučajeva ta otpornost nije prenosivog tipa pa zadovoljavaju navedeni kriterij (Saarela i sur., 2000). Za razliku od *Lactobacillus* roda, bakterije roda *Enterococcus*, koji također spada u BMK, pokazuje visoku otpornost na vankomicin, te tu otpornost može prenijeti na druge mikroorganizme i na taj način omogućiti patogene pojave kod domaćina (FAO/WHO, 2001). S obzirom na nepovoljne uvjete koji se nalaze u ljudskom gastrointestinalnom traktu, probiotici, da bi bili djelotvorni, moraju posjedovati otpornost na kiseli medij i žučne kiseline. Osim toga, hrana koja uključuje probiotike su većinom fermentirani mliječni proizvodi niske pH vrijednosti u kojima također moraju pokazati održivost. Za procjenu tolerancije na kiselost i žučne soli mogu se koristiti *in vitro* i složeniji *in vivo* testovi (Tuomola i sur., 2001). Nakon gutanja, probiotičke bakterije se suočavaju s antimikrobnim čimbenicima u želucu (niski pH, želučani sok i pepsin) i u crijevima (pankreatin i žučne soli). Otpornost na spomenute uvjete varira među sojevima. Primjerice, *Lactobacillus* sojevi su općenito otporni, dok su bifidobakterije osjetljive na niski pH. Općenito, pH vrijednosti od 2 do 5, te koncentracija žučnih soli od 0,3 do 2 % smatraju se kritičnim za odabir probiotičkih mikroorganizama, a u svrhu određivanja otpornosti na ove uvjete provode se ispitivanja u simuliranim uvjetima (De Melo Pereira i sur., 2018). Da bi probiotici bili djelotvorni u ljudskom gastrointestinalnom traktu, osim otpornosti na nepovoljne uvjete moraju posjedovati sposobnost stvaranja biofilma. Donlan i Costerton (2002) su biofilm definirali kao mikrobnu sesilnu zajednicu sastavljenu od stanica koje su ireverzibilno vezane na supstrat, određenu podlogu ili međusobno jedna na drugu. Osnovna karakteristika biofilma je stvaranje izvanstanične polisaharidne matrice koja pomaže u osiguravanju zaštite od antibiotika i enzima. Formiranje biofilma kao svojstvo probiotičkih bakterija poželjno je jer omogućuje olakšanu kolonizaciju i dulju postojanost u domaćinu, te inhibira kolonizaciju patogenih bakterija.

U tehnološke kriterije spadaju stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke, visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu, brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljenja za vrijeme čuvanja i distribucije. U konačnosti, potrebno je dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese (Frece i sur., 2010).

Pozitivno djelovanje probiotika ovisi o broju održivih i aktivnih stanica, stoga je neophodno osigurati visoku stopu preživljenja probiotičkih mikroorganizama tijekom proizvodnje (Mattila-Sandholm i sur., 2002). Tijekom fermentacije je poželjno održavanje temperature koja omogućuje rast i razmnožavanje bakterija, a optimalne vrijednosti za većinu BMK iznose od 37 do 43 °C. Pri odabiru probiotika, važno je pridati pažnju otpornosti BMK na procesne stresove. Do oštećenja stanica može doći tijekom smrzavanja uslijed stvaranja kristala leda i odmrzavanja uslijed osmotskih naprezanja. Također, potrebno je odabrati optimalan način sušenja. Sušenje raspršivanjem je ekonomičnije, ali rezultira manjom održivosti stanica, dok je sušenje smrzavanjem skuplje, ali preživljenje stanica je veće. U svrhu dodatnog povećanja stabilnosti, dodaju se zaštitna sredstva kao što su laktoza, saharoza, mononatrijev glutamat, askorbat, glicerol, betain, te razni polimeri u mliječnu ili vodenu bazu. Koje sredstvo će se dodati ovisi o probiotičkoj kulturi (Mattila-Sandholm i sur., 2002). Mnogi smatraju da mikroinkapsulacija može poboljšati preživljavanje probiotika tijekom procesiranja i skladištenja proizvoda, kao i tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Tijekom skladištenja, na održivost probiotika mogu utjecati ostali sastojci hrane, vrsta ambalažnog materijala i njegova propusnost plinova i svjetlosti, te uvjeti u skladišnom prostoru kao što su količina kisika koji nepovoljno utječe na rast i preživljavanje probiotičkih bakterija, količina vlage i temperatura. U jednom ispitivanju preživljenja *L. plantarum* u prisustvu ugljikohidrata, sorbitol se pokazao kao najučinkovitije zaštitno sredstvo tijekom skladištenja (Linders i sur., 1997; i Giri, 2014). U konačnici, cilj je dobivanje željenih organoleptičkih svojstava u fermentiranim proizvodima. Usporen rast probiotičkih mikroorganizama može biti uzrok nepoželjnih aroma, pa se probiotičke kulture kombiniraju s drugim bakterijama – starter kulturama pogodnima za fermentaciju. Interakcija između probiotika i startera može rezultirati poboljšanom kvalitetom i senzorskim svojstvima (FAO/WHO, 2001; Mattila-Sandholm i sur., 2002; Frece i sur., 2010).

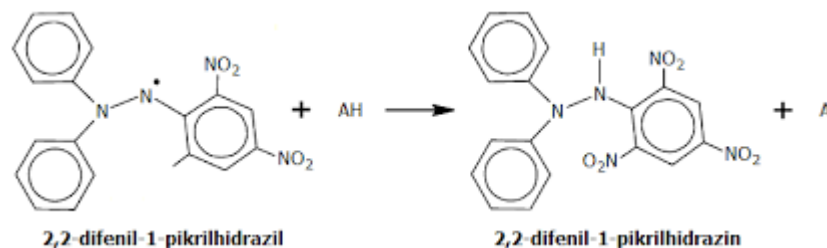
U funkcionalne kriterije spadaju sposobnost preživljenja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u organizmu, sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela, proizvodnje antimikrobnih tvari, antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama, mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore, otpornost prema antimikrobnim tvarima koje proizvodi crijevna mikroflora, imunostimulacijski učinak te pozitivan učinak na zdravlje.

Sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela potrebna je kod probiotika jer se u tom slučaju dulje zadržavaju u gastrointestinalnom traktu i veća je mogućnost njihovog pozitivnog djelovanja. Osim toga, ako probiotici pokazuju veću sposobnost adhezije, u kompeticiji s patogenim bakterijama ih mogu kompetitivno isključiti (Saarela i sur., 2000). Adhezija je

povezana sa sposobnošću autoagregacije i hidrofobnim svojstvima površine stanica. Sposobnost autoagregacije osigurava veliku gustoću stanica u crijevima. Sljedeći funkcionalni kriterij navodi da probiotici moraju imati antagonističku aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama. Probiotici, kad se vežu na epitelne stanice crijeva, proizvode antimikrobne komponente koje inaktiviraju ili inhibiraju patogene bakterije kao što su organske kiseline, enzimi, vodikov peroksid, bakteriocini i peptidi niske molekulske mase. Drugi mehanizam kojim probiotici inhibiraju patogene je njihova međusobna kompeticija za hranjivim tvarima i vezanjem na površinu crijevnog epitela (De Melo Pereira i sur., 2018). Stoga je potrebno da probiotik ima jedno ili više klinički dokumentarnih korisnih učinaka na zdravlje. Bakterije mogu djelovati antikancerogeno i antimutageno, a navedena svojstva prisutna su kod BMK roda *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Pediococcus* koje su izolirane iz fermentiranih mliječnih i nemliječnih proizvoda, a dokazana su na životinjskim modelima (Saarela i sur., 2000). Također, Ooi i Liong (2010) povezali su probiotike s prevencijom srčanih bolesti zbog sposobnosti smanjenja razine kolesterola. Probiotici mogu potisnuti povećanje tjelesne mase, pozitivno djelovati na dijabetes i djelovati imunostimulirajuće. Također, mogu izlučivati funkcionalne molekule uključujući antioksidanse, enzime, kratkolančane masne kiseline, peptide, esencijalne vitamine i minerale. Antioksidacijski spojevi koje proizvode su superoksid dismutaza, glutation dismutaza, askorbinska kiselina, melatonin i glutation (De Melo Pereira i sur., 2018).

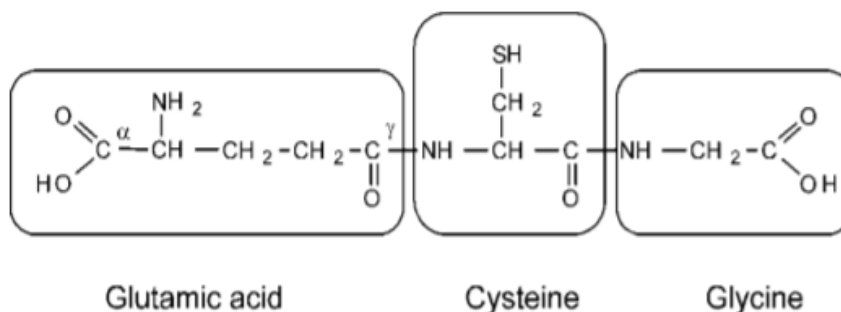
Antioksidansi su molekule koje neutraliziraju štetne slobodne radikale, te na taj način usporavaju lančane reakcije koje oni uzrokuju, sprječavaju nastanak bolesti koje su posljedica oksidacijskog stresa i štite organizam od štetnog djelovanja prooksidansa (Huang i sur., 2005).

Jedna od najviše korištenih metoda ispitivanja antioksidacijskog kapaciteta jest pomoću DPPH radikala, a temelji se na njegovoj redukciji od strane antioksidansa. DPPH je 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, stabilan organski dušikov radikal ljubičaste boje čija je struktura prikazana na slici 1. Kad se otopina DPPH radikala pomiješa s antioksidacijskim ili reducirajućim tvarima, prelazi iz ljubičaste u žutu boju odgovarajućeg hidrazina. Sposobnost redukcije antioksidansa se može procijeniti praćenjem apsorbancije. Ova metoda je vrlo jednostavna i brza što je i razlog njene široke primjene, a može se koristiti za tekuće i krute uzorke. Nije specifična za određenu vrstu antioksidansa, već određuje ukupni antioksidacijski kapacitet (Pyrzynska i Pekal, 2013; Goujot i sur., 2018).



Slika 1. Kemijska struktura DPPH radikala (Pyrzynska i Pekal, 2013)

Antioksidacijskim spojevima pripada i glutation (GSH) koji je najzastupljeniji tiol niske molekulske mase pronađen u gotovo svim eukariotskim organizmima, a prisutan je samo u nekim bakterijskim rodovima, uglavnom Gram-negativnim bakterijama. Kemijski je tripeptid glutamata, cisteina i glicina, a struktura je prikazana na slici 2. Antioksidacijska aktivnost izražena je zbog prisutnosti sulfhidrilne skupine u cisteinu koja može poslužiti kao donor elektrona (Ferguson i Bridge, 2019). U organizmima se nalazi u dva osnovna oblika. Monomerni glutation (GSH) predstavlja reducirani oblik, dok se dimerni oksidirani oblik naziva glutation disulfid (GSSG). Omjer GSSG/GSH je pokazatelj oksidacijskog stresa. U fiziološkim uvjetima GSH oblik je prisutan u koncentraciji 10 do 100 puta većoj nego GSSG oblik, a u uvjetima oksidacijskog stresa, GSH se pretvara u GSSG uslijed njihove reakcije sa slobodnim radikalima i reaktivnim spojevima s kisikom (H_2O_2 , O_2^- , OH^-). γ -peptidna veza između glutamata i cisteina omogućuje glutationu stabilnost s obzirom na to da ju većina peptidaza ne može hidrolizirati. Sinteza i razgradnja glutationa odvija se u okviru γ -glutamil ciklusa u citosolu iz kojeg se kasnije dovodi do drugih organela. Osim što djeluje kao antioksidans, služi i kao detoksikacijsko sredstvo ksenobiotika, može djelovati kao kofaktor antioksidacijskih enzima, uključen je u popravak DNA, te održava razinu cisteina (Bansal i Simon, 2018).



Slika 2. Struktura reduciranog oblika glutationa (Van Haaften i sur., 2003)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu korištena su dva soja BMK *Lactobacillus plantarum* KO9 i *Lactobacillus plantarum* M2. Korišteni sojevi pohranjeni su u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizama

Za uzgoj bakterijskih kultura korištena je MRS (de Man, Rogosa i Sharpe, Biolife, Milano, Italija) tekuća hranjiva podloga koja se primjenjuje za uzgoj bakterija iz roda *Lactobacillus*. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sastav je prikazan u tablici 1.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge

sastojci	količina (g/L destilirane vode)
pepton	10
mesni ekstrakt	10
kvašćev ekstrakt	5
glukoza	20
Tween 80	1
MgSO₄ x 7H₂O	0,1
MnSO₄ x 7H₂O	0,05
natrijev acetat	5
agar	20

3.1.3. Aparatura i pribor

- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vibromješač EV-102 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- brojač kolonija BZG 30 (WTW, Weilheim, Njemačka)
- termostat (Sutjeska, Beograd, Jugoslavija)
- tehnička vaga (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- analitička vaga (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- pH metar (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- spektrofotometar Helios ϵ (Thermo Electron, Waltham, Massachusetts, SAD)
- staklene kuglice, promjer 0,40-0,60 mm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- polistirenska mikrotitarska pločica (Falcon, Amsterdam, Nizozemska)

3.1.4. Kemikalije

- pepsin (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- klorovodična kiselina (Carlo Erba, Cornaredo, Italija)
- pankreatin (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- žučne soli (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev klorid (J.T.Baker, Gliwice, Poljska)
- natrijev hidroksid (Carlo Erba, Cornaredo, Italija)
- etanolna otopina DPPH radikala (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- DTNB (Merck KgaA, Darmstadt, Njemačka)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- metanol (Carlo Erba, Cornaredo, Italija)
- kristal violet (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina (J.T.Baker, Gliwice, Poljska)
- PBS (phosphate-buffered saline – fiziološka otopina s fosfatnim puferom)
- krvni agar Columbia (Biolife, Milano, Italija)

3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj mikroorganizama

Uzgoj odabranih sojeva mikroorganizama, *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9, proveden je sterilnim naciepljivanjem u 5 mL tekuće MRS podloge, homogeniziranjem na vibromješaču i inkubiranjem kroz 24 sata na 37 °C.

3.2.2. Priprema bakterijske suspenzije

Nakon inkubacije, podloge s poraslim mikroorganizmima su homogenizirane na vibromješaču, prebačene u kivete za centrifugiranje i centrifugirane 10 minuta na 6000 rpm. Dobiveni supernatant je uklonjen, a istaložena biomasa resuspendirana u 10 mL 0,5 % sterilne fiziološke otopine. Korak centrifugiranja i ispiranja biomase ponovljen je još jednom, te se dvostruko isprana biomasa resuspendirala u 10 mL 0,5 % sterilne fiziološke otopine.

3.2.3. Određivanje broja BMK u suspenziji

Broj bakterijskih stanica u dobivenoj suspenziji određen je indirektnom metodom brojanja poraslih kolonija. Pripremljena je serija decimalnih razrjeđenja suspenzija u omjeru 1:10, a po 100 µL suspenzije naciepljeno je na MRS agar u pločama. Nakon inkubacije naciepljenih podloga (24 sata na 37 °C) je pomoću brojača kolonija određen broj poraslih kolonija BMK, te izračunata CFU (Colony Forming Units) vrijednost prema jednadžbi [1] (Priručnik, 2016).

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrijebljenog uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad [1]$$

3.2.4. Preživljenje odabranih sojeva BMK u simuliranom soku želuca

Simulirani sok želuca pripremljen je dodatkom pepsina (3 g/L) i podešavanjem pH pomoću klorovodične kiseline. Pripremljene su 4 različite pH vrijednosti: 1,5; 2,0; 2,5 i 3,0. U 3 mL pripremljenog simuliranog soka želuca dodano je 1,5 mL suspenzije stanica BMK i izvršena je inkubacija 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, određen je broj živih BMK indirektnom metodom, kao u postupku 3.2.3. i izražen kao CFU vrijednost prema jednadžbi [1].

3.2.5. Određivanje broja MO u simuliranom soku tankog crijeva

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) i žučnih soli (1,5 i 3 mg/mL guste žuči) u 0,5 % otopini NaCl. Ph vrijednost podešena je pomoću natrijevog hidroksida na vrijednost 8. U 3 mL pripremljenog simuliranog soka tankog crijeva dodano je 1,5 mL suspenzije stanica BMK i izvršena je inkubacija 3,5 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, određen je broj živih BMK indirektnom metodom, kao u postupku 3.2.3. i izražen kao CFU vrijednost prema jednadžbi [1].

3.2.6. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala

U 1 mL pripremljene suspenzije stanica BMK ($10^9 - 10^{10}$ CFU) dodano je 2 mL etanolne otopine DPPH radikala (0,05 mM). Otopina je homogenizirana i prebačena na inkubaciju u mraku na sobnoj temperaturi sat vremena. Uzorak je centrifugiran 10 minuta na 6000 rpm, nakon čega je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 517 nm. Slijepu probu čine 1 mL deionizirane vode i 2 mL etanola, dok kontrole uključuju 1 mL deionizirane vode i 2 mL etanolne otopine DPPH. Preostali DPPH (% inhibicije) izračunat je prema jednadžbi [2].

$$\text{aktivnost uklanjanja DPPH radikala (\%)} = \left(1 - \frac{A(\text{uzorak}) - A(\text{slijepa proba})}{A(\text{kontrola})} \right) \times 100 \quad [2]$$

3.2.7. Priprema unutarstaničnog sadržaja sojeva BMK

U svrhu izdvajanja unutarstaničnog sadržaja iz stanica BMK, u pripremljenu i homogeniziranu suspenziju stanica dodane su staklene kuglice (Sartorius, Göttingen, Njemačka) u omjeru 1:1 koje služe za mehaničko razbijanje stanica. Dobiveni sadržaj naizmjenično je izmiješan i hlađen u trajanju od 1 minute, a postupak je ponovljen 5 puta. U konačnici je razbijeni sadržaj odvojen od staklenih kuglica, te centrifugiran 10 minuta na 9000 rpm.

3.2.8. Određivanje ukupne koncentracije glutaciona

Za određivanje ukupne unutarstanične koncentracije glutaciona (GSH) korišten je DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), poznat pod nazivom Ellmanov reagens koji služi za kolorimetrijsko određivanje tiolnih skupina u biološkim uzorcima.

Pripremljen je Na-fosfatni pufer (0,3 M), pH vrijednosti 4,7; miješanjem 10,744 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i 4,68 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ u 100 mL destilirane vode. U 10 mL pripremljenog pufera

dodano je 0,0396 g DTNB-a, a dobivena otopina je razrijeđena 10 puta tako da je konačna koncentracija iznosila 10 mmol/L.

1000 µL supernatanta dobivenog razbijanjem stanica se pomiješalo s 200 µL 10 mM DTNB-a, te je odmah spektrofotometrijski izmjerena optička gustoća uzorka na valnoj duljini od 412 nm. Slijepu probu umjesto uzorka čini 1000 µL vode i 200 µL DTNB. Na temelju apsorbancije indirektno je dobiven podatak o koncentraciji, koja se izračuna prema jednadžbi [3].

$$c = \frac{A}{\epsilon} \quad [3]$$

gdje je:

c = koncentracija GSH u uzorku

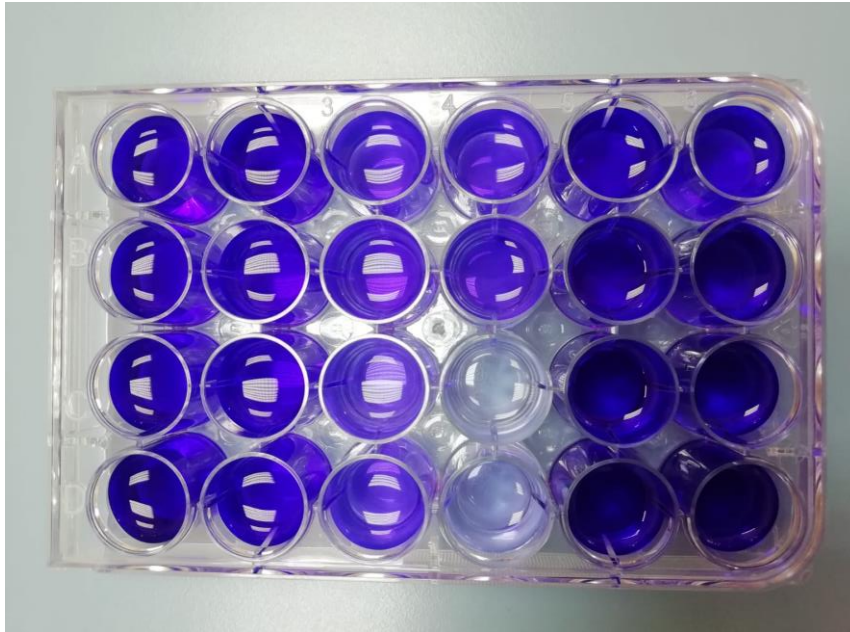
A = apsorbancija na 412 nm

$\epsilon = 14,10 \cdot 10^3 / \text{M cm}$

3.2.9. Kvantifikacija biofilma

U svrhu određivanja formiranja biofilma korištena je polistirenska mikrotitarska pločica s 24 jažice. U svaku jažicu stavljeno je 2 mL tekuće i sterilne MRS podloge i 100 µL pripremljene suspenzije stanica BMK. Pločica s mikroorganizmima inkubirana je 48 sati na 30 °C u aerobnim uvjetima.

Nakon 48 sati uklonjen je supernatant, a talog ispran s 2 mL sterilne vode uz blago miješanje. Preostale stanice su fiksirane dodatkom 2 mL metanola koji je nakon 15 minuta uklonjen. Nakon toga je u osušene jažice dodano 2 mL 1 % kristal violeta koji je zadržan na sobnoj temperaturi 5 minuta. Jažice su potom isprane pod mlazom vode, a boja je otpuštena pomoću 2 mL 33 % octene kiseline. Sadržaj u jažicama je homogeniziran, te je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija na 595 nm.



Slika 3. Polistirenska mikrotitarska pločica s 24 jažice u ispitivanju kvantifikacije biofilma

3.2.10. Autoagregacija

4 mL pripremljene suspenzije stanica BMK (10^8 CFU) je homogenizirano na vibromješaču, te inkubirano na sobnoj temperaturi 24 sata. Na početku, te nakon 1, 2, 4 i 24 sata izdvojeno je 0,1 mL gornjeg dijela suspenzije i dodano u 3,9 mL PBS-a. Nakon toga je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija na 600 nm, a postotak autoagregacije određen je jednačbom [4].

$$\text{autoagregacija (\%)} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100 \quad [4]$$

gdje je:

A_t = vrijednost apsorbancije nakon 1, 2, 4 i 24 sata

A_0 = vrijednost apsorbancije na početku ($t=0$)

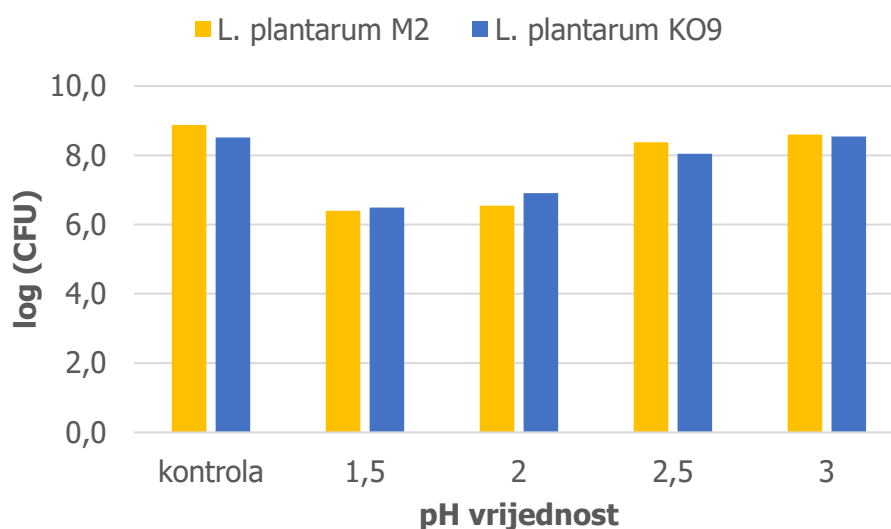
3.2.11. Hemolitička aktivnost BMK

Na Columbia krvni agar naciepljene su pripremljene suspenzije BMK i inkubirane 48 sati na 37 °C. Nakon inkubacije određena je prisutnost zona. Ako je prisutna beta ili potpuna hemoliza, tj. ako odabrani sojevi BMK imaju sposobnost potpune razgradnje hemoglobina, nastat će

prozirna zona oko kolonija. Zelenkasta zona oko kolonije upućuje na alfa ili nepotpunu hemolizu, a normalni izgled krvnog agara bez zona upućuje na gama hemolizu (Halder i sur., 2017).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je djelomična probiotička karakterizacija dvaju sojeva BMK: *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9. Određeno je njihovo preživljenje u uvjetima želuca i tankog crijeva, te antioksidativni potencijal preko sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala i ukupne unutarstanične koncentracije glutaciona. Također, određena je sposobnost formiranja biofilma, sposobnost autoagregacije te hemolitička aktivnost. Svi dobiveni rezultati prikazani su na slikama 4-10.



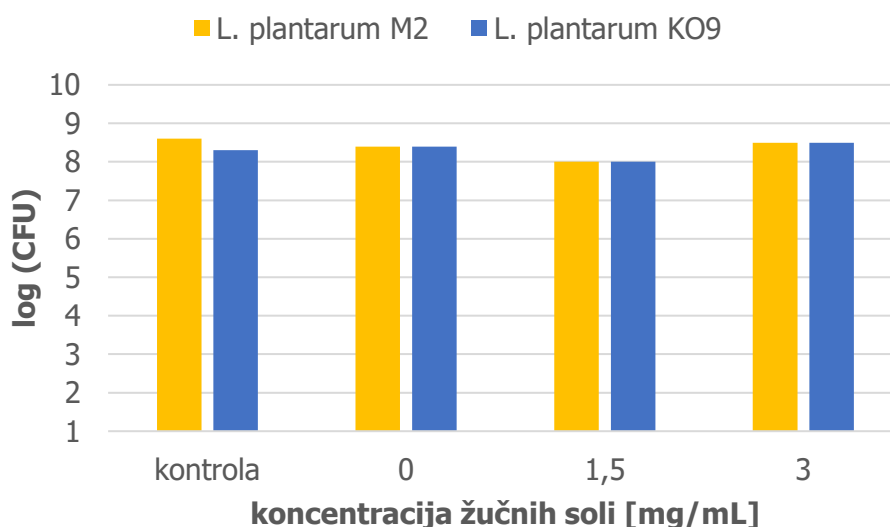
Slika 4. Preživljenje odabranih sojeva BMK u simuliranom soku želuca tijekom 2 h pri različitim pH vrijednostima

Kod zdravih ljudi pH vrijednosti želuca iznose 2 - 2,5, te selekcijski kriteriji navode da probiotičke bakterije moraju pokazati sposobnost preživljenja kod pH vrijednosti 2-5. Smatra se da je vrijeme od 90 minuta dovoljno da bakterije unesene u organizam prođu kroz želudac i dostignu mjesto djelovanja u crijevima. Stoga je sveukupno potrebno da probiotičke bakterije pokazuju preživljenje u kiselom mediju pH vrijednosti 2 u trajanju od 90 minuta (Fernández i sur., 2003).

Prema dobivenim rezultatima prikazanim na slici 4, vidljivo je da sojevi *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 pokazuju sličan stupanj preživljenja u simuliranom soku želuca. Uspoređujući broj stanica pri pH 2 kao graničnoj vrijednosti pri kojoj probiotici moraju biti održivi, s početnim brojem, vidljivo je da se taj broj smanjio za oko 2 log jedinice, tj. za oko 20 % kod oba soja što upućuje na visoki stupanj tolerancije u kiselom mediju. Što je pH viši, preživljenje je veće

te u konačnici pri pH 3 ono iznosi više od 95 % u odnosu na početni broj kod oba soja. Uspoređujući navedena dva soja međusobno u odnosu na kontrolne uzorke, tj. njihove početne log (CFU) vrijednosti, vidljivo je da *L. plantarum* KO9 ima veći postotak preživljenja u svim uvjetima simuliranog soka želuca od soja *L. plantarum* M2.

U istraživanju Kaushik i sur. (2009) je vrijednost log (CFU), nakon 2 sata pri 37 °C, kod pH 1,5 iznosila 7,3, a kod pH 2 iznosila je 8,4. Stoga je utvrđeno da je stupanj preživljenja niži što je niži pH, ali da ipak postoji tolerancija *L. plantarum* sojeva na kisele uvjete koji prevladavaju u želucu. Isto vrijedi za sojeve *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 prema dobivenim rezultatima.

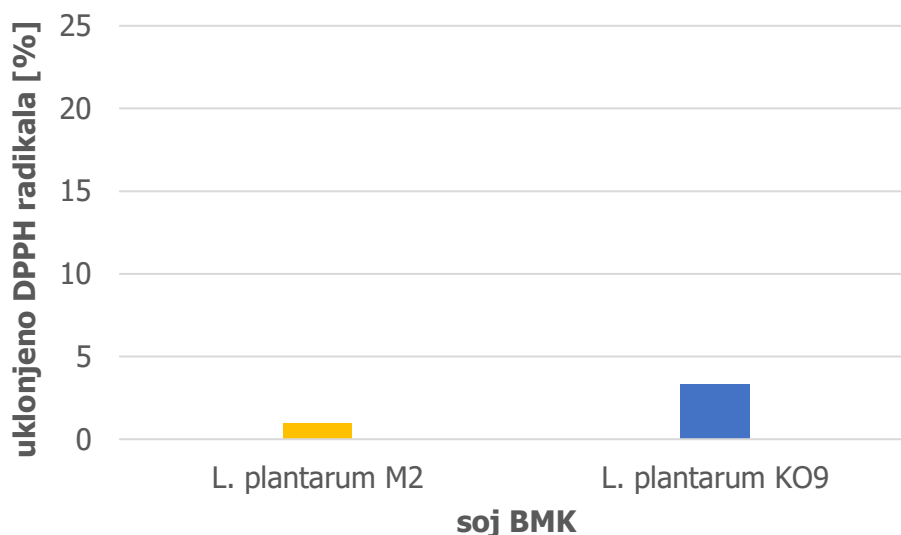


Slika 5. Preživljenje odabranih sojeva BMK u simuliranom soku tankog crijeva tijekom 3,5 h pri različitim koncentracijama žučne soli

Iz slike 5 vidljivo je da oba soja BMK pokazuju sličan stupanj preživljenja i u uvjetima simuliranog soka tankog crijeva. Preživljenje sojeva *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 se u različitim koncentracijama žučnih soli pretjerano ne razlikuje, te izmjeren log (CFU) kod svih ispitanih uvjeta za oba soja iznosi 8,0 – 8,5. Najveći stupanj preživljenja izmjeren je kod koncentracije 3 mg/mL žučnih soli. Uspoređujući navedena dva soja međusobno u odnosu na kontrolne uzorke, tj. njihove početne log (CFU) vrijednosti, vidljivo je da *L. plantarum* KO9 ima veći postotak preživljenja u svim uvjetima simuliranog soka tankog crijeva od soja *L. plantarum* M2.

Zago i sur. (2011) ispitali su održivost raznih sojeva *L. plantarum* u prisustvu žučnih soli i tvrde da oni posjeduju sposobnost rasta u takvim uvjetima. Isto vrijedi i za sojeve *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 prema dobivenim rezultatima.

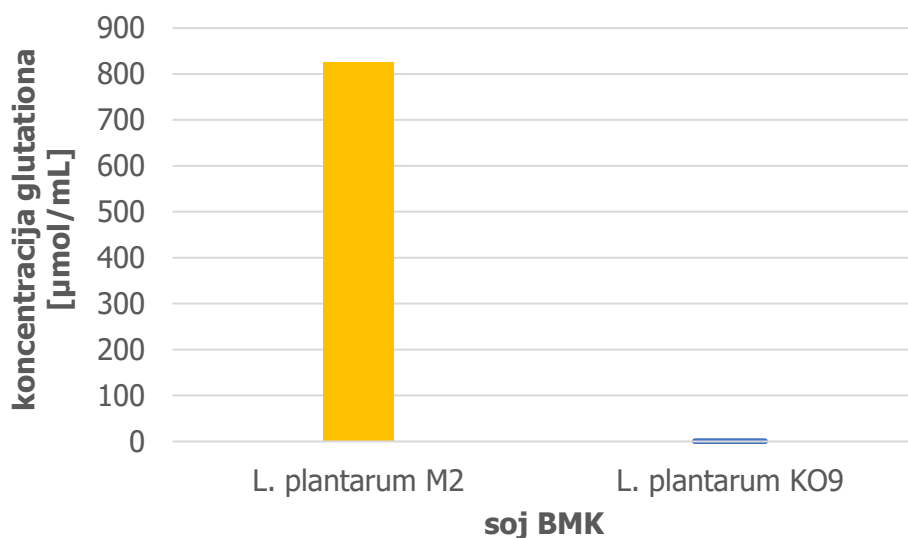
Fiziološka koncentracija žučnih soli kod ljudi iznosi 0,3-0,5 %, tj. 3-5 mg/mL (Fontana i sur., 2013). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da oba ispitana soja imaju sposobnost preživljenja i rasta u uvjetima 3 mg/mL žučnih soli.



Slika 6. Postotak uklonjenog DPPH slobodnog radikala kod odabranih sojeva BMK

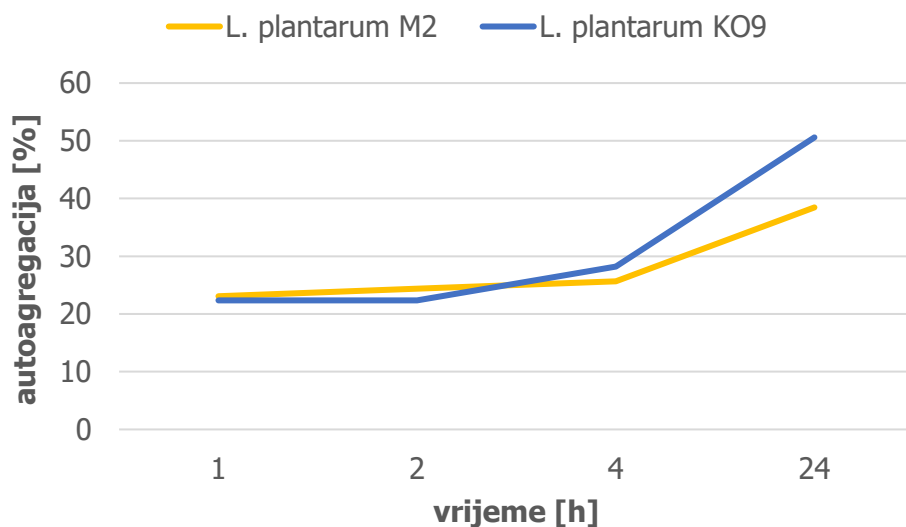
Iz dobivenih rezultata prikazanih na slici 6, vidljivo je da soj *L. plantarum* KO9 ima veću sposobnost, odnosno veći postotak uklonjenog DPPH slobodnog radikala, te on iznosi 3,30 %, dok kod *L. plantarum* M2 iznosi 0,99 %. CFU vrijednost suspenzije stanica *L. plantarum* M2 iznosi $1,6 \times 10^9$ st/mL, a vrijednost za *L. plantarum* KO9 iznosi $1,2 \times 10^9$.

Li i sur. u istraživanju 2012. godine izmjerili su antioksidativni kapacitet određivanjem sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala različitih sojeva *L. plantarum*, početnog broja 10^9 st/mL. Korištena je 0,05 mM etanolna otopina DPPH u volumenu dvostruko većem od suspenzije stanica. Rezultati tog istraživanja pokazuju da je postotak uklonjenog DPPH radikala ispitivanih sojeva oko 10 %, te da u toj količini nemaju veliki antioksidativni kapacitet. Suspenzije stanica (oko 10^9 st/mL) *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 također pokazuju mali antioksidativni kapacitet.



Slika 7. Unutarstanična koncentracija glutationa kod odabranih sojeva BMK

Dobiveni rezultati mjerenja ukupne unutarstanične koncentracije glutationa prikazani su slikom 7, te je vidljivo da je ona znatno veća kod soja *L. plantarum* M2 i iznosi 826,75 µmol/mL, a kod *L. plantarum* KO9 iznosi 0,02 µmol/mL.



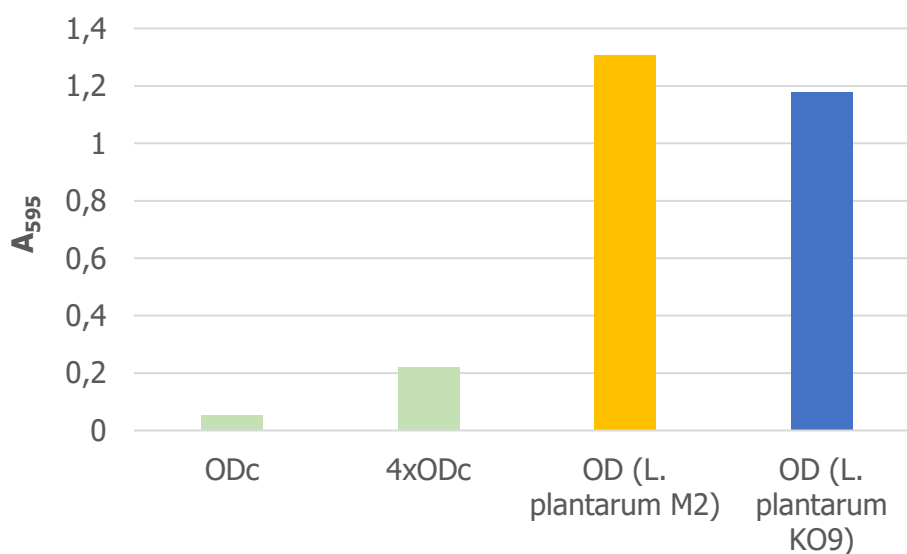
Slika 8. Autoagregacija odabranih sojeva BMK kroz 24 sata

Autoagregacija je nakupljanje bakterija koje pripadaju istom soju, te je bitno svojstvo probiotičkih bakterija. Autoagregacija je povezana s adhezijom na epitelne crijevne stanice koja je preduvjet za kolonizaciju i povećanu održivost u gastrointestinalnom sustavu. Kolonizacija i postojanost probiotičkih bakterija potrebna je jer se u takvom obliku dulje

zadržavaju i veća je mogućnost njihovog pozitivnog djelovanja na zdravlje domaćina (Janković i sur., 2012).

Rezultati dobiveni praćenjem autoagregacije kroz 24 sata prikazani su na slici 8. Oba soja BMK pokazuju slične vrijednosti do 4 sata. Poslije 4 sata slijedi veći porast autoagregacije koji je izraženiji kod soja *L. plantarum* KO9, te nakon 24 sata iznosi 50,59 %, dok kod *L. plantarum* M2 iznosi 38,46 %.

Slični rezultati dobiveni su u istraživanju García-Cayuela i sur. (2014) *Lactobacillus* sojeva. Mjerenje je u tom istraživanju također provedeno kroz 24 sata, te je pokazano da postotak autoagregacije kod svih *Lactobacillus* sojeva, uključujući i sojeve *L. plantarum*, raste, a vrijednosti nakon 24 sata iznose 30 – 60 %. To se poklapa s rezultatima dobivenim za sojeve *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9.



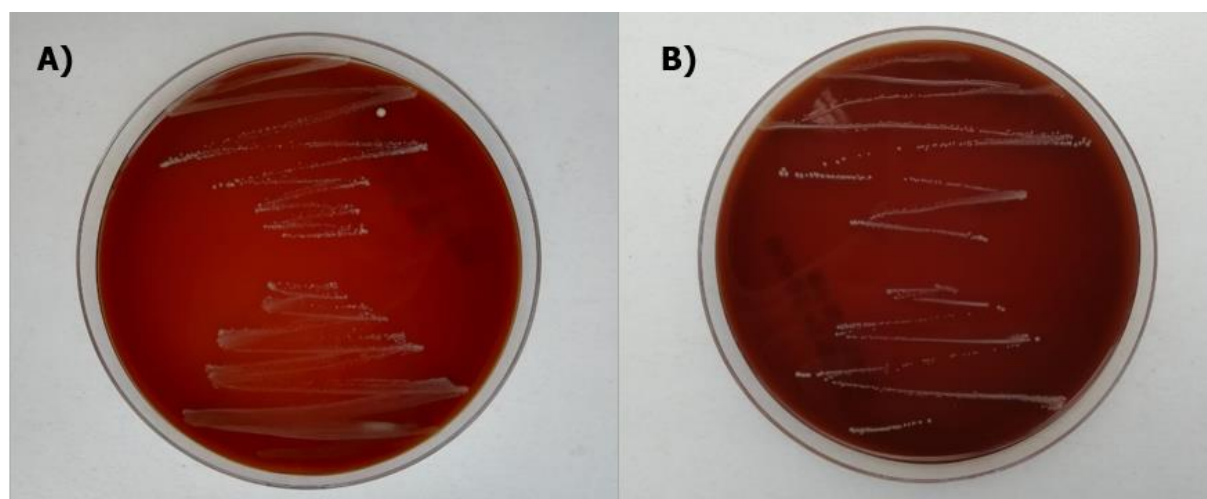
Slika 9. Kvantifikacija biofilma sojeva *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 nakon 48 h inkubacije

Tablica 2. Prikaz kriterija za određivanje jakosti produkcije biofilma (Extremina i sur., 2011)

OD < ODc	ne produciraju biofilm
ODc < OD ≤ 2 x ODc	slabo produciraju biofilm
2 x ODc < OD ≤ 4 x ODc	umjereno produciraju biofilm
4 x ODc < OD	jako produciraju biofilm

Tablica 2 prikazuje kriterije za određivanje jakosti produkcije biofilma gdje OD (optical density) označava srednju vrijednost dobivenu mjerenjem apsorbancije na 595 nm. ODc (optical density cutt-off) je granična vrijednost produkcije biofilma. Na temelju dobivenih rezultata prikazanim na slici 9 vidljivo je da sojevi *L.plantarum* M2 i *L.plantarum* KO9 spadaju u jake producente biofilma jer su njihove OD vrijednosti veće od 4 x ODc. OD za *L.plantarum* M2 iznosi 1,308, a OD za *L.plantarum* KO9 iznosi 1,178.

Ispitivanjima je utvrđeno da samo neki sojevi roda *Lactobacillus* imaju tu sposobnost. Primjerice, u istraživanju Kubota i sur. (2008) proučavan je soj *L. plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149, te je utvrđena njegova sposobnost stvaranja biofilma i da je u tom obliku otporniji na octenu kiselinu i etanol (Salas-Jara i sur., 2016).



Slika 10. A) *L. plantarum* M2 i **B)** *L. plantarum* KO9 na krvnom agaru nakon 48 h inkubacije pri 37°C u ispitivanju hemolitičke aktivnosti

Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C na krvnom agaru nije bilo vidljivih bistrih ni zelenih zona oko kolonija dvaju ispitivanih soja. Isto je dobiveno u istraživanju Halder i sur. (2017) koji su odsutnost hemolitičke aktivnosti osim kod soja *Lactobacillus plantarum* pokazali i na nekoliko drugih sojeva bakterija roda *Lactobacillus*.

5. ZAKLJUČAK

Provedena je djelomična probiotička karakterizacija dvaju sojeva BMK: *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti sljedeće:

1. Oba ispitana soja BMK pokazuju visoko preživljenje u simuliranim uvjetima želuca. Preživljenje *L. plantarum* M2 kod pH 2 je 74 %, a preživljenje *L. plantarum* KO9 je veće i iznosi 81 %. Preživljenje oba soja kod pH 2,5 je vrlo visoko i iznosi 94 %. Ispitivanje se provelo u trajanju od 120 minuta, iako je 90 minuta dovoljno da bakterije prođu želudac.
2. Ispitani sojevi imaju sposobnost preživljenja, ali i rasta u prisustvu žučnih soli. Sposobnost rasta zabilježena je kod koncentracije 3 mg/mL žučnih soli što je ujedno i fiziološka koncentracija žučnih soli kod ljudi.
3. Antioksidativni kapacitet dobiven mjerenjem sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala veći je kod soja *L. plantarum* KO9 (3,30 %) nego kod *L. plantarum* M2 (0,99 %). Međutim, vrijednosti dobivene za oba ispitana soja male su što ukazuje na niski antioksidativni kapacitet.
4. *L. plantarum* M2 ima puno veću ukupnu unutarstaničnu koncentraciju glutaciona (826,75 $\mu\text{mol/mL}$) od soja *L. plantarum* KO9 (0,02 $\mu\text{mol/mL}$).
5. Oba ispitana soja imaju sposobnost autoagregacije koja se povećava kroz 24 sata. *L. plantarum* KO9 pokazuje veći postotak nakon 24 sata (50,59 %) u odnosu na *L. plantarum* M2 (38,46 %).
6. Oba ispitana soja su jaki producenti biofilma što se zaključuje iz vrijednosti dobivene mjerenjem apsorbancije na 595 nm koje su puno veće od vrijednosti 4 x ODc. OD za *L. plantarum* M2 je veća i iznosi 1,308, dok za *L. plantarum* KO9 iznosi 1,178.
7. *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 nemaju hemolitičku aktivnost.

6. POPIS LITERATURE

1. Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., Ares I., Martínez M.A. (2016) Probiotics: Safety and Toxicity Considerations. *Nutraceuticals* **55**: 777 – 798.
2. Angmo K., Kumari A., Savitri, Bhalla T.C. (2016) Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT – Food Science and Technology* **66**: 428 – 435.
3. Bansal A., Simon M.C. (2018) Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *The Journal of Cell Biology* **217(7)**: 2291 - 2298.
4. Carr F.J., Chill D., Maida N. (2002) The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* **28(4)**: 281 – 370.
5. Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P. (2004) In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of dairy research* **71(4)**: 451 – 460.
6. Corsetti A., Settanni L. (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res Int* **40**: 539–558.
7. De Melo Pereira G.V., de Oliveira Coelho B., Júnior A.I.M., Thomaz-Soccol V., Soccol C.R. (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances* **36(8)**: 2060 – 2076.
8. De Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., de Vos W.M. (2006) *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal* **16(9)**: 1018 – 1028.
9. Donlan R.M., Costerton J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* **15(2)**: 167 – 193.
10. Extremina C.I., Costa L., Aguiar A.I., Peixe L., Fonseca A.P. (2011) Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *Journal of Microbiological Methods* **84(2)**: 167 – 173.
11. FAO/WHO (2001) Health and nutrition properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations, WHO-World Health Organization, Geneva, Rim

12. Ferguson G.D., Bridge W.J. (2019) The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biology* **24**: 101171.
13. Fernández M.F., Boris S., Barbes C. (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 449 – 455.
14. Fontana L., Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Muñoz-Quezada S., Gil A. (2013) Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition* **109**: 35 – 50.
15. Frece, J., Čvek, D., Kovačević, D., Gobin, I. (2010) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz „slavonskog kulena“, kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso* **12**: 208 - 214.
16. Frece J., Kos B., Beganović J., Vuković S., Šušković J. (2005) In vivo testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21(8-9)**: 1401 – 1408.
17. Frece J., Kos B., Svetec I.K., Zgaga Z., Beganović J., Leboš A., Šušković J. (2009) Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *Journal of Dairy Research* **76(1)**: 98 – 104.
18. Garcíá-Cayuela T., Korany A.M., Bustos I., de Cadinanos L.P.G., Requena T., Peláez C., Martínez-Cuesta M.C. (2014) Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International* **57**: 44 – 50.
19. Goujot D., Cuvelier M.E., Soto P., Courtois F. (2019) A stoichio-kinetic model for a DPPH[•]-ferulic acid reaction. *Talanta* **196**: 284 – 292.
20. Halder D., Mandal M., Chatterjee S.S., Pal N.K., Mandal S. (2017) Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines* **5(4)**: 1 – 3.
21. Haller D., Colbus H., Gänzle M.G., Scherenbacher P., Bode C., Hammes W.P. (2001) Metabolic and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria in the Gastro-intestinal Ecosystem: A comparative *in vitro* Study between Bacteria of Intestinal and Fermented Food Origin. *Systematic and Applied Microbiology* **24(2)**: 218 – 226.
22. Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(6)**: 1841 – 1856.

23. Janković T., Frece J., Abram M., Gobin I. (2012) Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research* **6**: 19 – 24.
24. Kaushik J.K., Kumar A., Duary R.K., Mohanty A.K., Grover S., Batish V.K. (2009) Functional and Probiotic Attributes of an Indigenous Isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS ONE* **4(12)**: 1 – 11.
25. Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Turchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Klein Lankhorst R.M., Bron P.A., Hoffer S.M., Nierop Groot M.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M., Siezen R.J. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100(4)**: 1990 – 1995.
26. Kubota H., Senda S., Nomura N., Tokuda H., Uchiyama H. (2008) Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **106(4)**: 381 – 386.
27. Leroy F. & De Vuyst L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15(2)**: 67 – 68.
28. Linders L.J.M., Wolkers W.F., Hoekstra F.A., van 't Riet K. (1997) Effect of Added Carbohydrates on Membrane Phase Behavior and Survival of Dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology* **35(1)**: 31 – 40.
29. Li S., Zhao Y., Zgang L., Zhang X., Huang L., Li D., Niu C., Yang Z., Wang Q. (2012) Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry* **135(3)**: 1914 – 1919.
30. Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B., Koonin E., Pavlov A., Pavlova N., Karamychev V., Polouchine N., Shakhova V., Grigoriev I., Lou Y., Rohksar D., Lucas S., Huang K., Goodstein D. M., Hawkins T., Plengvidhya V., Welker D., Hughes J., Goh Y., Benson A., Baldwin K., Lee J. H., Díaz-Muñiz I., Dosti B., Smeianov V., Wechter W., Barabote R. Lorca, G. Altermann, E. Barrangou, R. Ganesan, B. Xie, Y., Rawsthorne H., Tamir D., Parker C., Breidt F., Broadbent J., Hutkins R., O'Sullivan D., Steele J., Unlu G., Saier M., Klaenhammer T., Richardson P., Kozyavkin S., Weimer B., Mills D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**:15611-15616.

31. Manzoor A., Tayyeb A. (2019) Functional probiotic attributes and gene encoding plantaricin among variant *Lactobacillus Plantarum* strains. *Microbial Pathogenesis* **131**: 22 – 32.
32. Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fondén R., Saarela M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* **12(2-3)**: 173 – 182.
33. Ooi L.G., Liong M.T. (2010) Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International journal of molecular sciences* **11(6)**: 2499 – 2522.
34. Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Sveučilišni udžbenik, D. Hajsig i F. Delaš (ur.), Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, 2016. str. 54-55.
35. Pyrzynska K., Pełkal A. (2013) Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods* **5**: 4228 – 4295.
36. Quigley E.M.M. (2018) Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **17(2)**: 333 – 344.
37. Rahmeh R., Akbar A., Kishk M., Al-Onaizi T., Al-Azmi A., Al-Shatti A., Shajan A., Al-Mutairi S., Akbar B. (2019) Distribution and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from raw camel milk. *New Microbes and New Infections* **30**: 100560.
38. Rajoka M.S.R., Mehwish H.M., Siddiq M., Haobin Z., Zhu J., Yan L., Shao D., Xu X., Shi J. (2017) Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT* **84**: 271 – 280.
39. Roberfroid M. (2007) Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition* **137(3)**: 830s – 837s.
40. Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* **84(3)**: 197 – 215.
41. Salas-Jara M.J., Ilabaca A., Vega M., Garcia A. (2016) Biofilm Forming *Lactobacillus*. New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* **4(3)**: 35.
42. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (2004) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3.izd., CRC Press. str. 1-5.

43. Sanders M.E., Akkermans L.M., Haller D., Hammerman C., Heimbach J.T., Hörmannspenger G., Huys G. (2010) Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes* **1(3)**: 164 – 185.
44. Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73(2)**: 361s – 364s.
45. Shah N.P. (2000) Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science* **83(4)**: 894 – 907.
46. Sotoudegan F., Daniali M., Hassani S., Nikfar S., Abdollahi M. (2019) Reappraisal of probiotics' safety in human. *Food and Chemical Toxicology* **129**: 22 – 29.
47. Šušković J., Kos B., Goreta J., Matošić Shaller. (2001) Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Synbiotic Effect. *Food technology and biotechnology* **39(3)**: 227 – 235.
48. Šušković J., Kos B., Matošić S. (1998) Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend?. *Mljekarstvo* **4(3)**: 165 – 176.
49. Tripathi M.K., Giri S.K. (2014) Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* **9**: 225 – 241.
50. Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S. (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73(2)**: 393s – 398s.
51. Van Haaften R.I.M., Haenen G.R.M.M., Evelo C.T.A., Bast A. (2003) Effect of Vitamin E on Glutathione-Dependent Enzymes. *Drug Metabolism Reviews* **35(2-3)**: 215 – 253.
52. Vivek K., Mishra S., Pradhan R.C., Jayabalan R. (2019) Effect of probiotification with *Lactobacillus plantarum* MCC 2974 on quality of Sohiong juice. *LWT* **108**: 55 – 60.
53. Zago M., Fornasati M.E., Carminati D., Burns P., Suárez V., Vinderola G., Reinheimer J., Giragga G. (2011) Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* **28(5)**: 1033 – 1040.

Izjava o izvornosti

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

Marina Novak

ime i prezime studenta