

# Potencijal primjene bakterija mliječne kiseline iz majčinog mlijeka u fermentiranim probiotičkim napitcima

---

Žagar, Lovorka

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:159:103976>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Lovorka Žagar  
58219989**

**POTENCIJAL PRIMJENE BAKTERIJA MLIJEČNE  
KISELINE IZ MAJČINOG MLIJEKA U  
FERMENTIRANIM PROBIOTIČKIM NAPITCIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biotehnologija 4  
Mentor: dr. sc. Katarina Butorac**

**Zagreb, 2024.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Potencijal primjene bakterija mliječne kiseline iz majčinog mlijeka u fermentiranim probiotičkim napitcima

Lovorka Žagar, 58219989

**Sažetak:** Bakterije mliječne kiseline (BMK) imaju ključnu ulogu u fermentaciji hrane i održavanju zdravlja probavnog sustava domaćina, djelujući kao probiotici. Za ovo istraživanje odabrani su sojevi BMK *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 izolirani iz mikroflore majčinog mlijeka, a koji su okarakterizirani kao producenti S-proteina. Cilj ovog rada bio je ispitati funkcionalna probiotička svojstva odabranih sojeva BMK te odrediti njihov potencijal primjene u fermentiranim nusproizvodima mliječne industrije. Svi ispitani sojevi su pokazali visoku antioksidativnu aktivnost uklanjanja DPPH radikala, dok je soj *Lb. brevis* MB20 pokazao učinkovito antimikrobno djelovanje prema ispitanim test mikroorganizmima i srodnim BMK. Ispitivanjem potencijala primjene nusproizvoda mliječne industrije kao supstrata za uzgoj BMK, zaključeno je da se kisela i slatka sirutka mogu koristiti pri uzgoju i proizvodnji probiotičkih bakterija i starter kultura, kao doprinos načelima održive kružne bioekonomije.

**Ključne riječi:** probiotici, bakterije mliječne kiseline, S-proteini, nusproizvodi mliječne industrije

**Rad sadrži:** 27 stranica, 14 slika, 4 tablice, 23 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** dr. sc. Katarina Butorac

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Martina Banić

**Datum obrane:** srpanj, 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology  
Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

The potential of using breast milk lactic acid bacteria in fermented probiotic  
beverages

Lovorka Žagar, 58219989

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) play a crucial role in the fermentation of food and in maintaining the health of the host's digestive system, acting as probiotics. The LAB strains *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 and MB20, isolated from breast milk microflora and characterized as S-protein producers, were selected for this study. The aim of this work was to investigate the functional probiotic properties of selected LAB strains and to determine their application potential in fermented by-products of the dairy industry. All tested strains showed high antioxidant activity by removing DPPH radicals, while the strain *Lb. brevis* MB20 showed effective antimicrobial activity against tested test microorganisms and related LAB. By investigating the potential of using by-products of the dairy industry as a substrate for the cultivation of LAB, it was found that sour and sweet whey can be used for the cultivation and production of probiotic bacteria and starter cultures as a contribution to the principles of a sustainable circular bioeconomy.

**Keywords:** probiotics, lactic acid bacteria, S-proteins, prebiotics, by-products of the dairy industry

**Thesis contains:** 27 pages, 14 figures, 4 tables, 23 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Katarina Butorac, PhD

**Technical support and assistance:** Martina Banić, PhD

**Thesis defended:** July, 2024.

# Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE.....	2
2.1.1. METABOLIZAM BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	3
2.2.2. PRIMJENA NUSPROIZVODA MLIJEČNE INDUSTRIJE.....	3
2.2. PROBIOTICI I PREBIOTICI.....	4
2.3. S-PROTEINI.....	6
2.3.1. S-PROTEINI BAKTERIJSKE VRSTE <i>LEVILACTOBACILLUS BREVIS</i> .....	7
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>8</b>
3.1. MATERIJALI.....	8
3.1.1. RADNI MIKROORGANIZMI.....	8
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE.....	9
3.1.3. KEMIKALIJE.....	9
3.1.4. APARATURA I PRIBOR.....	10
3.2. METODE.....	11
3.2.1. ODRŽAVANJE I ČUVANJE MIKROORGANIZAMA.....	11
3.2.2. ODREĐIVANJE POTENCIJALA PRIMJENE NUSPROIZVODA MLIJEČNE INDUSTRIJE KAO SUPSTRATA ZA UZGOJ BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	11
3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI.....	12
3.2.4. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA.....	12
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>15</b>
4.1. POTENCIJAL PRIMJENE NUSPROIZVODA MLIJEČNE INDUSTRIJE KAO SUPSTRATA ZA UZGOJ BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	15
4.2. FUNKCIONALNA PROBIOTIČKA AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	18
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>24</b>
<b>6. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>25</b>

## 1. UVOD

Humano majčino mlijeko sadrži visoke koncentracije hranjivih tvari potrebnih za pravilan razvoj novorođenčadi, uključujući ugljikohidrate, esencijalne masne kiseline, proteine, vitamine i minerale. Istraživanja su pokazala kako je majčino mlijeko izvor komensalnih, mutualističkih i probiotičkih bakterija za crijevnu mikrofloru novorođenčadi, a među njima su i bakterije mliječne kiseline (BMK) (Serrano-Niño i sur., 2016). BMK su Gram - pozitivne, nesporogene i fakultativno anaerobne bakterije koje imaju ključnu ulogu u prehranbenoj i poljoprivrednoj industriji, a neke bakterije koje pripadaju ovoj skupini imaju i probiotička svojstva. Probiotici su mikroorganizmi koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje kada se konzumiraju u preporučenim količinama (Mokoena, 2017). Na čovjeka djeluju pozitivno na način da povećavaju učinkovitost imunološkog odgovora i lučenje antitijela čime se smanjuje rizik obolijevanja od raznih bolesti uzrokovanih patogenim bakterijama, virusima i gljivicama. Dodatno, utječu na stabilizaciju mikroflore u gastrointestinalnom traktu čovjeka (de Melo Pereira i sur., 2018). Proizvodi metabolizma probiotičkih BMK koriste se u konzerviranju hrane, ali imaju ulogu i u inhibiranju djelovanja štetnih mikroorganizama u crijevima čovjeka. Probiotičke bakterijske vrste koje imaju sposobnost oksidacije velike količine slobodnih radikala *in vivo* imaju utjecaj u prevenciji razvoja bolesti povezanih s oksidativnim stresom (Prosekov i sur., 2017).

Zbog svog kontinuiranog razvoja, mliječna industrija proizvodi sve veću količinu organskog otpada koja je većim dijelom sastavljena od sirutke. Budući da nepravilno zbrinjavanje organskog otpada rezultira zagađenjem okoliša, u razvoju su nove tehnologije koje imaju za cilj valorizaciju nusproizvoda mliječne industrije (Zandona, 2020).

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativnu aktivnosti i antimikrobno djelovanje odabranih sojeva BMK *Levilactobacillus brevis* izoliranih iz mikroflore majčinog mlijeka prema test mikroorganizmima i srodnim BMK te određivanje potencijala primjene nusproizvoda mliječne industrije kao supstrata za uzgoj BMK u svrhu proizvodnje funkcionalnih probiotičkih napitaka, kao doprinos načelima održive kružne bioekonomije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su Gram - pozitivne, nesporogene, fakultativno anaerobne bakterije koje se pojavljuju u dva morfološka oblika - kuglasti (koki) ili štapićasti (bacili). Ova je grupa bakterija povezana sličnim metaboličkim, morfološkim i fiziološkim svojstvima. Tijekom fermentacije ugljikohidrata jedan od glavnih produkata je mliječna kiselina (Florou-Paneri i sur., 2013). Identifikacija BMK se zasniva na Orla-Jensenovim kriterijima, a oni obuhvaćaju morfologiju, način fermentacije glukoze i iskorištavanje šećera te opseg temperature rasta. Naknadno su uvedene filogenetske analize sekvenca gena koje kodiraju za 16S ribosomske RNA, a trenutno je sekvenciranje cijelog genoma bakterija metoda koja se često koristi u laboratorijima za identifikaciju BMK (Mokoena, 2017).

BMK se često koriste u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervansi. U posljednjih nekoliko godina veliki fokus je na razvijanju tehnologija biološkog konzerviranja koje u cilju ima potpuno ukloniti korištenje umjetnih aditiva za konzerviranje hrane. Pojam biokonzerviranja se odnosi na primjenu mikroorganizama ili njihovih metabolita u korist produljenja trajnosti namirnica ili poboljšanja njihove sigurnosti. Proizvodnjom mliječne kiseline, bakterije snižavaju pH vrijednost medija i time ga čine nepogodnim za rast određenih mikroorganizama pri čemu sinteza octene, mravlje, propionske i maslačne kiseline dodatno ide u korist snižavanju pH vrijednosti medija. Proizvodnja etanola, masnih kiselina, diacetila, vodikovog peroksida te antifungalnih molekula i bakteriocina značajno pridonosi inhibiranju rasta patogena u hrani. BMK su dobri biokonzervansi zbog GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) statusa, nemaju utjecaja i nisu toksični za eukariotske stanice te su uglavnom termorezistentni i zadržavaju antimikrobnu aktivnost nakon pasterizacije. Dodatno, pozitivno utječu na teksturu, nutritivne vrijednosti i organoleptička svojstva prehrambenih namirnica (De Marco i sur., 2022).

Humano majčino mlijeko osigurava unos nutrijenata potrebnih za pravilan rast i razvoj dojenčadi. Bogato je esencijalnim masnim kiselinama, proteinima i mineralima, ali ima i bogatu mikrofloru što ga čini izvorom probiotičkih bakterija koje imaju ulogu u prevenciji raznih bolesti kod novorođenčadi. Pri rođenju je probavni trakt djeteta sterilan, međutim ubrzo nakon rođenja dolazi do kolonizacije probavnog trakta. Kod dojene novorođenčadi u gastrointestinalnom traktu najviše su prisutne bakterije roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Prisutnost korisnih bakterija je ono što razlikuje majčino mlijeko od umjetne formule te je dokazano da dojena djeca imaju razvijeniji imunološki sustav u odnosu na djecu hranjenu formulom i uz to manji rizik oboljenja od bolesti kao što su dijareja, dijabetes, alergije i astma (Kang i sur., 2020).

Istraživanja su pokazala da u kasnijim godinama života pojedinci koji su hranjeni majčinim mlijekom imaju manji rizik oboljenja od inflamatornih upala crijeva, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2 i pretilosti (Guaraldi i Salvatori, 2012). Sastav mlijeka majke ovisi najviše o prehrani, ali i o drugim čimbenicima kao što su etnicitet, higijena i podneblje. Prosječno sadrži  $10^3 - 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> od kojih su neke BMK koje u crijevima imaju sposobnost inhibicije rasta patogenih mikroorganizama (Banić i sur., 2022; Serrano-Niño i sur., 2016).

### **2.1.1. Metabolizam bakterija mliječne kiseline**

BMK dobivaju energiju metaboliziranjem ugljikohidrata, reakcijama koje se temelje na fosforilaciji na razini supstrata. Kod razgradnje heksoza, postoje dva metabolička puta. Prvi je put homofermentativni, zasniva se na glikolizi, a kao produkt nastaje samo mliječna kiselina. Drugi je heterofermentativni put pri kojem, uz mliječnu kiselinu, kao produkti nastaju i ugljikov dioksid, etanol ili acetat (Mokoena, 2017). BMK mogu metabolizirati i disaharide, primjerice laktozu, maltozu i saharozu. Njihova razgradnja započinje cijepanjem endocelularnim hidrolazama nakon transporta u stanicu. Amilolitičke BMK imaju ulogu u razgradnji škroba. Cijepajući ga na manje molekule, osiguravaju izvor energije ostaloj mikroflori. Iz bakterijske vrste *Lactobacillus plantarum* izoliran je enzim koji ima sposobnost hidroliziranja škroba, amilopektina i glikogena do konačnih produkata maltotrioze, maltotetraoze i maltopentoze. Hidroliza mliječnih proteina i upotreba slobodnih aminokiselina je ključna metabolička aktivnost BMK jer omogućuje bakteriji dobavu nutrijenata koje su joj neophodne za rast. Ovaj proces podržava rast i razmnožavanje BMK te također značajno pridonosi razvoju okusa, teksture i nutritivne vrijednosti fermentiranih mliječnih proizvoda (Bintsis, 2018).

### **2.2.2. Primjena nusproizvoda mliječne industrije**

Sirutka je žuto-zelena vodena komponenta mlijeka koja nastaje u procesu proizvodnje sira, a čini oko 85 % volumena mlijeka te sadrži oko 55 % nutrijenata prisutnih u mlijeku. Jedan je od glavnih nusprodukata mliječne industrije i budući da se smatra organskim otpadom, može predstavljati rizik za okoliš ako se ne tretira ispravno. Zbog nedostatka održivih načina zbrinjavanja otpada, velika količina sirutke se odlaže kao otpadna voda, što ju čini istaknutim ekološkim zagađivačem u mliječnoj industriji. Kako bi se iskoristila visoka nutritivna vrijednost sirutke i smanjio štetan učinak odlaganja na okoliš, razvijeni su novi biotehnološki postupci koji su rezultirali recikliranjem sirutke. Suha tvar sirutke sastoji se od laktoze, proteina, minerala, masti i mliječne kiseline. Prema metodama koagulacije mliječnih proteina, sirutka može biti kisela ili slatka. Kisela sirutka nastaje kao nusprodukt fermentacije tijekom koje se dodaju kiseline kako bi se postigla koagulacija kazeina, primjerice u industrijskoj proizvodnji kazeina. Slatka sirutka nastaje tijekom proizvodnje sira u kojoj je proces koagulacije kazeina potaknut



dotokom proteolitičkih enzima. Jedan od najčešćih načina iskorištavanja tekuće sirutke je proizvodnja praha sirutke koji se koristi u proizvodnji napitaka s visokim sadržajem proteina, odnosno u proizvodnji sportskih napitaka i napitaka za pothranjene osobe. Preostali permeat se reciklira u biotehnološkim postupcima proizvodnje mliječne kiseline, bioetanol, laktoze i bioplastike (Zandona, 2020).

## 2.2. PROBIOTICI I PREBIOTICI

Probiotici su nepatogeni mikroorganizmi koji imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina te imaju ulogu u prevenciji ili liječenju nekih bolesti kada se konzumiraju u adekvatnim količinama. Danas su najčešće korišteni probiotici bakterije roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Figueroa-González i sur., 2011). Postoji više mehanizama djelovanja probiotika koji utječu na poboljšanje zdravlja čovjeka, primjerice modulacija stanično posredovane i humoralne imunološke funkcije. Probiotici povećavaju fagocitozu, odnosno proces u kojem fagociti hvataju i uništavaju štetne čestice i patogene mikroorganizme, čime organizam štite od bakterija, virusa i gljivica. Direktnom interakcijom s dendritičnim stanicama, probiotici sudjeluju u pokretanju, regulaciji i učinkovitosti imunološkog odgovora te u stvaranju stečenog imuniteta. Neki probiotici povećavaju lučenje antitijela i povećavaju razinu protuupalnih citokina što za posljedicu ima smanjenje rizika oboljenja od raka debelog crijeva. Drugi primjer pozitivnog učinka probiotika na ljudsko zdravlje je snižavanje pH vrijednosti lumena, što onemogućuje rast nekih patogenih mikroorganizama. Interakcija probiotika s mikroflorom crijeva također ima pozitivan učinak na zdravlje pojedinca. Kompeticijom za hranjive tvari i antagonizmom prema drugim mikrobima u crijevu, smanjuje se i inhibira rast patogenih mikroorganizama. Probiotici također pozitivno utječu na stabilnost mikroflore u probavnom traktu. Neki probiotički sojevi sintetiziraju molekule koje utječu na funkcije mozga i hormonalnog sustava, pojačavaju sintezu proteina ključnih za očuvanje zdravlja i funkcije crijevnog epitela te sintetiziraju enzime koji sudjeluju u metabolizmu laktoze ( $\beta$ -galaktozidaza koja cijepa laktozu na probavljivu glukozu i galaktozu) i regulaciji lipida u krvi (Sanders i sur., 2019). BMK moraju zadovoljiti određene tehnološke i funkcionalne kriterije kako bi dobile status probiotika. Probiotičke bakterije moraju biti dovoljno okarakterizirane, sigurne za predviđenu uporabu, podržane s najmanje jednim pozitivnim kliničkim ispitivanjem i prisutne u proizvodu u djelotvornoj dozi tijekom cijelog roka trajanja proizvoda (de Melo Pereira i sur., 2018). U tablici 1. prikazane su neke vrste probiotičkih bakterija te njihov utjecaj na organizam domaćina.

**Tablica 1.** Probiotički sojevi bakterija mliječne kiseline i njihove uloge u organizmu (prilagođeno prema Figueroa-Gonzalez i sur., 2011)

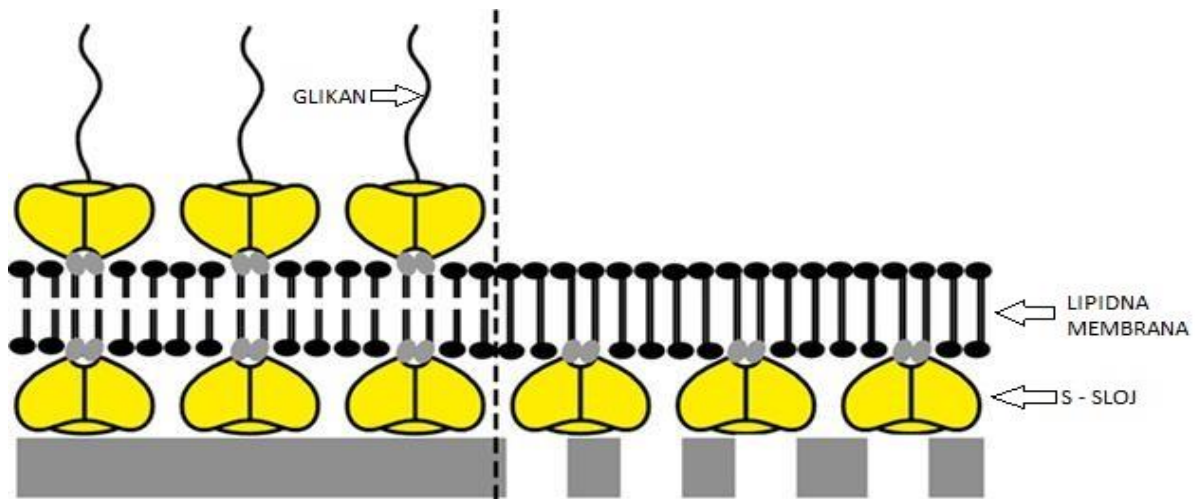
Bakterija	Učinak na zdravlje čovjeka
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	Smanjuje propusnost crijeva uzrokovanu izlaganjem kravljem mlijeku ili infekcijom rotavirusom. Može skratiti tijek rotavirusne infekcije
<i>Lactobacillus casei</i>	Stimulira imunološki sustav crijeva, ublažava simptome Crohnove bolesti i posjeduje snažna antimikrobna svojstva
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>	Sprječava dijareju uzrokovanu virusima. Ima preventivni učinak na stopu ponovne pojave površinskog raka mokraćnog mjehura nakon operacije
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Povećava imunološki odgovor i snižava razinu kolesterola u serumu
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Može smanjiti infekciju <i>Helicobacter pylori</i> i upalu te aktivnost gastritisa
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Smanjuje simptome sindroma iritabilnog crijeva, podržava zdravlje crijeva, jača imunološki sustav
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Smanjuje nadutost, podržava zdravlje desni
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Pomaže u smanjenju simptoma sindroma iritabilnog crijeva, podržava zdravlje crijeva, jača imunološki sustav
<i>Bifidobacterium breve</i>	Aktivira humoralni imunološki sustav povećanjem proizvodnje anti-rotavirusnih IgA ili anti-virusnih antitijela protiv gripe
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Može uspješno konkurirati za prostor i hranjive tvari protiv patogenih bakterija. Smanjuje učestalost dijareje i povećava imunološki odgovor
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Sprječava dijareju i zatvor
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Normalizira intestinalnu pokretljivost kod osoba s konstipacijom
<i>Lactococcus lactis</i>	Koristi se u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda kao što su jogurt i sir, podržava probavu

Prebiotici su funkcionalni sastojci prehrambenih namirnica biljnog ili životinjskog porijekla koje čovjek ne može probaviti, ali imaju pozitivan utjecaj na rast i funkciju nepatogenih bakterija u crijevima. Prebiotici su uglavnom neprobavljivi polisaharidi, oligosaharidi, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, rafinoza, laktuloza i inulin. Da bi se neki spoj mogao definirati kao prebiotik, on mora ispunjavati određene kriterije. Mora biti otporan na niske pH vrijednosti, ne smije biti podložan hidrolizi enzima domaćina i ne smije se razgraditi u gornjem dijelu probavnog trakta. Jedan od uvjeta je i da bakterije u donjem dijelu gastrointestinalnog trakta fermentiraju prebiotički supstrat koji onda utječe na aktivnost i rast same bakterije na način koji pridonosi poboljšanju zdravlja domaćina. Prebiotici su prirodno prisutni u raznim prehrambenim namirnicama kao što su šparoge, luk, med, banana, rajčica, soja, kravlje mlijeko, ali i humano mlijeko. No, u ovim se namirnicama nalaze u niskim koncentracijama pa se provode i industrijski postupci proizvodnje prebiotika u većim količinama. Budući da su izvor

energije mikroorganizmima u gastrointestinalnom traktu, prebiotici utječu na njihovu funkciju i sastav. Proizvodi fermentacije prebiotika su kratkolančane masne kiseline koje imaju sposobnost difundiranja u krv te na taj način utječu na ostale organe i sustave u organizmu, primjerice na središnji živčani sustav, imunološki i kardiovaskularni sustav (Davani-Davari i sur., 2019).

### 2.3. S-PROTEINI

S-proteini čine površinski proteinski sloj koji se može pronaći i kod Gram-pozitivnih i kod Gram-negativnih bakterija. Građeni su od identičnih S-proteinskih podjedinica koje tvore pravilan, dvodimenzionalni, visoko porozan, rešetkasti sloj koji prekriva površinu stanice. Podjedinice su međusobno povezane i pričvršćene na površinu stanice nekovalentnim vezama, a u pravilu najčešće su sastavljene od hidrofobnih i kiselih aminokiselinskih ostataka. S-sloj prisutan je kod mnogih, ali ne kod svih bakterija roda *Lactobacillus*, a provjera prisutnosti ovog sloja zahtjeva elektronsku mikroskopiju budući da slijed aminokiselina u S-proteinima varira od stanice do stanice. Funkcije površinskog sloja bakterijske stanice uključuju definiranje i održavanje oblika stanice, služi kao svojevrsno molekularno sito te kao mjesto vezanja za veće molekule i ione. Kod patogenih bakterija, S-sloj utječe na virulentnost soja na nekoliko načina, uključujući adheziju, antigensku varijaciju, zaštitu od fagocitoze te modulaciju T-staničnih ili citokinskih odgovora. Proteini S-sloja štite stanicu od raznih vanjskih faktora, primjerice antimikrobnih peptida, zračenja, promjena pH vrijednosti okoliša i bakteriofaga (Hynönen i Palva, 2013). Kod nekih se bakterija može pojaviti dvostruki S-sloj koji služi kao dodatna zaštita i potpora strukturi bakterije. Na slici 1. prikazano je kako se dijelovi molekula lipida unutar membrane (siva boja) elektrostatski povezuju s određenim domenama proteinskih S-slojeva. Molekule lipida na lijevoj strani slike shematski prikazuju fosfolipide, dok molekule lipida s desne strane prikazuju eterske lipide.



**Slika 1.** Shematski prikaz lipidne membrane sa S-slojem na čvrstim (lijevo) ili poroznim (desno) nosačima (prilagođeno prema Sletyr i sur., 2014.)

### 2.3.1. S-proteini bakterijske vrste *Levilactobacillus brevis*

*Levilactobacillus brevis* je BMK koja je često prisutna u kiselom kupusu, kiselom tijestu, mlijeku, siru, probavnom traktu i usnoj šupljini čovjeka. To je BMK koja ekspirira S-proteine na površini stanica i njena je struktura definirana S-slojem. Budući da je S-sloj u direktnom kontaktu s okolinom, odgovoran je za probiotička svojstva bakterije. Ovisno o uvjetima u kojima bakterija raste, provodi se različita ekspresija gena koji kodiraju za S-proteine. S-proteini bakterije *Lb. brevis* pokazuju specifična strukturalna i funkcionalna svojstva. N-terminalne regije proteina su izrazito slične i njihova je uloga vezanje za staničnu stijenku bakterijske stanice, a C-terminalne regije pojedinih proteina se razlikuju i imaju ulogu formiranja proteinskih podjedinica u S-sloj. Istraživanjima je pokazano da S-proteini imaju sposobnost inhibiranja rasta patogenih bakterija te utječu na proizvodnju citokina u dendritičnim stanicama. Na taj način pridonose probiotičkim svojstvima bakterije. Obzirom na to da čine 15 % ukupnog sadržaja proteina u bakterijskoj stanici i da se mogu izolirati jednostavnim postupcima, S-proteini su biomolekule koje imaju potencijal da se u budućnosti koriste u postupcima dobivanja novih lijekova i funkcionalne hrane (Mazzeo i sur., 2022).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Tijekom izrade ovog završnog rada korišteni su sojevi BMK vrste *Levilactobacillus brevis* izoliranih iz majčinog mlijeka, kao i srodne BMK i test mikroorganizmi. Korišteni su sojevi dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kutura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Bakterijski sojevi korišteni u izradi ovog rada

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB2	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB13	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB20	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LMG 9450	M17, 30 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC®9430™	M17, 37 °C, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC®25925™	hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC®19111™	hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Escherichia coli</i>	ATCC®25922™	hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Salmonella</i> Typhimurium	FP1	hranjivi bujon, 37 °C, aerobno

### 3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

- a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj BMK roda *Lactobacillus*
  - MRS (*engl.* De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava ( $\text{g L}^{-1}$  destilirane vode) („Biolife“, Italija): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri  $121\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 15 min.
  - MRS tekuća podloga je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- b) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj BMK roda *Lactococcus*
  - M17 bujon sastava ( $\text{g L}^{-1}$  destilirane vode) („Biolife“, Italija): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5,0; kvašćev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5,0; laktoza 5,0; natrijev glicerofosfat 19,0; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1.
- c) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj test mikroorganizama
  - hranjivi bujon („Biolife“, Italija), sastava ( $\text{g L}^{-1}$  destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri  $121\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 15 min.
- d) pasteurizirani nusproizvodi mliječne industrije („Sirela“, Hrvatska)
  - slatka sirutka dobivena nakon proizvodnje polutvrdog sira
  - kisela sirutka dobivena nakon proizvodnje svježeg sira
  - permeat dobiven ultrafiltracijom mlijeka

### 3.1.3. Kemikalije

- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol 70 %, „Kemika“, Hrvatska
- etanol 96 %, „Kemika“, Hrvatska
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- fenolftalein, „Kefo“, Hrvatska
- natrijev hidroksid, „Carlo ERBA“, Italija
- DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil), „Sigma-Aldrich“, SAD

### 3.1.4. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- celulozna vata, „Lola Ribar“, Hrvatska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje (15 mL, 50 mL), „Falcon“, Engleska
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, Engleska
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pincete, „Isolab“, Njemačka
- plastične tubice od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- stalci za ependorfe, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- pH metar, „Metrohm“, Švicarska
- vodena kupelj, „Inkolab“, Hrvatska
- filter veličine pora 0,2 µm, „Sigma-Aldrich, Merck“ SAD
- sonikator Sonopuls mini20, „Bandelin“, Njemačka
- Anaerocult® A za anaeroban uzgoj, „Merck“, Njemačka

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi BMK čuvani su pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v v<sup>-1</sup>) glicerola. Dan prije početka eksperimenta, sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta koji su navedeni u tablici 2.

### 3.2.2. Određivanje potencijala primjene nusproizvoda mliječne industrije kao supstrata za uzgoj bakterija mliječne kiseline

Kulture sojeva BMK prekonoćno su uzgojene pri 37 °C u 5 mL MRS bujona, a zatim su dobivene suspenzije centrifugirane pri 4200 o min<sup>-1</sup> tijekom 10 minuta i 4 °C. Talog stanica je ispran u 5 mL sterilne fiziološke otopine. Tako pripremljen inokulum (5 %) korišten je za prekonoćni uzgoj u slatkoj sirutci, kiseloj sirutci, permeatu i MRS bujonu koji je poslužio kao kontrola pri 37 °C. Prije i nakon inkubacije indirektnom metodom je određen broj bakterijskih stanica u svakom uzorku priređivanjem odgovarajućih decimalnih razrjeđenja bakterijskih suspenzija u fiziološkoj otopini koja su u dvije paralele naciepljena na MRS krutu hranjivu podlogu. Nakon 48 sati inkubacije pri 37 °C, izračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka prema navedenoj jednadžbi u kojoj "a" predstavlja srednju vrijednost broja poraslih kolonija na odgovarajućem razrjeđenju, "b" predstavlja volumen upotrijebljenog uzorka u mL, a "c" je recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja.

$$\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} = \frac{a}{b} \cdot c$$

Izmjerena je i pH vrijednost medija te udio proizvedene mliječne kiseline u uzorcima. pH vrijednost uzoraka je izmjerena uranjanjem pH elektrode u uzorke nakon centrifugiranja 10 minuta pri 4200 o min<sup>-1</sup> i 4 °C. Postotak mliječne kiseline u uzorku izmjeren je titracijskom metodom na način da je 1 mL svakog uzorka supernatanta razrijeđen s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici volumena 100 mL. Razrijeđeni je uzorak titriran s 0,1 M NaOH uz dodatak fenoftaleina kao indikatora. Postotak proizvedene mliječne kiseline je izračunat prema navedenoj formuli u kojoj °SH označava stupanj kiselosti uzorka.

$$\begin{aligned} \text{°SH} &= a \cdot 20 \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 2 \\ \text{\% mliječne kiseline} &= \text{°SH} \cdot 0,0225 \\ a &= \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH} \\ f_{\text{NaOH}} &= 1 \\ (\text{°SH} &\sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline (\%)}) \end{aligned}$$



### 3.2.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Cilj ovog postupka bio je ispitati antioksidacijsku aktivnost stanica i unutarstaničnih sadržaja bez stanica (*engl.* Intracellular Cell-Free Extracts (ICFE)). Intaktne stanice su pripremljene tako da su sojevi BMK prekonočno uzgojeni pri 37 °C u 5 mL MRS bujona, a zatim su dobivene kulture centrifugirane pri 4200 o min<sup>-1</sup> tijekom 10 minuta i 4 °C. Talog stanica je ispran i suspendiran u 1 mL PBS pufera (pH 7,4). Priprema intracelularnog ekstrakta bez stanica je provedena na isti način, ali je nakon suspendiranja stanica u 1 mL PBS pufera provedena liza stanica ultrazvukom (3 puta po 30 sekundi pri 30 kHz) te su stanice zatim izdvojene centrifugiranjem. U dobivenom supernatantu nalazio se unutarstanični sadržaj bez stanica. Da bi se odredila antioksidacijska svojstva stanica i ICFE-a, mjerila se aktivnost uklanjanja DPPH radikala. 0,2 mM otopina DPPH (*engl.* 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) je svježe pripremljena na način da je 1,58 g DPPH dodano u 20 mL etanola. Tijekom analize je kao slijepa proba korišten etanol pomiješan s PBS puferom (pH 7,4), a kao kontrola je korištena otopina DPPH u etilnom alkoholu pomiješanom s PBS puferom (pH 7,4). Intaktne stanice, odnosno ICFE, pomiješane su s pripremljenim DPPH u omjeru 1:1 nakon čega je provedena inkubacija u mraku tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 10 minuta na 4200 o min<sup>-1</sup>. Apsorbancija supernatanta izmjerena je pri 517 nm, a sposobnost uklanjanja DPPH radikala izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ uklanjanja DPPH radikala} = 1 - \frac{OD_{\text{uzorak}}}{OD_{\text{kontrola}}} \cdot 100$$

### 3.2.4. Turbidimetrijsko određivanje antimikrobnog djelovanja

Turbidimetrijskom metodom određena je antimikrobna aktivnost sojeva BMK prema test mikroorganizmima te prema srodnim BMK. Prekonočno uzgojene kulture izolata iz majčinog mlijeka su prebačene u epice te su centrifugirane pri 13 000 o min<sup>-1</sup> tijekom 10 minuta. Supernatant je profiltriran pomoću sterilnih filtera promjera 0,2 μm, pri čemu su uklonjene stanice bakterija, a filtrat je dalje korišten u eksperimentu.

Kod određivanja antimikrobne aktivnosti odabranih izolata prema test mikroorganizmima u jažice mikrotitarske pločice je dodano 90 μL hranjivog bujona, 10 μL različitih prekonočno uzgojenih kultura test mikroorganizama usklađene optičke gustoće te 100 μL različitih supernatanata kultura odabranih izolata iz majčinog mlijeka. Test mikroorganizmi na kojima je ispitana antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline su *S. aureus* ATCC®25925™, *L. monocytogenes* ATCC®19111™, *E. coli* ATCC®25922™ i *Salmonella Typhimurium* FP1. Kao kontrola je korišteno 190 μL hranjivog bujona te 10 μL kulture određenog test mikroorganizma. Antibakterijsko djelovanje supernatanta bakterijskih kultura prema test mikroorganizmima pri

37 °C određeno je tijekom 24 sata, pri 0, 2, 4, 6, 22 i 24 sata, spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Shema po kojoj su ispunjene jažice mikrotitarske pločice nalazi se u tablici 3.

**Tablica 3.** Shema mikrotitarske pločice za turbidimetrijsko određivanje antimikrobnog djelovanja odabranih sojeva BMK prema test mikroorganizmima

	KONTROLA	MB1	MB2	MB13	MB20
<b>SLIJEPA PROBA</b>	200 µL HB	100 µL HB + 100 µL MRS			
<b><i>S. aureus</i> ATCC®25925™</b>	190 µL HB + 10 µL test MO	90 µL HB + 10 µL test MO + 100 µL supernatanta kulture			
<b><i>L. monocytogenes</i> ATCC®19111™</b>					
<b><i>E. coli</i> ATCC®25922™</b>					
<b><i>Salmonella</i> Typhimurium FP1</b>					

Kod određivanja antimikrobne aktivnosti odabranih izolata prema srodnim bakterijama mliječne kiseline u jažice mikrotitarske pločice dodano je 90 µL MRS za rod *Lactobacillus*, odnosno M17 bujona za *Enterococcus* i *Lactococcus* rodove, 10 µL različitih prekončno uzgojenih kultura srodnih BMK usklađene optičke gustoće te 100 µL različitih supernatanta kultura odabranih izolata iz majčinog mlijeka. Kao kontrola je korišteno 100 µL hranjivog bujona i 100 µL MRS, odnosno M17 bujona te 5 µL kulture određene srodne BMK. Antibakterijsko djelovanje supernatanta bakterijskih kultura prema srodnim bakterijama mliječne kiseline pri 37 °C određeno je tijekom 24 sata, pri 0, 2, 4, 6, 22 i 24 sata, spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Korišteni sojevi srodnih bakterije mliječne kiseline bili su *Ec. faecium* ATCC®9430™, *Lb. helveticus* M92, *Lc. lactis* subsp. *lactis* LMG 9450. Shema po kojoj su ispunjene jažice mikrotitarske pločice nalazi se u tablici 4.

**Tablica 4.** Shema mikrotitarske pločice za turbidimetrijsko određivanje antimikrobnog djelovanja odabranih sojeva BMK prema srodnim BMK

	KONTROLA	MB1	MB2	MB13	MB20
<b>SLIJEPA PROBA</b>	200 µL MRS	200 µL MRS			
<b><i>Lb. helveticus</i> M92</b>	190 µL MRS + 10 µL srodnog MO	90 µL MRS + 10 µL srodnog MO + 100 µL supernatanta kulture			
<b>SLIJEPA PROBA</b>	200 µL M17	100 µL M17 + 100 µL MRS			
<b><i>Lc. lactis subsp. lactis</i> LMG 9450</b> <b><i>Ec. faecium</i> ATCC®9430™</b>	190 µL M17 + 10 µL srodnog MO	90 µL M17 + 10 µL srodnog MO + 100 µL supernatanta kulture			

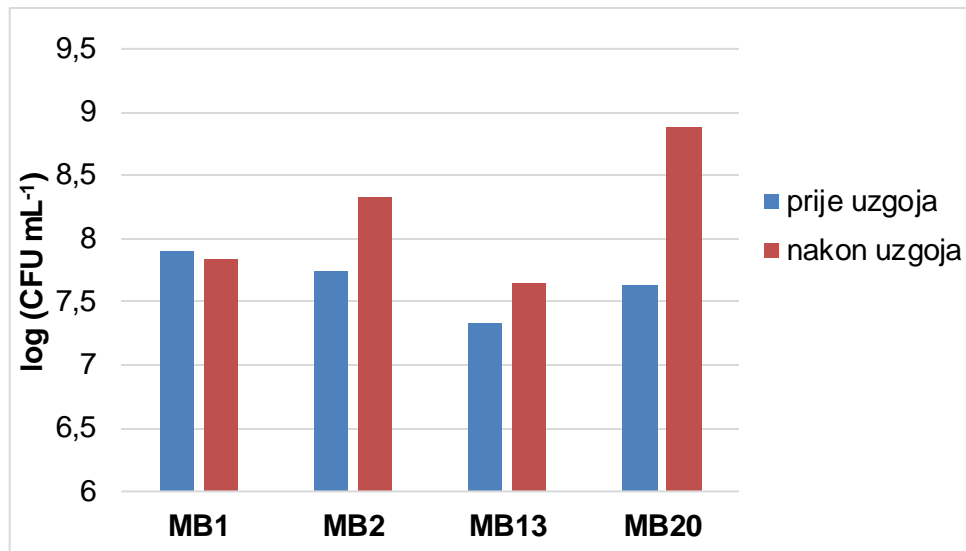
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. POTENCIJAL PRIMJENE NUSPROIZVODA MLIJEČNE INDUSTRIJE KAO SUPSTRATA ZA UZGOJ BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

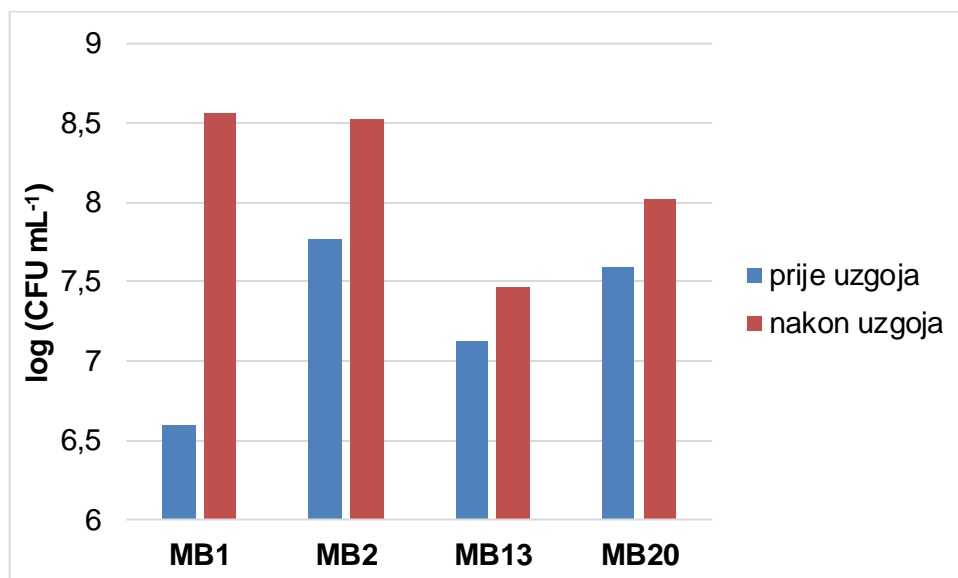
Sirutka je nusproizvod mliječne industrije koji ima primjenu u proizvodnji drugih mliječnih proizvoda, izradi nefermentiranih i fermentiranih napitaka od sirutke, te u razdvajanju i valorizaciji laktoze i proteina. Slatka i kisela sirutka imaju veliki potencijal u proizvodnji prebiotičkih i probiotičkih proizvoda (Lavelli i Beccalli, 2022.). Stoga, ispitan je potencijal primjene slatke i kisele sirutke, dobivenih nakon proizvodnje polutvrđog i svježeg sira te permeata dobivenog ultrafiltracijom mlijeka kao supstrata za uzgoj BMK. Stanice bakterijskih sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 izoliranih iz majčinog mlijeka suspendirane su u spomenutim nusproizvodima mliječne industrije tijekom 24 sata nakon čega je određen ukupan broj poraslih stanica prije i nakon inkubacije ( $\log \text{CFU mL}^{-1}$ ). Analizom rezultata zaključeno je da je sojevima *Lb. brevis* MB1 i MB2 za rast najpogodnija kisela sirutka (Slika 2), dok je najveći porast stanica soja *Lb. brevis* MB20 zabilježen u slatkoj sirutki (Slika 1). Soj *Lb. brevis* MB13 je imao podjednaki vrlo slab rast u svim nusproizvodima mliječne industrije (Slike 1-3). Kako se permeat sastoji od otopina laktoze, soli i vitamina za očekivati je slabi porast BMK, za razliku od sirutke koja je bogatija sastavom i to laktozom, proteinima, mastima i mineralnim tvarima.

Kako BMK metaboliziranjem ugljikohidrata dobivaju energiju pri čemu kao glavni produkt metabolizma nastaje mliječna kiselina (Mokoena, 2017.) ispitana je i količina acidifikacije kao mjera rasta BMK uslijed koje dolazi do zakiseljavanja podloge. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima određivanja broja poraslih stanica BMK, pri čemu se kao optimalan supstrat za uzgoj pokazala kisela sirutka, zatim slatka sirutka i permeat (Slike 4 i 5).

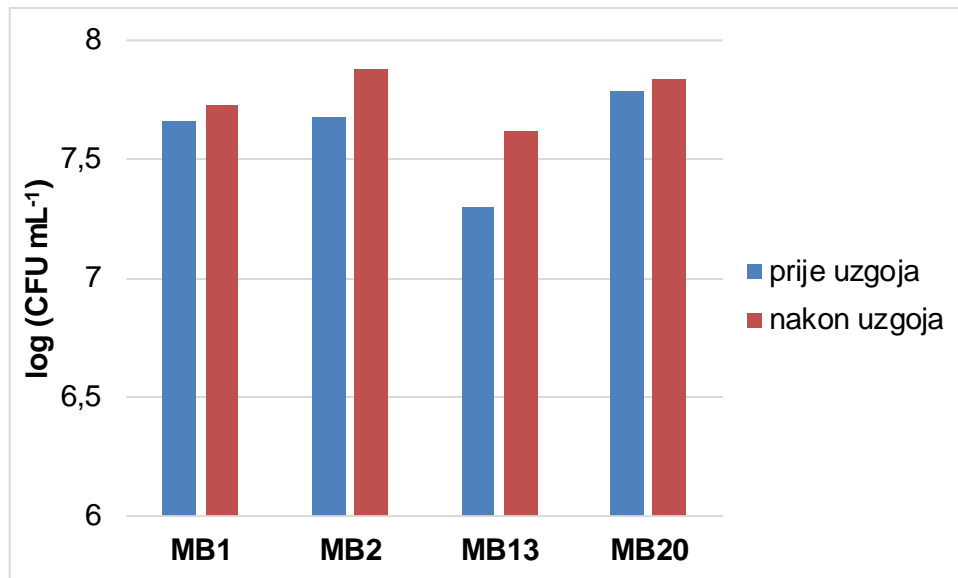
Kako mliječna industrija proizvodi velike količine sirutke kao nusproizvod, što dovodi do znatnih ekoloških problema zbog visokog sadržaja organske tvari, istražuju se ekološke i ekonomske mogućnosti učinkovitog iskorištavanja sirutke (Zandona i sur., 2020.) pri čemu je u ovom radu dokazan potencijal primjene kisele i slatke sirutke pri uzgoju i proizvodnji probiotičkih bakterija i starter kultura, kao doprinos načelima održive kružne bioekonomije.



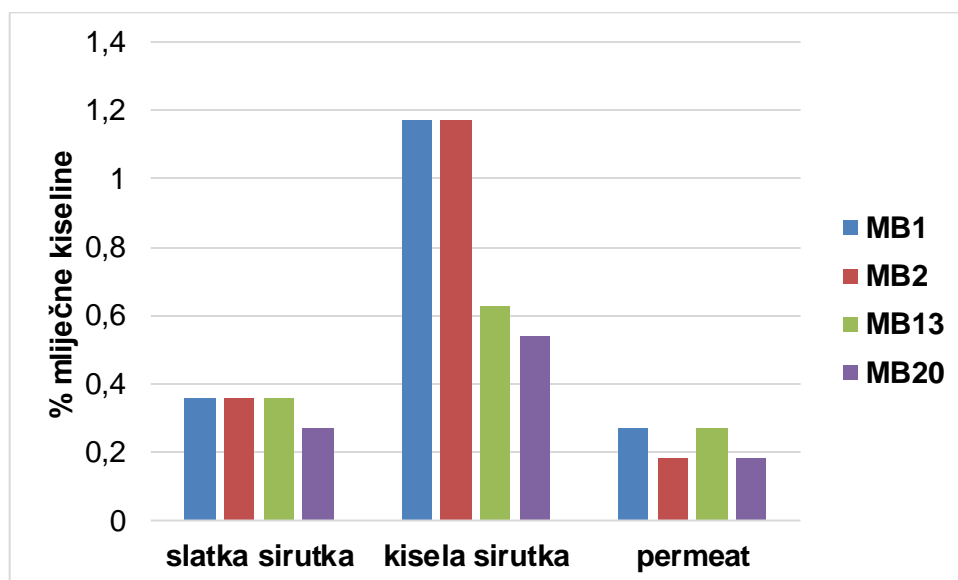
**Slika 2.** Broj poraslih stanica bakterijskih sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 izražen kao logaritamska vrijednost CFU mL<sup>-1</sup> nakon inkubacije u slatkoj sirutki



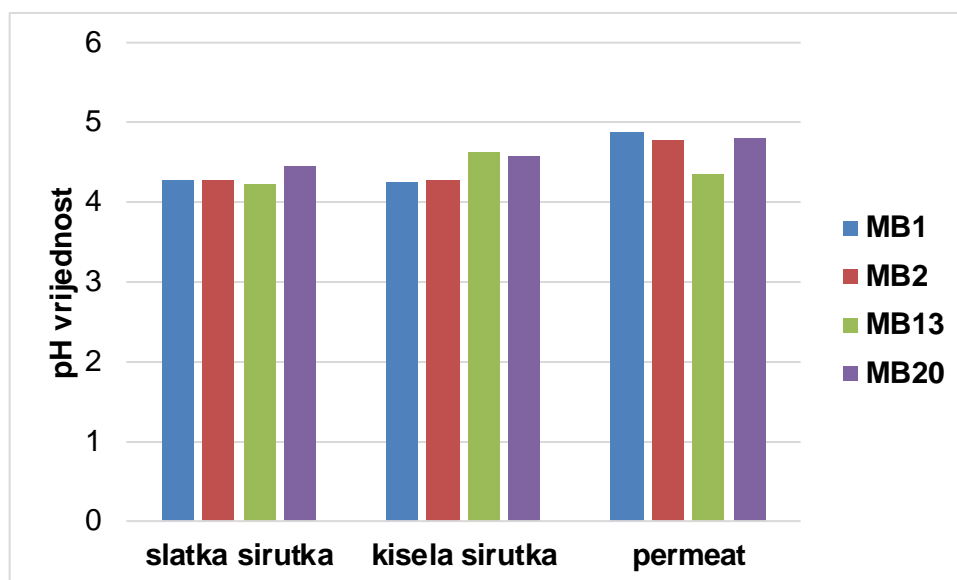
**Slika 3.** Broj poraslih stanica bakterijskih sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 izražen kao logaritamska vrijednost CFU mL<sup>-1</sup> nakon inkubacije u kiselj sirutki



**Slika 4.** Broj poraslih stanica bakterijskih sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 izražen kao logaritamska vrijednost CFU mL<sup>-1</sup> nakon inkubacije u permeatu



**Slika 5.** Proizvedena mliječna kiselina (%) u supernatantu nakon uzgoja sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 u nusproizvodima mliječne industrije

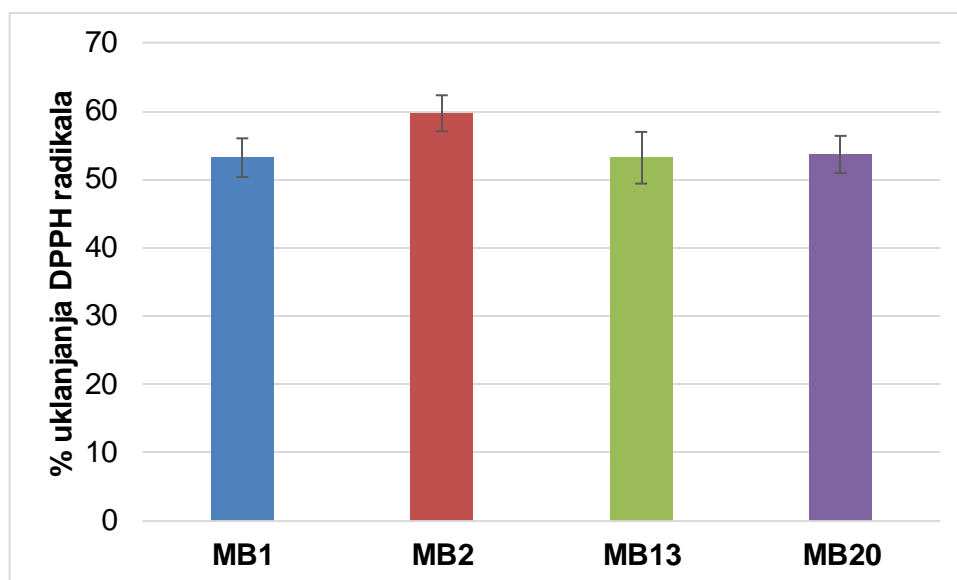


**Slika 6.** pH vrijednost u supernatantu nakon uzgoja sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 u nusproizvodima mliječne industrije

#### 4.2. FUNKCIONALNA PROBIOTIČKA AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

BMK posjeduju antioksidacijska svojstva koja im omogućuju neutralizaciju slobodnih radikala te time smanjivanje utjecaja oksidativnog stresa u tijelu. Na ovaj način se smanjuje rizik od oštećenja stanica i razvoja raznih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, rak i neurodegenerativne poremećaje (Ağagündüz i sur., 2021). Ispitana je antioksidativna aktivnost intaktnih i liziranih stanica *Lb. brevis* sojeva mjerenjem aktivnosti uklanjanja DPPH radikala. Kod liziranih stanica nije zabilježena antioksidacijska aktivnost, a aktivnost uklanjanja DPPH radikala intaktnih stanica grafički je prikazana na slici 7. Iz rezultata zaključujemo da soj *Lb. brevis* MB2 ima najveću antioksidativnu sposobnost budući da je uklonio najveći udio DPPH radikala ( $59,67 \pm 2,63$ ), iako su i ostali sojevi pokazali vrlo visoko antioksidativno svojstvo (oko 53 %).

Dobiveni rezultati su u skladu s drugim istraživanjima. Prema Vougiouklaki i sur. (2023) najveću sposobnost uklanjanja DPPH radikala je pokazao soj *Lb. brevis* ATCC 8287 usporedbom s *Lb. gasseri* ATCC 33323, *Lb. rhamnosus* GG ATCC 53103 i *Lb. plantarum* ATCC 14917, čija je antioksidativna aktivnost iznosila oko 80 %. Prema i Wang i sur. (2022) antioksidativna aktivnost BMK je iznosila  $57,43 \pm 0,29$  za *S. thermophilus* do  $73,02 \pm 0,24$  za *L. rhamnosus* GG.



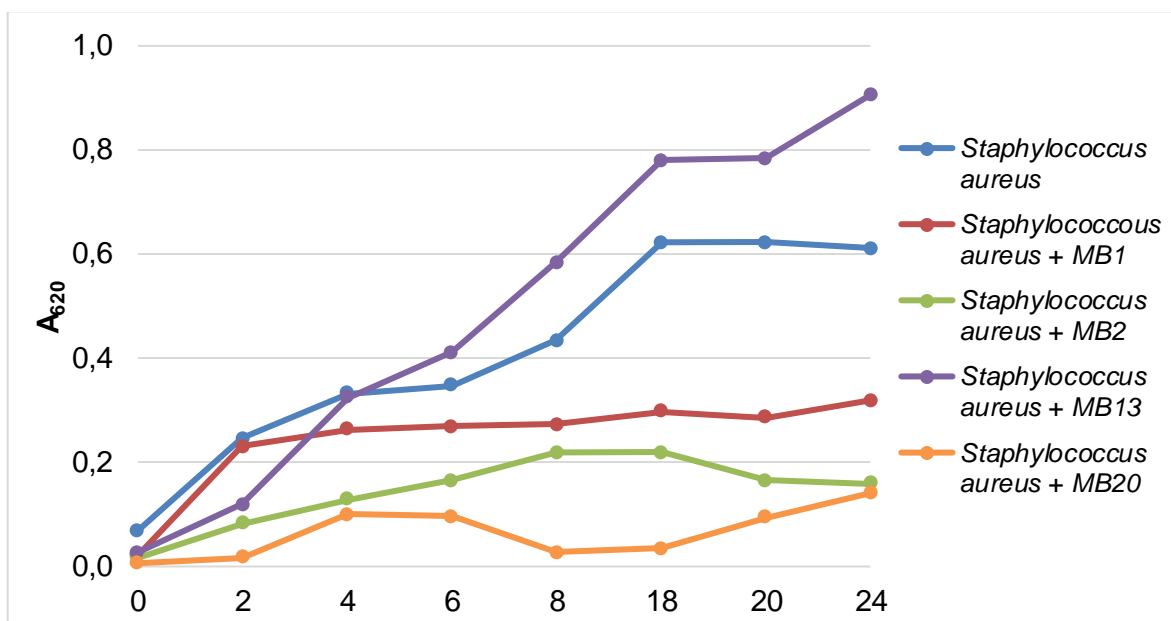
**Slika 7.** Antioksidativna svojstva sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 izražena u postotcima uklonjenih DPPH radikala

Antimikrobna aktivnost BMK još je jedno važno svojstvo probiotičkih bakterija zbog primjene u biološkom konzerviranju prehrambenih namirnica te zbog suzbijanja rasta patogenih mikroorganizama u humanom gastrointestinalnom traktu (Arqués i sur., 2015). Turbidimetrijskom metodom su određena antimikrobna svojstva odabranih sojeva bakterije *Lb. brevis* prema test mikroorganizmima i srodnim BMK. Kao kontrola je mjereno intenzitet rasta samog test mikroorganizma, odnosno predstavnika BMK, bez dodatka supernatanta kulture ispitivanog *Lb. brevis* soja. Na slikama 8.-11. grafički je prikazana ovisnost izmjerene apsorbancije o vremenu inkubacije uzoraka sojeva *Lb. brevis* pomiješanih s 4 različita test mikroorganizma (*S. aureus* ATCC®25925™, *L. monocytogenes* ATCC®1911™, *E. coli* ATCC®25922™ i *Salmonella* Typhimurium FP1.). Veća apsorbancija ukazuje na veću koncentraciju stanica, odnosno što je veća apsorbancija pri 620 nm, to je manja antimikrobna aktivnost odabranog *Lb. brevis* soja prema test mikroorganizmu, odnosno predstavniku BMK. Iz prikazanih rezultata možemo zaključiti da najbolju sposobnost inhibicije rasta test mikroorganizma ima soj *Lb. brevis* MB20, zatim sojevi *Lb. brevis* MB2 i MB1 čija aktivnost je bila podjednaka, dok soj *Lb. brevis* MB13 nije pokazao antimikrobnu aktivnost niti prema jednom test mikroorganizmu. Isti učinak uočen je i prilikom inhibicije srodnih BMK *Lc. lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 (Slika 13) i *Ec. faecium* ATCC®9430™ (Slika 14), dok je najmanje antimikrobno djelovanje uočeno prema *Lb. helveticus* M92 (Slika 12).

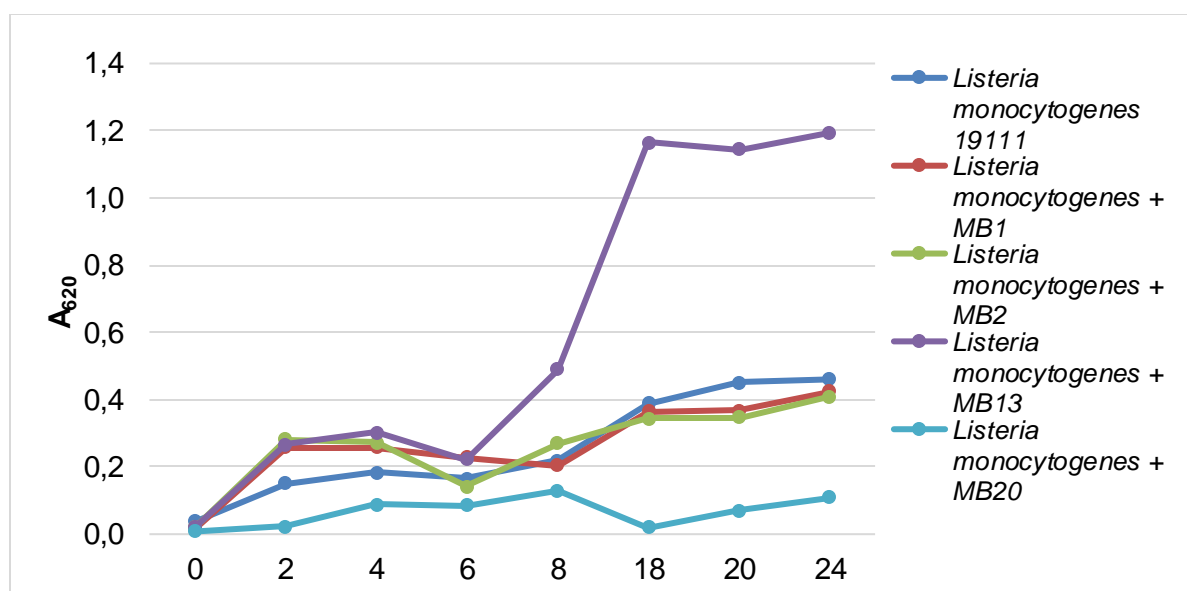
Dobiveni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima je dokazano antimikrobno djelovanje sojeva bakterije *Lb. brevis* prema patogenim mikroorganizmima koji kontaminiraju prehrambene namirnice, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* i *Salmonella* Typhimurium.



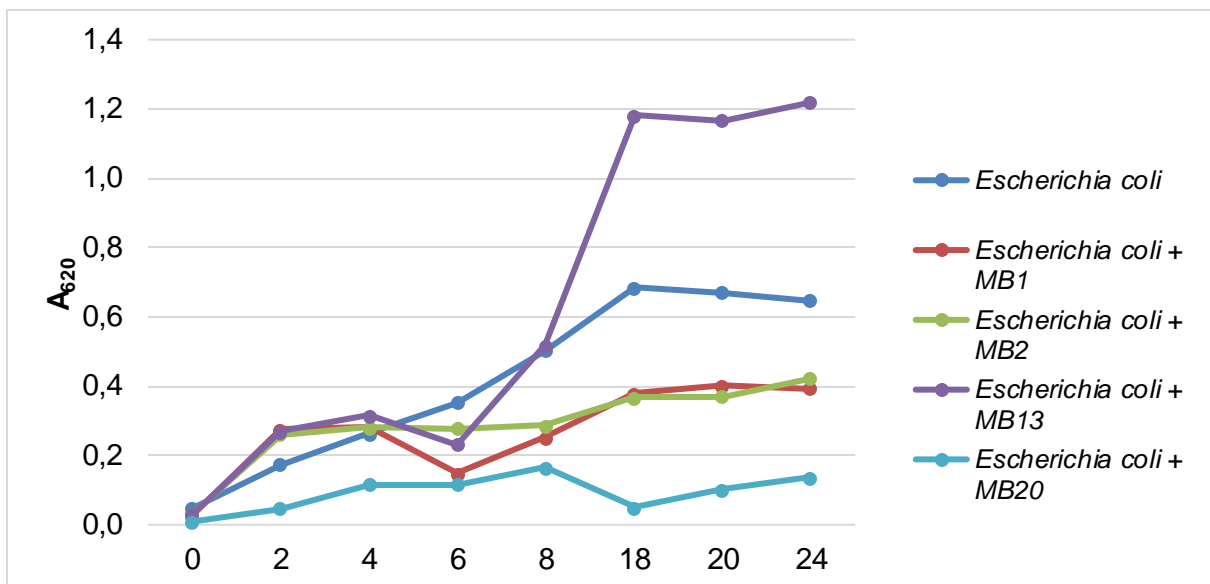
Prema Kobeščak (2021.), u najvećoj mjeri je inhibiran rast *S. aureus* 3048, dok je soj *Lb. brevis* MB20 inhibirao *L. monocytogenes* ATCC 19111 u većoj mjeri od preostala tri odabrana soja.



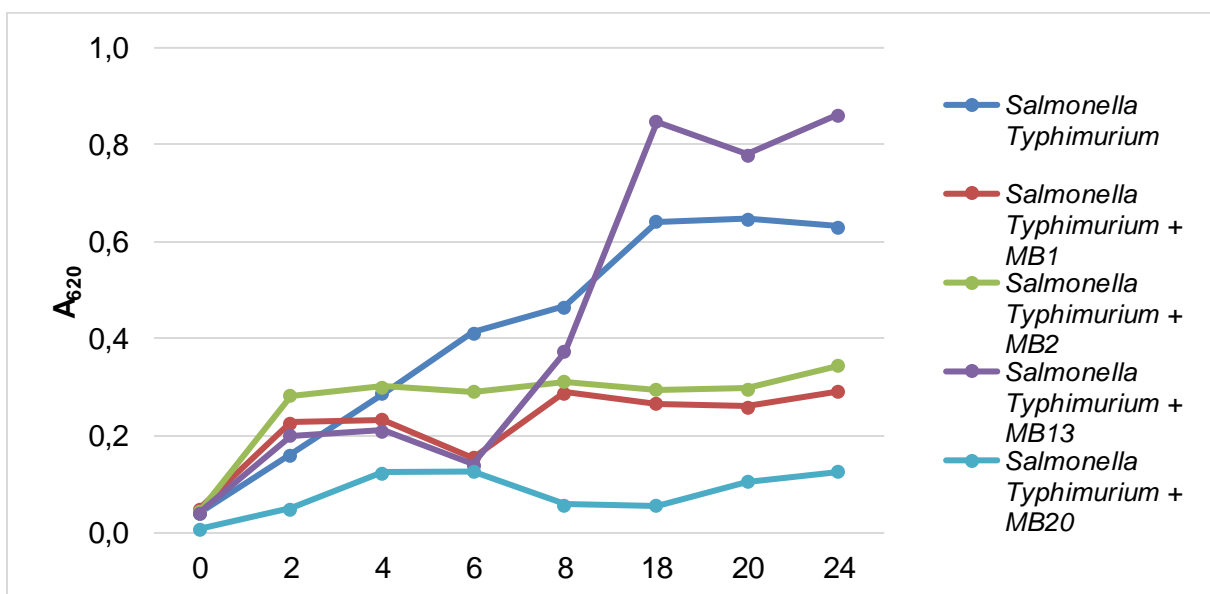
**Slika 8.** Inhibicijsko djelovanje sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 prema test mikroorganizmu *S. aureus* ATCC®25925™



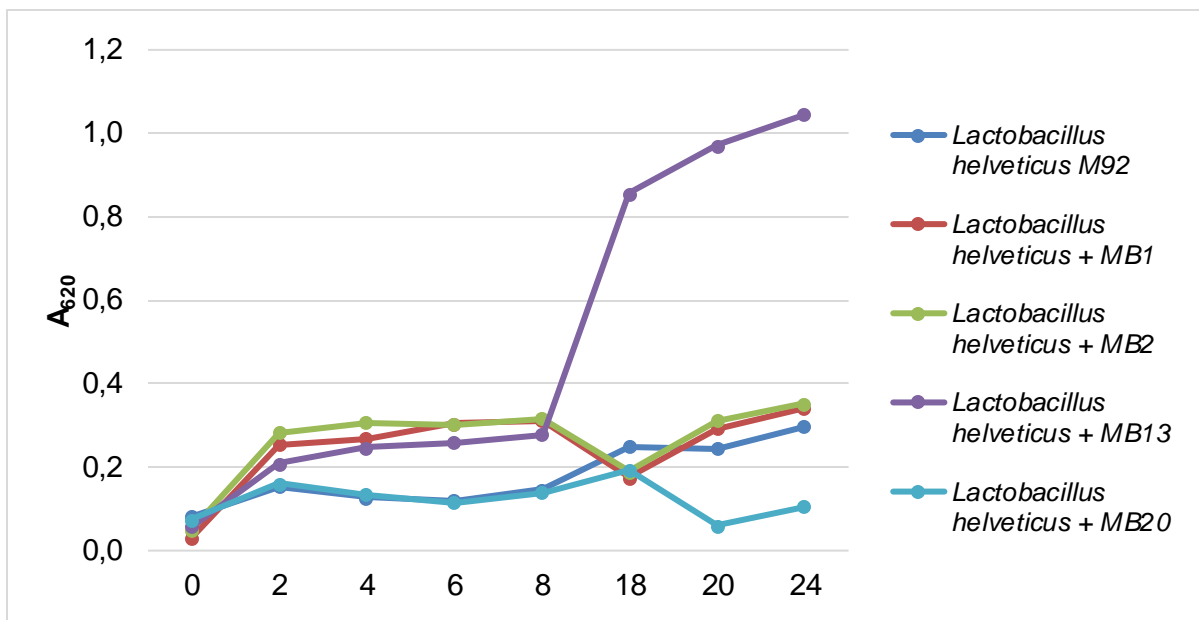
**Slika 9.** Inhibicijsko djelovanje sojeva *LB. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 prema test mikroorganizmu *L. monocytogenes* ATCC®19111™



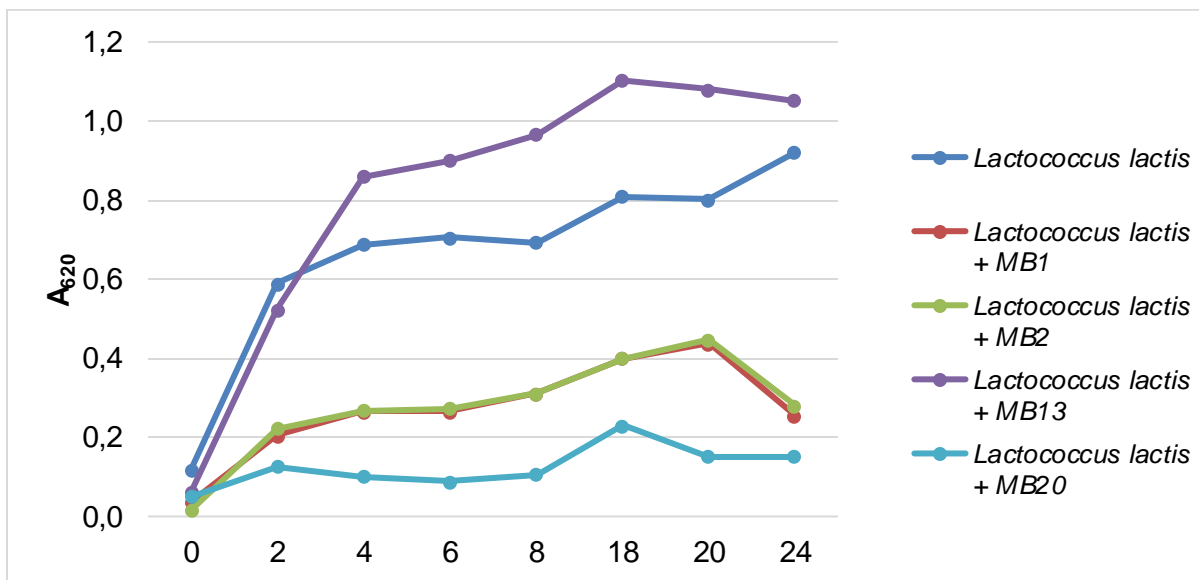
**Slika 10.** Inhibicijsko djelovanje sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 prema test mikroorganizmu *E. coli* ATCC®25922™



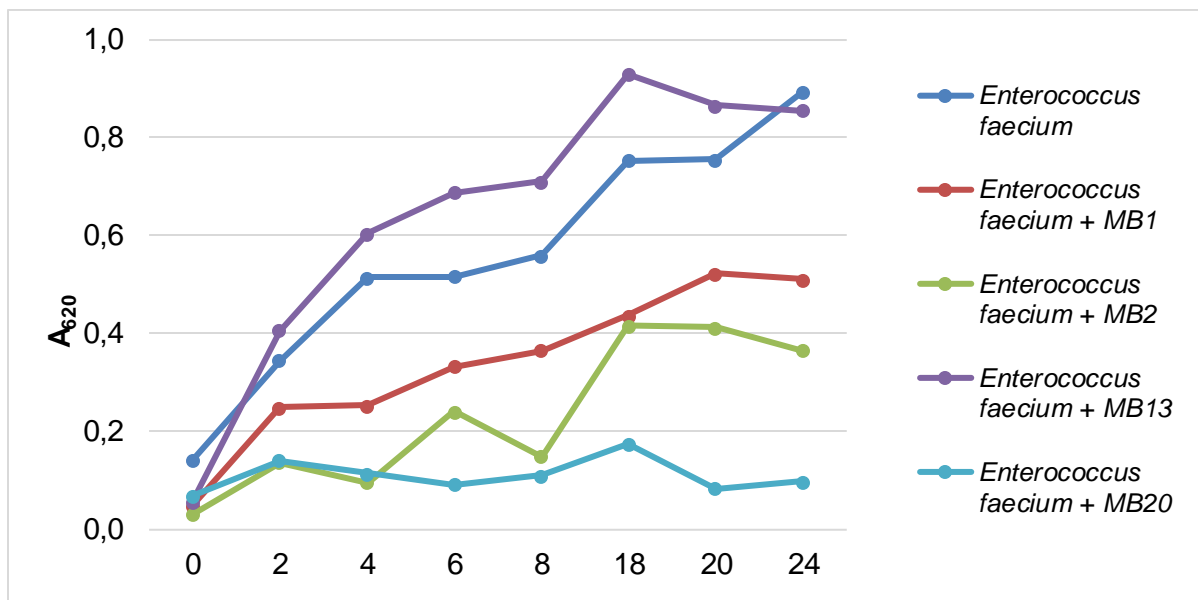
**Slika 11.** Inhibicijsko djelovanje sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 prema test mikroorganizmu *S. Typhimurium* FP1



**Slika 12.** Inhibicijsko djelovanje sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 prema srodnoj BMK *Lb. helveticus* M92



**Slika 13.** Inhibicijsko djelovanje sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 prema srodnoj BMK *Lc. lactis subsp. lactis* LMG 9450



**Slika 14.** Inhibicijsko djelovanje sojeva *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 prema srodnoj BMK *Ec. faecium* ATCC®9430™

## 5. ZAKLJUČCI

1. Primijenjeni nusproizvodi mliječne industrije, slatka i kisela sirutka, mogu se koristiti pri uzgoju i proizvodnji probiotičkih bakterija i starter kultura, kao doprinos načelima održive kružne bioekonomije.
2. Svi ispitani *Lb. brevis* sojevi su pokazali visoku sposobnost uklanjanja DPPH radikala.
3. Soj *Lb. brevis* MB20 pokazao je najbolje antimikrobno djelovanje prema ispitanim test mikroorganizmima i srodnim BMK.

## 6. POPIS LITERATURE

Ağagündüz D, Yılmaz B, Şahin TÖ, Güneşliol BE, Ayten Ş, Russo P, Özogul F (2021) Dairy lactic acid bacteria and their potential function in dietetics: The food–gut–health axis. *Foods*, **10**, 3099. <https://doi.org/10.3390/foods10123099>

Arqués JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M (2015) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *Biomed Res Int*, 584183. <https://doi.org/10.1155/2015/584183>

Banić M, Butorac K, Čuljak N, Leboš Pavunc A, Novak J, Bellich B, i sur. (2022) The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Biomolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *Int J Mol Sci* **23**(22),14382. <https://doi.org/10.3390/ijms232214382>.

Bintsis T (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol.*, **4**, 665. [10.3934/microbiol.2018.4.665](https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665)

Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi SJ, Ghasemi Y. (2019) Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, **8**, 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>

De Marco I, Fusieger A, Nero LA, Kempka AP, Moroni LS (2022) Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) synthesized by *Lactococcus lactis* LLH20: Antilisterial activity and application for biopreservation of minimally processed lettuce (*Lactuca sativa* L.) *ISBAB* **42**, 102355. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102355>

de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Júnior AIM., Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol adv* **36**, 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

Figuroa-González I, Quijano G, Ramirez G, Cruz-Guerrero A. (2011) Probiotics and prebiotics—perspectives and challenges. *J Sci Food Agr*, **91**, 1341-1348. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4367>

Florou-Paneri P, Christaki E, Bonos E (2013) Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In *Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/47766>

Guaraldi F, Salvatori G (2012) Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front Cell Infect mi* **2**, 94. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00094>

Hynönen U, Palva A (2013) Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biot* **97**, 5225-5243. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4962-2>

Kang W, Pan L, Peng C, Dong L, Cao S, Cheng H, Zhou H (2020) Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *J Dairy Sci* **103**, 9980-9991. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18704>

Kobeščak M (2021) *Funkcionalnost Levilactobacillus brevis sojeva iz mikrobiote majčinog mlijeka koji eksprimiraju S-proteine* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Food Technology and Biotechnology. Department of Biochemical Engineering. Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology). <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:193267>

Lavelli V, Beccalli MP (2022). Cheese whey recycling in the perspective of the circular economy: Modeling processes and the supply chain to design the involvement of the small and medium enterprises. *Trends Food Sci Tech* **126**, 86-98 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.013>

Mazzeo MF, Reale A, Di Renzo T, Siciliano RA (2022) Surface Layer Protein Pattern of Levilactobacillus brevis Strains Investigated by Proteomics. *Nutrients* **14**, 3679. <https://doi.org/10.3390/nu14183679>

Mokoena MP (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules* **22**, 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

Prosekov AY, Dyshlyuk LS, Milentyeva IS, Sykhikh SA, Babich OO, Ivanova SA, Matskova, LV (2017) Antioxidant and antimicrobial activity of bacteriocin-producing strains of lactic acid bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *Prog Nutr* **19**, 67-80. <https://doi.org/10.23751/pn.v19i1.5147>

Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA (2019) Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastro Hepat* **16**, 605-616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>

Serrano-Nino JC, Solis-Pacheco JR, Gutierrez-Padilla JA, Cobian-Garcia A, Cavazos-Garduno A, González-Reynoso O, Aguilar-Uscanga BR (2016) Isolation and identification of lactic acid bacteria from human milk with potential probiotic role. *J Food Nutr Res* **4**, 170-177. <https://doi.org/10.12691/jfnr-4-3-7>

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, & Pum D (2014) S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 823-864. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12063>

Vougiouklaki D, Tsironi T, Tsantes AG, Tsakali E, Van Impe JFM, Houhoula D (2023) Probiotic Properties and Antioxidant Activity *In Vitro* of Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms* **11**, 1264. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051264>

Wang H, Li L (2022) Comprehensive Evaluation of Probiotic Property, Hypoglycemic Ability and Antioxidant Activity of Lactic Acid Bacteria. *Foods* **11**, 1363. <https://doi.org/10.3390/foods11091363>

Zandona E, Blažić M, Režek Jambrak A (2020) Whey Utilization: Sustainable Uses and Environmental Approach. *Food Technol Biotechnol* **59**(2), 147-161. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968>



## Izjava o izvornosti

Ja, Lovorka Žagar, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Handwritten signature of Lovorka Žagar in black ink, written in a cursive style. The signature is positioned above a horizontal line.

Vlastoručni potpis