

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Nikolina Matešić
6720/PT

**Preživljavanje prirodne mikrobiote izolirane iz proizvoda akvakulture u
simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2017.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij prehrambene tehnologije
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Labaratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Preživljavanje prirodne mikrobiote izolirane iz prirodozoda akvakulture u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Nikolina Matešić

0058203437

Sažetak: Mnogi bakterijski sojevi iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* su okarakterizirani kao probiotici jer iskazuju pozitivne učinke na zdravlje domaćina. Preživljavanje nepovoljnih uvjeta gastrointestinalnog trakta (GIT) je jedan od ključnih kriterija prilikom odabira probiotičkih sojeva budući da je GIT ciljno mjesto njihovog djelovanja. U ovome radu ispitano je preživljavanje autohtonih izolata BMK iz riba i školjaka Jadranskog mora- *Lactobacillus plantarum* O1, *Lactobacillus helveticus* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *Lactobacillus plantarum* D1 i *Lactobacillus plantarum* K4 u simuliranim uvjetima GIT-a. Svi bakterijski sojevi pokazuju visoku otpornost prema djelovanju pepsina te dobro podnose visoke koncentracije vodikovih iona, ali pokazuju i dobru toleranciju na djelovanje enzima gušterače i žučnih soli. Bakterijski soj *L. plantarum* O1 pokazao je najbolje preživljavanje u simuliranim uvjetima GIT-a, dok je najmanju sposobnost preživljavanja imao bakterijski soj *L. plantarum* D1.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, probiotici, gastrointestinalni trakt

Rad sadrži: 24 stranica, 1 sliku, 2 tablice, 76 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: prof. dr. sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: mag. ing. Iva Čanak

Datum obrane: 19. rujan 2017.

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

Survival of natural probiotics isolated from aquaculture in simulated conditions of the gastrointestinal tract

Nikolina Matešić
0058203347

Abstract: Many bacterial strains from *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus are characterized as probiotics due to their positive effects on the health of the host. The survival of adverse conditions of the gastrointestinal tract (GIT) is one of the main criteria in the selection of probiotic strains because GIT is target location of their work. Autochthonous LAB strains isolated from fish and shellfish of Adriatic sea (*Lactobacillus plantarum* O1, *Lactobacillus helveticus* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *Lactobacillus plantarum* D1 and *Lactobacillus plantarum* K4) were examined in this work for their ability to survive harsh simulated GIT conditions *in vitro*. All bacterial strains show high resistance to the activity of pepsin and to high concentration of hydrogen ions, but also they show good resistance to the activity of pancreatic enzymes and bile salts. Bacterial strain *L. plantarum* O1 showed highest survival in simulated GIT conditions, while the lowest survival was detected for the strain *L. plantarum* D1.

Keywords: lactic acid bacteria, probiotics, gastrointestinal tract

Thesis contains: 24 pages, 1 figure, 2 tables, 76 references

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: Iva Čanak, B. Sc

Defence date: September 19th 2017

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Bakterije mliječne kiseline kao starter kulture za proizvode akvakulture	2
2.2. Probiotičko djelovanje bakterija mliječne kiseline	4
2.2.1. Proizvodnja antimikrobnih tvari	4
2.2.2. Konkurencija za adhezijske receptore	5
2.2.3. Konkurencija za hranjive tvari	5
2.2.4. Toksični metaboliti i nepovoljni uvjeti okoline	6
2.3. Adaptacija bakterija mliječne kiseline na stresne uvjete	6
2.4. Probiotici	8
2.4.1. Starter kulture i funkcionalne starter kulture	9
2.4.2. Izbor sojeva za probiotičku uporabu	9
3. Eksperimentalni dio	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Mikroorganizmi	12
3.1.2. Hranjive podloge	12
3.1.3. Pribor i oprema	12
3.2. Metode	13
3.2.1. Čuvanje mikroorganizama	13
3.2.2. Uzgoj mikroorganizama	13
3.2.3. Priprema simuliranog želučanog soka i simuliranog soka tankog crijeva	13
3.2.4. Priprema suspenzija bakterijskih stanica	13
3.2.5. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	13
3.2.6. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom	13
4. Rezultati i rasprava	15
5. Zaključci	17
6. Literatura	18

1. Uvod

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su industrijski važni organizmi zbog svoje fermentativne sposobnosti, kao i zbog zdravstvene i prehrambene koristi. Pojedine vrste bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija čine mikrobnu populaciju probavnog sustava ljudi ili životinja, a samim time sudjeluju u njihovom metabolizmu. Osim što su dio mikrobne populacije probavnog sustava, u domaćinu im je uloga probavljanje laktoze te asimilacija minerala (Rogelj, 1994.). BMK su najčešće korištene bakterije kao starter kulture za industrijsku preradu fermentiranih mliječnih proizvoda, mesa, povrća i proizvoda od žitarica (Šušković, 2010.).

Nadalje, određeni sojevi BMK imaju pozitivno djelovanje na zdravlje domaćina pa se ujedno nazivaju i probioticima (Šušković i sur., 2009.). Havenaar i Huis in't Veld (1992.) definiraju probiotike na ovaj način: "Probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u životinja ili ljudi djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture". Probiotici se prema načinu primjene mogu podijeliti u dvije skupine, a to su bioterapeutici koji se koriste u terapijske svrhe ili sprječavaju razvitak raznih bolesti te na probiotike koji kao funkcionalna hrana pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore i stimulaciju imuno sustava (Tratnik i Božanić, 2012). Kako bi određeni bakterijski soj mliječne kiseline djelovao probiotički, mora preživjeti uvjete koji vladaju u gastrointestinalnom traktu, stoga je nužno da ima obrambeni stanični mehanizam kojim će se oduprijeti niskom pH u želucu, probavnim enzimima i žučnim solima.

Osim što probiotici pozitivno utječu na zdravlje čovjeka, bitna im je uloga i zaštita od patogena u crijevnom traktu domaćina. To postižu tako što proizvode metabolite kao što su organske kiseline (mliječna i octena), vodikov peroksid, etanol, diacetil, acetaldehid i ostale spojeve male molekulske mase s antimikrobnom aktivnošću (bakteriocine) (Šušković 2010.).

Svrha ovog završnog rada bila je ispitati sposobnost sojeva BMK izoliranih iz proizvoda akvakulture prilikom preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, a s ciljem njihovog definiranja kao potencijalnih autohtonih funkcionalnih starter kultura.

2. Teorijski dio

Bakterije mliječne kiseline su nesporogene, gram-pozitivne bakterije pravilnog oblika, te su obvezatni ili fakultativni anaerobi. Određene vrste imaju široku primjenu u proizvodnji fermentiranih namirnica, a osobito sireva i jogurta (Šušković i sur., 2010.). Interes za primjenu mikroorganizama i njihovih metabolita u svrhu prevencije kvarenja hrane i produživanja roka trajanja određenih proizvoda se znatno povećao zadnjih dvadesetak godina. Uz to postoji sve više informacija o primjeni različitih sojeva bakterija mliječne kiseline kao probiotika pa se zbog toga povećava interes za prehrambenim proizvodima, u prvom redu mliječnim, koji sadrže specifične bakterijske vrste s potencijalnim dobrobitnim djelovanjem na zdravlje potrošača. Tako se u fermentirane mliječne proizvode dodaju probiotički sojevi *Lactobacillus acidophilus* i/ili *Bifidobacterium bifidum*. Ako uz probiotička svojstva, sojevi bakterija mliječne kiseline pokazuju i karakteristike važne za starter kulture, takvi bi se sojevi mogli primjeniti kao probiotičke starter kulture za proizvodnju funkcionalne hrane (Topisirović i sur., 2006; Holzapfel i Hammes, 1998). Prema navodu Frece (2007) da bi probiotički soj djelovao pozitivno na zdravlje domaćina mora: antimikrobno djelovati prema patogenim mikroorganizmima, utjecati na poboljšanje metabolizma laktoze, stimulirati imunološki sustav, antikancerogeno djelovati i snižavati koncentraciju kolesterola u serumu.

2.1. Bakterije mliječne kiseline kao starter kulture za proizvode akvakulture

U današnje vrijeme potrošači teže za hranom visoke prehrambene vrijednosti, ali i sigurnim, odnosno zdravstveno ispravnim namirnicama. Nutricionisti osobito preporučuju češću konzumaciju morskih organizama zbog svog nutritivnog vrijednog sastava. Riba sadrži manje masnog tkiva u odnosu na crveno meso te se ono nalazi raspoređeno unutar mišića. S druge strane, školjkaši su bogati ugljikohidratnim tvarima pohranjenim u obliku glikogena. Sastav mikroflore ribe i školjkaša uvelike ovisi o uvjetima okoliša u kojem obitavaju, osobito o temperaturi, ali i o godišnjem dobu u kojem su izlovljeni te samom načinu izlova, prerade i rukovanja ribom i školjkašima (Duraković i sur., 2012). Riba i morski plodovi su iznimno osjetljivi na kvarenje zbog mikrobiološke i biokemijske razgradnje, stoga su razvijene brojne fizikalne i kemijske metode s ciljem produžetka roka trajanja i uporabe svježih morskih plodova. Međutim, s vremenom dolazi do gubitka njihovog nutritivnog sastava, stoga se sve više teži upotrebi bakterija mliječne kiseline kao starter kultura u svrhu biokonzerviranja. Primarna svrha bakterija mliječne kiseline je povećanje sigurnosti i trajnosti proizvoda sprječavanjem rasta patogenih mikroorganizama i mikroorganizama kvarenja (Nilsson i sur., 2005; Nes, 2011). Duga tradicija upotrebe bakterija mliječne kiseline bez štetnog utjecaja

na zdravlje čovjeka, pribavila im je GRAS (Generally Recognized As Safe) status prema US FDA, odnosno QPS status (Qualified Presumption of Safety) prema regulativi Europske unije (Frece i sur., 2010 a i c). U uzorcima koji su analizirani pronađene su bakterije roda *Lactobacillus* i *Leuconostoc*.

Bakterije roda *Lactobacillus* su gram-pozitivni, nesporogeni štapići ili kokobacili. One su strogo fermentirane, aerotolerantne ili anaerobne, acidofilne bakterije i imaju složene prehrambene potrebe (za ugljikohidrate, aminokiseline, peptide, estere masnih kiselina, soli, derivate nukleinske kiseline i vitamine). Laktobacili su pronađeni tamo gdje su dostupne podloge bogate sadržajem ugljikohidrata. Rod se dijeli u tri skupine: obligatno homofermentativne, obligatno heterofermentativne i fakultativno heterofermentativne (Hammes i Vogel, 1995). Bakterije iz roda *Leuconostoc* su gram-pozitivne te pripadaju skupini heterofermentativnih koka. Ove bakterije su katalaza-negativne te proizvode dekstran iz saharoze. Zbog svoje sposobnosti proizvodnje mliječne kiseline i diacetila imaju čestu primjenu u proizvodnji fermentiranih proizvoda.

U ribama slatkih i slanih voda pronađene su određeni rodovi, kao što su *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* ssp., *Carnobacterium* spp. *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. *Aerococcus* spp. i *Vagococcus* spp (Ghanbari i sur., 2013). BMK koje čine sastavni dio prirodne mikroflore riba i školjkaša koriste se u procesu biokonzerviranja što podrazumijeva metodu produženja održivosti i povećanja sigurnosti hrane uporabom mikroorganizama i/ili njihovih produkata. Primjenjuju se zaštitne kulture bakterija mliječne kiseline tj. antagonističke kulture koje inhibiraju patogene mikroorganizme i/ili produžuju održivost hrane uz istovremeno očuvanje senzornih svojstva proizvoda (Zdolec i sur., 2007; Frece i sur., 2014). BMK izolirane iz proizvoda akvakulture i koje pokazuju antimikrobnu aktivnost prema sojevima bakterija poput *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* i *Bacillus* spp. koriste se u svrhu očuvanja kvalitete hrane. Pokazuju dobru rezistenciju na uvjete kojima se izlažu, kao što su temperatura zamrzavanja, različiti tlakovi pri pakiranju proizvoda, niske pH vrijednosti, visoke koncentracije soli te prisustvo mliječne kiseline, octene kiseline i etanola kao aditiva hrane (Brillet i sur., 2008; Pinto i sur., 2009; Leroi, 2010; Ghanbri i Jami, 2013). S druge strane, BMK mogu uzrokovati i razvitak bolesti pa tako soj bakterije *Lactococcus garvieae* uzrokuje sepsu, krvarenje i upalu očiju, dok je tijekom provođenja eksperimenta soj *C. maltaromaticum* uzrokovao zarazu kalifornijske pastrve i prugastog grgeča (Baya i sur., 1991).

2.2. Probiotičko djelovanje bakterija mliječne kiseline

Da bi se neki soj mogao definirati kao probiotik moraju se ispuniti strogi zahtjevi probiotičkog koncepta. Također je neophodno da ispunjavaju tehnološke zahtjeve tako da tijekom proizvodnje i primjene u prehrambenim proizvodima zadrže funkcionalnost, a da pri tom ne uzrokuju nepoželjne promjene okusa ili teksture. Prvi selekcijski kriterij koji treba ispuniti potencijalni probiotički soj je preživljavanje u gornjem dijelu probavnog sustava, zatim zadržavanje u gastrointestinalnom traktu gdje će pomoću mehanizama djelovanja iskazati pozitivne učinke na zdravlje domaćina (Mattila-Sandholm i sur., 2002).

2.2.1. Proizvodnja antimikrobnih tvari

Probiotici proizvodnjom antimikrobnih supstanci pomažu domaćinu u obrani od patogenih bakterija. Glavni produkt koji nastaje su organske kiseline, od kojih su najznačajne mliječna i octena kiselina. Stvaranjem kiselina dolazi do sniženja unutarstaničnog pH pri čemu takvi uvjeti sprečavaju rast i širenje potencijalnih patogenih mikroorganizama. BMK mogu proizvesti i vodikov peroksid u aerobnim uvjetima. Budući da nemaju katalaznu aktivnost, odnosno ne mogu rastaviti molekulu vodikovog peroksida na molekule kisika i vode, takav spoj će također u određenoj koncentraciji djelovati inhibicijski jer će dovesti do oksidacije stanice mikroba te će destrukuirati stanične proteine. Šušković i sur. (1997) navode kako je diacetil (2,3-butandion) metabolit koji proizvode svi rodovi bakterija mliječne kiseline. Znatne količine diacetila mogu nastati u prisutnosti organskih kiselina, npr. limunske, koja se preko piruvata konvertira u diacetil. Osim što daje maslačnu aromu fermentiranim mliječnim proizvodima, ujedno služi kao i konzervans. Gram–negativne bakterije su puno osjetljivije od gram–pozitivnih na djelovanje diacetila, pri čemu diacetil inhibira rast gram–negativnih bakterija reakcijom s arginin–vezujućim proteinom i pritom izaziva trošenje arginina (Ammor i sur., 2006). Jedne od antimikrobnih supstanci koje proizvode BMK su bakteriocini, odnosno specifični bioaktivni peptidi. Oni mogu djelovati inhibirajuće na više načina, kao što je npr. mijenjanje aktivnosti enzima, inhibicija izlučivanja spora i stvaranje pora u membrani nakon što dođu u interakciju sa lipidima prisutnim u membranama (Šušković i sur., 1997; Rogelj, 1994). Nekoliko bakteriocina potencijalno su primjenjivi u konzerviranju hrane, što može dovesti do smanjenja dodavanja kemijskih konzervansa i smanjenja primjene toplinske obrade proizvoda, čime bi se dobili prirodno konzervirani proizvodi s bogatijim senzorskim i nutricionističkim svojstvima. To može biti alternativa za zadovoljenje zahtjeva potrošača za sigurnom, svježom, gotovom minimalno prerađenom hranom, te način razvoja novih proizvoda. Razlikuju se po molekulskoj masi, biokemijskim svojstvima te rasponu i načinu

djelovanja. Veličina molekula bakteriocina varira od peptida koji sadržavaju pedesetak aminokiselina do peptida molekulske mase veće od 10000 Da. Bakteriocini se mogu podijeliti u četiri velike skupine koje uključuju: lantibiotike, peptide otporne na toplinu, proteine osjetljive na visoku temperaturu te proteinske komplekse koji često sadržavaju ugljikohidrate i lipide (Brkić, 1995).

2.2.2. Konkurencija za adhezijske receptore

Intestinalni patogeni mikroorganizmi moraju imati sposobnost adhezije na stanice crijevnog epitela, ali i koloniziranja tog područja određeno vrijeme da bi uzrokovali bolest. Posljedično tome, da bi određeni soj BMK djelovao probiotički također mora imati sposobnost adhezije na stanice crijevnog epitela da bi na taj način konkurirao za vezna mjesta sa patogenim mikrobima. Drugim riječima, vezanjem određenog probiotičkog soja na epitelnu površinu crijeva spriječeno je vezanje patogenih mikroorganizama (Šušković i sur., 1997; Frece 2007). Poželjno svojstvo probiotičkih bakterija je sposobnost agregacije jer na taj način imaju učinkovitije djelovanje. Isto tako, mikroorganizmi koji imaju sposobnost koagregacije s drugim bakterijama, na primjer patogenima, imaju veliku prednost pred onima koji nemaju tu sposobnost i koji mogu lako biti uklonjeni iz intestinalnog okoliša (Collado i sur., 2007).

2.2.3. Konkurencija za hranjive tvari

Od svih prehrambenih sastojaka koji se unesu, oni koji nisu probavljivi za enzime domaćina, kao što su prehrambena vlakna, ili oni koji izbjegnu gornju probavu i apsorpciju, kao što je višak proteina, mogu se metabolizirati crijevnom mikroflorom (Walker i sur., 2010). Iako je intestinalni trakt bogat izvor hranjivih tvari, probiotičke bakterije ipak konkuriraju za određene nutrijente koji su im potrebni da bi uspješno obavljale svoju ulogu. Šušković i sur. (1997) opisuju primjer inhibicije razmnožavanja *E. coli*, *Fusobacterium sp.* i *Eubacterium sp.* nakon inokulacije u fekalni filtrat mišje intestinalne flore. Proučavajući sličan kontinuirani sustav, Wilson (1986) je došao do zaključka da zbog preniske koncentracije ugljikohidrata u mišjem fekalnom filtratu *Clostridium difficile* ne može rasti. Iz toga proizlazi da je natjecanje za iskoristive ugljikohidrate temeljno važno za regulaciju bakterijske populacije u intestinalnom traktu.

2.2.4. Toksični metaboliti i nepovoljni uvjeti okoline

Toksični metaboliti koji djeluju pogubno na patogene bakterije crijevnog sustava su vodik-sulfid, slobodne žučne kiseline te kratkolančane masne kiseline. Vodik-sulfid djeluje inhibicijski na rast i razmnožavanje *E. coli* koja obitava u intestinalnom traktu.

U jetri se iz kolesterola sintetiziraju primarne žučne kiseline, a to su kolna i kenodeoksikolna kiselina, zatim dolazi do konjugacije primarnih kiselina sa taurinom i glicinom. U intestinalnom traktu pod djelovanjem bakterijske flore može doći do dehidroksilacije pri čemu nastaju sekundarne žučne kiseline, odnosno iz kolne kiseline nastane deoksikolna, a iz kenodeoksikolne nastane litokolna kiselina. Smatra se da sekundarne žučne kiseline imaju veći učinak u suzbijanju patogenih bakterija u odnosu na primarne.

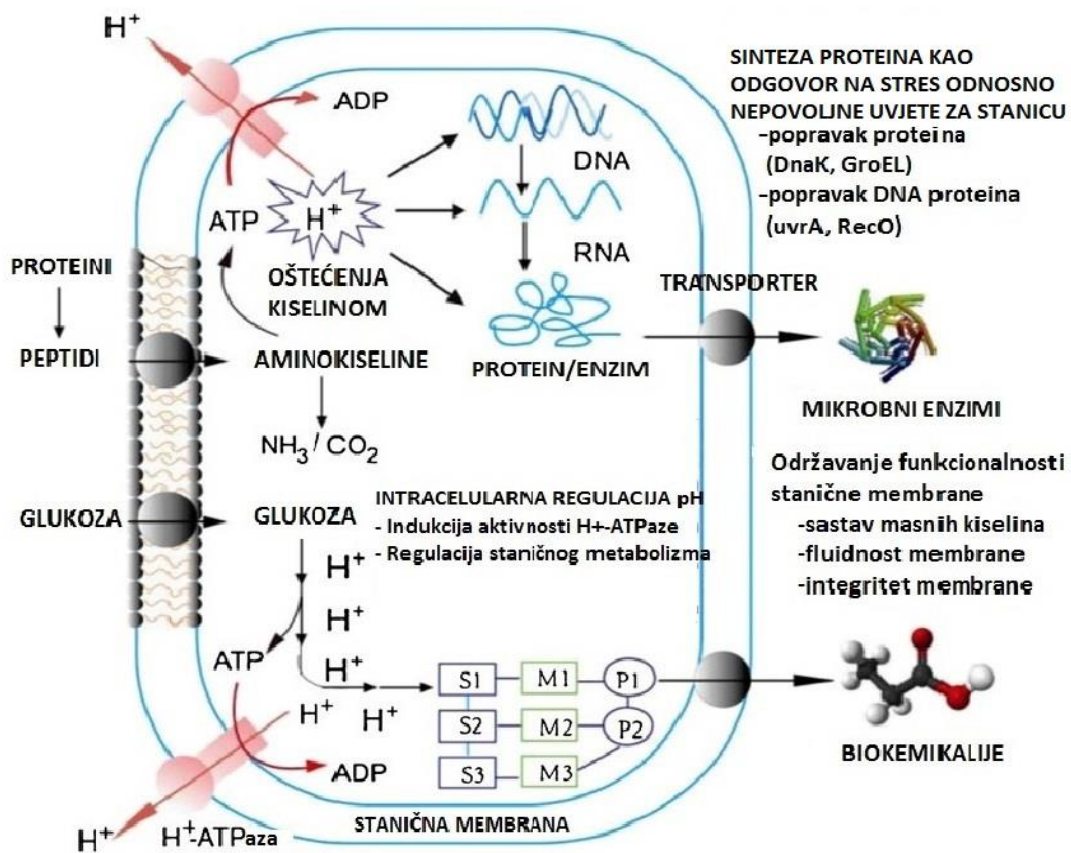
Kratkolančane hlapljive masne kiseline dovode do sniženja oksido-redukcijskog potencijala i pH vrijednosti što posljedično djeluje inhibicijski na rast i razmnožavanje neželjenih bakterija (Šušković i sur., 1997). Bakterije mliječne kiseline proizvode organske kiseline, u prvom redu mliječnu i octenu, koje stvaraju kiseli okoliš čineći ga inhibirajućim za patogene.

2.3. Adaptacija bakterija mliječne kiseline na stresne uvjete

Bakterije mliječne kiseline čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili samo u anaerobnim uvjetima, a fermentacijom izvora ugljika proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. Upotrebljavaju se kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda, a sve je češća primjena bakterija mliječne kiseline kao probiotika ili u kombinaciji s prebioticima (Šušković, 1996.).

BMK kao potencijalni probiotički soj nalazi se u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta kao što su niski pH želuca, žučne soli i probavni enzimi, poput lizozima, pepsina i enzima gušterače. Bakterije roda *Lactobacillus* pokazale su uglavnom veću otpornost prema niskim pH vrijednostima u usporedbi sa sojevima *Bifidobacterium* vrsta (Kršev, 1996; Dunne i sur., 1999). BMK prilikom fermentacije stvaraju mliječnu kiselinu koja djeluje toksično na aktivnost stanica jer dolazi do sniženja intracelularnog pH. Ulaskom nedisocirane mliječne kiseline u stanicu dolazi do njene razgradnje pri čemu se mijenja stanični pH i koncentracija aniona citoplazme što utječe na strukturu baze koja se sastoji od purina i uzrokuje promjenu u strukturi i aktivnosti esencijalnih enzima unutar stanica (Warnecke i Gill, 2005). Snižanjem intracelularnog pH bakterije ulaze u stacionarnu fazu rasta bez obzira na dostupne nutrijente (Hutkins i Nanen, 1993). BMK su razvile stanične mehanizme koji im omogućuju brzu prilagodbu na nepovoljne kisele uvjete održavanjem unutarstanične pH homeostaze,

funkcionalnosti stanične membrane i povećane osjetljivosti proteina stresa čija se aktivnost inducira u nepovoljnim uvjetima (Lebeer i sur., 2008; O'Sullivan i Condon 1997)(Slika 1).



Slika 1. Mehanizmi adaptacije bakterija mliječne kiseline na kisele uvjete mikrookoliša (Wu i sur., 2014)

Osim toga, prethodnim tretiranjem soja s ublaženim nepovoljnim uvjetima, može se poboljšati otpornost bakterijskih sojeva prilikom ekstremnih nepovoljnih uvjeta (De Angelis i sur., 2001).

Na BMK utječu promjene u koncentracijama soli, ali i šećera. Zbog toga imaju sposobnost akumulacije njima korisnih sastojaka kao što su aminokiseline (glutamat, glutamin, prolin), derivati aminokiselina (betaini, peptidi, N-acilirane aminokiseline) te šećeri koji im omogućuju bolju otpornost na osmotski šok (Csonka i Hanson, 1991). Visoke koncentracije šećera dovode do kraćeg osmotskog šoka jer šećeri unutar i izvan stanice brzo prelaze u ravnotežno stanje (Glaasker i sur., 1998b).

Sposobnost preživljavanja djelovanja žučnih soli je također jedan od kriterija za izbor probiotičkih sojeva. Žuč nastaje u stanicama jetre, a njena uloga je sudjelovanje u probavi

masti u duodenumu tankog crijeva. Primarno se sastoji od žučnih kiselina, te žučnih soli koje nastaju kada je organizam izložen stresnim uvjetima. Primarne žučne kiseline, kolna i kenodeoksikolna sintetiziraju se iz kolesterola, a konjugacijom tih kiselina sa glicinom ili taurinom nastaju žučne soli (Hoffman i Mysels, 1992). Specifični mehanizmi koje posjeduju laktobacili i bifidobakterije u otpornosti na žuč su hidroliza žučnih soli te promjene u građi/sastavu stanične membrane i stanične stijenke. U kiselim uvjetima uočena je povećana fluidnost stanične membrane te udio jednostavnih nezasićenih masnih kiselina. Promjenu sastava masnih kiselina i fiziologije stanične površine na primjeru prilagodbe bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* na žučne soli su istraživali Lorena i sur. (2007). Fosfolipidni dvosloj bakterijskih stanica je podvrgnut promjenama kako bi izdržao u nepovoljnom okolišu i olakšao unos egzogenih masnih kiselina i tako održao homeostazu stanične membrane. Bakterijske stanice tako mogu promijeniti strukturu postojećih masnih kiselina ili kontrolirati biosintezu novih. Ovo svojstvo omogućava stanici promjenu viskoziteta stanične membrane i brzu prilagodbu na nove okolišne uvjete (Wu i sur., 2014, Zhang i Rock, 2008.). Osim toga, neke vrste bakterija posjeduju aktivne transportere žučnih kiselina odnosno soli koji ih zbog toga čine otpornima na spomenute kiseline odnosno soli (Thanassi i sur., 1997).

2.4. Probiotici

Najznačajniji predstavnici probiotika su bakterijski sojevi koji pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Pozitivno djelovanje BMK na domaćina očituje se u smislu njihovog antimikrobnog djelovanja prema patogenim mikroorganizmima, poboljšanju metabolizma laktoze, stimulaciji imunološkog sustava, antikancerogenog djelovanja i snižavanja koncentracije kolesterola u serumu. Zbog takvog širokog raspona korisnog djelovanja, primjenjuju se u prehrani i terapiji, a osobito u slučajevima poremećaja ravnoteže intestinalne mikroflore. Smatra se da probiotici izazivaju povoljan učinak na zdravlje ukoliko ih se dnevno unosi oko 10^9 CFU (Sanders i Huis in't Veld, 1999; Tratnik i Božanić, 2012).

Da bi se održala dovoljna količina probiotičkih bakterija, ali i osigurala njihova uloga u crijevnoj mikroflori domaćina, koriste se prebiotici. Ciljno mjesto djelovanja probiotika, prebiotika te njihove združene primjene u obliku sinbiotika, kao funkcionalnih dodataka hrani, je gastrointestinalni sustav. Gibson i Roberfroid (1995) definiraju prebiotik kao neprobavljiv sastojak hrane koji povoljno utječe na domaćina selektivnom stimulacijom rasta i/ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu što poboljšava zdravlje domaćina (Božanić i Tratnik, 1999). Da bi određena tvar bila prebiotik mora dospjeti u izvornom obliku

u debelo crijevo te mora spriječiti pojavu patogenih bakterija. U gastrointestinalnom traktu selektivno stimuliraju rast autohtonih korisnih bakterija, kao što su bifidobakterije i laktobacili te na taj način uklanjaju bakterije koje negativno utječu na zdravlje domaćina. Najčešći prebiotici koji se koriste na tržištu su: rafinoza, sojini oligosaharidi, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, galaktozil laktoza, palatinoza te poliolli (Šušković i sur., 2003; Božanić i Tratnik 1999).

2.4.1. Starter kulture i funkcionalne starter kulture

Već duži niz godina bakterije mliječne kiseline imaju primjenu kao starter kulture u svrhu fermentacije hrane i pića s ciljem poboljšanja nutricionističkih, organoleptičkih i tehnoloških karakteristika proizvoda. BMK pretvaraju ugljikohidrate u različite organske kiseline, od kojih su najčešće mliječna i octena kiselina, ali mogu proizvesti i etanol, bakteriocine, različite sastavnice arome proizvoda, egzopolisaharide i neke enzime. Uslijed promjene pH, mijenjaju se izvorne karakteristike hrane, što rezultira poboljšanjem organoleptičkih karakteristika konačnog proizvoda. (De Vuyst i sur., 2007; Frece i sur. 2012, 2014).

Starter kulturu možemo definirati kao mikrobni pripravak velikog broja jednog ili više sojeva mikroorganizma koji se uvode u sirovinski materijal s ciljem ubrzavanja i usmjeravanja procesa fermentacije, kako bi se proizvele fermentirane namirnice (Ray, 1992).

Funkcionalne starter kulture su kulture koje posjeduju barem jedno nasljedno, funkcionalno svojstvo s krajnjim ciljem poboljšanja gotovog proizvoda. Poželjne bakterije mliječne kiseline su one koje proizvode antimikrobne supstancije kao što su bakteriocini koji osiguravaju mikrobiološku ispravnost namirnica, šećerne polimere koji poboljšavaju teksturu, aromatične spojeve koji poboljšavaju okus ili sojevi koji iskazuju proteolitička svojstva. Danas se intenzivno proučavaju starter kulture koje proizvode bakteriocine, posebice za proizvodnju sireva i kobasica, zatim starter kulture koje proizvode egzopolisaharide u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda i sireva te kulture koje proizvode supstancije odgovorne za specifičnu aromu u fermentaciji kiselih tijesta i kakaa te općenito bakterijski sojevi s antimikrobnim svojstvima (Leroy i De Vuyst, 2004).

2.4.2. Izbor sojeva za probiotičku uporabu

Bakterijski sojevi za probiotičku upotrebu trebaju zadovoljiti tzv. opće, tehnološke i funkcionalne izborne kriterije. Pod općim kriterijima se podrazumijeva podrijetlo, zdravstvena sigurnost, otpornost prema niskom pH, želučanom soku, soku gušterače i žučnim solima.

Funkcionalni kriteriji su adhezija na crijevni epitel, antimikrobno djelovanje, poticanje imunološkog odgovora te promjene mikrobnog metabolizma u probavnom traktu. Tehnološki kriteriji uključuju genetičku stabilnost, mogućnost proizvodnje u velikom mjerilu, preživljavanje i zadržavanje aktivnosti tijekom pripreve i čuvanja probiotičkog proizvoda te neutralan ili pozitivan doprinos aromi ili okusu u fermentiranim proizvodima (Forssten i sur., 2011; Kos, 2001; Sanders i Huis in't Veld, 1999; Frece 2007). Dodatno se može postaviti „specifičan izborni kriterij“ ako je probiotički soj namijenjen za specifičnu zdravstvenu primjenu. Popis svih očekivanih svojstava potencijalnog probiotičkog soja prema općim (1-6), tehnološkim (7-10) i funkcionalnim zahtjevima (11-17) prikazan je u tablici 1. (Kullen i Klaenhammer, 1999; Kos, 2001; Šušković i sur., 2001, Frece 2007).

Tablica 1. Zahtjevi za izbor probiotičkih sojeva (Kullen i Klaenhammer, 1999; Kos, 2001; Šušković i sur., 2001; Frece, 2007)

1	točna taksonomska identifikacija	Opći zahtjevi
2	humano podrijetlo za humane probiotike	
3	netoksičnost i nepatogenost	
4	genetička stabilnost (nema prijenosa plazmida)	
5	otpornost prema žučnim kiselinama	
6	otpornost prema niskim pH vrijednostima	
7	stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreve kulture, skladištenja i isporuke	Tehnološki zahtjevi
8	visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu (10^6 - 10^8 mL ⁻¹ ili g ⁻¹), npr. 100 g proizvoda osigurava 10^8 - 10^{10} živih stanica	
9	brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreve probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja tijekom čuvanja i distribucije	
10	doivanje poželjnih orgaoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese	
11	sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u "ciljanom" području primjene u organizmu	Funkcionalni zahtjevi
12	sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela	
13	sinteza antimikrobnih supstancija, uključujući bakteriocine, vodikov peroksid i organske kiseline	
14	antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama	
15	mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje proizvodi autohtona mikroflora	
16	imunostimulatorni učinak	
17	sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentarnih korisnih učinaka na zdravlje	

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu izolirani su i identificirani u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u sklopu istraživanja autohtone mikrobne populacije riba i školjaka Jadranskog mora. Sojevi nose oznake prema uzorku iz kojih su izolirani (npr. O1.- orada, uзорak 1).

3.1.2. Hranjive podloge

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS (Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80; $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,2; $MnSO_4 \times 7H_2O$ 0,05; Na-acetat 5; agar 13. pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 C/15min.
- MRS (Man, Rogosa i Sharpe) bujon je istog sastava kao MRS-agar, samo bez dodanog agara.

3.1.3. Pribor i oprema

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- vibracijska miješalica (Tehnica, Slovenija)
- centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- centrifuga Centric 150 (Tehnica, Slovenija)
- inkubator MEMMERT BE 600 (Mermert GmbH + Co.KG, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- tehnička vaga (Sartorius, Njemačka)
- analitička vaga (Sartorius, Njemačka)
- pH-metar (Mettler Toledo, Švicarska)

3.2. Metode

3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

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

3.2.2. Uzgoj mikroorganizama

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

3.2.3. Priprema simuliranog želučanog soka i simuliranog soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem 3 g/L pepsina (Sigma Aldrich, SAD) u 0.5% fiziološkoj otopini kojoj je pH podešen na 2.5 i 3.0 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem 1 g/L pankreatina (Fluka, Švicarska) i 3 mg/mL žučnih soli (Difco, SAD) u 0.5% fiziološkoj otopini kojoj je pH podešen na 8.0 s natrijevom lužinom.

3.2.4. Priprema suspenzija bakterijskih stanica

Kulture bakterija mliječne kiseline (*L. plantarum* O1, *L. helveticus* O9, *L. mesenteroides* L4A, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4) uzgojene su preko noći u MRS bujonu i centrifugirane 15 minuta pri 10 000 rpm. Dobiveni talog je ispran s 0.5% sterilnom fiziološkom otopinom, ponovno centrifugiran i resuspendiran u istoj otopini.

3.2.5. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Priređena suspenzija bakterijskih stanica izložena je djelovanju želučanog soka tijekom 2 sata, zatim je centrifugirana na 6000 rpm i resuspendirana u simuliranom soku tankog crijeva tijekom 4 sata (Kos, 2001, Frece 2003). Broj poraslih kolonija je određen indirektnom metodom.

3.2.6. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz uzoraka koji su sadržavali bakterijske stanice pripremljena su decimalna razrijeđenja i naciepljena na MRS agar. Nakon inkubacije od 48 sati na 37°C izbrojane se porasle kolonije

a ukupan broj izražen je kao CFU/mL.

4. Rezultati i rasprava

Mikrobna populacija intestinalnog trakta čovjeka je izrazito kompleksna, sadrži mikrobne vrste koje se mogu svrstati na one koje povoljno djeluju na zdravlje domaćina, na one koji su neutralne i ne utječu na zdravlje ljudi, te na nepoželjne koje predstavljaju mikroorganizmi štetni za zdravlje (Garrido i sur., 2012).

Sa otprilike 1,5 kg bakterija u debelom crijevu, koncentracije 10^{12} stanica po gramu crijevnog sadržaja, crijevna mikrobiota je priznata kao važan metabolički organ, usporediv s jetrom (Martin i sur., 2009), te se može smatrati kontinuiranim sustavom uzgoja, gdje neprobavljeni dijelovi hrane služe kao supstrat za održavanje visoke koncentracije i raznolikosti crijevne mikrobiote. Mikroorganizmi u crijevima upotrebljavaju složene ugljikohidrate, proteine i masti koje nisu probavljene u tankom crijevu, te komponente sekreta domaćina i epitelne stanice kao izvor ugljika i energije. Iako su nutrijenti dostupni najviše u želucu i tankom crijevu, ovi dijelovi intestinalnog trakta sadrže mali broj mikroorganizama. Broj mikroorganizama u tim dijelovima je ograničen zbog niske pH vrijednosti i sadržaja želuca, toksičnosti žučnih soli i relativno brzog protoka tijekom probave (Walsh i sur., 2014).

Probiotički sojevi iskazuju svoje zdravstvene učinke prvenstveno u GIT-u. Budući da u GIT-u prevladavaju nepovoljni uvjeti (kiseli pH želuca, probavni enzimi i žučne soli), poželjno je da probiotički sojevi prežive te nepovoljne uvjete u dovoljno visokom broju živih aktivnih stanica kako bi mogli iskazati pozitivne učinke na zdravlje domaćina. Glavnu prepreku pri prolasku mikroorganizama kroz želudac čine niska pH vrijednost i pepsin. Kada se želučani sok izluči, pH vrijednost mu je oko 2, a udjel soli oko 0,5% dok je vrijeme zadržavanja u želucu oko 90 min (Kos, 2001, Frece 2003). Podaci iz literature govore da je većina ispitanih bakterija iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* otporna na djelovanje probavnih enzima iz soka gušterače, dok je veća osjetljivost utvrđena prema djelovanju žučnih soli (Kos, 2001; Frece 2003). Stoga je glavni kriterij kod odabira probiotičkih sojeva otpornost prema žučnim solima. U ovome radu korišteni su autohtoni sojevi BMK *Lactobacillus plantarum* O1, *Lactobacillus helveticus* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *Lactobacillus plantarum* D1 i *L. plantarum* K4, izolirani iz riba i školjaka Jadranskog mora, te je ispitano njihovo preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta s ciljem njihove karakterizacije kao potencijalnih funkcionalnih starter kultura. Praćeno je preživljavanje prilikom direktnog prijelaza iz simuliranog želučanog soka kojemu je pH iznosio 2,5 i 3 u simulirani sok tankog crijeva. Vrijeme zadržavanja u simuliranom želučanom soku iznosilo je 2 sata, dok je u simuliranom soku tankog crijeva iznosilo 4 sata (Tablica 4).

Tablica 2. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Sojevi	Početni broj (CFU/mL)	Želučani sok pH 2,5(CFU/mL)	Želučani sok pH 3 (CFU/mL)	Sok tankog crijeva, (CFU/mL)
<i>Lactobacillus plantarum</i> D1	4×10^9	7×10^9	5×10^6	2×10^6
<i>Lactobacillus plantarum</i> O1	1.1×10^9	2×10^8	8×10^8	5×10^9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> L4A	4×10^9	1×10^8	$1,8 \times 10^9$	5×10^6
<i>Lactobacillus plantarum</i> K4	5×10^9	5×10^8	5×10^9	4×10^7
<i>Lactobacillus helveticus</i> O9	3×10^9	1×10^9	5×10^9	1×10^9

Svi sojevi su pokazali dobro preživljavanje nakon tretmana u simuliranom gastrointestinalnom traktu, dok je najveće preživljavanje pokazao *L. plantarum* O1 (5×10^9 CFU / mL) i *L. helveticus* O9 (1×10^9 CFU / mL) (Tablica 2). Dobra otpornost *L. helveticus* O9 može se objasniti prisutnošću S-proteina. Do sada biološka uloga ovog proteina nije u potpunosti razjašnjena, ali rezultati dobiveni od strane različitih autora ukazuju da ima zaštitnu ulogu (Frece i sur., 2005; Golowczyc i sur., 2007; Beganović i sur., 2011). Izolirani sojevi pokazuju bolje preživljavanje nakon tretmana sa želučanim sokom pH 3 u odnosu na želučani sok pH 2.5. Najniže preživljavanje nakon simuliranog soka tankog crijeva zabilježeno je za *L. plantarum* D1 i iznosi 2×10^6 CFU / mL. Tolerancija na žučne soli smatra se važnom osobinom *Lactobacillus* sojeva, što im omogućuje preživljavanje, rast i izlučivanje metabolita tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Prema Sanders i sur. (1996), bakterije iz roda *Lactobacillus* koji mogu rasti i metabolizirati pri normalnoj fiziološkoj koncentraciji žuči mogli bi preživjeti u gastrointestinalnom traktu. Otpornost nekih sojeva na žučnu sol povezana je i s aktivnošću hidrolaze žučne soli koja može hidrolizirati kombiniranu žučnu sol i time smanjiti njenu toksičnost i nuspojave. Nadalje, Gänzle i sur. (1999b) te Du Toit i sur. (1998) sugeriraju da neke komponente hrane mogu zaštititi i povećati otpornost soja na žučnu sol. Obzirom na dobivene rezultate, odnosno dobro preživljavanje u simuliranom GIT-u, može se zaključiti kako izolirani sojevi bakterija mliječne kiseline mogu biti potencijalne funkcionalne starter kulture. Naravno, s ciljem njihovog definiranja kao autohtonih starter kultura potrebno je zadovoljiti sve opće kriterije za izbor starter kultura (Šušković, 2008; Frece i sur. 2014).

5. Zaključci

1. Prilikom izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta broj živih stanica svih izoliranih sojeva BMK ostao je visok što znači da ispitani sojevi uspješno preživljavaju simulirane uvjete GIT-a i zadovoljavaju jedan od glavnih selekcijskih kriterija za izbor probiotičkih sojeva.
2. Bakterijski soj *L. plantarum* O1 pokazao je najbolju otpornost na djelovanje pepsina i niskog pH u simuliranom želučanom soku, ali i prema djelovanju enzima gušterače te žučnih soli. S druge strane, najmanju otpornost prema navedenim uvjetima pokazao je bakterijski soj *L. plantarum* D1.

6. Literatura

Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small - scale facility 1- Screening and characterization of the antimicrobial compounds. *Food Control* **17**: 454 – 461.

Baya, A. M., Toranzo, A. E., Lupiani, B., Li,T., Roberson, B. S., Hetrick, F. M. (1991) Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *American Society for Microbiology* **57**: 3114-3120.

Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Pavunc, A. L., Habjanič, K., Šušković, J. (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie van Leeuwenhoek International Jpurnal of General and Molecular Microbiology* **100** (1): 43-53.

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

Brkić, B. (1995) Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline. *Magistarski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007) Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods* **71**: 71-74.

Csonka, L. N., Hanson, A. D. (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* **45**: 569-606.

De Angelis M., Bini L., Pallini V., Cocconcelli P. S., Gobbetti, M. (2001) The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* **147**: 1863–1873

De Vuyst, L., Leroy (2007) Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, And Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**: 194-199.

Du Toita, M., Franza, C. M. A. P., Dicksb, L. M. T., Schillinger, U., Haberera, P., Warliesc, B., Ahrensc, F., Holzapfela, W. H. (1998) Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **40** (1-2): 93-104.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O' Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O'Sullivan, G. C. O., Shanahan, F., Collins, J. K. (1999) Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **76**: 279-292.

Duraković, S., suradnici (2002) Moderna mikrobiologija namirnica, Durieux, knjiga prva.

Forssten, S. D., Sindelar, C. W., Ouwehand, A. C. (2011) Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe* **17**: 410-413.

Frece J. (2003) *In vitro* i *in vivo* istraživanja probiotičkog mehanizma djelovanja bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. *Magistarski rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Frece J. (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. Doktorski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Frece, J., Kos, B., Svetec, I.-K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušćković, J. (2005) Importance of S-layer protein sin probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*. **2**: 285-292.

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

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

Frece, J., Pleadin, J., Vahčić, N., Đugum, J., Mrvčić, J., Markov, K. (2012) Mikrobiološka, fizikalno- kemijska i senzorska svojstva industrijskih kobasica proizvedenih s različitim komercijalnim starter kulturama. *Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis*. **4**: 293-300.

Frece, J., Cvrtila, J., Topić, I., Delaš, F., Markov, K. (2014) Mogućnost primjene bakterije *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* kao funkcionalne starter kulture. *Food technology and biotechnology*. **4**: 489-494.

Frece, J., Kovačević, D., Kazazić, S., Mrvčić, J., Vahčić, N. (2014) Comparison of sensory properties, shelf life and microbiological safety of industrial sausages produced with autochthonous and commercial starter cultures (starter cultures for sausages production). *Food Technology and Biotechnology* **52** (3): 307-316.

Gänzle, M. G., Weber, S., Hammes, W. P. (1999b) Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology* **46** (3): 207-217.

Garrido, D., Barile, D., Mills, D. A. (2012) A Molecular Basis for Bifidobacterial Enrichment in the Infant Gastrointestinal Tract. *Advances in Nutrition* **3**: 415–421.

Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K. J., Kneifel, W., (2013) Seafood biopreservation by lactic acid bacteria. *LWT- Food Science and Technology* **54**: 315-324.

Ghanbari M., Jami M. (2013) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: a promising approach to seafood biopreservation. U: Lactic Acid Bacteria – R & D for food, Health and Livestock Purposes, Kongo M., ur., InTech Publication, str. 382- 404.

Glaasker, E., Tjan, F. S., Ter Steeg, P. F., Konings, W. N., Poolman, B. (1998b) Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress, *Journal Bacteriology* **180**: 4718-4723.

Golowczyc, M. A., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A. G., De Antoni, G. L. (2007) Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica*

serovar *Enteritidis* **118** (3): 264-273.

Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995) The genus *Lactobacillus*, u: Genera of lactic acid bacteria, 2 (Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H., ured.), Blackie Academic & Professional, London, str. 19-54.

Hoffman, A.F., Mysels, K.J. (1992) Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH and Ca²⁺ ions, *Journal of Lipid Research* **33**: 617-626.

Holzapfel, W.H., Hammes, W.P. (1989) Die Bedeutung moderner biotechnologischer Methoden für die Lebensmittelherstellung. U: Biotechnologie in der Agrar-und Ernährungswirtschaft. Berichte über Landwirtschaft, 201. Sonderheft, V.P. Parey (ured.), Hamburg i Berlin, str. 47-65.

Hutkins, R.W., Nannen, N.L. (1993) pH homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* **76**: 2354-2365.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Kršev, Lj. (1996) Utjecaj bakterija mliječne kiseline na zdravlje ljudi. *Mljekarstvo* **46** (1):57-65.

Kullen, M. J., Klaenhammer, T. R. (1999) Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria. U: *Probiotics. A Critical Review*, G. W. Tannock (ured.), Horizon scientific press, England, str. 65-84.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72** (4): 728–764.

Leroi F. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology* **27**: 698-709.

Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15**: 67-78.

Lorena, R., Borja, S., Patricia, R.-M., Clara G., Abelardo, M. (2007) Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. *FEMS Microbiology Letters* **274**: 316-322.

Martin, F. P., Sprenger, N., Yap, I. H., Wang, Y., Babiloni, R., Rochat, F., Rezzi, S., Cherbut, C., Kochhar, S., Lindon, J. C., Holmes, E., Nicholson, J. K. (2009) Panorganismal gut microbe – host metabolic crosstalk. *Journal of Proteome Research* **8**: 2090 – 2015.

Mattila-Sandholm, T., Myllarién, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* **12**: 173-182.

Nes, I. (2011). History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in actic acid bacteria. In D. Drider, & S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications* (pp. 3-12). New York: Springer Publishing Company.

Nilsson, L., Hansen, T., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knochel, S., Gram, L, Gravesen, A. (2005). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 172-183.

O'Sullivan E., Condon S. (1997) Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **63** (11): 4210–4215.

Pinto A. L., Fernandes M., Pinto C., Albano H., Castilho F., Teixeira P., Gibbs P. A. (2009) Characterization of anti- *Listeria* bacteriocins isolated from shellfish. *International Journal of Microbiology* **129**: 50-58.

Ray (1992) The Need For Food Biopreservation. In: Ray B, Daeschel M, editors. Food biopreservatives of microbial origin Boca Raton, Florida: *CRC Press*, str. 123.

Rogelj I (1994) Lactic acid bacteria as probiotics. *Mljekarstvo* **44** (4): 277 – 284.

Sanders, M. E. i Huis in't Veld, J. (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the

market: microbiological, product, regulatory and labeling issued. U: Proceedings of the 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, str. 293-316.

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

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanić K., Matošić S. (2010) Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria, *Food Technology and Biotechnology* **48** (3): 296-307.

Šušković J., Brkić B., Matošić S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47** (1): 57-73.

Šušković, J. (1996) The growth and probiotic effect of chosen lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Croatia.

Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology* **39**: 227-235.

Thanassi, D.G., Cheng, L.W., Nikaido, H. (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**: 2512-2518.

Topisirović, Lj., Kojić, M., Fira, Dj., Golić, N., Strahinić, I., Lozo, J. (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **112** (3): 230-235.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi. **5**: 195-200.

Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., i sur. (2010) Dominant and diet – responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. **5**: 195-200.

Walsh, C. J., Guinane, C. M., O'Toole, P. W., Cotter, P. D. (2014) Beneficial modulation of the gut microbiota. *EBS Letters* **588** (22): 4120-4130.

Warnecke T., Gill R. T. (2005) Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories* **4** (1): 25–32.

Wilson, K. H., J. N. Sheagren i R. Freter (1986): Gnotobiotic models for study of *Clostridium difficile* and *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases* **153**: 547-551.

Wu, C., Huang, J., Zhou R. (2014) Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 1055–1063.

Zdolec, N., Lazić, S., Kozačinski, L., Hadžiosmanović, M., Filipović, I. (2007) Inhibicijsko djelovanje bakterija mliječne kiseline izoliranih iz svježeg kravljeg sira. *Mljekarstvo* **57**(1): 5-13.

Zhang, Y. M., Rock, C. O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 222-233.

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.

Matešić
