

# Funkcionalna karakterizacija i optimiranje uzgoja bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka na nusproizvodima mliječne industrije

---

Habuš, Ena

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:159:813450>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ena Habuš  
0058221167**

**FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA I OPTIMIRANJE UZGOJA  
BAKTERIJSKIH SOJEVA IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA NA  
NUSPROIZVODIMA MLIJEČNE INDUSTRIJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Probiotici i starter kulture

**Mentor:** dr. sc. Martina Banić

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Funkcionalna karakterizacija i optimiranje uzgoja bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka na nusproizvodima mliječne industrije

Ena Habuš, 0058221167

**Sažetak:** Bakterije mliječne kiseline (BMK) nužne su za održavanje zdravlja probavnog sustava te imaju važnu ulogu u fermentaciji hrane. U radu su korišteni odabrani sojevi BMK izolirani iz mikrobiote majčinog mlijeka kako bi se ispitala njihova funkcionalna probiotička svojstva te odredio potencijal njihovog uzgoja u slatkoj i kiseloj sirutki te permeatu mlijeka u svrhu iskorištenja nusproizvoda mliječne industrije po načelima cirkularne ekonomije. Odabrani sojevi korišteni u istraživanju su *Lactiplantibacillus plantarum* MB18, *Lactiplantibacillus plantarum* KR19, *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1. Svi sojevi su pokazali visoku antioksidacijsku aktivnost pri čemu se posebno istaknuo soj MB18. Dokazana je i antimikrobna aktivnost ovih sojeva, pri čemu su izolati MB18 i KR19 najefikasnije inhibirali rast patogenih mikroorganizama i srodnih BMK. Među ispitanim nusproizvodima mliječne industrije, svi sojevi su pokazali bolji rast u kiselju sirutki nego u slatkoj sirutki ili permeatu.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, majčino mlijeko, antioksidacijska aktivnost, antimikrobno djelovanje, nusproizvodi mliječne industrije

**Rad sadrži:** 22 stranice, 14 slika, 5 tablica, 22 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** dr. sc. Martina Banić

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Katarina Butorac

**Datum obrane:** 10. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Nutrition

**Functional characterization and optimization of the cultivation of bacterial strains isolated  
from breast milk on by-products of the dairy industry**

**Ena Habuš, 0058221167**

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) are necessary for maintaining the health of the host's digestive system and play an important role in food fermentation. In this work, selected LAB strains from the microbiota of breast milk were used to test their functional probiotic properties and determine the potential of their cultivation in sweet and sour whey and permeate to utilise the by-products of the dairy industry according to the principles of circular economy. The strains selected for the study were *Lactiplantibacillus plantarum* MB18, *Lactiplantibacillus plantarum* KR19, *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 and *Limosilactobacillus fermentum* MC1. All strains showed high antioxidant activity, with strain MB18 specially standing out. The antimicrobial activity of these strains was also demonstrated, with isolates MB18 and KR19 being the most effective in inhibiting the growth of pathogenic microorganisms and related LAB. Of the milk by-products tested, all strains showed better growth in acid whey than in sweet whey or permeate.

**Keywords:** lactic acid bacteria, mother's milk, antioxidant activity, antimicrobial activity, by-products of the dairy industry

**Thesis contains:** 22 pages, 14 figures, 5 tables, 22 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Martina Banić, PhD

**Technical support and assistance:** Katarina Butorac, PhD

**Thesis defended:** September 10, 2024

# Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. MAJČINO MIJEKO - POTENCIJALNI IZVOR BMK .....	2
2.2. ANTIOKSIDACIJSKA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BMK.....	3
2.3. SIRUTKA.....	5
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>6</b>
3.1. MATERIJALI.....	6
3.1.1 Radni mikroorganizmi.....	6
3.1.2. Hranjive podloge .....	6
3.1.3. Kemikalije.....	7
3.1.4. Aparatura i pribor.....	7
3.2. METODE.....	9
3.2.1. Održavanje i čuvanje radnih mikroorganizama .....	9
3.2.2. Ispitivanje potencijala antioksidacijske aktivnosti .....	9
3.2.3. Turbidimetrijsko određivanje antimikrobnog djelovanja odabranih izolata BMK prema patogenim test-mikroorganizmima i srodnim BMK.....	9
3.2.4. Potencijal primjene sirutke kao lioprotektora i medija za uzgoj BMK.....	11
3.2.5. Određivanje pH vrijednosti i udjela mliječne kiseline.....	11
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>12</b>
4.1. ISPITIVANJE POTENCIJALA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI STANICA I UNUTARSTANIČNIH EKSTRAKATA BEZ STANICA.....	12
4.2. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA ODABRANIH IZOLATA PREMA PATOGENIM TEST-MIKROORGANIZMIMA I SRODNIM BMK.....	13
4.3. POTENCIJAL PRIMJENE SIRUTKE KAO LIOPROTEKTORA I MEDIJA ZA UZGOJ BMK, ODREĐIVANJE PH VRIJEDNOSTI TE % MLIJEČNE KISELINE .....	16
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>20</b>
<b>6. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>21</b>

## 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su Gram-pozitivne bakterije koje ne stvaraju spore, katalazu su negativne, nepokretne i preferiraju anaerobne ili mikroaerofilne uvjete. Ovi acidofilni organizmi mogu preživjeti i razmnožavati se u okruženju s pH vrijednostima između 4,5 i 7,0 (Garbacz, 2022). Tijekom godina, BMK su značajno poboljšale kvalitetu i sigurnost hrane pretvaranjem ugljikohidrata u mliječnu kiselinu. Njihova primjena je prošla put od spontane fermentacije do pažljivo kontrolirane upotrebe kao starter kultura u prehrambenoj industriji (De Filippis i sur., 2020). Sojevi iz roda *Lactobacillus* se koriste za očuvanje hrane i kontrolu infekcija patogenim mikroorganizmima zahvaljujući sposobnosti inhibicije njihova rasta, proizvodnji bakteriocina i razgradnji mikotoksina te probiotičkim i antimikrobnim svojstvima (Mokoena, 2017).

Majčino mlijeko je idealna hrana za novorođenčad jer osigurava potpunu prehranu i sadrži mnoge bioaktivne komponente. Ono posjeduje vlastiti mikrobiom s korisnim bakterijama poput laktobacila, koje igraju ključnu ulogu u formiranju crijevnog mikrobioma kod novorođenčadi (Łubiech i Twarużek, 2020). Probiotičke BMK su intenzivno proučavane zbog svoje otpornosti na oksidativni stres i svojih antioksidativnih svojstava. BMK također proizvode bakteriocine, potentne antimikrobne peptide koji su posebno aktivni protiv srodnih Gram-pozitivnih bakterija. Bakteriocini razgrađuju peptidoglikan u staničnoj stijenci bakterija hidrolizom glikozidnih ili peptidnih veza, što ih čini korisnim za biokonzerviranje fermentirane hrane (García-Cano i sur., 2019).

Sirutka je tekući dio mlijeka koji ostaje nakon uklanjanja masti i kazeina te sadrži uglavnom topive komponente poput laktoze, topivih soli i globularnih proteina. Karakteristična zelenkasto-žuta boja tekuće sirutke dolazi od prisutnosti riboflavina (vitamin B12). Sirutka se tradicionalno dijeli na kiselu i slatku, ovisno o uvjetima obrade (Allen i sur., 2021). Cilj ovog rada je ispitati antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost odabranih sojeva BMK iz rodova *Lactiplantibacillus* i *Limosilactobacillus*, izoliranih iz majčinog mlijeka, prema test mikroorganizmima i srodnim BMK. Također, ispitan je mogući potencijal sirutke kao lioprotektora i medija za uzgoj odabranih izolata majčina mlijeka u svrhu proizvodnje funkcionalnih probiotičkih napitaka.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MAJČINO MIJEKO - POTENCIJALNI IZVOR BMK

BMK pripadaju skupini Gram-pozitivnih bakterija koje ne stvaraju spore te su katalaza-negativne. Općenito, BMK nisu pokretne, anaerobne su ili mikroaerofilne. Prema obliku, mogu biti koki (okrugle) ili bacili (štapičaste). Osim oblika, klasificiraju se i prema sposobnosti fermentiranja ugljikohidrata na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK uglavnom proizvode mliječnu kiselinu iz šećera, dok heterofermentativne proizvode mliječnu kiselinu, octenu kiselinu ili alkohol i ugljikov dioksid. BMK inhibiraju rast patogenih mikroorganizama, imaju sposobnost razgradnje mikotoksina, kao i antimikrobnu aktivnost (Mokoena, 2017). Do danas se nekoliko izolata BMK iz roda *Lactobacillus* te njihovi bakteriocini primjenjuju u konzerviranju hrane i u kontroli patogena kod ljudi. Transformacijom ugljikohidrata iz sirovih materijala u većinski mliječnu kiselinu, BMK su kroz povijest doprinijele kvaliteti i sigurnosti hrane. Spoznaja stvarnog doprinosa i potencijala BMK u fermentaciji hrane se mijenjala tijekom vremena, od spontane uporabe fermentacije do pažljivo promišljenog odabira i primjene BMK kao starter kultura za prehrambenu industriju (De Filippis i sur., 2020). Mnoge vrste i sojevi BMK smatraju se probioticima, koji se definiraju kao "živi mikroorganizmi koji, kada se primjenjuju u adekvatnim količinama, pružaju korist za zdravlje domaćina", prema definiciji predloženoj 2001. godine od strane panela stručnjaka Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (*engl.* Food and Agriculture Organization, FAO) i Svjetske zdravstvene organizacije (*engl.* World Health Organization, WHO), a kasnije potvrđenoj od strane Međunarodnog znanstvenog udruženja za probiotike i prebiotike (*engl.* International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP) u konsenzusnom izvješću 2014. godine (Hill i sur., 2014).

Majčino mlijeko smatra se optimalnim načinom prehrane jer novorođenčadi osigurava potpunu ishranu i mnoge bioaktivne komponente. Iako se majčino mlijeko prvotno smatrano sterilnom tekućinom, a mikrobi koje su izolirani kontaminantima, danas je općeprihvaćeno da majčino mlijeko posjeduje vlastiti jedinstveni mikrobiom. Sojevi izolirani iz majčinog mlijeka mogu se smatrati potencijalnim probioticima. Mnoga istraživanja usredotočuju se na izolaciju sojeva iz mlijeka radi kasnije uporabe na tržištu i prehrane novorođenčadi (Lyons i sur., 2020). Razna istraživanja su izvijestila o korisnom djelovanju probiotičkih bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka na formiranje crijevnog mikrobioma novorođenčadi. Ljudsko mlijeko sadrži široki spektar bakterija iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Enterococcus* (Łubiech i Twarużek, 2020).

## 2.2. ANTIOKSIDACIJSKA I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BMK

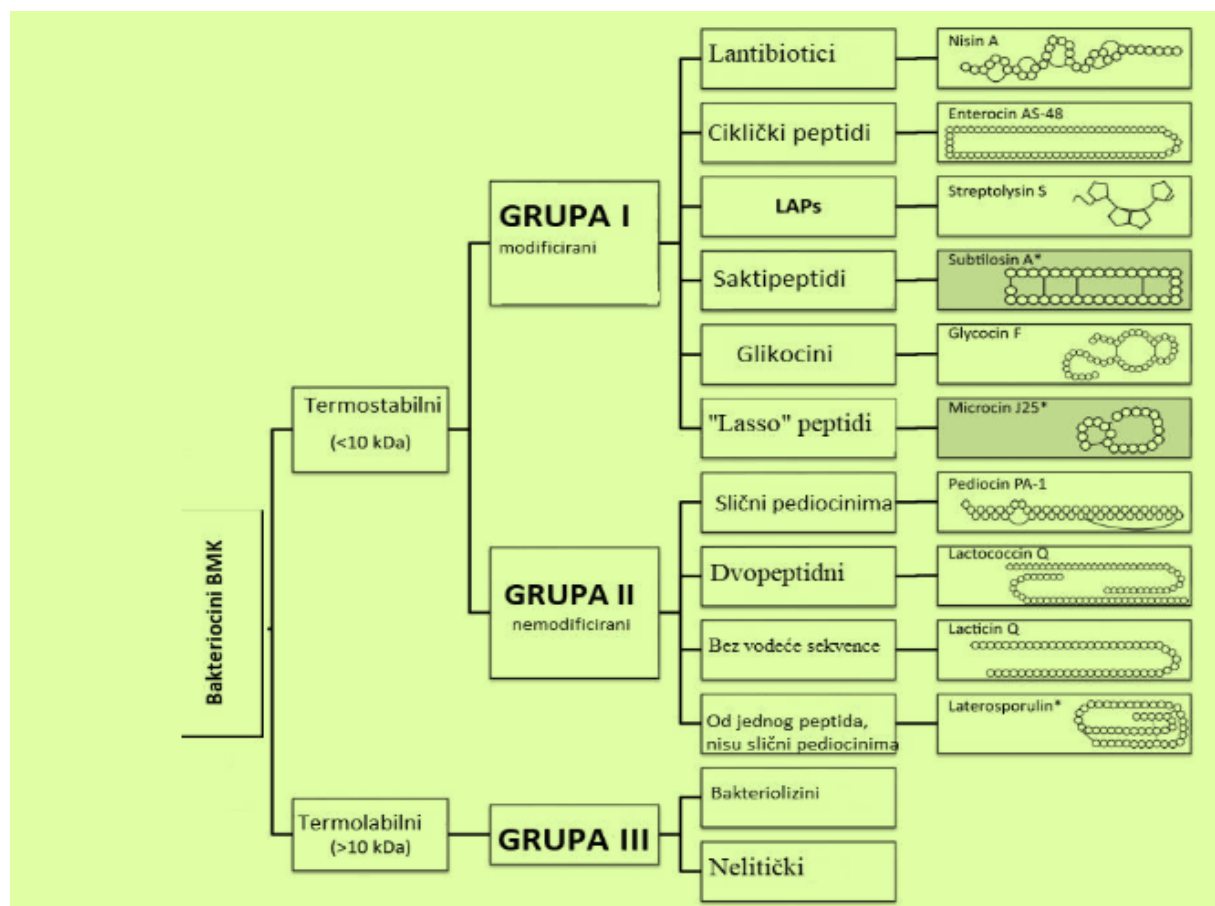
Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno je istraživana tolerancija na oksidativni stres i antioksidativna sposobnost probiotičkih BMK, kao i njihova uloga u promicanju zdravlja. Antioksidativna svojstva probiotičkih sojeva potvrđena su brojnim istraživanjima, a proučavana je i primjena BMK u bolestima povezanim s oksidativnim stresom. Probiotički sojevi BMK posjeduju snažne redoks sustave povezane s antioksidativnim enzimima i sustavima za popravak oksidativnih oštećenja. Navedeno pridonosi njihovoj toleranciji na O<sub>2</sub> i funkcionalnoj ulozi. Probiotički sojevi BMK pokazuju značajnu antioksidativnu sposobnost uglavnom putem uklanjanja slobodnih radikala, vezivanja pro-oksidativnih metalnih iona, reguliranja relevantnih enzima i moduliranja mikrobiote crijeva. Na taj način, oni mogu doprinijeti produljenju trajnosti prehrambenih proizvoda i promicanju zdravlja te ravnoteže redoks stanja u tijelu. Kada je tijelo u stanju oksidativnog stresa, nakupljeni reaktivni kisikovi spojevi (*engl.* reactive oxygen species, ROS) uzrokuju lančane reakcije slobodnih radikala oštećujući biomolekule, što rezultira štetom za organizam. Oksidativni stres je glavni čimbenik u razvoju brojnih poremećaja kao što su kardiovaskularne, upalne, cerebrovaskularne i degenerativne bolesti te starenje i rak. Mlade životinje su posebno izložene oksidativnim oštećenjima jer u svom crijevnom traktu nemaju zreli antioksidativni sustav, što dovodi do neravnoteže između oksidativnog i antioksidativnog sustava te povećane količine slobodnih radikala i malondialdehida (MDA) te smanjenog kapaciteta antioksidativnih enzima. Više studija je pokazalo da probiotički sojevi, poput onih bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, posjeduju izvrsnu antioksidativnu sposobnost pružanja zaštite od oksidativnog stresa (Feng i Wang, 2020). Brojna istraživanja su pokazala da adsorpcija štetnih tvari od strane sojeva *Lactobacillus* može ublažiti njihov negativan učinak na zdravlje ljudi (Shi i sur., 2021).

Bakteriocini su skupina potentnih antimikrobnih peptida koji su primarno aktivni protiv bliskih organizama (uglavnom Gram-pozitivnih bakterija) koje proizvode neki mikroorganizmi, uključujući BMK. Sojevi BMK koji proizvode bakteriocine štite se od njihovog djelovanja sintezom specifičnog proteina imunosti koji je kodiran u bakteriocinskom operonu. BMK i njihovi bakteriocini predstavljaju odličnu alternativu kemijskim sredstvima i antibioticima u prehrambenoj industriji, a neki su pokazali i snažna antimikrobna svojstva protiv uropatogena i gastrointestinalnih patogena (Mokoena, 2017). Mnogi sojevi BMK mogu proizvesti bakteriocine ili antibakterijske proteine koji su vrlo učinkoviti protiv patogena prenosivih hranom, poput *S. aureus*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *K. pneumoniae* i *C. botulinum*. Bakteriocini predstavljaju i moguću alternativu antibioticima zbog njihove visoke stabilnosti bez popratnih nuspojava. U



kombinaciji s antibioticima, bakteriocini djeluju sinergijski, tj. ne samo da povećavaju učinkovitost antibiotika i sprječavaju pojavu vrsta otpornih na antibiotike, već i smanjuju nuspojave antibiotika smanjenjem koncentracije antibiotika potrebne za eliminaciju bakterija (Darbandi i sur., 2022).

Bakteriocini se klasificiraju na nekoliko načina: prema molekularnoj težini, aminokiselinskoj sekvenci ili posttranslacijskim modifikacijama, organizmu iz kojeg potječu, litičkoj sposobnosti, načinu djelovanja, ili prema supstratu ili meti djelovanja (slika 1). Bakteriocini koji razgrađuju peptidoglikan u staničnoj stijenci bakterija nazivaju se hidrolazama stanične stijenke bakterija, autolizinima ili hidrolazama peptidoglikana (*engl.* peptidoglycan hydrolases, PGHs). Svoju antibakterijsku aktivnost ispoljavaju hidrolizom glikozidnih ili peptidnih veza peptidoglikana, glavne komponente staničnih stijenki bakterija. Bakteriocini općenito, a posebno PGHs porijeklom iz BMK-a, pokazuju potencijal primjene u biokonzerviranju fermentirane hrane jer imaju snažnu aktivnost *in vivo* i *in vitro*, osobito protiv patogenih Gram-pozitivnih bakterija. Zbog svog jedinstvenog mehanizma djelovanja, potpuno različitog od onog antibiotika, ovi proteini imaju djelovanje protiv bakterija otpornih na antibiotike (García-Cano i sur., 2019).



**Slika 1.** Klasifikacija bakteriocina (*prema Alvarez-Sieiro i sur., 2016*)

### 2.3. SIRUTKA

Sirutka koja nastaje prilikom pripreme sira glavni je nusprodukt mliječne industrije. Na svakih 10 kg sira proizvede se do 9 kg sirutke. Obično se koristi za gnojdbu, stočnu hranu i ljudsku ishranu (Dopazo i sur., 2023). Općenito, frakcija sirutke sadrži približno 55 % hranjivih tvari i 20 % ukupnog proteinskog sadržaja mlijeka te 85 do 95 % izvornog volumena mlijeka. Sirutka je serumska faza mlijeka, odnosno tekućina koja ostaje nakon uklanjanja masti i kazeina, a sadrži uglavnom topive komponente poput laktoze, topljivih soli i globularnih proteina. Tekuća sirutka karakteristična je po svojoj zelenkasto-žutoj boji koja potječe od prisutnosti riboflavina (vitamin B12). Sirutka se tradicionalno dijeli na kiselu i slatku sirutku, ovisno o uvjetima obrade. Slatka sirutka, nusprodukt proizvodnje većine sireva, obično ima pH vrijednost između 6 i 7, te niži sadržaj pepela i viši sadržaj proteina u usporedbi s kiselom sirutkom (tablica 1). Slatka sirutka se prikuplja nakon zgrušavanja kazeina tijekom proizvodnje tvrdih (zrelih) sireva putem retentata ili enzimskog zgrušavanja pomoću mješavine kimozina i pepsina. S druge strane, kisela sirutka je nusprodukt kiselog zgrušavanja, koje uključuje mikrobnu fermentaciju pomoću laktobacila ili dodavanje organskih kiselina poput limunske, octene ili mliječne kiseline, ili mineralnih kiselina poput klorovodične ili sumporne kiseline. Kisela sirutka je nusprodukt proizvodnje sireva zgrušanih kiselinom (poput svježeg sira, ricotte i drugih) te grčkog jogurta (Allen i sur., 2021). Selektivna frakcionacija pomoću membranske tehnologije ključni je procesni korak u kojem se proteinska frakcija sekvencijalno odvaja iz sirutke. Odvajanje se provodi kroz više faza filtracije, pri čemu se proteini koncentriraju u retentatu, dok se laktoza i minerali koncentriraju u permeatu. Nusproizvod dobiven iz proizvodnje mliječnih proteina poznat je kao permeat sirutke i sadrži značajnu količinu laktoze (75 – 80 % suhe tvari) (Enteshari i Martínez-Monteagudo, 2020). Permeat je učinkovit i jeftin alternativni induktor za proizvodnju rekombinantnih proteina. Njegova upotreba stoga kombinira prednost iskorištavanja otpada s prednošću smanjenja troškova proizvodnje rekombinantnih proteina (de Divitiis i sur., 2023).

**Tablica 1.** Prosječan sastav slatke i kisele sirutke (prema Jelen, 1979)

Sastojak	Slatka sirutka [g/L]	Kisela sirutka [g/L]
Ukupna suha tvar	63,0 – 70,0	63,0 – 70,0
Laktoza	46,0 – 52,0	44,0 – 46,0
Proteini	6,0 – 10,0	6,0 – 8,0
Kalcij	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6
Fosfati	1,0 – 3,0	2,0 – 4,5
Laktati	2,0	6,4
Kloridi	1,1	1,4

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1 Radni mikroorganizmi

U radu su korišteni sojevi BMK iz rodova *Lactiplantibacillus* i *Limosilactobacillus* izolirani iz majčinog mlijeka, test-mikroorganizmi i srodne BMK (tablica 2). Navedeni sojevi dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

**Tablica 2.** Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MB18	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	KR19	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MC19	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MC1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	Hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	19111	Hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Escherichia coli</i>	3014	Hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Salmonella</i> Thyphimurium	FP1	Hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 9430	M17, 37 °C, aerobno
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LMG 9450	M17, 30 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 9430	M17, 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 (g/L destilirane vode) („Biolife“, Italija): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °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 (g/L 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 (g/L destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

d) pasterizirani nusproizvodi mliječne industrije (Dukat mliječna industrija d. d., Zvornica Bjelovar, Hrvatska)

- slatka sirutka dobivena nakon proizvodnje tvrdog sira
- kisela sirutka dobivena nakon proizvodnje svježeg sira
- permeat dobiven ultrafiltracijom mlijeka

### 3.1.3. Kemikalije

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

### 3.1.4. Aparatura i pribor

- Anaerocult® A, „Merck“, Njemačka
- 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
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- filter veličine pora 0,2 µm, „Sigma-Aldrich, Merck“ SAD
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje (15 mL, 50 mL), „Falcon“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH metar, „Metrohm“, Švicarska
- pincete, „Isolab“, Njemačka
- plastične tubice od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- sonikator Sonopuls mini20, „Bandelin“, Njemačka
- stalci za ependorfice, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Inkolab“, Hrvatska
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje radnih mikroorganizama

Sojevi iz roda *Lactobacillus* čuvani su u MRS tekućoj hranjivoj podlozi pri -80 °C uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Sojevi iz rodova *Lactococcus* i *Enterococcus* čuvani su u M17 bujonu, a testmikroorganizmi u hranjivom bujonu, također uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježu hranjivu podlogu te inkubirani u optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 2 dan prije provođenja eksperimenta.

### 3.2.2. Ispitivanje potencijala antioksidacijske aktivnosti

Intaktne stanice i intracelularni ekstrakti bez stanica (*engl.* intracellular cell-free extract, ICFE) su pripremljeni za analizu na sljedeći način: 1. sojevi BMK uzgojeni su preko noći pri 37 °C u 5 ml MRS bujona te centrifugirani pri 4200 g, 10 minuta na 4 °C. Talog stanica ispran je dva puta i suspendiran u 1 ml fosfatnog pufera (*engl.* phosphate buffered saline, PBS) pH 7.4, a broj intaktnih stanica određen je indirektnom metodom. 2. Nakon uklanjanja stanica centrifugiranjem pri 4200 g 10 minuta na 4 °C, dobiveni ICFE su tretirani ultrazvukom 3 puta po 30 sekundi pri 30 kHz. Kako bi se detektirala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilna (*engl.* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) aktivnost uklanjanja radikala, intaktne stanice ili ICFE su pomiješani sa svježe pripremljenom DPPH (0,2 mM u metilnom alkoholu odnosno 1,58 mg u 20 ml metanola) u omjeru 1:1 nakon čega je provedena inkubacija u mraku od 30 minuta. Kao slijepa proba korišten je metanol s PBS puferom, a kao kontrola DPPH u metilnom alkoholu s PBS puferom. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 4200 g. Potom je izmjerena apsorbancija supernatanta pri 517 nm i izračunata antioksidacijska aktivnost prema jednadžbi:

$$\% \text{ uklanjanja DPPH radikala} = (1 - (\text{OD uzorak}/\text{OD kontrola})) \times 100$$

OD - optička gustoća kulture (*engl.* optical density)

### 3.2.3. Turbidimetrijsko određivanje antimikrobnog djelovanja odabranih izolata BMK prema patogenim test-mikroorganizmima i srodnim BMK

Ispitano je antibakterijsko djelovanje supernatanta kultura sojeva MB18, KR19, MC19 i MC1, izoliranih iz majčina mlijeka, prema 4 patogena test-mikroorganizma i 3 srodne BMK. Supernatanti su dobiveni centrifugiranjem prekončno uzgojenih kultura i potom filtrirani sterilnim filterima promjera 0,2 μm. Dodano je 90 μL prethodno pripremljenog i steriliziranog hranjivog bujona (HB) u jažice mikrotitarske pločice. Uzorci su nanoseni na mikrotitarsku pločicu prema shemama prikazanim u tablicama 3 i 4. Antibakterijsko djelovanje supernatanta bakterijskih kultura prema test-mikroorganizmima i srodnim BMK mjereno je tijekom 24 sata (tijekom 0, 2, 4, 6, 22 i 24 h) inkubacije pri 37 °C spektrofotometrijskim

mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini od 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Shema nanošenja uzorka na mikrotitarsku pločicu prikazana je u tablici 3.

**Tablica 3.** Shema nanošenja uzoraka na mikrotitarsku pločicu u svrhu turbidimetrijskog određivanja antimikrobne aktivnosti sojeva BMK prema patogenim test-mikroorganizmima

	KONTROLA	MC1	MB18	KR19	MC19
<b>SLIJEPA PROBA</b>	200 µL HB	100 µL HB + 100 µL MRS			
<b><i>S. aureus</i> 3048</b>	190 µL HB + 10 µL test MO	90 µL HB +			
<b><i>L. monocytogenes</i> 19111</b>		10 µL test MO +			
<b><i>E. coli</i> 3014</b>		100 µL supernatanta kulture			
<b><i>S. Typhimurium</i> FP1</b>					

MO – mikroorganizam, HB – hranjivi bujon, MRS – De Man-Rogosa-Sharpe bujon

**Tablica 4.** Shema nanošenja uzoraka na mikrotitarsku pločicu u svrhu turbidimetrijskog određivanja antimikrobnog djelovanja odabranih sojeva BMK prema srodnim BMK

	KONTROLA	MC1	MB18	KR19	MC19
<b>SLIJEPA PROBA</b>	200 µL MRS	200 µL MRS			
<b><i>L. helveticus</i> M92</b>	190 µL MRS + 10 µL srodnog MO	90 µL MRS +			
		10 µL srodnog MO +			
<b>SLIJEPA PROBA</b>	200 µL M17	100 µL M17 + 100 µL MRS			
<b><i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 9450</b>	190 µL M17 + 10 µL srodnog MO	90 µL M17 +			
<b><i>E. faecium</i> ATCC 9430</b>		10 µL srodnog MO +			
		100 µL supernatanta kulture			

MO – mikroorganizam, MRS - De Man-Rogosa-Sharpe bujon, M17- M17 bujon

### 3.2.4. Potencijal primjene sirutke kao lioprotektora i medija za uzgoj BMK

Sojevi BMK uzgojeni su anaerobno preko noći pri 37 °C u 5 ml MRS bujona. Kulture su potom centrifugirane pri 4200 g, 10 minuta na 4 °C, a talog stanica ispran u 5 ml fiziološke otopine. 200 µL suspenzije stanica svakog soja u 4 paralele je centrifugirano 5 min pri 4200 g, te je talog stanica dobiven centrifugiranjem resuspendiran u 5 mL MRS bujona, 5 mL kisele sirutke, 5 mL slatke sirutke, odnosno 5 mL permeata. Indirektnom metodom određen je broj poraslih kolonija (*engl.* colony forming units, CFU) prije inkubacije te su uzorci stavljeni na prekonoćnu inkubaciju pri 37 °C. Idući dan je CFU/mL ponovno provjeren indirektnom metodom tako što su nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su porasle kolonije i izračunat je njihov broj po mL uzorka prema sljedećoj formuli:

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

a = srednja vrijednost broja poraslih kolonija na odgovarajućem razrjeđenju

b = volumen upotrijebljenog uzorka (mL)

c = recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja

### 3.2.5. Određivanje pH vrijednosti i udjela mliječne kiseline

Nakon prekonoćnog uzgoja u optimalnim uvjetima, kulture sojeva BMK su centrifugirane pri 4200 g, 10 minuta na 4 °C. U supernatant je uronjena pH elektroda i izmjerena pH vrijednost uzorka. U svrhu određivanja udjela mliječne kiseline, 1 mL svakog uzorka supernatanta razrijeđen je s 19 mL destilirane vode te je razrijeđeni uzorak titriran s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator do pojave ružičaste boje. Postotak proizvedene mliječne kiseline računat je po sljedećoj formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \cdot 20 \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}\text{SH} \cdot 0,0225$$

a = mL 0,1 M NaOH

$f_{\text{NaOH}} = 1$

( $^{\circ}\text{SH}$  (stupanj kiselosti) ~ 0,0225 g mliječna kiseline (%))

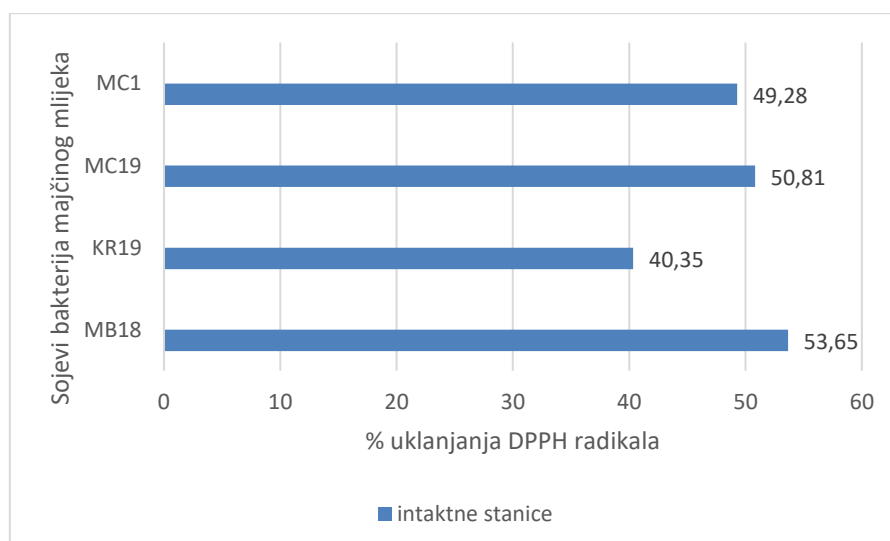
$^{\circ}\text{SH} \rightarrow$  stupanj kiselosti



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. ISPITIVANJE POTENCIJALA ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI STANICA I UNUTARSTANIČNIH EKSTRAKATA BEZ STANICA

DPPH metoda je jednostavna i brza analitička tehnika koja se koristi za procjenu antioksidativne aktivnosti različitih spojeva ili ekstrakata. DPPH je stabilan slobodni radikal koji ima intenzivnu ljubičastu boju. Kada antioksidans reagira s DPPH radikalom, dolazi do reduciranja DPPH i promjene boje otopine iz ljubičaste u žutu, što se može kvantitativno mjeriti spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 517 nm (Brand-Williams i sur., 1995). Ovim radom provedeno je ispitivanje antioksidacijske aktivnosti bakterijskih izolata iz majčinog mlijeka *Lactiplantibacillus plantarum* MB18, *Lactiplantibacillus plantarum* KR19, *Lactiplantibacillus plantarum* MC19, *Limosilactobacillus fermentum* MC1, tj. njihovih stanica te ekstrakata bez stanica. Postupak izvođenja eksperimenta opisan je u poglavlju 3.2.2. kao i jednadžba korištena za dobivanje % uklanjanja DPPH radikala. Potencijal antioksidacijske aktivnosti unutarstaničnih ekstrakata bez stanica ovim pokusom nije zabilježen, a rezultati antioksidacijske aktivnosti intaktnih stanica su prikazani na slici 2. Prema rezultatima, najveću sposobnost uklanjanja DPPH radikala posjeduje soj *Lactiplantibacillus plantarum* MB18 (53,65 %), a najmanju *Lactiplantibacillus plantarum* KR19 (40,35 %). Sojevi *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1 pokazuju vrlo sličan potencijal uklanjanja DPPH radikala. Sposobnost uklanjanja DPPH radikala pomoću BMK potvrđena je u mnogim istraživanjima. Kim i sur. (2022) ispitili su antioksidativnu aktivnost 15 sojeva BMK izoliranih iz različitih uzorka hrane. Svi sojevi su pokazali dobru sposobnost hvatanja DPPH i ABTS radikala, a među njima se istaknuo soj *Latilactobacillus curvatus* MG5020. Značajna sposobnost neutraliziranja DPPH radikala pruža mogućnost potencijalne primjene navedenih sojeva kao probiotika s antioksidativnim djelovanjem.

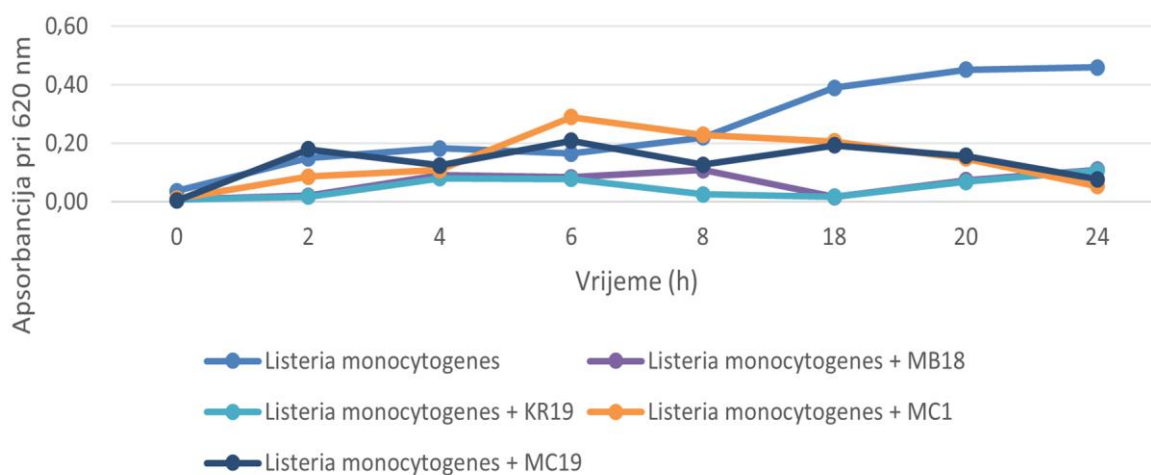


**Slika 2.** Antioksidacijska aktivnost intaktnih stanica sojeva MC1, MC19, KR19, MB18

#### 4.2. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA ODABRANIH IZOLATA PREMA PATOGENIM TEST-MIKROORGANIZMIMA I SRODNIM BMK

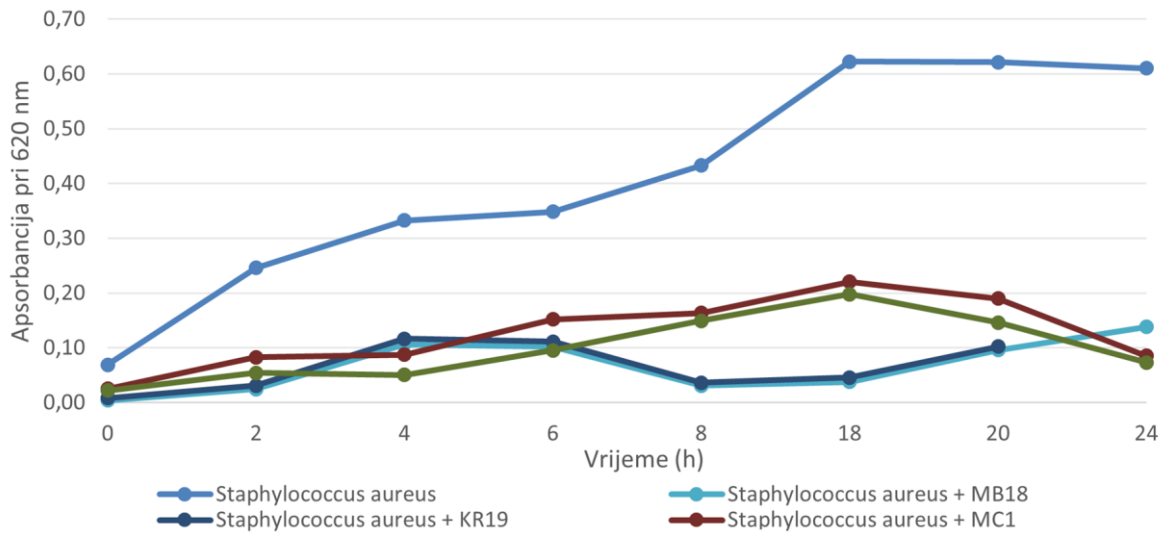
Turbidimetrijsko određivanje antimikrobne aktivnosti BMK prema patogenim ili srodnim bakterijama uključuje mjerenje zamućenosti (turbiditeta) kulture u svrhu kvantifikacije inhibicije rasta mikroorganizama. Ova metoda se temelji na principu inhibicije rasta ciljanih patogenih ili srodnih bakterija pomoću antimikrobnih spojeva BMK, što rezultira smanjenjem zamućenosti kulture u usporedbi s kontrolom (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010). U radu je ispitano antimikrobno djelovanje sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* MB18, *Lactiplantibacillus plantarum* KR19, *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1 prema patogenim test-mikroorganizmima *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* i *Salmonella* Typhimurium i srodnim BMK *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Postupak izvođenja eksperimenta opisan je u poglavlju 3.2.3.

Kod soja *Listeria monocytogenes*, inhibicija rasta tijekom 24h postignuta je pomoću svih sojeva pri čemu je najveća inhibicija u najkraćem vremenu postignuta pomoću izolata KR19 (slika 3).

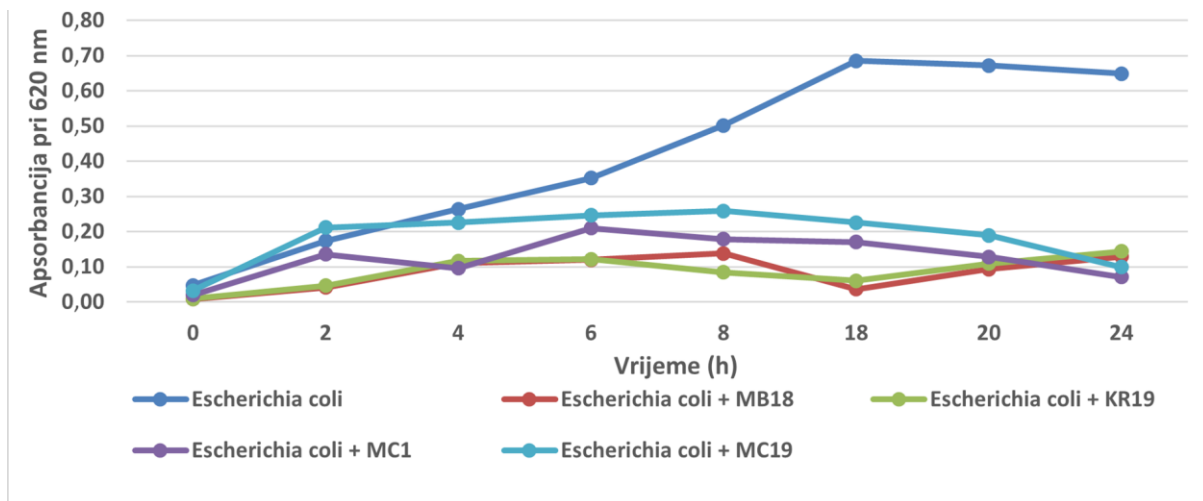


**Slika 3.** Inhibicija rasta *L. monocytogenes* pomoću sojeva KR19, MC19, MB18 i MC1

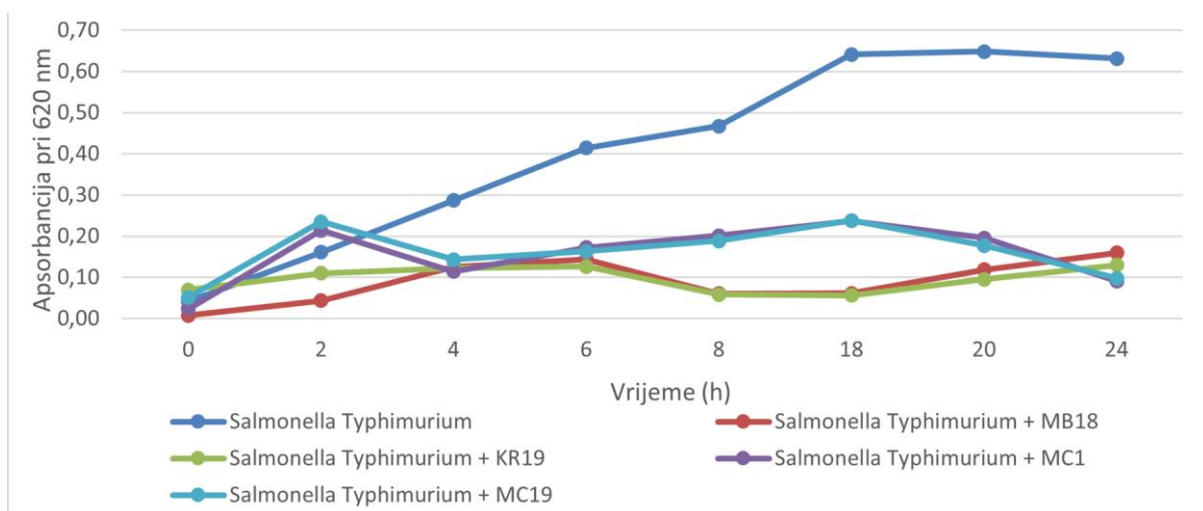
Pomoću izolata MC1, MB18, MC19 i KR19, postignuta je značajna inhibicija rasta soja *Staphylococcus aureus*, a najučinkovitiji inhibicijski učinak prema *S. aureus* pokazali su izolati KR19 i MB18 između 6 – 20 h (slika 4). Navedeni rezultati su u korelaciji s rezultatima inhibicije rasta *E. coli* (slika 5) i *S. Thyphimurium* (slika 6).



**Slika 4.** Inhibicija rasta *S. aureus* pomoću sojeva KR19, MC19, MB18 i MC1

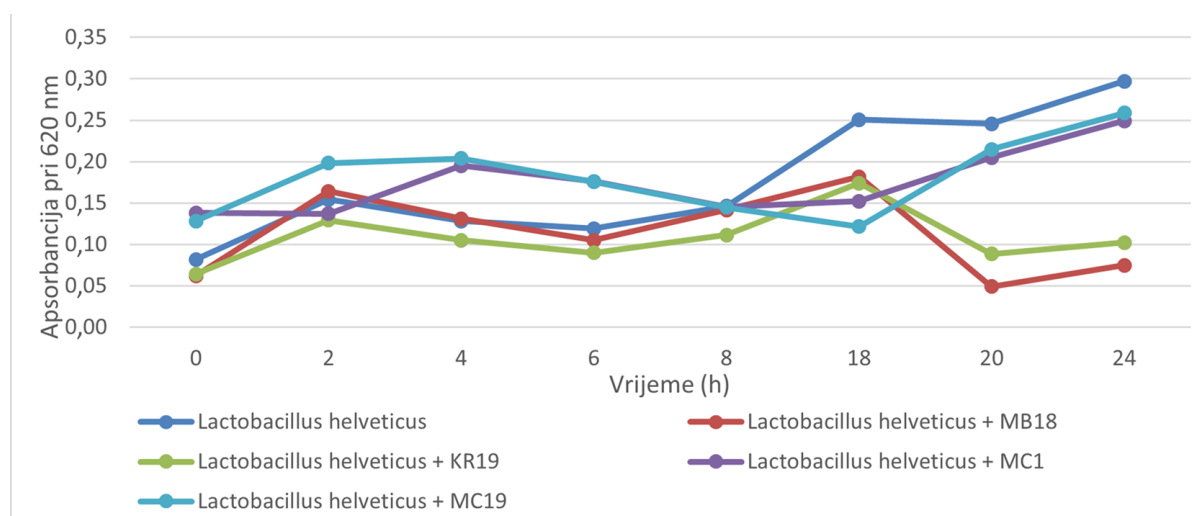


**Slika 5.** Inhibicija rasta *E. coli* pomoću sojeva KR19, MC19, MB18 i MC1

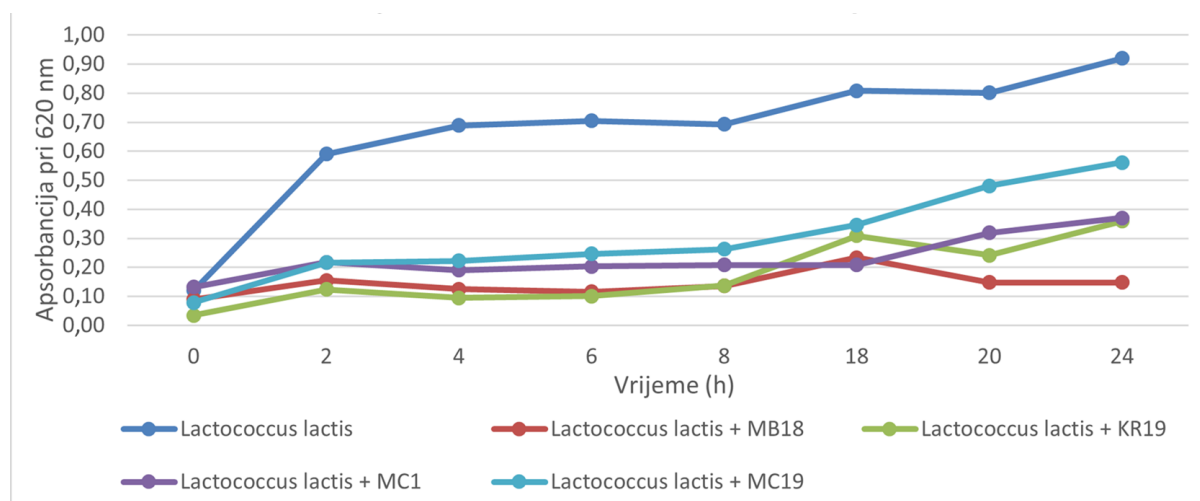


**Slika 6.** Inhibicija rasta *S. Typhimurium* pomoću sojeva KR19, MC19, MB18 i MC1

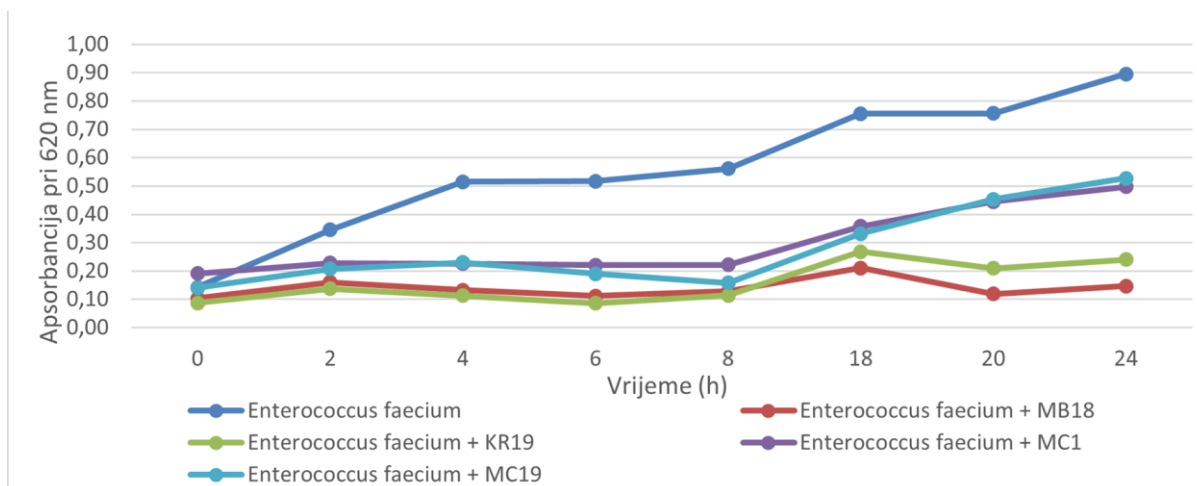
Nakon 24 h, izolati MB18 i KR19 pokazali su značajniju inhibiciju sojeva *Lactobacillus helveticus* (slika 7) i *Enterococcus faecium* (slika 9) nego li sojevi MC1 i MC19. Rast soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, kao i rast ostalih srodnih sojeva, inhibiran je pomoću svih izolata, no najučinkovitije pomoću izolata MB18 (slika 8). Rezultati pokazuju da je najznačajnija inhibicija rasta patogenih test-mikroorganizama i srodnih BMK postignuta pomoću izolata *Lactiplantibacillus plantarum* MB18 i *Lactiplantibacillus plantarum* KR19 što ne iznenađuje jer su sojevi vrste *L. plantarum* poznati po proizvodnji antimikrobnih supstanci, a posebno bakteriocina plantiricina koji ima snažno antimikrobno djelovanje prema srodnim mikroorganizmima. Rocchetti i suradnici (2021) su proveli istraživanje kemijske prirode, spektra djelovanja i mehanizama koji podupiru antibakterijsku aktivnost vrste *L. plantarum* i utvrdili su jaku antibakterijsku aktivnost protiv raznih patogenih bakterija koju sojevi *L. plantarum* osiguravaju biosintezom organskih kiselina, vodikovog peroksida, bakteriocina (npr. PlnT, PlnU, PlnV, i PlnW) te drugih antimikrobnih spojeva.



**Slika 7.** Inhibicija rasta *L. helveticus* pomoću sojeva KR19, MC19, MB18 i MC1



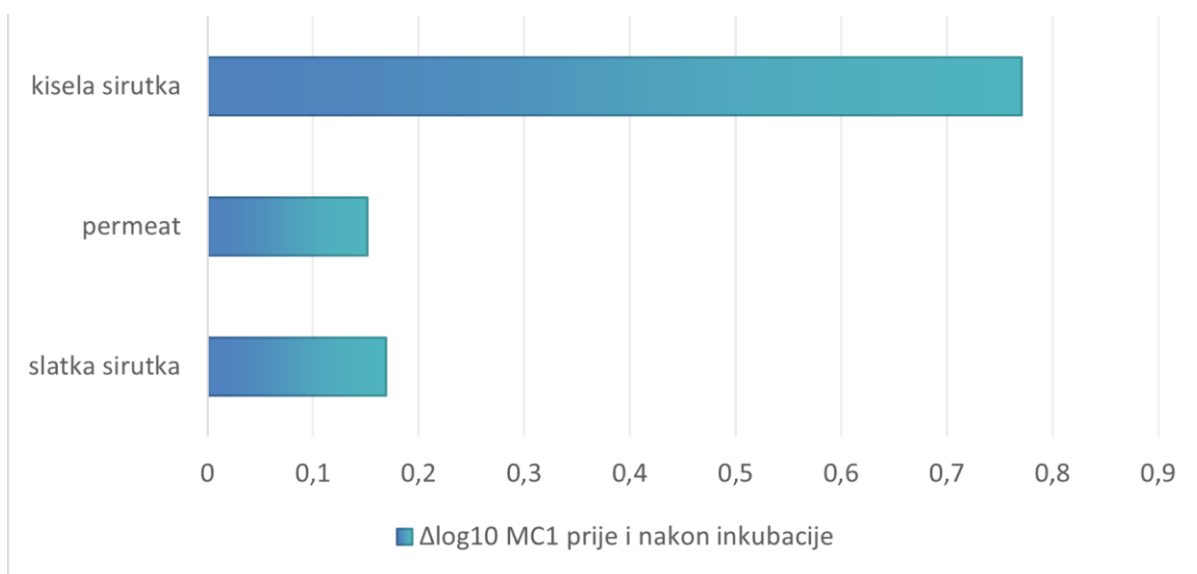
**Slika 8.** Inhibicija rasta *L. lactis* subsp. *lactis* pomoću sojeva KR19, MC19, MB18 i MC1



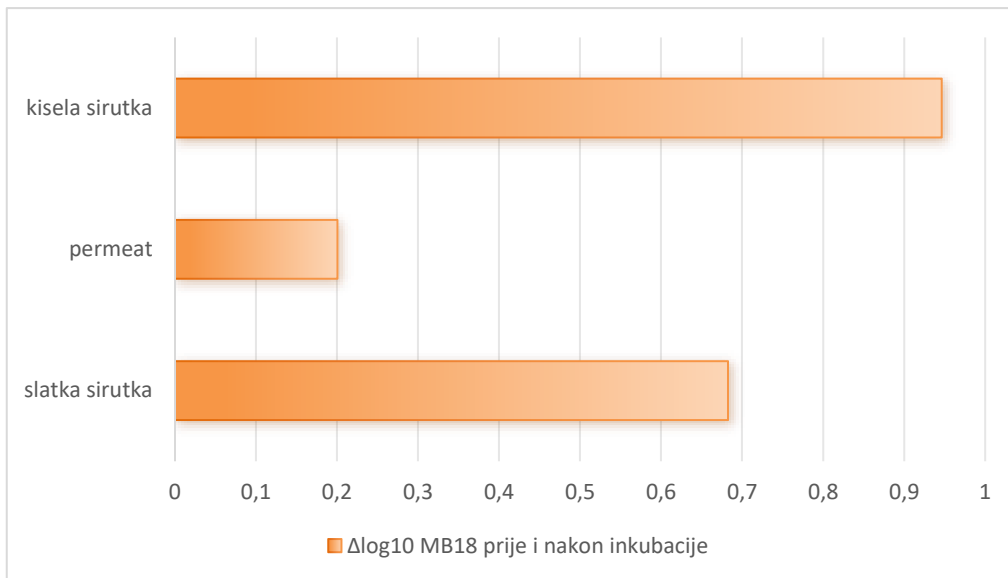
Slika 9. Inhibicija rasta *Enterococcus faecium* pomoću sojeva KR19, MC19, MB18 i MC1

#### 4.3. POTENCIJAL PRIMJENE SIRUTKE KAO LIOPROTEKTORA I MEDIJA ZA UZGOJ BMK, ODREĐIVANJE PH VRIJEDNOSTI TE % MLIJEČNE KISELINE

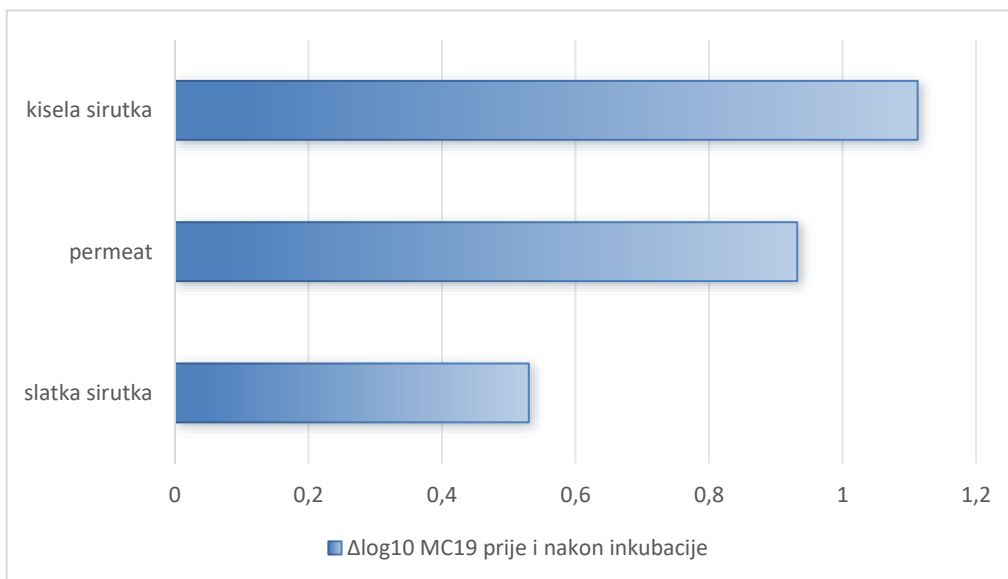
Istražena je moguća primjena nusproizvoda mliječne industrije (slatke i kisele sirutke te permeata) kao lioprotektora i medija za uzgoj BMK. Smanjenje pH tijekom fermentacije ukazuje na proizvodnju kiselina, uglavnom mliječne, što je indikator aktivnosti BMK. Stoga je u ovom radu određen postotak proizvodnje mliječne kiseline kod odabranih sojeva BMK na različitim nusproizvodima mliječne industrije. Slike 10, 11, 12 i 13 prikazuju  $\Delta\log_{10}$  (CFU/mL) pojedinih sojeva poraslih na različitim nusproizvodima mliječne industrije. Prema rezultatima, svi sojevi MB18, KR19, MC19 i MC1 su pokazali naj snažniji rast na kiselj sirutki. Pritom je soj MC19 najslabije rastao na slatkoj sirutki, a svi ostali sojevi na permeatu.



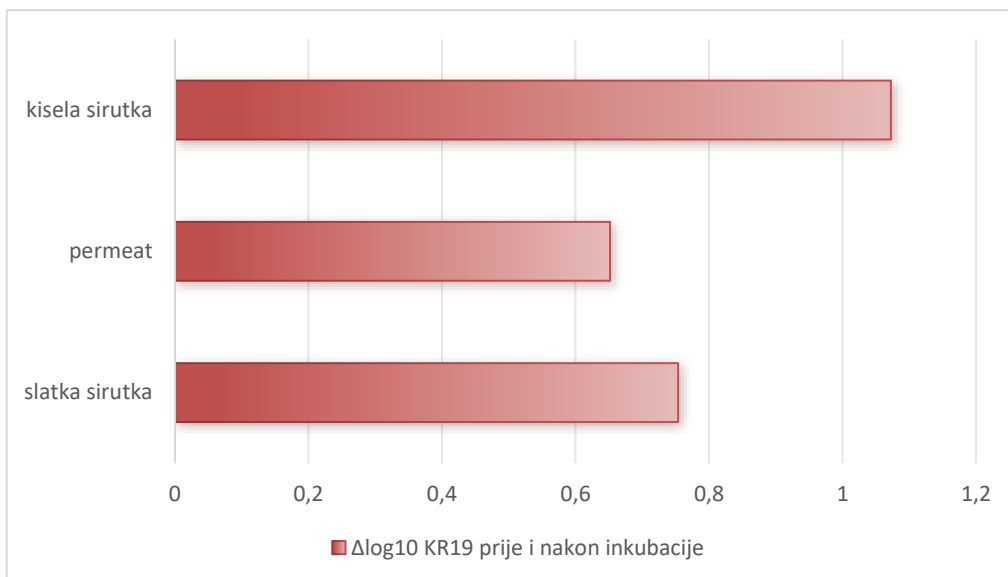
Slika 10.  $\Delta\log_{10}$  (CFU/mL) soja MC1 nakon uzgoja na kiselj sirutki, permeatu i slatkoj sirutki



**Slika 11.**  $\Delta \log_{10}$  (CFU/mL) soja MB18 nakon uzgoja na kiseljoj sirutki, permeatu i slatkoj sirutki

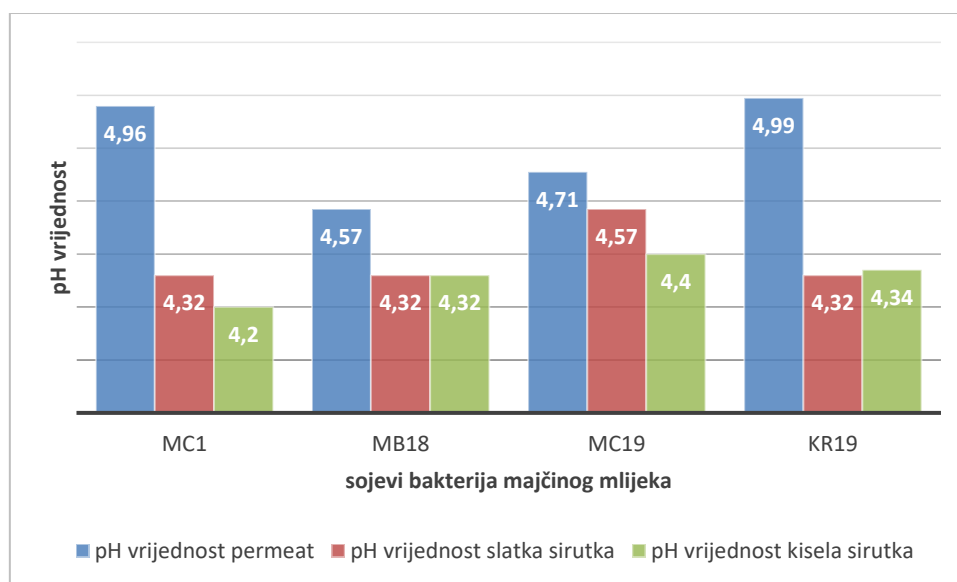


**Slika 12.**  $\Delta \log_{10}$  (CFU/mL) soja MC19 nakon uzgoja na kiseljoj sirutki, permeatu i slatkoj sirutki



**Slika 13.**  $\Delta \log_{10}$  (CFU/mL) soja KR19 nakon uzgoja na kiseloj sirutki, permeatu i slatkoj sirutki

Na slici 14 prikazane su pH vrijednosti nakon uzgoja sojeva KR19, MB18, MC1 i MC19 u različitim nusproizvodima mliječne industrije. Kod svih sojeva, pH je bio najviši na permeatu (između 4,57 i 4,99), što je i očekivano jer je u permeatu i rast navedenih sojeva koji zakiseljavaju podlogu bio vrlo slab. Kisela sirutka je pokazala najnižu pH vrijednosti nakon uzgoja soja MC1 (4,2), dok je pH kisele sirutke nakon uzgoja ostalih sojeva iznosio između 4,32 i 4,4. Slatka sirutka je imala pH vrijednost 4,32 nakon uzgoja svih sojeva osim MC19 kod kojeg je pH vrijednost podloge iznosila 4,57.



**Slika 14.** pH vrijednost permeata, slatke sirutke i kisele sirutke nakon uzgoja sojeva MC1, MB18, MC19 i KR19

Pomoću volumena 0,1 M NaOH utrošenog za titraciju, određen je postotak proizvedene mliječne kiseline. Prema rezultatima, sojevi produciraju najviše mliječne kiseline tijekom uzgoja u kiseloj sirutki pri čemu se posebno istaknuo soj KR19 (1,35 %) sa stupnjem kiselosti od 60 °SH (tablica 5). Pokazalo se da je sirutka učinkovit medij za rast i fermentaciju, što rezultira povećanjem proizvodnje organskih kiselina (posebno mliječne) i sniženjem pH. Bodzen i suradnici (2021) pokazali su da dodatak sirutke lioprotektoru poboljšava preživljavanje *L. plantarum* tijekom liofilizacije i dugoročnog skladištenja. Kombinacija sukroze i sirutke povećala je stopu preživljavanja bakterija u usporedbi s drugim kombinacijama, poput sukroze s micelarnim kazeinom ili inulinom. Istraživanje Sharpe i suradnika (2021) je pokazalo da sirutka kao izvor ugljika i dušika može povećati proizvodnju plantaricina i mliječne kiseline kod *L. plantarum*.

**Tablica 5.** Vrijednosti 0,1 M NaOH utrošenog za titraciju, stupnja kiselosti (°SH) te % mliječne kiseline nakon uzgoja sojeva MC1, MB18, MC19 i KR19 u permeatu te slatkoj i kiseloj sirutki

<b>permeat</b>	mL 0,1 M NaOH za titraciju	stupanj kiselosti (°SH)	% mliječne kiseline
MC1	0,3	12	0,27
MB18	0,2	8	0,18
MC19	0,3	12	0,27
KR19	0,1	4	0,09
<b>slatka sirutka</b>	mL 0,1 M NaOH za titraciju	stupanj kiselosti (°SH)	% mliječne kiseline
MC1	0,2	8	0,18
MB18	0,3	12	0,27
MC19	0,2	8	0,18
KR19	0,3	8	0,27
<b>kisela sirutka</b>	mL 0,1 M NaOH za titraciju	stupanj kiselosti (°SH)	% mliječne kiseline
MC1	1,4	56	1,26
MB18	1,2	48	1,08
MC19	1,1	44	0,99
KR19	1,5	60	1,35



## 5. ZAKLJUČCI

S obzirom na rezultate provedenih eksperimenata mogu se proizvesti sljedeći zaključci:

1. Unutarstanični ekstrakti bez stanica nisu pokazali antioksidacijsku aktivnost, dok su intaktne stanice sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* MB18, MC19, KR19 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1 pokazale dobar potencijal uklanjanja DPPH radikala, pri čemu je soj MB18 bio najefikasniji.
2. Sojevi *Lactiplantibacillus plantarum* MB18 i KR19, izolirani iz majčinog mlijeka, pokazali su najsnažniju antimikrobnu aktivnost prema patogenim test-mikroorganizmima i srodnim BMK, pri čemu su se posebno istaknuli u inhibiciji rasta *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* i *E. coli*.
3. Svi ispitani sojevi izolirani iz majčinog mlijeka, bolje rastu u kiseloj sirutki nego u slatkoj sirutki ili permeatu, pri čemu soj KR19 proizvodi najviše mliječne kiseline.

## 6. POPIS LITERATURE

Allen MM, Pike OA, Kenealey JD, Dunn ML (2021) Metabolomics of acid whey derived from Greek yogurt. *J Dairy Sci* **104**(11), 11401-11412. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20442>

Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Dongdong M, Kuipers O (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 2939-2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>

Bodzen A, Jossier A, Dupont S, Mousset PY, Beney L, Lafay S i sur. (2021) Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried Lactobacillus strain survival to long-term storage. *BMC Biotechnol* **21**, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00726-2>

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol* **28**(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Darbandi A, Asadi A, Mahdizade AM, Ohadi E, Talebi M, Halaj ZM i sur. (2022) Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J Clin Lab Anal* **36**(1). <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>

de Divitiis M, Ami D, Pessina A, Palmioli A, Sciandrone B, Airoidi C i sur. (2023) Cheese-whey permeate improves the fitness of Escherichia coli cells during recombinant protein production. *Biotechnol Biofuels Bioprod* **16**(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02281-8>

De Filippis F, Pasolli E, Ercolini D (2020) The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. *FEMS Microbiol Rev* **44**(4), 454-489. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa015>

Dopazo V, Illueca F, Luz C, Musto L, Moreno A, Calpe J i sur. (2023) Evaluation of shelf life and technological properties of bread elaborated with lactic acid bacteria fermented whey as a bio-preservation ingredient. *LWT - Food Sci Technol* **174**, 114427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114427>

Enteshari M, Martínez-Monteagudo SI (2020) One-pot synthesis of lactose derivatives from whey permeate. *Foods* **9**(6), 784. <https://doi.org/10.3390/foods9060784>

Feng T, Wang J (2020) Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes* **12**(1), 1801944. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>

Garbacz K (2022) Anticancer activity of lactic acid bacteria. *Semin Cancer Biol* **86**(3), 356-

366. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.013>

García-Cano I, Rocha-Mendoza D, Ortega-Anaya J, Wang K, Kosmerl E, Jiménez-Flore R (2019) Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 5243-5257. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B i sur. (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**(8), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Jelen, P (1979) Industrial whey processing technology: An overview. *J Agric Food Chem* **27**(4), 658-661. <https://doi.org/10.1021/jf60224a037>

Kim S, Lee JY, Jeong Y, Kang CH (2022) Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria. *Fermentation* **8**(1), 29. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010029>

Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C (2020) Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health. *Nutrients* **12**(4), 1039. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>

Łubiech K, Twarużek M (2020) *Lactobacillus* bacteria in breast milk. *Nutrients* **12**(12), 3783. <https://doi.org/10.3390/nu12123783>

Mokoena MP (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules* **22**(8), 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann Biol Res* **1**(4), 218-228, 0976-1233.

Rocchetti MT, Russo P, Capozzi V, Drider D, Spano G, Fiocco D (2021) Bioprospecting antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: Key factors underlying its probiotic action. *Int J Mol Sci* **22**(21), 12076. <https://doi.org/10.3390/ijms222112076>

Sharma A, Mukherjee S, Tadi SRR, Ramesh A, Sivaprakasam S (2021) Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. *LWT* **139**, 110744. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110744>

Shi L, Pan R, Lin G, Liang X, Zhao J, Zhang H i sur. (2021) Lactic acid bacteria alleviate liver damage caused by perfluorooctanoic acid exposure via antioxidant capacity, biosorption capacity and gut microbiota regulation. *Ecotoxicol Environ Saf* **222**, 112515. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112515>

## Izjava o izvornosti

Ja Ena Habuš 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 naveden

Ena Habuš

---

Vlastoručni potpis