

# Bioaktivno djelovanje autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz kiselog kupusa

---

Sever, Nika

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:159:275016>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Nika Sever**  
0058221905

**BIOAKTIVNO DJELOVANJE AUTOHTONIH SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE  
KISELINE IZOLIRANIH IZ KISELOG KUPUSA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

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

**Zagreb, 2024.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

## Bioaktivno djelovanje autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz kiselog kupusa

**Nika Sever, 0058221905**

**Sažetak:** Bakterije mliječne kiseline (BMK) su industrijski vrlo važni mikroorganizmi koji se upotrebljavaju kao starter kulture za dobivanje raznih fermentiranih proizvoda. Kao posljedica djelovanja njihovog metabolizma koja ovisi o supstratu i tipu fermentacije mogu sintetizirati metabolite s raznovrsnim bioaktivnim djelovanjem. Cilj ovog rada bio je ispitati potencijalno bioaktivno djelovanje autohtonih sojeva BMK izoliranih iz rasola kiselog kupusa dobivenog spontanom fermentacijom. Potencijal biosinteze makromolekula egzopolisaharida je dokazan kod 33,33 % BMK, dok je najbolje antioksidativno djelovanje dokazano kod dva soja čija je sposobnost uklanjanja DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) radikala iznosila oko 37 %. Svi izolirani sojevi su pokazali slabu sposobnost hidrolize kazeina. Antimikrobno djelovanje prema srodnim BMK je bilo slabije izraženo nego prema test-mikroorganizmima. Primijenjeni sojevi imaju potencijal za primjenu u prehrambenoj te biotehnološkoj proizvodnji.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, bioaktivno djelovanje, kiseli kupus

**Rad sadrži:** 28 stranica, 10 slika, 4 tablica, 18 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Datum obrane:** 10. srpnja 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

Bioactive activity of autochthonous lactic acid bacteria strains isolated from  
sauerkraut

Nika Sever, 0058221905

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) are industrially very important microorganisms that are used as starter cultures for the production of various fermented products. As a result of their metabolism, which depends on the substrate and the type of fermentation, they can synthesize metabolites with different bioactive effects. The aim of this work was to investigate the potential bioactive effect of autochthonous LAB strains isolated from sauerkraut obtained by spontaneous fermentation. The potential to biosynthesize exopolysaccharide macromolecules was detected in 33.33 % of LAB, while the best antioxidant activity was detected in two strains whose ability to remove DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) radical was about 37 %. All isolated strains showed a weak ability to hydrolyze casein. The antimicrobial activity against related LAB was less pronounced than against the test-microorganisms. The strains used have potential for application in food and biotechnological industry.

**Keywords:** lactic acid bacteria, bioactive activity, sauerkraut

**Thesis contains:** 28 pages, 10 figures, 4 tables, 18 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Katarina Butorac, PhD

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

**Thesis defended:** July 10, 2024

## Sadržaj:

<b>1.</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1.	BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE .....	2
2.2.	BIOAKTIVNI METABOLITI .....	3
2.2.1.	BAKTERIOCINI .....	4
2.2.2.	VITAMINI .....	5
2.2.3.	EGZOPOLISAHARIDI .....	5
2.3.	BIOAKTIVNO DJELOVANJE .....	6
2.3.1.	PROTEOLITIČKO DJELOVANJE .....	6
2.3.2.	ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE .....	7
<b>3.</b>	<b>EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>9</b>
3.1.	MATERIJALI .....	9
3.1.1.	MIKROORGANIZMI .....	9
3.1.2.	HRANJIVE PODLOGE .....	10
3.1.3.	KEMIKALIJE .....	10
3.1.4.	APARATURA I PRIBOR .....	11
3.2.	METODE .....	12
3.2.1.	ČUVANJE I ODRŽAVANJE BAKTERIJSKIH SOJEVA .....	12
3.2.2.	DETEKCIJA BIOSINTEZE EGZOPOLISAHARIDA .....	12
3.2.3.	ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNOG DJELOVANJA .....	13
3.2.4.	ODREĐIVANJE PROTEOLITIČKOG DJELOVANJA .....	15
3.2.5.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG DJELOVANJA .....	15
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>16</b>
4.1.	BIOAKTIVNI METABOLITI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE .....	16
4.2.	BIOAKTIVNO DJELOVANJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE .....	22
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>POPIS LITERATURE</b> .....	<b>26</b>

## 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina mikroorganizama sa širokom primjenom u prehrambenoj industriji kod proizvodnje mliječnih proizvoda i fermentirane hrane, kao i u biotehnologiji zbog brojnih prednosti koje nude te sigurne primjene za ljude i životinje (Kieliszek i sur., 2021). BMK imaju iznimnu važnost u proizvodnji fermentirane hrane zbog duljeg vijeka trajanja te raznih korisnih učinaka na ljudsko zdravlje (Ayivi i sur., 2020). Karakterizacija BMK izoliranih iz različitih izvora je od iznimne važnosti za učinkovitu i široku primjenu u terapijske svrhe (Hakim i sur., 2023).

BMK iskazuju mnoga bioaktivna djelovanja koje ih čini interesantnim za daljnja istraživanja te široku primjenu. Ekspimiraju proteaze za razgradnju kazeina do bioaktivnih peptida, mogućnost sinteze raznih polisaharida i vitamina, probiotičko djelovanje, antioksidativno djelovanje te sintezu raznih molekula s antimikrobnim učinkom. Antimikrobno djelovanje pokazuju prema patogenim bakterijama, kvascima i plijesnima tako da inhibiraju njihov rast te samim time produžuju vijek trajanja hrane (Ibrahim i sur., 2021).

U ovom radu ispitane su razne vrste bioaktivnog djelovanja 30 sojeva BMK izoliranih iz rasola kiselog kupusa dobivenog spontanom fermentacijom. Ispitana je mogućnost biosinteze egzopolisaharida, antimikrobno djelovanje prema izabranim sojevima patogenih bakterija i srodnim sojevima BMK primjenom metode s dvostrukim slojem agara i metodom difuzije s rupama u agaru, proteolitičko djelovanje te antioksidativno djelovanje mjerenjem sposobnost uklanjanja DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) radikala.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) pripadaju skupini Gram pozitivnih ne sporulirajućih bakterija, u pravilu okruglog (koki) ili štapićastog (bacili) oblika. Podnose niske pH vrijednosti, a po potrebi za kisikom dijele se na anaerobne i fakultativno anaerobne organizme (Zapašnik i sur., 2022). Općenito BMK se dijele u četiri roda, a to su *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Po novijim taksonomskim istraživanjima dodano je još jedanaest rodova, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Khalid, 2011). Konvencionalna klasifikacija BMK temelji se na fiziološkoj i metaboličkoj karakterizaciji, međutim za modernu klasifikaciju je od iznimne važnosti molekularna karakterizacija koja uključuje profiliranje slučajno umnožene polimorfne DNA (*engl.* Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), 16 rDNA sekvencioniranje i diferencijaciju vrsta primjenom višestruke lančane reakcije polimeraze (*engl.* Multiplex Polymerase Chain Reaction, PCR) (Ayivi i sur., 2020).

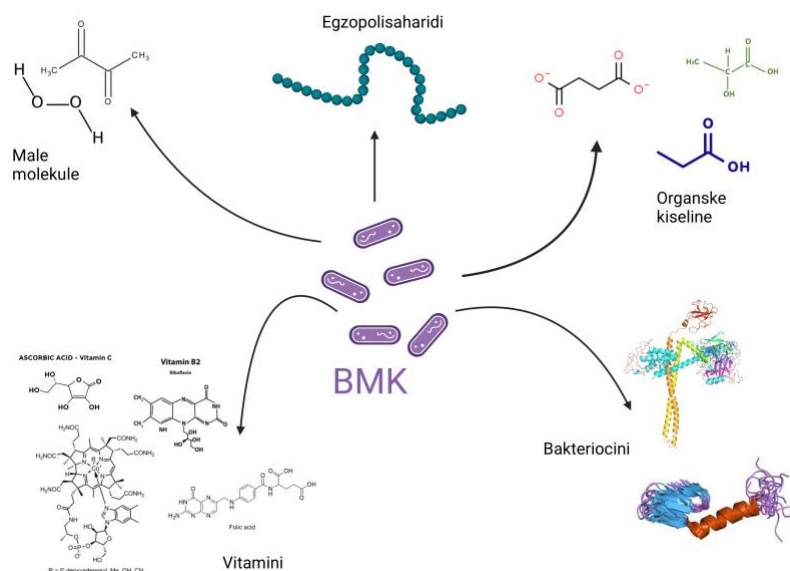
Glavna karakteristika BMK je mogućnost fermentacije šećera u mliječnu kiselinu, kojom se oslobađa energija (Kieliszek i sur., 2021). S obzirom na produkte fermentacije, BMK se dijele na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne vrste razgrađuju disaharide do mliječne kiseline, a kod heterofermentativnih vrsta kao produkti razgradnje laktoze osim mliječne kiseline nastaju etilni alkohol, ugljikov dioksid, vodikov peroksid, diacetil, acetoin i acetaldehid (Zapašnik i sur., 2022). Kod BMK se razlikuju dva metabolička puta fermentacije šećera do mliječne kiseline, a to su glikoliza i 6-fosfoglukonatni/fosfoketolazni put. Kao produkt glikolize nastaje mliječna kiselina te je ovaj put razgradnje zastupljen kod homofermentativnih vrsta, a kod heterofermentativnih vrsta zastupljen je 6-fosfoglukonatni put kojim nastaju veće količine drugih produkata (Khalid, 2011). BMK se nalaze u područjima bogatim ugljikohidratima, kao što su mliječni proizvodi, fermentirana hrana, povrće, voće te gastrointestinalni trakt sisavaca i ljudi, kod kojih poboljšavaju metabolizam i probavu te jačaju imunološki sustav (Ayivi i sur., 2020).

Većina BMK ima GRAS (*engl.* Generally Recognized as Safe) status jer nisu patogene, proizvode antimikrobne supstance te se primjenjuju u ljudskoj prehrani. To im omogućava široku primjenu u prehrambenoj industriji, gdje osim kod proizvodnje mliječnih proizvoda imaju bitnu ulogu i u proizvodnji fermentirane hrane. U prehrambenoj industriji, važnu ulogu ima fermentirana hrana zbog brojnih povoljnih učinaka na ljudsko zdravlje koji proizlaze iz antimikrobnog i antioksidativnog djelovanja BMK te proizvodnje bioaktivnih molekula. BMK s

navedenim pozitivnim učincima su izolirane iz različitih izvora fermentirane hrane kao što su jogurt, kiseli kupus, kimchi i kefir (Hakim i sur., 2023). Kiseli kupus je produkt fermentacije kupusa primjenom različitih rodova BMK, poput *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Pediococcus* vrsta. Fermentacija omogućava dugi vijek trajanja kiselog kupusa zbog dodatka soli te poželjni kiseli okus zbog produkata metabolizma BMK (Fevria i Hartano, 2020). Upotreba BMK u očuvanju hrane je poznata pod nazivom biokonzerviranje te podrazumjeva prirodni pristup upotrebe kontroliranih mikroorganizama kao alternative za produljenje vijeka trajanja i konzerviranje hrane. Biokonzerviranje ima široku primjenu jer BMK sprječavaju kvarenje hrane te time osiguravaju sigurnost i kvalitetu prehrambenih proizvoda (Ayivi i sur., 2020).

## 2.2. BIOAKTIVNI METABOLITI

Osim mogućnosti razgradnje makromolekula te sinteze mliječne kiseline, BMK mogu sintetizirati i druge produkte čija sinteza ovisi o supstratu i tipu fermentacije koji bakterija provodi. Ovi produkti mogu imati različita bioaktivna djelovanja kao što su antialergijsko, imunomodulacijsko, protuupalno, antimikrobno i antioksidativno. Metaboliti s navedenim učincima su bakteriocini, vitamini, egzopolisaharidi te bioaktivnih peptidi (slika 1) (Hakim i sur., 2023).



**Slika 1.** Bioaktivne molekule bakterija mliječne kiseline (BMK) (fotografija izrađena pomoću programa Biorender)



### 2.2.1. Bakteriocini

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani hidrofobni uglavnom termostabilni peptidi građeni od 20 do 60 aminokiselina, koji se dijele u tri klase. Prvoj klasi pripadaju termostabilni, modificirani peptidi malih molekulskih masa koji sadrže neuobičajane aminokiseline poput lantionina. U drugu klasu pripadaju ne modificirani, termostabilni bakteriocini niskih molekulskih masa. Termolabilni bakteriocini većih molekulskih masa pripadaju trećoj skupini. Bakteriocini su najviše korišteni zbog njihove aktivnosti protiv bakterija, virusa, plijesni i parazita, a mehanizam djelovanja ovisi o njihovoj primarnoj strukturi. Neki bakteriocini mogu proći kroz staničnu membranu bakterija te na taj način djelovati na ekspresiju gena i sintezu proteina, a drugi djeluju na staničnu membranu bakterija što u konačnici dovodi do lize stanica (Zapašnik i sur., 2022). Nemaju svi rodovi BMK sposobnost proizvodnje bakteriocina. Prema literaturi kod rodova *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella* detektirana je biosinteza bakteriocina (Reis i sur., 2012). Na proizvodnju bakteriocina utječu mnogi faktori, a to su pH vrijednost hranjive podloge, temperatura inkubacije, sastav hranjive podloge te dostupnost nutrijenata (Hakim i sur., 2023). Primjena bakteriocina u prehrambenoj industriji moguća je zbog toga što imaju GRAS status, nisu aktivni ni toksični u eukariotski stanicama, u organizmu su inaktivirani proteazama stoga ne djeluju negativno na crijevnu mikrobiotu, uglavnom su termostabilni te imaju širok antimikrobni spektar (Reis i sur., 2012). Trenutno je primjena bakteriocina u prehrambenoj industriji ograničena, za konzerviranje hrane u čiju svrhu se koriste lantibiotik nisin i pediocin PA-1/Ac H (Zapašnik i sur., 2022). Bakteriocini se mogu koristiti i zajedno s antibiotskom terapijom pri čemu zbog sinergističkog djelovanja omogućuju primjenu smanjene koncentracije antibiotika, ublažavanje nuspojava njihovog djelovanja te smanjenu pojavu antibiotske rezistencije. Osim s antibioticima, bakteriocini pokazuju sinergistički učinak i s drugim biomolekulama. Jedan od takvih primjera je aktivnost limunske kiseline i nisina protiv *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* (Zapašnik i sur., 2022). Za širu primjenu bakteriocina u prehrambenoj industriji i biokonzerviranju potrebno je provesti daljnja istraživanja u svrhu boljeg razumijevanja njihovog djelovanja te kvalitativne i kvantitativne procjene njihove efektivnosti (Reis i sur., 2012).

### 2.2.2. Vitamini

Neki od rodova BMK mogu sintetizirati vitamine uz ostale produkte fermentacije, poput cijanokobalamina (B12), vitamina C, riboflavina (B2) i folata. Mogućnost sinteze vitamina ovisi o rodu i soju bakterije, pri čemu se *L. plantarum* pokazao kao najbolji producent folne kiseline, a osim nje folat sintetiziraju i bakterije iz rodova *Lactococcus* i *Streptococcus*. Folat je esencijalan kod sinteze nukleotida i proteina te za popravke DNA. Do njegove sinteze ne može doći ukoliko hranjiva podloga ne sadrži *p*-aminobenzojevu kiselinu koja služi kao prekursor za sintezu. Riboflavin je sastavni dio flavinskih koenzima (FMN i FAD) te sudjeluje u mnogim redoks reakcijama kataliziranim enzimima. Sinteza vitamina tijekom fermentacije omogućava poboljšanje nutritivne vrijednosti proizvedene hrane (Hakim i sur., 2023).

### 2.2.3. Egzopolisaharidi

Egzopolisaharidi su biorazgradivi polimeri koje sintetiziraju BMK iz monosaharida te ih izlučuju u hranjivu podlogu. U prehrambenoj industriji se koriste kao stabilizatori i emulgatori zbog mogućnosti zadržavanja vode, a fermentiranoj hrani pružaju specifičnu teksturu i viskozitet. Neke od BMK koje su poznate po sintezi egzopolisaharida su *Lactiplantibacillus plantarum*, *Fructilactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella*, i *Leuconostoc*. Ovi polimeri dijele se na homopolisaharide i na heteropolisaharide ovisno o tome iz kojeg su monosaharida sintetizirani. Homopolisaharidi se sastoje od samo jedne vrste monosaharida, a heteropolisaharidi od različitih vrsta monosaharida. Biosinteza homopolisaharida je jednostavniji proces u usporedbi sa sintezom heteropolisaharida koja je kompleksnija zbog sastava šećera, molekulske mase te načina povezivanja monosaharidnih jedinica. Osim soja BMK, na sintezu egzopolisaharida utječu pH vrijednost medija i temperatura (Hakim i sur., 2023). Egzopolisaharidi također iskazuju korisne učinke za zdravlje zbog imunomodulacijskog, protuupalnog, antitumorskog, antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja. Dokazano je da aktivnost egzopolisaharida ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, odnosno o strukturi glavnog lanca, bočnih lanaca i molekulskom masi. Sojevi BMK koji sintetiziraju egzopolisaharide pokazuju probiotičko djelovanje koje pospješuje kolonizaciju crijeva s korisnim bakterijama. Osim toga egzopolisaharidi pokazuju antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama koje su najčešći uzročnici kvarenja hrane, a to su *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*. Sojevi BMK koji proizvode

egzopolisaharide se široko primjenjuju kao starter kulture u proizvodnji fermentirane hrane te pokazuju potencijal primjene u medicini i farmaceutskoj industriji, osim zbog njihovog stabilizirajućeg i emulgirajućeg učinka, zbog njihove netoksičnosti te brojnih korisnih učinaka na ljudsko zdravlje (Jurášková i sur., 2022). Postoje razne metode za provjeru sojeva BMK koji sintetiziraju egzopolisaharide, poput promatranja fenotipskih karakteristika kolonija BMK. Kolonije mogu biti sluzavog tzv. "ropy" fenotipa, koji je okarakteriziran formiranjem dugih filamentoznih nakon podizanja mikrobiološke ušice s površine kolonija BMK. Kvantitativne metode za određivanje količine egzopolisaharida zahtijevaju ekstrakciju egzopolisaharida iz medija, a najčešće se primjenjuju konfokalna laserska pretražna mikroskopija (*engl.* confocal laser scanning microscopy, CLSM) i elektronska mikroskopija (Jurášková i sur., 2022).

## **2.3. BIOAKTIVNO DJELOVANJE**

### **2.3.1. Proteolitičko djelovanje**

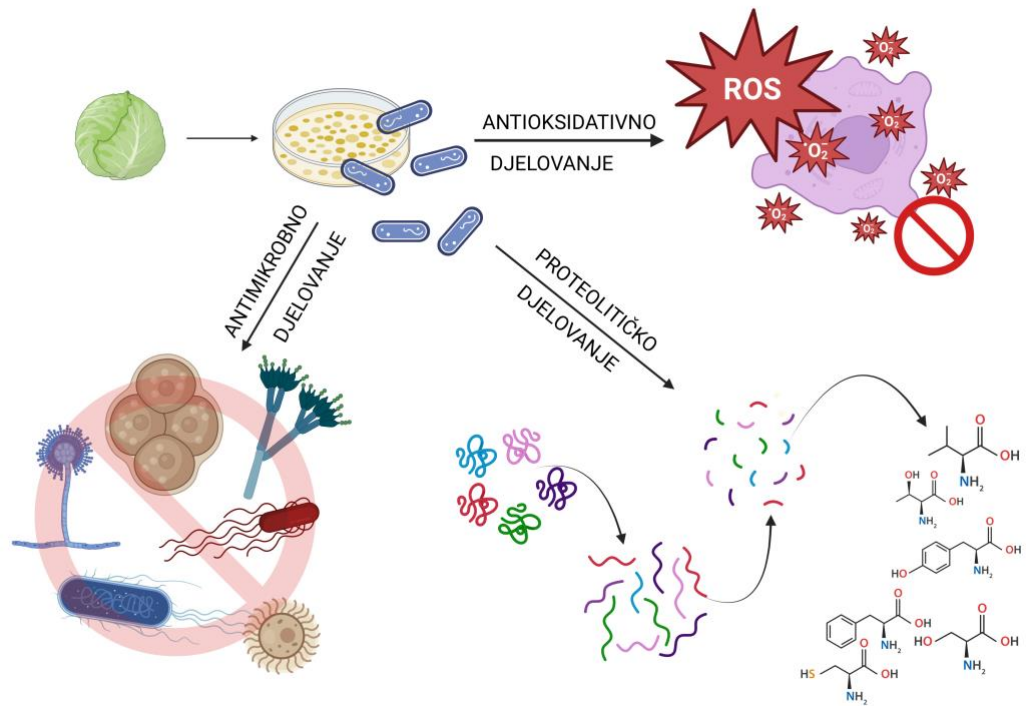
BMK imaju mogućnost sinteze proteolitičkih enzima koji ostaju u stanici ili se izlučuju izvan stanice u hranjivi medij. Optimalna pH vrijednost za rast bakterija s proteolitičkim djelovanjem je 7-7,5, dok niske temperature inhibiraju rast te smanjuju njihovu enzimsku aktivnost. Pri temperaturama iznad optimalnih dolazi do brze inaktivacije proteolitičkih enzima te ireverzibilnog gubitka aktivnosti. BMK razgrađuju proteine najčešće do aminokiselina koje zatim koriste kao izvor dušika. Termofilni laktobacili u pravilu imaju bolju proteolitičku aktivnost od ostalih laktobacila i laktokoka, međutim BMK pokazuju velike raznolikosti u proteolitičkoj aktivnosti ovisno o vrsti i soju bakterije. Proteolitički enzimi dijele se na endopeptidaze i egzopeptidaze ovisno o mjestu u molekuli gdje se nalazi peptidna veza koju cijepaju. Egzopeptidaze cijepaju peptidnu vezu koja se nalazi u blizini terminalne amino ili karboksilne skupine molekule, a endopeptidaze cijepaju peptidne veze koje su udaljene od terminalnih krajeva molekule supstrata. Kazein kao glavni protein u mlijeku predstavlja jedan od glavnih supstrata za proteolitičko djelovanje BMK. Razgradnja kazeina započinje ekstracelularnim proteolitičkim enzimima koji ga razgrađuju na manje proteine, a nastali peptidi se vežu za membrane BMK te se pomoću transportnih sustava unose u stanicu. Dalje razgradnju u stanici nastavljaju endopeptidaze i aminopeptidaze. Endopeptidaze cijepaju peptidne veze unutar peptida, a aminopeptidaze cijepaju terminalnu amino i karboksilnu skupinu peptida. Ovom hidrolizom nastaju dipeptidi i tripeptidi koji se u konačnici hidroliziraju do slobodnih aminokiselina. Osim kao izvor dušika, slobodne aminokiseline bakterije koriste u sintezi vlastitih proteina i za rast te na ovaj način stanica štedi energiju koju bi inače koristila za

sintezu aminokiselina. BMK mogu regulirati ekspresiju gena s obzirom na okolišne uvjete, odnosno reagiraju na promjene u dostupnosti izvora dušika te reguliraju aktivnost proteolitičkog sustava kako bi se osigurala dovoljna količina izvora dušika u stanici. Biosinteza specifičnih proteolitičkih enzima u stanici se bazira na mehanizmu indukcije ekspresije gena supstratom specifičnim za proteolitički enzim. U slučaju da u stanici postoji drugi razgradivi izvor energije doći će do kataboličke represije dušikom što će spriječiti sintezu proteolitičkog enzima koji je potreban za razgradnju određenog supstrata. Ovaj mehanizam negativne kontrole ima važnu ulogu u regulaciji sinteze proteolitičkih enzima budući da može u potpunosti blokirati sintezu. Proteolitička aktivnost BMK pruža brojne prednosti pri upotrebi ovih bakterija u raznim granama prehrambene industrije, u proizvodnji mliječnih proizvoda, mesnih prerađevina, kruha, piva te aditiva u hrani. Proteolitički enzimi sintetizirani od BMK najveću primjenu imaju u mliječnoj industriji u proizvodnji sira, kefira i jogurta iz razloga što uzrokuju koagulaciju mlijeka koja je ključna u dobivanju ovih proizvoda (Kieliszek i sur., 2021).

### 2.3.2. Antioksidativno djelovanje

BMK su uglavnom aerotolerantni anaerobni mikroorganizam. Anaerobne bakterije nemaju razvijen sustav za transport elektrona te iz tog razloga u prisutnosti velike količine kisika dolazi do nastajanja reaktivnih kisikovih spojeva. Superoksidni anion, vodikov peroksid i hidrosil radikal su reaktivni kisikovi spojevi koji u visokim koncentracijama uzrokuju oksidativni stres koji oštećuje proteine, DNA i lipide te u konačnici može uzrokovati smrt stanice. BMK kao odgovor na oksidativni stres pokazuju antioksidativno djelovanje, produciraju antioksidativne enzime koji uklanjaju reaktivne kisikove spojeve te na taj način smanjuju i spječavaju oštećenja nastala oksidativnim stresom (slika 2). Neke vrste BMK imaju enzime koji posjeduju sposobnost vezanje superoksidnih anion radikala, a to su NADH oksidaze, piruvat oksidaze i laktat oksidaze. Ovi su enzimi iznimno važni za uklanjanje kisika te imaju ulogu u održavanju intracelularnog redoks balansa. NADH oksidaze djeluju na način da superoksidni anion prevode u molekulu vode ili vodikov peroksid. Najvažnije antioksidativne enzime kod BMK predstavljaju superoksid dismutaze koje dismutiraju superoksidni anion u molekulu vode ili vodikov peroksid, a kao koenzime koriste metalne ione Mn, Fe i Cu. Ovi enzimi vezanjem metalnih kationa smanjuju njihovu koncentraciju u stanici što posljedično smanjuje oštećenja vezana uz vodikov peroksid koji da bi producirao slobodne radikale treba reagirati sa željezovim kationom. Tioredoksin i glutaredoksin sustav također imaju bitnu ulogu u odgovoru na oksidativni stres. Tioredoksin sustav čine NADPH, tioredoksin reduktaza te tioredoksin, a njegova je uloga prijenos elektrona do tiol ovisnih reduktaza u

svrhu očuvanja redoks homeostaze te zaštite bakterije od reaktivnih kisikovih spojeva. Antioksidativno djelovanje BMK omogućava razne prednosti pri primjeni u prehrambenoj industriji jer pozitivno utječu na redoks ravnotežu u organizmu te omogućuju produljenje roka trajanja nekih prehrambenih proizvoda (Feng i Wang, 2020).



**Slika 2.** Prikaz bioaktivnog djelovanja bakterija mliječne kiseline (fotografija izrađena pomoću programa Biorender)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

U eksperimentima je korišteno je 30 sojeva BMK izoliranih iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7, TM8, TM9, TM10, TM11, TM12, TM13, TM14, TM15, TM16, TM17, TM18, TM19, TM20, TM21, TM22, TM23, TM24, TM26, TM27, TM28, TM29 i TM30). Za ispitivanje antimikrobnog djelovanja korišteni su predstavnici BMK i test-mikroorganizmi navedeni u tablici 1. Svi navedeni sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

**Tablica 1.** Prikaz bakterijskih sojeva koji su korišteni u ovom radu

Bakterijski soj	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7, TM8, TM9, TM10, TM11, TM12, TM13, TM14, TM15, TM16, TM17, TM18, TM19, TM20, TM21, TM22, TM23, TM24, TM25, TM26, TM27, TM28, TM29, TM30	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25925™	hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922™	hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Salmonella enterica</i> serotip Typhimurium FP1	hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC®19111™	hranjivi bujon, 37 °C, aerobno
<i>Lactobacillus helveticus</i> M92	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactococcus 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 (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biolife“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
- MRS bujon („Biolife“, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj BMK roda *Lactococcus* i *Enterococcus*

- M17 agar („Biolife“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5; laktoza 5; natrijev glicerofosfat 19; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
- M17 bujon („Biolife“, Italija), istog sastava kao podloga M17 agar, ali bez dodatka agara.

c) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test-mikroorganizama

- HA (hranjivi agar) („Biolife“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3; agar 18. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
- HB (hranjivi bujon) („Biolife“, Italija), istog sastava kao HA, ali bez dodatka agara

### 3.1.3. Kemikalije

- agar, „Sigma-Aldrich“, SAD
- etanol, 70 % (v/v) „Kemika“, Hrvatska
- etanol, apsolutni, „Kemika“, Hrvatska
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- obrano mlijeko „Sigma-Aldrich“, SAD
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), „Sigma-Aldrich“, SAD

#### 3.1.4. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyerove tikvice, „Technische Glaswerke Ilmenau“, Njemačka
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje od 15 mL i 50 mL, „Falcon“, Engleska
- mikrotitarska pločica s 96 jažica, „Greiner Bio-One“, Austrija
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- plastične epruvete od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vodena kupelj, „Inkolab“, Hrvatska
- vorteks mješač V1 plus, „Biosan“, Latvija
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD
- mikrobiološka ušica, „Syntesis“, Italija



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Čuvanje i održavanje bakterijskih sojeva

Sojevi iz roda *Lactobacillus* čuvani su pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Sojevi iz roda *Lactococcus* i *Enterococcus* čuvani su pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u M17 bujonu uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Test-mikroorganizmi su čuvani pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u hranjivom bujonu s 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u optimalnu podlogu, te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta.

### 3.2.2. Detekcija biosinteze egzopolisaharida

Među bakterijskim sojevima izoliranim iz kiselog kupusa, provedena je fenotipska detekcija sojeva producenata egzopolisaharida doticanjem bakterijskih kolonija nakon prekonoćnog uzgoja na MRS agaru uz dodatak 2 % (v/v) glukoze. Prisutnost dugih, filamentoznih rastezljivih niti, tipičnih za „ropy“ fenotip, upućuje na proizvodnju EPS-a (slika 3).

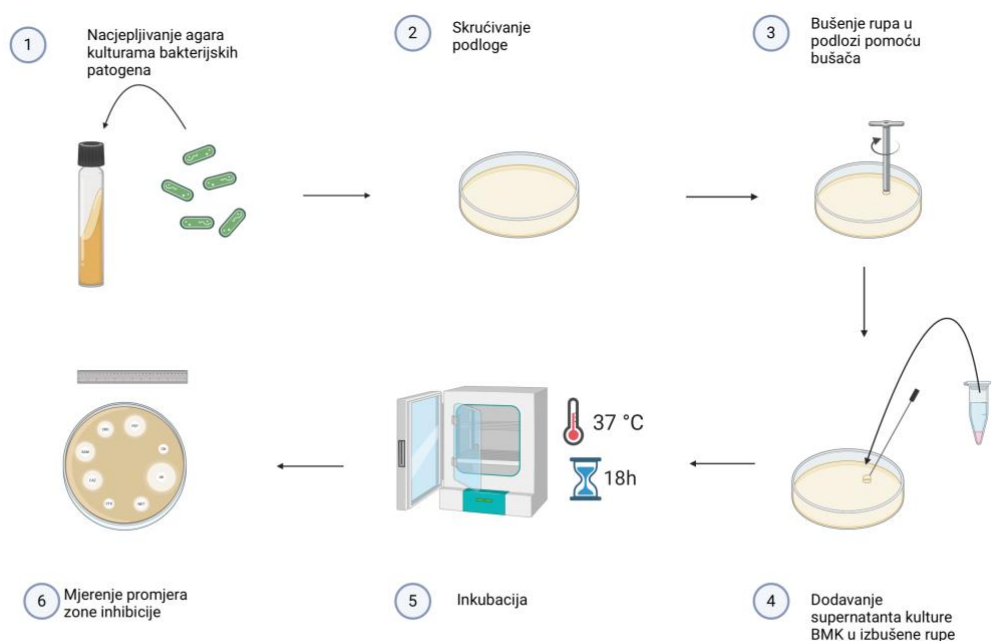


**Slika 3.** Određivanje „ropy“ fenotipa (vlastita fotografija)

### 3.2.3. Određivanje antimikrobnog djelovanja

#### 3.2.3.1. Metoda difuzije s rupama u agaru (engl. agar well-diffusion method)

Antimikrobno djelovanje bakterija izoliranih iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa prema *S. aureus* ATCC®25925™, *L. monocytogenes* ATCC®19111™, *E. coli* ATCC®25922™ i *S. Typhimurium* FP1 ispitano je metodom difuzije u agar. 100 µL bakterijske kulture test-mikroorganizma optičke gustoće  $OD_{620}=2$  nacijepljeno je u 12 mL sterilnog hranjivog agara (1,5 % (w/v)) prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 °C. Nakon skrtnjavanja, sterilnim bušačem promjera 7 mm izbušene su rupe u agaru u koje je dodano 50 µL supernatanta kulture čije se antimikrobno djelovanje ispituje. Nakon 18 h inkubacije pri 37 °C, izmjereni su promjeri zona inhibicije (slika 4).

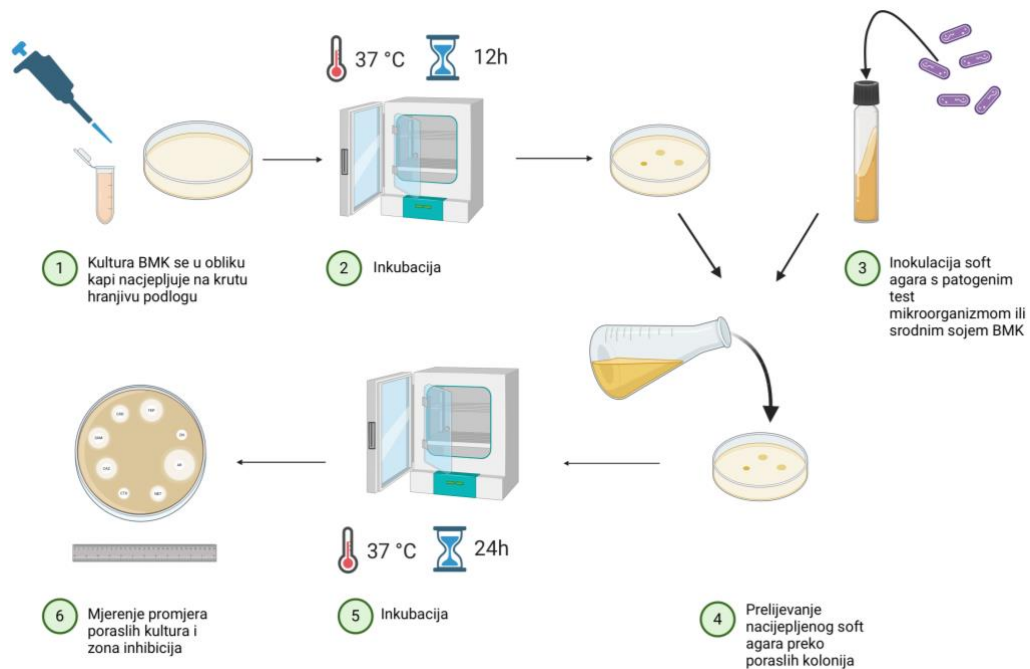


**Slika 4.** Određivanje antimikrobnog djelovanja bakterija mliječne kiseline metodom difuzije s rupama u agaru (fotografija napravljena pomoću programa Biorender)

### 3.2.3.2. Metoda s dvostrukim slojem agara (*engl. agar spot-test method*)

Antimikrobno djelovanje bakterija izoliranih iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa prema srodnim BMK (*Lb. helveticus* M92, *Lc. lactis* LMG 9450, *Ec. faecium* ATCC®9430™) te prema patogenim test-mikroorganizmima (*S. aureus* ATCC®25925™, *L. monocytogenes* ATCC®19111™, *E. coli* ATCC®25922™ i *S. Typhimurium* FP1) ispitano je metodom s dvostrukim slojem agara. Bakterijska kultura čije se antimikrobno djelovanje ispituje naciepljena je u obliku kapi od 10 µL na optimalnu krutu hranjivu podlogu. Nakon prekonoćne inkubacije pri 37 °C, preko poraslih kolonija preliveno je 10 mL soft agar (0,75 % (w/v)) hranjive podloge inokulirane sa 100 µL test-mikroorganizma, odnosno srodne BMK optičke gustoće OD<sub>620</sub>=2. Nakon 24 h aerobne inkubacije pri 37 °C, izmjeren je promjer porasle kulture (*engl.* Culture diameter, CD) i bistrih zona inhibicije (*engl.* Inhibition diameter, ID) (slika 5) te je izračunat efektivni inhibicijski odnos (*engl.* Effective inhibition ratio, EIR):

$$EIR = \frac{ID - CD}{CD}$$



**Slika 5.** Određivanje antimikrobnog djelovanja bakterija mliječne kiseline metodom s dvostrukim slojem agara (fotografija napravljena pomoću programa Biorender)

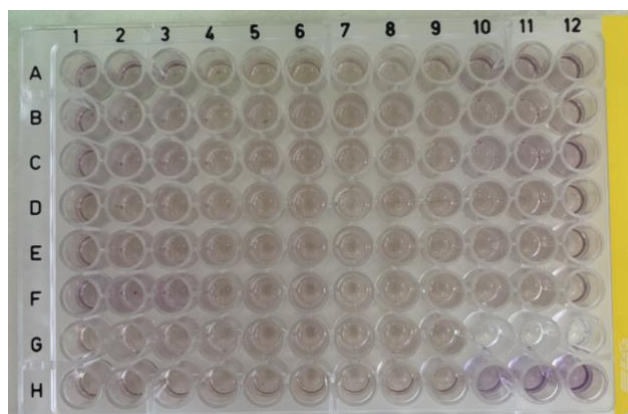
### 3.2.4. Određivanje proteolitičkog djelovanja

Proteolitička aktivnost prekonoćnih kultura BMK uzgojenih u MRS bujonu određena je kvalitativnom metodom difuzije u podlogu prema Raveschot i sur. (2020) s modifikacijama. Sterilna kruta podloga s obranim mlijekom (10 % w/v) uz dodatak 2 % (w/v) agara ohlađena je u vodenoj kupelji temperiranoj na 50 °C i izlivena u Petrijevu zdjelicu. Nakon skrutnjavanja podloge, izbušene su „rupe“ u agaru bušačem promjera 7 mm, u koje je zatim ukapano 50 µL supernatanta bakterijske kulture. Petrijeve zdjelice su inkubirane pri 30 °C, a promjeri zona, nastalih uslijed hidrolize kazeina, koji upućuju na proteolitičku aktivnost pojedinog soja bakterije mliječne kiseline određeni su nakon 48 sati.

### 3.2.5. Određivanje antioksidativnog djelovanja

DPPH metoda mjeri apsorbanciju otopine spoja određene antioksidativne aktivnosti nakon reakcije s DPPH radikalom (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate). Korištene su prekonoćne kulture sojeva BMK izoliranih iz kiselog kupusa u 5 ml MRS bujona. Kulture stanica su centrifugirane pri 4200g kroz 10 minuta te je dobiveni talog stanica ispran dva puta i suspendiran u 1 mL PBS pufera (pH=7,4). Stanice su pomješane sa svježim pripremljenim DPPH-om (0,2 mM u etilnom alkoholu) u umjeru 1:1 nakon čega je provedena inkubacija u mraku tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani pri 4200g kroz 10 minuta te je mjerena apsorbancija supernatanta pri 517 nm (slika 6). Kao slijepa proba korišten je etanol i PBS pufer (pH= 7,4), a kao kontrola korištena je otopina DPPH u etilnom alkoholu i PBS pufer (pH= 7,4). Sposobnost uklanjanja DPPH radikala izračunata je po jednadžbi (Son i sur., 2018):

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



**Slika 6.** Pločica za mjerenje apsorbancije uzoraka (vlastita fotografija)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. BIOAKTIVNI METABOLITI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Egzopolisaharidi su biorazgradivi polimeri koje sintetiziraju određeni sojevi BMK. Detekcija sojeva koji su potencijalni producenti EPS-a provodi se ispitivanjem „ropy“ fenotipa kojeg karakteriziraju dugački rastezljivi filamenti doticanjem kolonija BMK s mikrobiološkom ušicom. Analiza je provedena na svih 30 sojeva BMK izoliranih iz rasola kiselog kupusa, pri čemu je „ropy“ fenotip prisutan kod 33,33 % ispitivanih sojeva (TM2, TM3, TM4, TM6, TM7, TM11, TM25, TM26, TM27 i TM28). Rezultati su prikazani u tablici 2.

U sklopu istraživanja od Ramos i sur. (2023) kao prvi korak provedena je detekcija „ropy“ fenotipa kod 123 soja BMK izolirana iz različitih izvora fermentirane hrane, vina i piva. Rezultati su pokazali da je 44,3 % ispitivanih BMK pokazalo „ropy“ fenotip. Niti jedan soj bakterija roda *Leunostoc* nije pokazao „ropy“ fenotip za razliku od bakterija roda *Lactococcus* kod kojih je većina bakterija koje proizvode egzopolisaharide pokazala „ropy“ fenotip. Oko 25 % ispitivanih BMK roda *Lactobacillus* i *Lactiplantibacillus* je pokazalo mogućnost sinteze EPS-a, a više od 50 % bakterija rodova *Levilactobacillus* i *Lacticaseibacillus* pokazalo je „ropy“ fenotip.

Usporedbom naših rezultata i rezultata koje su dobili Ramos i sur. (2023) može se pretpostaviti da sojevi BMK koji pokazuju „ropy“ fenotip ne moraju nužno proizvoditi egzopolisaharide i obrnuto.

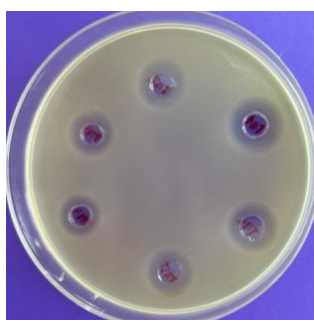
**Tablica 2.** Rezultati određivanja detekcije sinteze egzopolisaharida bakterija mliječne kiseline izoliranih iz rasola kiselog kupusa primjenom „ropy“ fenotipa

Soj BMK	„ropy“ fenotip	Soj BMK	„ropy“ fenotip
TM1	-	TM16	-
TM2	+	TM17	-
TM3	+	TM18	-
TM4	+	TM19	-
TM5	-	TM20	-
TM6	+	TM21	-
TM7	+	TM22	-
TM8	-	TM23	-
TM9	-	TM24	-
TM10	-	TM25	+
TM11	+	TM26	+
TM12	-	TM27	+
TM13	-	TM28	+
TM14	-	TM29	-
TM15	-	TM30	-

Antimikrobno djelovanje BMK proizlazi od sintetiziranih bakteriocina, malih molekula, vitamina, organskih kiselina te EPS-a, pri čemu je antimikrobno djelovanje dokazano prema patogenim bakterijama koje su najčešći uzročnici kvarenja hrane, kvascima te plijesnima (Ibrahim i sur., 2021). Najčešći kontaminanti hrane su *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli*, čiji rast je inhibiran smanjenjem pH vrijednosti medija zbog proizvedenih organskih kiselina te djelovanja bakteriocina. Najčešće korišteni bakteriocin je nisin koji pokazuje snažno antimikrobno djelovanje prema Gram negativnim bakterijama kao što su *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* (Zapašnik i sur., 2022).

U ovom radu ispitivala se antimikrobna aktivnost 30 sojeva BMK izoliranih iz rasola kiselog kupusa prema odabranim test-mikroorganizmima i srodnim BMK. Ispitivanje je provedeno primjenom dvije metode, metode difuzije s rupama u agaru i metode s dvostrukim slojem agara.

Prema rezultatima dobivenih metodom difuzije u agru, mjerenjem promjera zona inhibicije (slika 7) uočeno je jače antimikrobno djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. Typhimurium* FP1, nego kod *S. aureus* ATCC®25925™ i *E. coli* ATCC®25922™ (tablica 3). U istraživanju od Erdoğmuş i sur. (2021) provedena je detekcija antimikrobnog djelovanja 30 sojeva BMK izoliranih iz različitih oblika fermentiranog mesa metodom difuzije u agaru. Rezultati su pokazali da bakterije imaju snažnije antimikrobno djelovanje prema patogenima *L. monocytogenes* ATCC 19115 i *S. aureus* ATCC 25923, te nešto slabije djelovanje prema *E. coli* ATCC 35218. Metodom difuzije u agaru provedeno je i istraživanje od Goa i sur. (2022) za detekciju antimikrobne aktivnosti 12 sojeva BMK izoliranih iz fermentiranog mlijeka. Najbolju antimikrobnu aktivnost ovi su sojevi pokazali prema *S. aureus*, a nešto slabiju prema *E. coli* i *Salmonella spp.* Usporedbom naših rezultata, rezultata dobivenih od Erdoğmuş i sur. (2021) te rezultata dobivenih od Goa i sur. (2022) dokazano je da sojevi BMK imaju antimikrobnu aktivnost prema sva četiri ispitivana bakterijska patogena od kojih je najbolje antimikrobno djelovanje dokazano prema *L. monocytogenes*, a najslabije prema *E. coli*.



**Slika 7.** Inhibicijski učinak bakterija mliječne kiseline izoliranih iz rasola kiselog kupusa na test mikroorganizame ispitano metodom difuzije s rupama u agaru (vlastita fotografija)

**Tablica 3.** Rezultati određivanja antimikrobnog djelovanja bakterija mliječne kiselineizoliranih iz rasola kiselog kupusa metodom difuzije s rupama u agaru

Soj BMK	Promjer zone inhibicije (mm)			
	<i>S. aureus</i> ATCC®25925™	<i>S.</i> Typhimurium FP1	<i>E. coli</i> ATCC®25922™	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i> ATCC®19111™
TM1	11	16	12	15
TM2	11	15	12	15
TM3	12	15	12	15
TM4	11	14	11	14
TM5	10	15	12	14
TM6	10	15	12	14
TM7	11	13	11	14
TM8	10	13	11	14
TM9	10	14	13	14
TM10	10	14	12	13
TM11	10	13	11	13
TM12	11	14	12	15
TM13	11	14	11	13
TM 14	10	14	11	14
TM15	11	14	11	15
TM16	10	14	11	15
TM17	11	14	11	15
TM18	10	14	12	13
TM19	11	12	12	14
TM20	10	13	11	14
TM21	10	12	12	15
TM22	10	12	12	17
TM23	11	13	12	15
TM24	10	12	12	13
TM25	12	14	13	15
TM26	11	15	13	14
TM27	/	/	/	/
TM28	10	14	12	13
TM29	10	15	11	14
TM30	10	10	12	14

Metodom s dvostrukim slojem agara, osim prema bakterijskim patogenima, ispitivana je i antimikrobna aktivnost prema srodnim sojevima BMK (slika 8). Rezultati su izraženi pomoću efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR). Prema Coeuret i sur. (2004)  $EIR < 0,5$  označava slabu, a  $EIR > 1,5$  jaku inhibiciju, dok vrijednosti između upućuju na srednje jako inhibicijsko djelovanje. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da sojevi BMK izolirani iz rasola kiselog kupusa pokazuju jače antimikrobno djelovanje prema bakterijskim patogenima nego prema srodnim BMK. Najjače djelovanje primjećeno je prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™, *S. aureus* ATCC®25925™, *E. coli* ATCC®25922™ i *S. Typhimurium* FP1 kod kojih se EIR vrijednost uglavnom kretala od 1 do 2,5 što dokazuje jako ili srednje jako inhibicijsko djelovanje. U skladu s rezultatima dobivenim metodom difuzije u agaru najveće vrijednosti EIR primjećene su za djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™. Sojevi pokazuju dosta slabije djelovanje prema srodnim BMK, kod njih se vrijednosti EIR kreću od 0,4 do 1,5, s iznimkom nekoliko sojeva koji pokazuju jaku inhibiciju prema *Lb. helveticus* M92. Prema sojevima *Lc. lactis* LMG 9450 i *Ec. faecium* ATCC®9430™ prisutno je uglavnom srednje jako ili slabo inhibicijsko djelovanje (tablica 4). Prema istraživanju od Mohamad i sur. (2022) ispitano je antimikrobno djelovanje 2 soja BMK izolirana iz ukiseljenog voća metodom s dvostrukim slojem agara prema različitim Gram negativnim i Gram pozitivnim bakterijama. Prema dobivenim rezultatima ovi sojevi najslabije djelovanje su pokazali prema *Ec. faecalis* ATCC® 19433™, koji je jedini korišteni srodni soj BMK. Prema bakterijskim patogenima *L. monocytogenes* ATCC® 7644™, *S. aureus* ATCC® 25923™, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ATCC® 14028™ dokazano je jače antimikrobno djelovanje dok je prema *E. coli* ATCC® 48888™ dokazano slabije djelovanje. Usporedbom naših rezultata s rezultatima koje su dobili Mohamad i sur. (2022) može se zaključiti da BMK pokazuju jače antimikrobno djelovanje prema bakterijskim patogenima nego prema srodnim BMK, pri čemu je najbolja sposobnost inhibicije dokazana prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™, a najslabija prema *E. coli* ATCC®25922™.



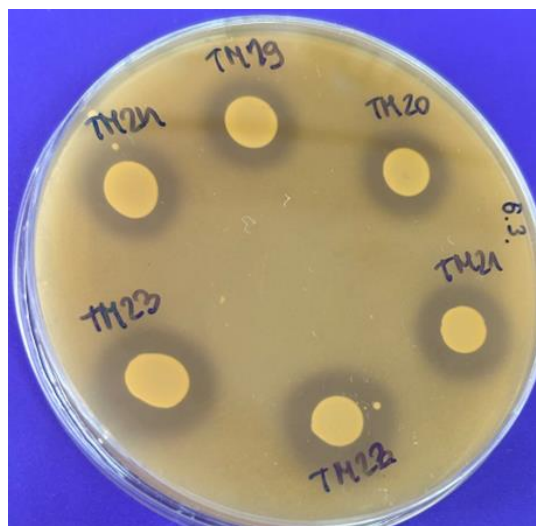
**Tablica 4.** Rezultati određivanja antimikrobnog djelovanja bakterija mliječne kiselineizoliranih iz rasola kiselog kupusa metodom s dvostrukim slojem agara prema a) test-mikroorganizmima i b) srodnim BMK

a)

Soj BMK	EIR (efektivni inhibicijski odnos)			
	<i>S. aureus</i> ATCC®25925™	<i>S. Typhimurium</i> FP1	<i>E. coli</i> ATCC®25922™	<i>L. monocytogenes</i> ATCC®19111™
TM1	0,33	1,22	1,11	2,44
TM2	0,44	1,11	1,11	2,33
TM3	0,56	1,0	1,11	1,78
TM4	0,44	0,78	1,11	1,78
TM5	0,44	0,78	1,11	1,78
TM6	0,56	0,78	1,11	2,22
TM7	1,22	1,22	1,11	2,33
TM8	0,89	1,22	1,11	2,33
TM9	1,11	0,78	1,0	2,11
TM10	1,11	0,78	1,44	1,78
TM11	1,22	0,78	1,56	2,11
TM12	1,11	0,78	1,44	1,11
TM13	2,33	0,44	1,89	2,11
TM14	2,33	0,44	1,78	2,11
TM15	2,22	0,44	1,78	1,89
TM16	2,22	0,44	2,22	1,89
TM17	2,22	0,67	1,67	2,0
TM18	2,22	0,67	1,56	1,44
TM19	1,56	1,0	2,33	1,56
TM20	1,67	1,78	2,11	2,0
TM21	1,67	1,89	1,89	2,0
TM22	1,11	1,78	1,89	1,78
TM23	1,22	1,67	1,89	1,56
TM24	1,33	1,89	2,11	1,56
TM25	1,22	1,89	2,0	1,44
TM26	1,11	1,89	2,0	1,44
TM27	1,11	1,89	2,0	1,44
TM28	1,0	1,89	2,0	1,44
TM29	1,11	1,89	2,0	1,44
TM30	1,22	1,89	2,0	1,44

b)

Soj BMK	EIR (efektivni inhibicijski odnos)		
	<i>Lc. lactis</i> LMG 9450	<i>Ec. faecium</i> ATCC®9430™	<i>Lb. helveticus</i> M92
TM1	0,78	1,0	1,22
TM2	0,78	1,11	1,22
TM3	0,78	1,11	1,22
TM4	0,78	1,22	1,11
TM5	0,89	0,89	1,11
TM6	1,0	0,89	1,22
TM7	0,56	0,56	1,11
TM8	0,67	0,67	1,11
TM9	0,78	0,78	0,89
TM10	1,22	0,56	1,0
TM11	0,44	0,67	1,11
TM12	0,44	0,67	1,0
TM13	0,44	0,56	2,33
TM14	0,44	0,67	2,44
TM15	0,89	0,56	2,33
TM16	0,89	0,56	2,33
TM17	0,89	0,56	2,44
TM18	0,89	0,67	2,44
TM19	1,11	0,78	1,11
TM20	1,22	1,0	1,33
TM21	1,11	1,0	1,33
TM22	0,89	1,0	1,33
TM23	0,67	1,0	1,33
TM24	0,56	0,67	1,22
TM25	0,78	0,67	1,11
TM26	0,89	0,67	1,0
TM27	1,0	0,67	1,0
TM28	0,89	1,0	1,0
TM29	1	1,0	1,11
TM30	0,89	1,0	1,11

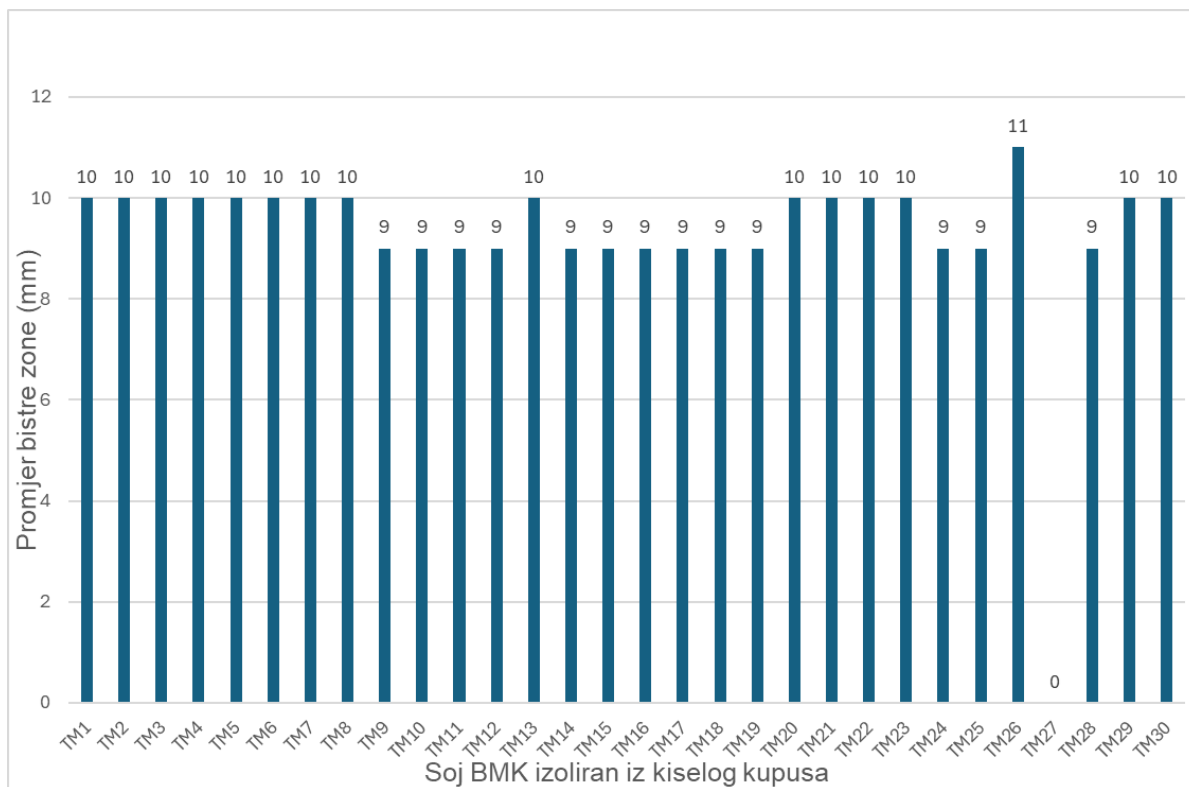


**Slika 8.** Inhibicijski učinak bakterija mliječne kiseline izoliranih iz rasola kiselog kupusa na test mikroorganizme ispitano metodom s dvostrukim slojem agara (vlastita fotografija)

#### 4.2. BIOAKTIVNO DJELOVANJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Proteolitičko djelovanje BMK okarakterizirano je sintezom proteolitičkih enzima koji cijepaju proteine do manjih peptida i/ili aminokiselina. U ovome radu proteolitičko djelovanje ispitano je kod 30 sojeva BMK izoliranih iz rasola kiselog kupusa. Proteolitičko djelovanje ispitano je hidrolizom kazeina, glavnog proteina iz mlijeka. Prema dobivenim rezultatima proteolitičko djelovanje svih sojeva je vrlo slično, odnosno promjer bistre zone hidrolize kazeina iznosi između 9 i 10 mm, iznimno 11 mm kod soja TM26. Jedino soj TM27 ne pokazuje proteolitičku aktivnost (slika 9). Istraživanje koje je provedeno od Raveschot i sur. (2020) ispitano je proteolitičko djelovanje 170 sojeva BMK izoliranih iz različitih vrsta fermentiranog mlijeka istom metodom koja je korištena u ovom radu. Prema njihovim rezultatima najbolja proteolitička aktivnost dokazana je kod 15 sojeva koji pripadaju vrstama *L. delbrueckii* i *Lb. helveticus*, kod kojih je izmjereni promjer bistre zone iznosio između 28 i 37 milimetara.

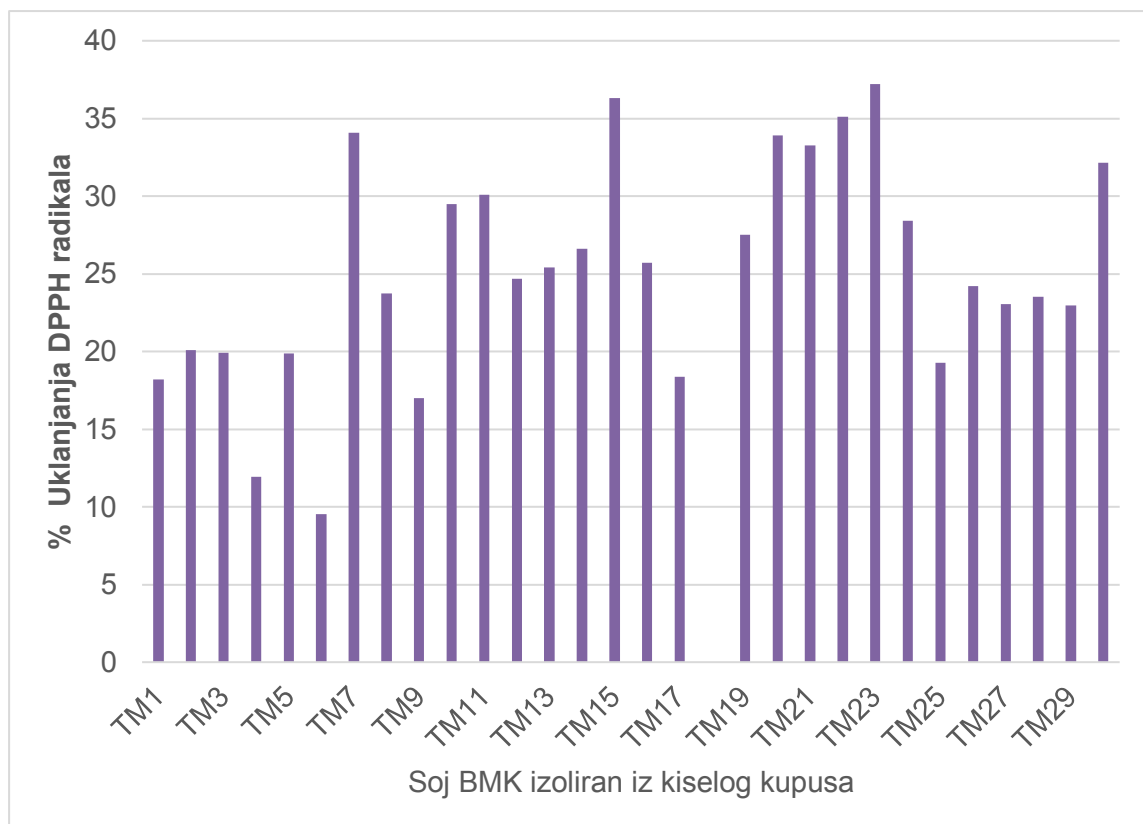
Usporedbom naših rezultata i rezultata dobivenih od Raveschot i sur. (2020) primjećujemo da su promjeri bistrih zona BMK izoliranih iz kiselog kupusa manji od promjera kod vrsta *L. delbrueckii* i *Lb. helveticus* izoliranih iz fermentiranog mlijeka, što upućuje na to da BMK koje nisu izolirane iz mliječnih izvora posjeduju manju proteolitičku aktivnost.



**Slika 9.** Rezultati određivanja proteolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline izoliranih iz rasola kiselog kupusa

Antioksidansi su spojevi koji pokazuju veliku aktivnost u sprječavanju štetnog djelovanja slobodnih radikala. U ovoj metodi mjeri se apsorbancija otopine spoja određene antioksidativne aktivnosti nakon reakcije s DPPH radikalom. Metoda se temelji na sposobnosti uklanjanja radikala antioksidansom. Antioksidans donira vodik dušiku koji sadrži jedan nesporeni elektron odgovarajućeg hidrazina. DPPH radikal je stabilni radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule, pa on ne dimerizira kao ostali slobodni radikali. Rezultati ispitivanja antioksidativnog djelovanja su izraženi kao postotak (%) uklanjanja DPPH radikala, koji se kreću od 10 % do 37 %, s iznimkom soja T18 kod kojega antioksidativna aktivnost nije detektirana. Najjaču antioksidativnu aktivnost pokazuju sojevi TM15 i TM23, kod kojih sposobnost uklanjanja DPPH radikala iznosi oko 37 % (slika 10). U istraživanju od Vougiouklaki i sur. (2023) provedeno je ispitivanje antioksidativne aktivnosti istom metodom za 4 vrste BMK iz roda *Lactobacillus*, *Lactobacillus gasserii* ATCC 33323, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Levilactobacillus brevis* ATCC 8287 i *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 pri čemu je najbolju antioksidativnu aktivnost pokazao soj *Lactobacillus gasserii* ATCC 33323 s 78 % uklanjanja DPPH radikala. Kod ostala tri soja dokazana je sposobnost uklanjanja DPPH radikala između 33 % i 39 % Uporedbom naših

rezultata i rezultata koje su dobili Vougiouklaki i sur. (2023) može se zaključiti da veliki broj sojeva ima sposobnost uklanjanja DPPH radikala oko 30 % za vrijeme inkubacije od 30 minuta. Isto tako, moguće je da sojevi izolirani iz rasola kiselog kupusa koji pokazuju bolje antioksidacijsko djelovanje pripadaju rodu *Lactobacillus* na temelju sličnih vrijednosti sposobnosti uklanjanja DPPH radikala.



**Slika 10.** Rezultati ispitivanja potencijala antioksidacijske aktivnosti bakterija mliječne kiseline izoliranih iz rasola kiselog kupus

## 5. ZAKLJUČCI

1. Potencijal biosinteze egzopolisaharida dokazan je kod 33,33 % sojeva BMK izoliranih iz rasola kiselog kupusa.
2. BMK izolirane iz rasola kiselog kupusa pokazuju jače antimikrobno djelovanje prema test-mikroorganizmima nego prema srodnim BMK.
3. BMK izolirane iz rasola kiselog kupusa pokazuju snažno antimikrobno djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™, *S. Typhimurium* FP1, *S. aureus* ATCC®25925™ i *E. coli* ATCC®25922™.
4. Svi sojevi BMK izolirani iz rasola kiselog kupusa pokazuju sličnu proteolitičku aktivnost.
5. Najbolja antioksidativna aktivnost BMK izoliranih iz rasola kiselog kupusa dokazana je kod sojeva TM15 i TM23.

## 6. POPIS LITERATURE

Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R, i sur. (2020) Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy* **1**, 202–232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>

Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP (2004) *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J Dairy Res* **71**, 451-60. <https://doi.org/10.1017/s0022029904000469>

Erdoğmuş SF, Erişmiş UC, Uğuz C (2021) Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented meat products and evaluation of their antimicrobial effect. *Czech J Food Sci* **39**, 289-296. <https://doi.org/10.17221/222/2020-CJFS>

Feng T, Wang J (2020) Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes* **12**, 1801944. <https://doi.org/1801944.10.1080/19490976.2020.1801944>

Fevria R, Hartanto I (2020) Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus* sp.) From Sauerkraut. *Adv Biol Sci Res* **10**, 74-77. <https://doi.org/10.2991/absr.k.200807.018>

Goa T, Beyene G, Mekonnen M, Gorems K (2022) Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk Produced in Jimma Town, Southwest Ethiopia, and Evaluation of their Antimicrobial Activity against Selected Pathogenic Bacteria. *Int J Food Sci* **2022**. <https://doi.org/10.1155/2022/2076021>

Hakim BNA, Xuan NJ, Oslan SNH (2023) A Comprehensive Review of Bioactive Compounds from Lactic Acid Bacteria: Potential Functions as Functional Food in Dietetics and the Food Industry. *Foods* **12**, 2850. <https://doi.org/10.3390/foods12152850>

Ibrahim SA, Ayivi RD, Zimmerman T, Siddiqui SA, Altemimi AB, Fidan H, i sur. (2021) Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods* **10**, 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>

Jurášková D, Ribeiro SC, Silva CCG (2022) Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods* **11**, 156. [https://doi:10.3390/foods11020156](https://doi.org/10.3390/foods11020156)

Khalid K (2011) An overview of lactic acid bacteria. *Int J Biosci.* **1**, 1-13.

Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM (2021) Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules* **26**, 1858. [https://doi:10.3390/molecules26071858](https://doi.org/10.3390/molecules26071858)

Mohamad NI, Manan MA, Sani NA (2022) The Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria from Pickled Spondias dulcis (Ambarella) against Foodborne Pathogens. *Trends Sci* **19**. <https://doi.org/10.48048/tis.2022.2896>

Ramos IM, Seseña S, Poveda JM, Palop ML (2023) Screening of Lactic Acid Bacteria Strains to Improve the Properties of Non-fat Set Yogurt by in situ EPS Production. *Food Bioproc Tech* **16**, 2541–2558. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03080-7>

Raveschot C, Cudennec B, Deracinois B, Frémont M, Dugersuren J, Demberel S, i sur. (2020) Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from Mongolian traditional dairy products: A multiparametric analysis, *Food Chem* **304**, 125415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125415>

Reis JA, Paula AT, Casarotti SN, Penna ALB (2012) Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng Rev* **4**, 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>

Son SH, Yang SJ, Jeon HL, Yu HS, Lee NK, Park YS i sur. (2018) Antioxidant and immunostimulatory effect of potential probiotic *Lactobacillus paraplantarum* SC61 isolated from Korean traditional fermented food, jangajji. *Microb Pathog* **125**, 486-492. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.018>

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



Zapaśnik A, Sokołowska B, Bryła M (2022) Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods* **11**, 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>

### Izjava o izvornosti

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



---

Vlastoručni potpis