

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Helena Dujmović

Funkcionalne značajke *Lactiplantibacillus plantarum* S3 iz sirišta janjadi – potencijal primjene u  
mljekarstvu

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Mentor: izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Vesna Dobranić
2. prof. dr. sc. Lidija Kozačinski
3. izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec
4. dr. sc. Tomislav Mikuš (zamjena)

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr sc. Neviju Zdolecu na podršci, izdvojenom vremenu i korisnim savjetima tijekom pisanja diplomskog rada. Također veliko hvala asistentici Marti Kiš, dr. med. vet. na velikoj pomoći u provođenju eksperimenata. Zahvaljujem se i Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji je omogućio sredstva za ovo istraživanje u sklopu projekta „Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva“ KK. 01.1.1.04.0058 (voditeljica doc. dr. sc. Nataša Mikulec).*

*Zahvaljujem se svojim kolegama koji su mi uveseljavali i olakšali studentske dane i s kojima sam stekla prijateljstvo za cijeli život.*

*Posebno se zahvaljujem obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja.*

*Hvala vam!*

## Popis kratica

BMK bakterije mliječne kiseline

MIC minimalne inhibicijske koncentracije

CFU colony forming units

EFSA European Food Safety Agency

MRS de Man, Ragosa, Sharpe bujon

## Popis priloga

### Tablice:

Tablica 1. Razgradnja ugljikohidrata soja *L. plantarum* S3 (API 50 CHL)

Tablica 2. Enzimatska aktivnost soja *L. plantarum* S3 (API ZYM)

Tablica 3. Brojnost soja *L. plantarum* S3 pri različitim temperaturnim uvjetima i koncentracijama soli (log CFU/ml  $\pm$  SD)

Tablica 4. Brojnost soja *L. plantarum* S3 pri različitim pH vrijednostima (log CFU/ml  $\pm$  SD)

Tablica 5. Mjerenje acidifikacijske sposobnosti *L. plantarum* S3 tijekom 6 sati (ml NaOH/pH vrijednost)

Tablica 6. Rezultati ispitivanja osjetljivosti *L. plantarum* S3 na antimikrobne tvari (E test)

### Slike:

Slika 1. API 50 CHL dijagnostički test

Slika 2. API ZYM dijagnostički test

Slika 3. Produkcija plina razgradnjom glukoze

Slika 4. Acidifikacijska krivulja *L. plantarum* S3

Slika 5. Antimikrobna aktivnost *L. plantarum* S3 (lijevo) i *E. faecalis* 101 (desno)

## SADRŽAJ

1.	Uvod.....	1
2.	Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja.....	3
	2.1. Bakterije mliječne kiseline.....	3
	2.2. Starter kulture.....	5
	2.3. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....	6
3.	Materijali i metode.....	9
	3.1. Utvrđivanje biokemijskog profila pomoću API dijagnostičkih kitova..	9
	3.2. Sposobnost stvaranja plina razgradnjom glukoze.....	10
	3.3. Sposobnost razmnožavanja soja <i>L. plantarum</i> S3 pri različitim temperaturnim uvjetima.....	10
	3.4. Sposobnost razmnožavanja soja <i>L. plantarum</i> S3 pri različitim pH vrijednostima.....	10
	3.5. Sposobnost razmnožavanja soja <i>L. plantarum</i> S3 pri različitim koncentracijama soli.....	11
	3.6. Utvrđivanje acidifikacijske sposobnosti soja <i>L. plantarum</i> S3.....	11
	3.7. Utvrđivanje antimikrobne otpornosti.....	11
	3.8. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti prema <i>Listeria monocytogenes</i> ...	12
	3.9. Statistička obrada.....	12
4.	Rezultati.....	13
	4.1. Utvrđivanje biokemijskog profila pomoću API dijagnostičkih kitova..	13
	4.2. Sposobnost stvaranja plina razgradnjom glukoze.....	15
	4.3. Sposobnost razmnožavanja soja <i>L. plantarum</i> S3 pri različitim temperaturnim uvjetima, pH vrijednostima i koncentracijama soli.....	15
	4.4. Utvrđivanje acidifikacijske sposobnosti.....	16
	4.5. Utvrđivanje antimikrobne otpornosti.....	17
	4.6. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti prema <i>L. monocytogenes</i> .....	17
5.	Rasprava.....	18
6.	Zaključci.....	21
7.	Literatura.....	22
8.	Sažetak.....	27
9.	Summary.....	28
10.	Životopis.....	29

## 1. Uvod

Fermentacija mlijeka je jedna od najstarijih korištenih metoda za produljenje roka trajanja mlijeka, a ljudi ju prakticiraju tisućama godina. Nije poznato točno podrijetlo proizvodnje fermentiranog mlijeka, ali se pretpostavlja da datira prije više od 10.000 godina. Arheološki dokazi civilizacija Sumerana, Babilonaca i Indijaca sugeriraju da su bili napredni u poljoprivredi i u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. Današnji fermentirani mliječni proizvodi se proizvode gotovo u cijelom svijetu, a faze proizvodnje kombiniraju zajedno umjetnost drevnog zanata i znanosti (TAMIME, 2002.). U fermentaciji mlijeka se najčešće koriste bakterije mliječne kiseline i one su jedne od najranije otkrivenih i proučavanih bakterija u mikrobiologiji hrane. Zadnjih godina sve više pažnje se obraća na njih zbog povoljnih probiotičkih svojstava i antimikrobnog potencijala (GEORGE i sur., 2018.). Postoji preko 60 rodova bakterija mliječne kiseline, od kojih se *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Fructobacillus*, *Oenococcus* i *Weissella* povezuju s proizvodnjom hrane (DILLON, 2014.).

Starter kulture se dakle, dodaju mlijeku u cilju proizvodnje mliječnih prerađevina ubrzanim i kontroliranim fermentacijskim procesom (TAMIME, 2002.). U njima se među ostalima koristi i *Lactiplantibacillus plantarum* koji osim antimikrobnog djelovanja, poboljšava okus proizvoda, čuva i poboljšava nutritivni sastav proizvoda i zdravstvene prednosti, te produžuje rok trajanja. *L. plantarum* je široko rasprostranjena bakterija mliječne kiseline koju nalazimo u brojnim prehrambenim proizvodima te nastanjuje ljudsku i životinjsku mukozu gastrointestinalnog trakta (YILMAZ i sur., 2022.). Nedavnim istraživanjima u okviru projekta *Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva KK. 01.1.1.04.0058* izolirana je autohtona mikrobiota u tradicionalnoj proizvodnji Paškog sira od sirovog mlijeka. Jedan od ciljeva istraživanja bio je identificirati potencijalne sirarske kulture temeljem fenotipskih i genotipskih analiza, te su preliminarno odabrani sojevi vrste *L. plantarum* i *Lactococcus lactis* (KIŠ i sur., 2021.). *L. plantarum* je u navedenom istraživanju izoliran iz sirišta sisajuće janjadi te se pretpostavljalo da posjeduje određenu sposobnost preživljavanja i aktivnosti u kiselom mediju s obzirom na uvjete u sirištu. Pored toga je za očekivati da povoljno doprinosi razvoju senzorskih svojstava sireva.

Stoga je cilj ovog rada bio je ispitati funkcionalne značajke soja *L. plantarum* S3 izdvojen iz sirišta sisajuće janjadi te zabilježiti njegove biokemijske značajke, enzimske sustave, antimikrobnu aktivnost, osjetljivost na antimikrobne tvari, sposobnost rasta pri različitim temperaturama, koncentracijama soli i kiselosti. Očekuje se da će *L. plantarum* S3

imati probiotička svojstva i otpornost na granične uvjete rasta te pokazati povoljne tehnološke i zdravstvene značajke da bi bio primjenjiv u mljekarstvu, ponajprije proizvodnji sireva kao starter kultura.

## 2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja

### 2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine skupinu gram pozitivnih bakterija koja je široko rasprostranjena u prirodi i kojima je zajedničko da proizvode mliječnu kiselinu kao glavni produkt fermentacije ugljikohidrata. Najčešće nalaze u proizvodima mliječnog (fermentiranog), mesnog i biljnog podrijetla, u gastrointestinalnom i urogenitalnom traktu ljudi i životinja te u tlu i vodi (LIU i sur., 2014.). U mikrobiologiji hrane najznačajniji su rodovi *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus* pri čemu su laktobacili najveća skupina BMK i najčešće korišteni u mljekarstvu (LIU i sur., 2014.).

BMK su poznate po svojoj sposobnosti da pretvaraju šećere u mliječnu kiselinu. U njihovu metabolizmu se fermentacijom mogu sintetizirati i druge organske kiseline. Prema navedenom možemo ih klasificirati u homofermentativne i heterofermentativne bakterije. Homofermentativne bakterije su one kod kojih se kao rezultat fermentacije ugljikohidrata uglavnom oslobađa mliječna kiselina (98 %). U malim količinama, proces prati sinteza sukcinata i fumarna kiselina, ugljični dioksid i etanol. Za razliku od njih, kod heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline uz mliječnu kiselinu oko polovice šećera koristi se za proizvodnju octene kiseline, ugljičnog dioksida i etanola (BLAJMAN i sur., 2018.)

BMK se također mogu klasificirati i prema optimalnoj temperaturi rasta. Mogu se podijeliti na mezofilne kulture kojima je optimalna temperatura od 22 °C do 30 °C i termofilne koje imaju višu optimalnu temperaturu rasta od 37 °C do 45 °C. Mezofilne kulture bakterija sudjeluju u koagulaciji proteina, u fermentaciji laktoze uz nastanak kiselina, te aromatskih tvari poput diacetila, aldehida te CO<sub>2</sub>. Termofilne kulture se koriste u proizvodnji jogurta i ostalih fermentiranih mliječnih napitaka kao monokulture ili mješovite kulture, a sastavljene su od bakterija *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. (JOHNSON, 2013.).

BMK mogu sintetizirati bakteriocine, a to su primarni metaboliti polipeptida, proteina ili proteinskih kompleksa s antibakterijskim djelovanjem. Bakteriocini koji dolaze iz BMK privukli su veliki industrijski i znanstveni interes zbog svojstva da inhibiraju rast i razmnožavanje patogenih bakterija (DIEP i NES, 2002.). Njihova uloga je stupiti u interakciju s površinom stanice kako bi se povećala propusnost stanice, inhibirala proizvodnja stanične stijenke, inhibirala sinteza nukleinske kiseline i inhibirala sinteza proteina što dovodi do oštećenja stanice (KUMARIYA i sur., 2019.). Stoga ih se primjenjuje kao sredstva za biokontrolu zbog sigurnog i učinkovitog sprječavanja kvarenja hrane, uključujući neke mliječne



proizvode. Tako je nizin, bakteriocin kojeg sintetizira *Lactococcus lactis*, jedini odobren antimikrobni konzervans u proizvodnji sireva (REN i sur., 2018.). Antimikrobne karakteristike BMK su uglavnom rezultat kompeticije za hranu i nutritivne komponente ali i sinteze inhibitornih tvari, spomenutih organskih kiselina i bakteriocina (RAY i JOSHI, 2014.). Primjerice, GUPTA i SRIVASTAVA (2014.) su potvrdili antifungalni učinak antimikrobnih peptida (AMPs LR14) koje proizvodi *L. plantarum* soj LR/14 prema *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus* i *Penicillium chrysogenum*. Osim u mljekarskoj industriji BMK su važne i za očuvanje zdravlja. Poboljšavaju metabolizam laktoze, učinkovitost imunološkog sustava, sprječavaju urogenitalne i crijevne infekcije, reguliraju koncentracije kolesterola, posjeduju antitumorno djelovanje, suzbijaju alergijske reakcije i modificiraju crijevu mikrobiotu. Zbog svega navedenog poželjno je primijeniti BMK u prehrani kao probiotike, posebno ako se radi o poremećajima ravnoteže crijevne mikrobiote (MATHUR i sur., 2020.). Sojevi s probiotičkim svojstvima izolirani su iz različitih niša povezanih s mliječnim proizvodima, uključujući sireve od kravljeg ili ovčjeg mlijeka i sirutku. Stoga su mnoge studije usmjerene na primjenu probiotičkih sojeva u fermentiranim mliječnim napitcima ili sirevima kako bi se proizveli novi proizvodi s poboljšanim zdravstvenim prednostima (BEHERA i sur., 2018.).

BMK mogu proizvoditi i proteolitičke enzime unutar stanice kao i u vanjskom okruženju. U mliječnoj industriji, mikrobne kulture bogate enzimima, posebice s proteolitičkom aktivnošću, imaju široku primjenu u proizvodnji sireva, jogurta, kefira i drugih fermentiranih mliječnih proizvoda. Proteolitički enzimi se koriste ne samo za hidrolizu bjelančevina nego i za koagulaciju mliječnih bjelančevina u proizvodnji sira. Iz mlijeka se pomoću proteolitičkih enzima dobivaju različiti proteinski hidrolizati. Optimalni pH za razvoj i rast proteolitičkih bakterija u mlijeku je 7–7,5 (KIELISZEK i sur., 2021.).

Iako BMK imaju dugu povijest postojanja te se široko koriste u proizvodnji fermentirane hrane i općenito su prepoznate kao sigurne, u istraživanjima su neke od njih pokazale intrinzičnu ili stečenu rezistenciju na antimikrobne lijekove. Nastanak rezistencije je globalna prijetnja jer smanjuje učinkovitost antimikrobne terapije i pogoršava se horizontalnim prijenosom rezistencije gena između bakterija. Ove bakterije mogu nositi prenosive gene za rezistenciju koji bi se mogli prenijeti na patogene bakterije. Stoga je potrebno procjenjivati rizik rezistencije BMK prije primjene u proizvodnji fermentirane hrane (ERGINKAYA i sur., 2018.).

## 2.2. Starter kulture

Starter kulture su pripravci koji se sastoje od mikroorganizama koji se dodaju sirovini za proizvodnju fermentirane hrane. Svojim aktivnostima poboljšavaju fermentaciju sirovine i pospješuju nastanak poželjnih metabolita koji u konačnici imaju utjecaj na teksturu, miris i okus samog završnog proizvoda. Uloga starter kultura najjednostavnije rečeno je poboljšavanje kvalitete fermentiranih proizvoda. Starter kulture su se počele prvotno razvijati za mljekarsku industriju, da bi se nakon njihova primjena proširila i na druge grane prehrambene industrije. Jedna od najvažnijih uloga starter kulture je sprječavanje kvarenja proizvoda zbog inhibicije patogenih mikroorganizama te se posljedično tome povećava higijenska ispravnost hrane i produljuje rok valjanosti proizvoda. Ne manje važna uloga starter kultura je i poboljšanje organoleptičkih svojstva hrane kao što su aroma, boja i tekstura. Mikroorganizmi koji najbolje odgovaraju za starter kulture su oni koji su izolirani iz izvorne mikroflore tradicionalnih proizvoda jer su dobro prilagođeni na uvjete okoline i sposobni su kontrolirati kvarenje i broj patogenih mikroorganizama hrane. Mikroorganizmi koji se koriste u fermentaciji hrane kao starter kulture su: bakterije mliječne kiseline, kvasci i plijesni (SHAH, 2007.).

Najčešće korištene bakterije mliječne kiseline kao starter kulture u mliječnoj industriji su *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Enterococcus faecalis* (SHAH, 2007.) Starter kulture možemo podijeliti na pojedinačne (monokulture) i mješovite. Češće se koriste mješovite u kojima se kombiniraju različite vrste bakterija ili bakterije s kvascima ili plijesni. Pri kombiniranju različitih mikroorganizama treba obratiti pažnju na njihovu sinergiju što znači da jedni druge moraju stimulirati u rastu. Najbolji primjer primjene mješovite starter kulture je proizvodnja jogurta u kojoj se kombiniraju laktobacili i streptokoki (ANDRIAN i sur., 2018.). Kombiniranje mljekarskih kultura pokazuje i povoljan učinak na razvoj senzoričkih svojstava sireva (BEKELE i sur., 2019.). Poboljšanje sigurnosti i kvalitete sira može se postići primjenom konkurentnih starter kultura ili njihovih metabolita, koji su sposobni spriječiti kvarenje sira i produžiti rok trajanja kroz mikrobne interakcije, smanjujući ili eliminirajući potencijalne opasnosti (tj. patogene bakterije ili plijesni, mikroorganizme kvarenja, bakterije koje sintetiziraju biogene amine, plijesni koje sintetiziraju mikotoksine, rezistentne bakterije) i imaju blagotvorne učinke na zdravlje potrošača kroz svoja probiotička svojstva (ZDOLEC i sur., 2018.).

Najadekvatniji sojevi za starter kulture obično se biraju iz autohtone mikrobiote, jer su dobro prilagođeni okolišu hrane i specifičnom procesu proizvodnje. Postupak odabira

potencijalnih starih kultura trebao bi uključivati sve potencijalno "rizične" kriterije, kao što su toksigenost, stečena transmisivna antimikrobna rezistencija ili tehnološki neprihvatljiva metabolička svojstva (ZDOLEC i sur., 2013.). Opći kriteriji za odabir starter kultura uključuju sigurnost, tehnološka svojstva i ekonomske aspekte. Neki od specifičnih kriterija za njihov odabir uključuju: (1) brzu i adekvatnu proizvodnju mliječne kiseline, proizvodnju L (+) mliječne kiseline; (2) brz rast pri različitim temperaturama, koncentracijama soli i pH; (3) homofermentativni metabolizam; (4) aktivnost katalaze i hidroliza vodikovog peroksida; (5) aktivnost proteolitičkih i lipolitičkih enzima; (6) tolerancija ili sinergizam prema drugim mikrobnim komponentama starter kulture; (7) proizvodnja antimikrobnih spojeva; (8) antagonizam prema patogenim i tehnološki nepoželjnim mikroorganizmima; (9) nedostatak antimikrobne rezistencije, biogenih amina i stvaranje sluzi; i konačno (10) probiotička svojstva (tolerancija na nizak pH, tolerancija na žučne soli, adhezija na ljudske crijevne stanice) (ŠUŠKOVIĆ i sur., 2001.). Očuvanje senzoričkih svojstava tradicionalnih sireva može se postići i očuvati korištenjem odabranih autohtonih sojeva kao starter kultura u termički obrađenom mlijeku. Druga moguća tehnika u proizvodnji sira je uvođenje starter kultura u obliku sirutke prikupljene dan prije proizvodnje sira. Osim kvalitativnih svojstava, autohtona mikrobiota u obliku zaštitnih kultura, najčešće dodanih kao pomoćne kulture, može utjecati na sigurnost sira. Zaštitne kulture ne mijenjaju senzorna svojstva sira, već sigurnost sira suzbijanjem patogene mikrobiote. U tom smislu, njihova antimikrobna svojstva u proizvodnji sira usmjerena su na toksigene plijesni, mikrobiotu koja proizvodi amine ili patogene koji se prenose hranom, kao što je *Listeria monocytogenes* (LEBOŠ PAVUNC i sur., 2013.; ZDOLEC i sur., 2022.).

### **2.3. *Lactiplantibacillus plantarum***

*Lactiplantibacillus plantarum* je široko rasprostranjena bakterija mliječne kiseline koja se nalazi u fermentiranim proizvodima i u gastrointestinalnom traktu. *L. plantarum* je fakultativna anaerobna bakterija koja se zadnjih godina primjenjuje i u svojstvu probiotika (MAYO i sur., 2010.).

Probiotici su mikroorganizmi koji mogu preživjeti prolazak kroz gornji dio gastrointestinalnog sustava i pričvrstiti se na stanice u crijevu. Mehanizmi tolerancije na kiselinu u gastrointestinalnom traktu koje koristi *L. plantarum* uključuju promjene u sastavu masnih kiselina plazma membrane. Omjer zasićenih prema nezasićenim masnim kiselinama u membrani se povećava nakon izlaganja uvjetima niske pH vrijednosti gastrointestinalnog trakta

što dovodi do značajnog smanjenja fluidnosti membrane (HUANG i sur., 2016.). Rodovi bakterija koji se najčešće koriste u ove svrhe su *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus* (KAILASAPATHY i RYBKA, 1997.). Njihovi glavni doprinosi zdravlju su smanjenje intolerancije na laktozu, prevencija i smanjenje simptoma dijareje, smanjenje pojave alergija, hipokolesterolemijski učinak, inhibicija *Helicobacter pylori* i drugih patogena te prevencija sindroma iritabilnog crijeva (AKIN i sur., 2007.). U istraživanju NIEDZIELIN i sur. (2001.) se dokazivao učinak *L. plantarum* na 300 pacijenata s dijagnosticiranim sindromom iritabilnog crijeva te je potvrđeno poboljšanje i smanjenje simptoma kod 95 % ispitanika. HIGASHIKAWA i sur. (2010.) su evaluirali učinke nekoliko jogurta s različitim sojevima *L. plantarum* na gastrointestinalni sustav te zaključili da jogurti s *L. plantarum* SN35N i *L. plantarum* SN13T pokazuju povoljan učinak na zdravlje gastrointestinalnog trakta.

Kroz dugi niz godina *L. plantarum* se koristi u fermentaciji hrane jer nema štetnog utjecaja na proizvod i poboljšava njegove karakteristike. Uz to neki sojevi *L. plantarum* imaju sposobnost stvaranja bakteriocina koji se posebno ističu po svojim antimikrobnim svojstvima i primjene kao konzervansa. Štoviše, različiti sojevi ove bakterije stvaraju i druge antimikrobne tvari; organske kiseline, vodikov peroksid i diacetil (YILMAZ i sur., 2022.). U istraživanju LIU i sur. (2014.) su potvrdili i antioksidativno djelovanje sojeva *L. plantarum* sojeva izoliranih iz tradicionalne fermentirane hrane. Uz navedeno poznato je i da *L. plantarum* može poboljšati okus proizvoda, očuvati i poboljšati nutritivni sastav te produžiti rok trajanja proizvoda. DAN i sur. (2019.) utvrdili su da je okus proizvoda bio na optimalnoj razini kada je početni omjer *L. plantarum* P-8 prema starter kulturi jogurta bio 1:100. Zaključeno je i da se *L. plantarum* P-8 može koristiti sa starter kulturom jogurta i da ne utječe negativno na fizikalno-kemijska svojstva proizvoda.

KIŠ i sur. (2021.) naglašavaju da se primjena inovativnih tehnologija poput mikroinkapsulacije sve više primjenjuje u mljekarskoj industriji kako bi bolje sačuvala aktivnost bioaktivnih tvari i starter kultura u proizvodu. U tom smislu je razmatrana i mogućnost primjene *L. plantarum* S3 koji je i predmet ovog istraživanja. U istraživanju KIŠ i sur. (2021.) u sklopu provedbe projekta „Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva“ KK. 01.1.1.04.0058 prikupljeni su uzorci ovčjeg mlijeka, sirnog gruša, Paškog sira tijekom zrenja te janjećih sirišta s ciljem izolacije id eterminacija autohtone mikrobiote. Pri tome su determinirane slijedeće vrste: *Lactococcus lactis* (21%), *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* (15%), *Pediococcus pentosaceus* (15%), *Enterococcus faecium* (9%), *Enterococcus faecalis* (8%), *Loigolactobacillus coryniformis* (8%), *Leuconostoc mesenteroides* (5%), *Enterococcus durans* (5%), *Latilactobacillus sakei* (4%), *Carnobacterium maltaromaticum*

(3%), *Lactilactobacillus curvatus* (2%), *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* (1%), *Companilactobacillus paralimentarius* (1%), *Lactococcus raffinolactis* (1%), *Levilactobacillus brevis* (1%) te *Enterococcus italicus* (1%). Zanimljiv je rezultat bio uspješna izolacija *Lactiplantibacillus plantarum* iz sirišta sisajuće janjadi što je prvi takav nalaz zabilježen u literaturi. Upravo zbog toga je taj izolat nazvan *L. plantarum* S3 odabran za daljnja istraživanja te je ispitano njegovo preživljavanje u mikrosferama kao i otpuštanje iz njih. KIŠ i sur. (2021.) su zaključili da mikrosfere stvaraju povoljne uvjete za razmnožavanje soja *L. plantarum* S3 obzirom da se povećanjem njegove brojnosti pojačano otpuštaju iz mikrosfera. Dinamika preživljavanja kulture u mikrosferama pratila je dinamiku njezinog otpuštanja što je dokazano pozitivnim faktorom korelacije  $r=0,68$ . Provedeno istraživanje pokazalo je uspješnost pokusa mikroinkapsulacije, odnosno dalo je uvid u dinamiku preživljavanja i otpuštanja soja *L. plantarum* S3 što je bio jedan od prvih zadataka projektnog istraživanja.

### 3. Materijali i metode

U radu je korišten soj *L. plantarum* S3 izoliran iz sirišta sisajuće janjadi čija je preliminarna identifikacija provedena MALDI-TOF masenom spektrometrijom na Institutu Ruđer Bošković. Sve daljnje analize provodile su se u mikrobiološkom laboratoriju Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Analize su uključivale:

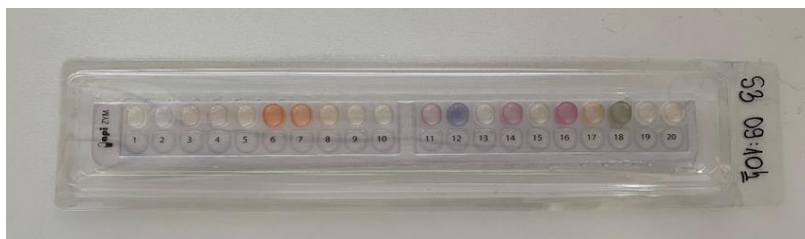
- Utvrđivanje biokemijskog profila pomoću API dijagnostičkih kitova
- Sposobnost stvaranja plina razgradnjom glukoze
- Sposobnost razmnožavanja pri različitim temperaturnim uvjetima, pH vrijednostima i koncentracijama soli
- Utvrđivanje acidifikacijske sposobnosti
- Utvrđivanje antimikrobne otpornosti
- Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti prema *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*

#### 3.1. Utvrđivanje biokemijskog profila pomoću API dijagnostičkih kitova

Biokemijska karakterizacija soja *L. plantarum* S3 određivana je pomoću komercijalnih API dijagnostičkih kitova: API 50 CHL i API ZYM (bioMérieux, Francuska). Testovi su provedeni prema uputama proizvođača, a rezultati očitani pomoću apiweb™ softvera. API 50 CHL testom utvrđuje se sposobnost fermentacije 49 različitih ugljikohidrata (Slika 1), dok API ZYM test daje uvid u aktivnost enzimatskog sustava temeljem razgradnje 19 različitih supstrata (Slika 2).



Slika 1. API 50 CHL dijagnostički test



Slika 2. API ZYM dijagnostički test

### 3.2. Sposobnost stvaranja plina razgradnjom glukoze

Kako bi se utvrdilo da li soj *L. plantarum* S3 tijekom fermentacije glukoze stvara plin, u epruvetu s 8 ml MRS bujona inokulirano je 50  $\mu$ L MRS bujona sa svježe pripremljenom kulturom. U epruvetu se oprezno postavila naopako postavljena Durhamova cjevčica kako u nju ne bi ušao zrak. U slučaju stvaranja plina, u Durhamovoj cjevčici bi se nakon 48 sati inkubacije pri 30 °C trebao stvoriti mjehurić ispunjen plinom. Kao pozitivna kontrola korištena je bakterija koja producira plin, a to je *Leuconostoc mesenteroides*.

### 3.3. Sposobnost razmnožavanja soja *L. plantarum* S3 pri različitim temperaturnim uvjetima

U tri epruvete sa devet ml MRS bujona inokuliran je jedan ml svježe pripremljene kulture *L. plantarum* S3 u koncentraciji od 4 log CFU/ml kako bi se postigla početna koncentracija u vrijednosti od 3 log CFU/ml. Epruvete su potom inkubirane na 10 °C, 30 °C i 45 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, broj bakterija određivan je nasađivanjem 0.1 ml uzorka odabranih razrjeđenja na krutu MRS podlogu nakon čega su ploče inkubirane na 30 °C tijekom 24 sata. Broj poraslih kolonija izražen je kao log CFU/ml.

### 3.4. Sposobnost razmnožavanja soja *L. plantarum* S3 pri različitim pH vrijednostima

Pet epruveta pripremljeno je s različitih pH vrijednostima MRS bujona: 6.5, 5.5, 4.5, 3.5, i 2.5. U svaku epruvetu inokuliran je 1 ml svježe pripremljene kulture *L. plantarum* S3 čija je konačna koncentracije iznosila 3 log CFU/ml. Epruvete su potom inkubirali na 30 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, broj bakterija određivan je nasađivanjem 0.1 ml uzorka odabranih razrjeđenja na krutu MRS podlogu nakon čega su ploče inkubirane na 30 °C tijekom 24 sata. Broj poraslih kolonija izražen je kao log CFU/ml.

### **3.5. Sposobnost razmnožavanja soja *L. plantarum* S3 pri različitim koncentracijama soli**

U tri Erlenmayerove tikvice s 50 ml MRS bujona odvagano je po 2.25 g, 2.75 g i 3.25 g natrijeva klorida čime su dobiveni bujoni koncentracija 4.5 %, 5.5 % i 6.5 %. Iz svake tikvice uzeto je 9 ml bujona odgovarajuće koncentracije i preneseno u tri nove epruvete. U svaku je dodan 1 ml svježe pripremljene kulture *L. plantarum* S3 u koncentraciji od 4 log CFU/ml i tako pripremljeni bujoni su inkubirani na 30 °C tijekom 24 sata. Sposobnost rasta mjerila se je nasadivanjem 0.1 ml uzorka odabranih razrjeđenja na krutu MRS podlogu nakon čega su ploče inkubirane na 30 °C tijekom 24 sata. Broj poraslih kolonija izražen je kao log CFU/ml.

### **3.6. Utvrđivanje acidifikacijske sposobnosti soja *L. plantarum* S3**

U 10 ml MRS bujona inokulirana je svježe pripremljena kultura *L. plantarum* S3 te inkubirana na 30°C tijekom 24 sata. Idući dan je otopina prebačena u 100 ml MRS bujona te stavljena na inkubaciju na 30 °C tijekom 7 sati. Svaki sat, (uključujući i nulti) mjerena je pH vrijednost otopine pomoću pH metra (Cyber Scan 510, Eutech, Nizozemska), a količina proizvedene kiseline na način da smo 10 ml uzorka pomiješali sa 20 ml destilirane vode te titrirali sa 0.1 M natrijeve lužine do pH vrijednosti 8.2 te pojave blijedoružičaste boje. Kao indikator korišten je fenolftalein.

### **3.7. Utvrđivanje antimikrobne otpornosti**

Sukladno preporukama EFSE o karakterizaciji mikroorganizama korištenih u proizvodne svrhe, antimikrobna otpornost soja *L. plantarum* S3 ispitivana je na sedam antimikrobnih lijekova: ampicilin, gentamicin, kanamicin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol. Testiranje je provedeno pomoću E testova (bioMerieux, Francuska) prema uputama proizvođača gdje su nakon inkubacije na 37 °C tijekom 24 sata očitane minimalne inhibicijske koncentracije (MIC). Očitane koncentracije usporedile su se sa definiranim graničnim vrijednostima (EFSA, 2018.) te je soj definiran kao osjetljiv/rezistentan.



### **3.8. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti prema *Listeria monocytogenes***

U svrhu ispitivanja antimikrobne aktivnosti soj *L. plantarum* S3 je višestruko namnažan u MRS bujonu na 37 °C nakon čega je 1 ml kulture centrifugiran na 14 000 o/m tijekom 10 minuta na 4 °C. Antimikrobna aktivnost nadtaloga testirana je agar difuzijskim testom sa mekim pokrovnim BHI agarom (0.7 % agara) u koji je dodana indikatorska bakterija *L. monocytogenes*. Nakon pripreme ploča, u agaru su napravljene četiri jažice u koje se je apliciralo 100 µl nadtaloga. Kako bi se isključilo antimikrobno djelovanje kiseline i vodikovog peroksida, nadtalog jedne jažice neutraliziran je pomoću NaOH, dok je drugi nadtalog tretiran katalazom. Eventualno dokazivanje bakteriocin-slične tvari provjereno je pomoću enzima Proteinaze-K. U slučaju pojave inhibicije rasta oko jažice s neutraliziranim nadtalogom te oko one s nadtalogom tretiranim katalazom, a izostanka inhibicije oko jažice s nadtalogom tretiranim Proteinazom-K, možemo posumnjati na djelovanje bakteriocina. Kao pozitivna kontrola korišten je bakteriocin sintetizirajući soj *Enterococcus faecalis* 101.

### **3.9. Statistička obrada**

Rezultati su obrađeni metodama deskriptivne statistike (Statistica 13.5) te prikazani kao srednje vrijednosti triju mjerenja uz standardnu devijaciju ( $\bar{x} \pm SD$ ).

## 4. Rezultati

### 4.1. Utvrđivanje biokemijskog profila pomoću API dijagnostičkih kitova

Tablica 1. Razgradnja ugljikohidrata soja *L. plantarum* S3 (API 50 CHL)

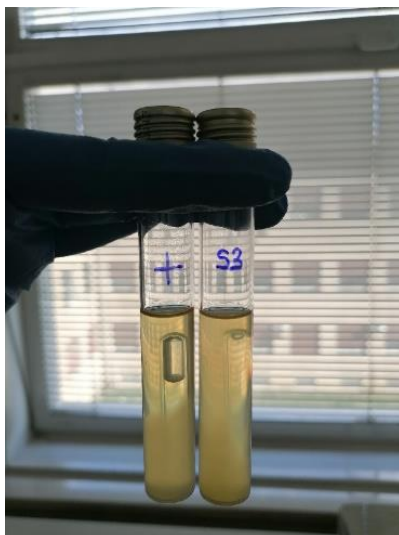
Ugljikohidrat	S3	Ugljikohidrat	S3
Kontrola	-	Arbutin	+
Glicerol	-	Eskulin	+
Eritriol	-	Salicin	+
D-arabinoza	-	Celobioza	+
L-arabinoza	+	Maltoza	+
Riboza	+	Laktoza	+
D-ksiloza	-	Melibioza	+
L-ksiloza	-	Saharoza	+
Adonitol	-	Trehaloza	-
$\beta$ -metil-ksilozid	-	Inulin	+
Galaktoza	+	Melezitoza	-
D-glukoza	+	D-rafinoza	-
D-fruktoza	+	Amidon	-
D-manoza	+	Glikogen	-
L-sorboza	-	Ksilitol	+
Ramnoza	-	$\beta$ -gentobioza	+
Dulcitol	-	D-turanoza	-
Inozitol	-	D-liksoza	-
Manitol	+	D-tagatoza	-
Sorbitol	+	D-fukoza	-
$\alpha$ -metil-D-manozid	+	L-fukoza	-
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-	D-arabitol	-
N-acetil glukozamin	+	L-arabitol	+
Amigdalinal	+	Glukonat	-
2-keto-glukonat	+	5-keto-glukonat	-

Tablica 2. Enzimatska aktivnost soja *L. plantarum* S3 (API ZYM)

<b>Enzim</b>	<b>S3</b>
Kontrola	+
Alkalna fosfataza	-
Esteraza (C4)	-
Esterazna lipaza (C8)	-
Lipaza (C14)	-
Leucin arilamidaza	+
Valin arilamidaza	+
Cistin arilamidaza	-
Tripsin	-
$\alpha$ -kimotripsin	-
Kisela fosfataza	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolaza	+
$\alpha$ -galaktozidaza	-
$\beta$ -galaktozidaza	+
$\beta$ -glukuronidaza	-
$\alpha$ -glukozidaza	+
$\beta$ -glukozidaza	-
N-acetyl- $\beta$ -glukozaminidaza	-
$\alpha$ -manozidaza	-
$\alpha$ -fukozidaza	-

## 4.2. Sposobnost stvaranja plina razgradnjom glukoze

Nakon inkubacije od 48 sati tijekom 30 °C nije zabilježeno stvaranje mjehurića plina u Durhamovoj cjevčici, za razliku od pozitivne kontrole (*Leuconostoc mesenteroides*) gdje je bio jasno vidljiv prostor ispunjen zrakom koji je istisnuo tekućinu iz Durhamove cjevčice (Slika 3).



Slika 3. Produkcija plina razgradnjom glukoze

## 4.3. Sposobnost razmnožavanja soja *L. plantarum* S3 pri različitim temperaturnim uvjetima, pH vrijednostima i koncentracijama soli

Tablica 3. Brojnost soja *L. plantarum* S3 pri različitim temperaturnim uvjetima i koncentracijama soli (log CFU/ml ± SD)

	T °C	log CFU/ml	% NaCl	log CFU/ml
S3	10 °C	1.84±0.47	4.5%	8.15±0.21
	30 °C	9.01±0.05	5.5%	7.96±0.59
	45 °C	<10	6.5%	6.03±0.06

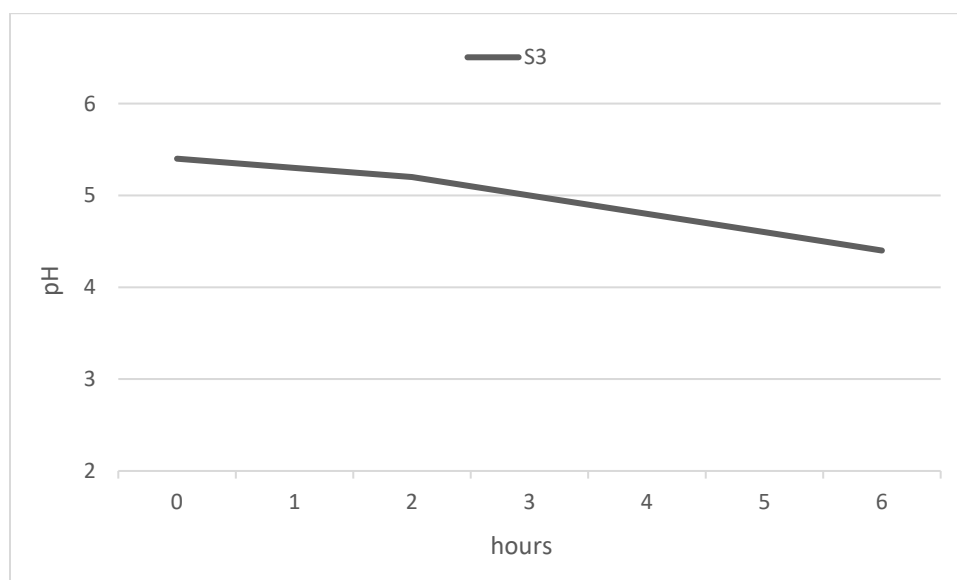
Tablica 4. Brojnost soja *L. plantarum* S3 pri različitim pH vrijednostima (log CFU/ml ± SD)

	pH	log CFU/ml
S3	2.5	<10
	3.5	4.84±0.15
	4.5	6.22±0.01
	5.5	8.77±0.01
	6.5	8.68±0.21

#### 4.4. Utvrđivanje acidifikacijske sposobnosti

Tablica 5. Mjerenje acidifikacijske sposobnosti *L. plantarum* S3 tijekom 6 sati (ml NaOH/pH vrijednost)

	0. h	pH	1 h	pH	2 h	pH	3 h	pH	4 h	pH	5 h	pH	6 h	pH
S3	6.18	5.4	7.51	5.3	7.85	5.2	8.76	5.0	9.31	4.8	9.88	4.6	10.20	4.4



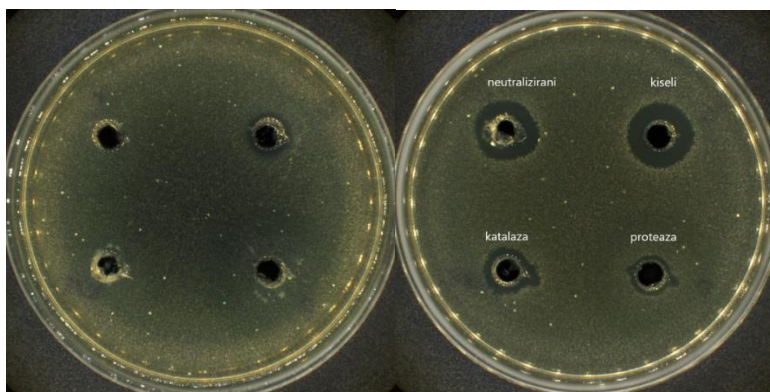
Slika 4. Acidifikacijska krivulja *L. plantarum* S3

#### 4.5. Utvrđivanje antimikrobne otpornosti

Tablica 6. Rezultati ispitivanja osjetljivosti *L. plantarum* S3 na antimikrobne tvari (E test)

Antibiotik	S3	
	Granična vrijednost (mg/L)	Rezultat
Ampicilin	2	1 S
Gentamicin	16	0.125 S
Kanamycin	64	12 S
Eritromicin	1	0.032 S
Klindamicin	4	0.125 S
Tetraciklin	32	2 S
Kloramfenikol	8	4 S

#### 4.6. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti prema *L. monocytogenes*



Slika 5. Antimikrobna aktivnost *L. plantarum* S3 (lijevo) i *E. faecalis* 101 (desno)

## 5. Rasprava

Sirovo mlijeko i sirevi od sirovog, nepasteriziranog mlijeka predstavljaju bogate izvore korisnih mikroorganizama, poput bakterija mliječne kiseline s probiotičkim svojstvima (BEHERA i sur., 2018.). Izolacija autohtonih BMK i njihova upotreba u mljekarstvu, uključujući sirarsku proizvodnju, može rezultirati očuvanjem bioraznolikosti i boljom diversifikacijom između proizvođača na globalnoj i regionalnoj razini (OŠTARIĆ i sur., 2022.).

Sastav mikrobiote sirovog mlijeka vrlo je složen i povezan s različitim unutarnjim i vanjskim čimbenicima, kao što su zdravlje vimeni, opće upravljanje farmom, postupci mužnje, higijenski uvjeti, skladištenje mlijeka na farmama itd. Populacija BMK u sirovom mlijeku vrlo je promjenjiva i vjerojatno povezana s fazom u proizvodnom lancu odnosno trenutku analize mlijeka (vrijeme od mužnje do analize). Na primjer, populacija BMK u sirovom kravljem mlijeku na razini farme kreće se od 2,0 do 3,6 log CFU/mL (DOBRANIĆ i sur., 2016.), dok na razini maloprodaje (automati) može premašiti 5 log CFU/mL (MIKULEC i sur., 2019.) zbog specifičnih uvjeta hlađenja mlijeka koji diktiraju rast psihotropnih bakterija tijekom skladištenja, uključujući populaciju BMK. Što se tiče proizvodnje sira, broj BMK povezan je s vrstom sira i uvjetima skladištenja (VRDOLJAK i sur., 2016.).

S obzirom na mliječne proizvode QUIGLEY i sur. (2013.) naglašavaju rijedak nalaz *L. plantarum* u sirovom mlijeku i njegova mala tehnološka važnost u standardnoj preradi mlijeka. Međutim, sojevi s probiotičkim svojstvima izolirani su iz različitih niša povezanih s mliječnim proizvodima, na primjer sireva od sirovog kravljeg ili ovčjeg mlijeka i sirutke (POTOČNJAK i sur., 2017.). Stoga su novije studije više usmjerene na primjenu probiotičkih sojeva *L. plantarum* u fermentiranim mliječnim napitcima ili sirevima kako bi se dobili novi proizvodi s poboljšanim zdravstvenim prednostima (PATROVSKY i sur., 2016.).

U našem je istraživanju biokemijskom karakterizacijom soja *L. plantarum* S3 zabilježen tipični fermentacijski profil ove bakterijske vrste te je API 50 CHL V 5.2 sustavom potvrđena pripadnost vrsti *L. plantarum* s 99.9 % vjerojatnosti. Podudarnost identifikacije bila je potpuna s rezultatima MALDI TOF-MS analize (KIŠ i sur., 2021.). Enzimskim profiliranjem utvrđena je aktivnost leucin arilamidaze, valin arilamidaze, kisele fosfataze, naftol-AS-BI-fosfohidrolaze,  $\beta$ -galaktozidaze i  $\alpha$ -glukozidaza pa se soj može okarakterizirati značajnom saharolitičkom aktivnošću te izostankom lipolitičke i proteolitičke aktivnosti. BEHERA i sur. (2018.) opisuju istraživanja enzimskih profila ove bakterijske vrste, no uočljiva je velika varijabilnost u enzimskim sustavima među različitim sojevima bakterij *L. plantarum*. Tehnološki je prihvatljiva značajka soja *L. plantarum* S3 izostanak stvaranja plina koji može uvjetovati pojave grešaka sira.

S obzirom na temperaturu inkubacije soja u MRS-u, optimalan rast zabilježen je pri 30 °C

pa se radi o mezofilnoj kulturi. Rast soja pri 10 °C i 45 °C bio je zanemariv i inhibiran. Druga istraživanja potvrđuju ovaj nalaz, pa i u praktičnoj primjeni u mlijeku (MATEJČEKOVÁ i sur., 2016.). Tako su navedeni autori istraživali dinamiku rasta *L. plantarum* u steriliziranom mlijeku pri temperaturama od 8 °C do 40 °C pri čemu je najveća brzina rasta u eksponencijalnoj fazi zabilježena pri 37 °C bez značajnog pada pH vrijednosti. Jedan od značajnih parametara procjene tehnološke primjenjivosti BMK i probiotičke prirode jest sposobnost njihova preživljavanja pri niskim pH vrijednostima koje su prisutne u početnom dijelu gastrointestinalnog trakta. Soj *L. plantarum* S3 je pokazao rast pri pH od 3.5 što je povoljan nalaz. Pored navedenog, utvrdili smo i njegovu značajnu acidifikacijsku sposobnost čime može povoljno doprinosti tehnološkoj fazi grušanja mlijeka u procesu proizvodnje sira. KIŠ i sur. (2021.) u ispitivanju inkapsuliranog soja *L. plantarum* S3 potvrđuju ovu acidifikacijsku komponentu soja pri čemu se postupkom mikroinkapsulacije acidifikacija tekućeg hranilišta može usporiti i kontrolirati dinamika kiseljenja medija. Nakon 24 sata obje formulacije su dosegle podjednaku vrijednost od  $4,08 \pm 0,02$ . 49. SMETANKOVÁ i sur. (2012.) također potvrđuju pad pH primjenom sojeva *L. plantarum* na 4,2 nakon 24 sata te naglašavaju da je to povoljan nalaz za primjenjivost u mljekarskoj industriji. Odnos soja *L. plantarum* S3 prema koncentracijama NaCl-a je bio optimalan, s obzirom da je zabilježen rast  $>8 \log$  pri 4.5 i 5.5 % NaCl-a.

Jedan od najvažnijih funkcionalnih svojstava potencijalnih mljekarskih (sirarskih) kultura BMK jest njihova antimikrobna aktivnost odnosno inhibicijsko djelovanje prema drugim bakterijama uključujući patogene vrste te uzročnike kvarenja (ŠUŠKOVIĆ i sur., 2010.). U našem je istraživanju ispitan antimikrobni učinak *L. plantarum* S3 prema bakteriji *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 te je zabilježena njena inhibicija primjenom nadtaloga. Nakon neutralizacije nadtaloga inhibicija nije bila prisutna pa je zaključeno da je rast *L. monocytogenes* ograničen djelovanjem kiselina. U našoj zemlji su provedena brojna istraživanja autohtone mikrobiote mlijeka i mliječnih proizvoda koja su također pokazala da BMK pokazuju antimikrobni učinak prema bakteriji *L. monocytogenes*, ali i drugim patogenim bakterijama (ZDOLEC i sur., 2011.; CRK i ZDOLEC, 2018.; VUKUŠIĆ i ZDOLEC, 2020.; ZDOLEC i KIŠ, 2022.).

Osjetljivost potencijalnih mljekarskih kultura BMK prema antimikrobnim lijekovima također je selekcijski kriterij koji ima i javnozdravstvenu važnost. Naime, prijenos gena otpornosti na antimikrobne tvari (antibiotike i ostale) može predstavljati rizik s obzirom da se mogu prenositi i na druge nesrodne bakterije, uključujući patogene bakterije (VESKOVIĆ-MORAČANIN i sur., 2017.). U našem istraživanju *L. plantarum* S3 nije pokazao otpornost na ispitivane antimikrobne lijekove ampicilin, gentamicin, kanamicin, eritromicin, klindamicin,



tetraciklin i kloramfenikol što je jedan od pokazatelje prikladnosti soja za praktičnu primjenu u mljekarstvu. Budući da je ovaj istraživani soj izoliran iz sirišta sisajuće janjadi na otoku Pagu, možemo pretpostaviti kako je u takvoj autohtonoj ovčarskoj proizvodnji manja opterećenost uzgoja s antimikrobnim lijekovima, u odnosu primjerice na proizvodnju kravljeg mlijeka. Istraživanja koja su provedena kod nas pokazuju da i mliječni proizvodi od kravljeg mlijeka sadrže sojeve BMK koji su otporni na antimikrobne lijekove. ZDOLEC i sur. (2013.) su istražili osjetljivost BMK (n=30) na klindamicin, tetraciklin, amikacin, amoksisicilin + klavulanska kiselina, enrofloksacin, vankomicin, trimetoprim + sulfametoksazol, tobramicin, kloramfenikol, ciprofloksacin, eritromicin, penicilin i trimetoprim. Izolati su bili prikupljeni iz industrijski proizvedenih mekih i tvrdih sireva, maslaca i salamure. Na rast BMK nisu utjecali trimetoprim + sulfametoksazol (n=29), vankomicin (n=29), trimetoprim (n=28), amikacin (n=10) i tobramicin (n=10). Autori su ukazali da značajan udio nepatogene mikroflore različitih mliječnih proizvoda s hrvatskog tržišta pokazuje fenotipsku rezistenciju na antimikrobne lijekove. Rezultati našeg istraživanja mogu doprinijeti sigurnosti mliječnih proizvoda u smislu smanjenja rizika od antimikrobne rezistencije budući da *L. plantarum* S3 ne pokazuje fenotipsku otpornost te dobru kompetitivnost i preživljavanje tijekom procesa grušanja i zrenja Paškog sira (KIŠ i sur., 2022.).

## 6. Zaključci

Soj *Lactiplantibacillus plantarum* S3 izoliran iz sirišta sisajuće janjadi pokazuje povoljne funkcionalne značajke: saharolitičku enzimatsku aktivnost, snažnu acidifikacijsku sposobnost, rast pri niskom pH (3.5) te višim koncentracijama soli (4.5 i 5.5 %).

S javnozdravstvenog gledišta soj *L. plantarum* S3 je također prihvatljiv jer inhibira rast bakterije *L. monocytogenes* te ne pokazuje otpornost na antimikrobne lijekove.

## 7. Literatura

1. AKIN, M. B., M. S. AKIN, Z. KIRMACI (2007.): Effects of Inulin and Sugar Levels on the Viability of Yogurt and Probiotic Bacteria and the Physical and Sensory Characteristics in Probiotic Ice Cream. *Food Chem.* 104, 93–99.
2. ANDRIAN, D., D. RIZKINATA, T. S. R. SUSANTO, J. LUCY, T. T. JAN (2018.): Isolation of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* as Starter Culture Candidate Originated from Indonesian Cow's Milk. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 3, 201–209.
3. BEHERA, S., R. RAY, N. ZDOLEC (2018.): *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-life of Fermented Foods. *Biomed Res. Int.* 2018, 9361614, 18.
4. BEKELE, B., E. B. HANSEN, M. ESHETU, R. IPSEN, Y. HAILU (2019.): Effect of starter cultures on properties of soft white cheese made from camel (*Camelus dromedarius*) milk. *J. Dairy Sci.* 102, 1108–1115.
5. BLAJMAN, J.E., R.B. PAEZ, C.G. VINDEROLA, M.S. LINGUA, M.L. SIGNORINI (2018.): A meta-analysis on the effectiveness of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria for corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 125, 1655–1669.
6. CRK, D., N. ZDOLEC (2018.): Antimikrobni potencijal enterokoka izdvojenih iz sirovog mlijeka. *Hrvatski veterinarski vjesnik – Hrvatska veterinarska komora*, 26 (1-2), 30–34.
7. DAN, T., H. CHEN, T. LI, J. TIAN, W. REN, H. ZHANG, T. SUN (2019.): Influence of *Lactobacillus plantarum* P-8 on Fermented Milk Flavor and Storage Stability. *Front. Microbiol.* 9, 1–14.
8. DIEP, D., I. F. NES (2002.): Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3, 107–122.
9. DILLON, V. M. (2014): Natural anti-microbial systems, Preservative Effects During Storage. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2, 941–947.
10. DOBRANIĆ, V., S. KAZAZIĆ, I. FILIPOVIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2016.): Composition of raw cow's milk microbiota and identification of enterococci by MALDI-TOF MS – short communication. *Vet. arhiv*, 86 (4), 581–590.
11. ERGINKAYA, Z., E. U. TURHAN, D. TATLI (2018.): Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. *IJVR*, 1, 53–56.
12. EFSA (2018.): Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal* 16(3):5206.
13. GEORGE, F., C. DANIEL, M. THOMAS, E. SINGER, A. GUILBAUD, F. J. TESSIER, A.

- REVOL-JUNELLES, F. BORGES, B. FOLIGNÉ (2018.): Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Front. Microbiol.* 2899, 1-15.
14. GUPTA, R., S. SRIVASTAVA (2014.): Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiol.* 42, 1–7.
15. HIGASHIKAWA, F., M. NODA, T. AWAYA, K. NOMURA, H. OKU, M. SUGIYAMA (2010.): Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial. *Nutrition* 26, 367–374.
16. HUANG, R., M. PAN, C. WAN, N. P. SHAH, X. TAO, H. WEI (2016.): Physiological and transcriptional responses and cross protection of *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 under acid stress. *J. Dairy Sci.* 99, 1002–1010.
17. JOHNSON, M.E. (2013.): Mesophilic and thermophilic cultures used in traditional cheesemaking. *Microbiol. Spectrum* 1, 1–18.
18. KAILASAPATHY, K., S. RYBKA (1997.): *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. - their therapeutic potential and survival in yoghurt. *Aust. J. Dairy Tech.* 52, 28–35.
19. KIELISZEK, M., K. POBIEGA, K. PIWOWAREK, A. M. KOT (2021.): Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules* 26(7), 1858, 1–15.
20. KIŠ, M., S. KAZAZIĆ, M. VINCEKOVIĆ, V. DOBRANIĆ, F. OŠTARIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2021.): Potencijal mikroinkapsulacije u sirarstvu: odabir autohtone mljekarske kulture za paški sir. *Veterinarski dani 2021, Vodice 26.-29. rujna 2021, Zbornik radova*, str. 363-370.
21. KIŠ, M., S. KAZAZIĆ, M. VINCEKOVIĆ, V. DOBRANIĆ, F. OŠTARIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2022.): Viability of novel microencapsulated indigenous cultures of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* in Pag cheese pilot production – preliminary results. U: Kolarić, B., Krivohlavek, A., Bošnjir, J., Šikić, S. (ur.) *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology (Volume 73/2022, Suppl. 1, 10-18)*. 4th International Congress on Food Safety and Quality “One Health”, 9-12 November, Dubrovnik, Croatia, p. 53.
22. KUMARIYA, R., A. GARSA, Y. RAJPUT, S. SOOD, N. AKHTAR, S. PATEL (2019.): Bacteriocins: classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microb. Pathog.* 128, 171–177.
23. LEBOŠ PAVUNC, A., B. KOS, J. BEGANOVIĆ, K. UROIĆ, D. BUČAN, J. ŠUŠKOVIĆ (2013.): Antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of autochthonous starter cultures

- as safety parameters for fresh cheese production. *Mljekarstvo*, 63, 185–194.
24. LIU, W., H. Pang, H. Zhang, Y. Cai (2014.): Biodiversity of lactic acid bacteria. U: Zhang, H., Cai, Y. (ur.). *Lactic Acid Bacteria*. Springer, Dordrecht, 103–203.
  25. MATEJČEKOVÁ, Z., D. LIPTÁKOVÁ, S. SPODNIÁKOVÁ, L. VALÍK (2016.): Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. *Acta Chimica Slovaca* 2, 104–108.
  26. MATHUR, H., T. P. BERESFORD, P. D. COTTER (2020.): Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients* 12, 1–16.
  27. MAYO, B., T. ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, M. FERNANDEZ, M. KOWALCZYK, P. ALVAREZ-MARTIN, J. BARDOWSKI (2010.): Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. U: Mozzi, F. R. R. Raya, G.M. Vignolo (ur.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, Blackwell Publishing, 3–33.
  28. MIKULEC, N., J. ŠPOLJARIĆ, Š. ZAMBERLIN, M. KRGA, B. RADELJEVIĆ, D. PAVLJANIĆ, I. HORVAT KESIĆ, N. ZDOLEC, V. DOBRANIĆ, N. ANTUNAC (2019.): The investigation of sustainability of raw milk consumption from vending machines in Croatia. *J. Cent. Eur. Agric.* 20(4), 1076-1088.
  29. NIEDZIELIN, K., H. KORDECKI, B. BIRKENFELD (2001.): A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13(10), 1143–1147.
  30. OŠTARIĆ, F., N. ANTUNAC, V. CUBRIC-CURIK, I. CURIK, S. JURIC, M. KIŠ, M. VINCEKOVIĆ, N. ZDOLEC, J. ŠPOLJARIĆ, N. MIKULEC (2022.): Challenging Sustainable and Innovative Technologies in Cheese Production: A Review. *Processes*, 10 (3), 529, 30.
  31. PATROVSKÝ, M., L. KOUŘIMSKÁ, Š. HAVLÍKOVÁ, J. MARKOVÁ, R. PECHAR, V. RADA (2016.): Utilization of bacteriocin-producing bacteria in dairy products. *Mljekarstvo*, 66, 3, 215–224.
  32. POTOČNJAK, M., P. PUŠIĆ, J. FRECE, M. ABRAM, T. JANKOVIC, I. GOBIN (2017.): Three New *Lactobacillus plantarum* Strains in the Probiotic Toolbox against Gut Pathogen *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Food Technol. Biotechnol.* 55, 1, 48–54.
  33. QUIGLEY, L., O. O'SULLIVAN, C. STANTON, T. P. BERESFORD, R. P. ROSS, G. F. FITZGERALD, P. D. COTTER (2013.): The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 5, 664–698.
  34. RAY, C., V. K. JOSHI (2014.): *Fermented Foods: Past, Present and Future*. U: Ray, R.C., V.K. Joshi (ur.) *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*. CRC Press, Boca

- Raton, Florida, str. 1-36.
35. REN, D., J. ZHU, S. GONG, H. LIU, H. YU (2018.): Antimicrobial Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Homemade Fermented Foods. *BioMed Res. Int.* Article ID 5416725, 1-9.
  36. SHAH, N. P. (2007.): Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17, 1262–1277.
  37. SMETANKOVÁ, J., Z. HLADÍKOVÁ, F. VALACH, M. ZIMANOVÁ, Z. KOHAJDOVÁ, G. GREIF, M. GREIFOVÁ (2012.): Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. *Acta Chimica Slovaca*, 5 (2), 204–210.
  38. ŠUŠKOVIĆ, J., B. KOS, J. GORETA, S. MATOŠIĆ (2001.): Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Synbiotic Effect. *Food Technol. Biotechnol.* 39, 227–235.
  39. ŠUŠKOVIĆ, J., B. KOS, J. BEGANOVIĆ, A. LEBOŠ PAVUNC, K. HABJANIČ, S. MATOŠIĆ (2010.): Antimicrobial Activity – the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 3, 296–307.
  40. TAMIME, A. Y. (2002.): Fermented milks: a historical food with modern applications — a review. *European Journal of Clinical Nutrition.* 56, S2–S15.
  41. VESKOVIĆ MORAČANIN, S., D. DJUKIĆ, N. ZDOLEC, M. MILIJAŠEVIĆ, P. MAŠKOVIĆ (2017.): Antimicrobial resistance of lactic acid bacteria in fermented food. *J. Hyg. Eng. Des.* 18, 25–35.
  42. VRDOLJAK, J., V. DOBRANIĆ, I. FILIPOVIĆ, N. ZDOLEC (2016.): Microbiological quality of soft, semi-hard and hard cheeses during the shelf-life. *Mac. Vet. Rev.* 39 (1), 59–64.
  43. VUKUŠIĆ, N., N. ZDOLEC (2020.): The effect of enterococcal bacteriocins on selected foodborne pathogens. *Vet. stn.* 51 (2), 139–143.
  44. YILMAZ, B., S. P. BANGAR, N. ECHEGARAY, S. SURI, I. TOMASEVIĆ, J. M. LORENZO, E. MELEKOGLU, J. M. ROCHA, F. OZOGUL (2022.): The Impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the Functional Properties of Fermented Foods: A Review of Current Knowledge. *Microorganisms.* 826, 1–18.
  45. ZDOLEC, N., I. FILIPOVIĆ, Ž. CVRTILA FLECK, A. MARIĆ, D. JANKULOSKI, L. KOZAČINSKI, B. NJARI (2011.): Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese. *Vet. arhiv*, 81, 133–141.
  46. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, A. HORVATIĆ, S. VUČINIĆ (2013.): Selection and application of autochthonous functional starter cultures in traditional Croatian fermented sausages. *Int. Food Res. J.* 20, 1, 1–6.

47. ZDOLEC, N., J. LORENZO, R. RAY (2018.) Special Issue: Use of Microbes for Improving Food Safety and Quality. *Biomed Res. Int.* 2018, 1–66.
48. ZDOLEC, N., T. BOGDANOVIĆ, K. SEVERIN, V. DOBRANIĆ, S. KAZAZIĆ, J. GRBAVAC, J. PLEADIN, S. PETRIČEVIĆ, M. KIŠ (2022.): Biogenic amine content in retailed cheese varieties produced with commercial bacterial or mold cultures. *Processes*, 10 (1), 10.
49. ZDOLEC, N., M. KIŠ (2022.): Antimicrobial properties of food enterococci. U: Ray, R., Paramithiotis, S., de Carvalho Azevedo, V., Montet, D. (ur.) *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology. Innovations and Functional Aspects, Applied Biotechnology Reviews.* Amsterdam, Oxford, Cambridge, Elsevier, 195–203.

## 8. Sažetak

### Funkcionalne značajke *Lactiplantibacillus plantarum* S3 iz sirišta janjadi – potencijal primjene u mljekarstvu

Helena Dujmović

*Lactiplantibacillus plantarum* S3 izoliran je po prvi puta iz sirišta sisajuće janjadi na otoku Pagu. U ovom radu istražena su njegova odabrana funkcionalna svojstva; preživljavanje i rast u tekućem hranilištu pri različitim temperaturama, pH vrijednostima i koncentracijama soli, razgradnja ugljikohidrata i aktivnost drugih enzimskih sustava, antimikrobna aktivnost te osjetljivost na antimikrobne lijekove, s ciljem prosudbe primjenjivosti soja kao potencijalne autohtone sirarske kulture. *L. plantarum* je pokazao optimalan rast pri 30 °C, te rastao pri niskom pH (3.5) te koncentracijama NaCl-a od 4.5 i 5.5 %. Također posjeduje snažnu acidifikacijsku sposobnost, aktivnost saharolitičkih enzima te izostanak lipolitičke i proteolitičke aktivnosti. Primjenom nadtaloga kulture *L. plantarum* inhibiran je rast bakterije *Listeria monocytogenes* djelovanjem organskih kiselina. Soj pokazuje osjetljivost na sve testirane antimikrobne lijekove - ampicilin, gentamicin, kanamicin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol. Utvrđene funkcionalne značajke *in vitro* potvrđuju opravdanost primjene *L. plantarum* S3 kao autohtone kulture u proizvodnji Paškog sira.

Ključne riječi: *Lactiplantibacillus plantarum*, Paški sir, funkcionalna svojstva, sirarska kultura



## 9. Summary

### Functional properties of *Lactiplantibacillus plantarum* S3 from lambs abomasum – potential application in dairy

Helena Dujmović

*Lactiplantibacillus plantarum* S3 was isolated for the first time from the abomasum of suckling lambs on the island of Pag, Croatia. In this study, its selected functional properties were investigated; survival and growth in liquid medium at different temperatures, pH values and salt concentrations, carbohydrate utilisation and activity of other enzyme systems, antimicrobial activity and sensitivity to antimicrobial drugs, with the aim of assessing the applicability of the strain as a potential autochthonous cheese culture. *L. plantarum* showed optimal growth at 30 °C, and grew at low pH (3.5) and NaCl concentrations of 4.5 and 5.5%. It also has a strong acidification capacity, activity of saccharolytic enzymes and absence of lipolytic and proteolytic activity. The growth of the *Listeria monocytogenes* was inhibited by the application of the supernatant of the *L. plantarum* culture due to the action of organic acids. The strain shows sensitivity to all tested antimicrobial drugs - ampicillin, gentamicin, kanamycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline and chloramphenicol. The established functional characteristics *in vitro* confirm the potential of *L. plantarum* S3 as an autochthonous culture in the production of Pag cheese.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum*, Pag cheese, functional properties, cheese culture

## **10. Životopis**

Rođena sam 06. svibnja 1998. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje sam završila u Osnovnoj školi Silvije Strahimira Kranjčevića u Zagrebu, nakon čega svoje obrazovanje nastavljam u II. gimnaziji u Zagrebu, smjer opća gimnazija. Po završetku srednje škole, 2016. godine upisujem integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja sam radila poslove preko student servisa i 2022. godine volontirala sam u ambulanti privatne prakse. Za vrijeme studiranja sam shvatila da ono što me ispunjava i veseli kao osobu u veterinarstvu jest javno zdravstvo, odnosno poslovi vezani s izravnim ili neizravnim utjecajem na zaštitu zdravlja ljudi.