Karakterizacija sojeva Lactococcus lactis izoliranih iz ovčjeg mlijeka i odabir potencijalne sirarske kulture

Pajač, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:377267

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

KARAKTERIZACIJA SOJEVA *LACTOCOCCUS LACTIS* IZOLIRANIH IZ OVČJEG MLIJEKA I ODABIR POTENCIJALNE SIRARSKE KULTURE

DIPLOMSKI RAD

Lucija Pajač

Zagreb, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

KARAKTERIZACIJA SOJEVA *LACTOCOCCUS LACTIS* IZOLIRANIH IZ OVČJEG MLIJEKA I ODABIR POTENCIJALNE SIRARSKE KULTURE

DIPLOMSKI RAD

Lucija Pajač

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Neposredni voditelj:

Marta Kiš, dr. med. vet.

Zagreb, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Lucija Pajač**, JMBAG 1003129875, rođena 19.07.1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

KARAKTERIZACIJA SOJEVA *LACTOCOCCUS LACTIS* IZOLIRANIH IZ OVČJEG MLIJEKA I ODABIR POTENCIJALNE SIRARSKE KULTURE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Lucija Pajač**, JMBAG 1003129875, naslova

KARAKTERIZACIJA SOJEVA *LACTOCOCCUS LACTIS* IZOLIRANIH IZ OVČJEG MLIJEKA I ODABIR POTENCIJALNE SIRARSKE KULTURE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana_____ .

Povjerenstvo:		potpisi:
1. izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec	mentor	_____
2. prof. dr. sc. Lidija Kozačinski	član	_____
3. izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka	član	_____
4. Marta Kiš, dr. med. vet.	neposredni voditelj	_____

Zahvala

Zahvaljujem svome mentoru izv. prof. dr. sc. Neviju Zdolec koji mi je prvenstveno omogućio izradu diplomskog rada i pomogao u njegovoj realizaciji. Uz njega, veliko hvala i neposrednoj voditeljici Marti Kiš, dr. med. vet., koja mi je ponajviše pomogla u izvođenju praktičnog dijela ovoga rada, obradi i interpretaciji rezultata. Oboje ste mi svojom stručnošću i susretljivošću iznimno olakšali izradu rada.

Hvala i svim ostalim djelatnicima Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koji su mi pripomogli u laboratorijskom radu.

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).

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, braći i sestrama. Hvala Vam što ste mi omogućili školovanje, te ste mi kroz cijeli taj period pružili neizmjernu ljubav i podršku koja me uvijek ohrabrivala, vodila naprijed i nije dala da odustanem ni od čega u životu.

Još jednom, svima veliko HVALA!

Sadržaj

1. Uvod 1
   1.1. Cilj istraživanja i hipoteza 2
2. Pregled literature 3
   2.1. Bakterije mliječne kiseline u sirovom ovčjem mlijeku 3
   2.2. Lactococcus lactis 4
      2.2.1. Povijest – izolacija i klasifikacija 4
      2.2.2. Morfologija 5
      2.2.3. Izvori 6
      2.2.4. Korištenje 6
   2.3. Biokemijske i tehnološke značajke *Lactococcus lactis* 7
      2.3.1. Proteolitička aktivnost 8
      2.3.2. Lipolitička aktivnost 9
      2.3.3. Sposobnost acidifikacije 10
      2.3.4. Sposobnost preživljavanja u različitim uvjetima 12
   2.4. Antimikrobna aktivnost *Lactococcus lactis* 13
      2.4.1. Antimikrobno djelovanje bakteriocina 13
   2.5. Primjena *Lactococcus lactis* kao sirarske kulture 14
3. Materijali i metode 17
   3.1. Materijali 17
      3.1.1. Radni mikroorganizmi 18
      3.1.2. Testni mikroorganizmi 19
   3.2. Metode 19
      3.2.1. Statistička obrada 23
4. Rezultati i rasprava 25
5. Zaključak 34
6. Literatura 35
Životopis 40

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Lucija Pajač**, naslova

KARAKTERIZACIJA SOJEVA *LACTOCOCCUS LACTIS* IZOLIRANIH IZ OVČJEG MLIJEKA I ODABIR POTENCIJALNE SIRARSKE KULTURE

Lactococcus lactis je jedna od najbolje opisanih bakterija mliječne kiseline te se često koristi kao komercijalna starter kultura u mliječnoj industriji. Primjena autohtonih sojeva ove bakterije u sirarstvu može utjecati na kvalitetu i sigurnost te razvoj specifičnih senzornih svojstava proizvoda. Pretpostavljeno je da pet sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1-M5 izoliranih iz sirovog ovčjeg mlijeka posjeduju poželjne biokemijske i tehnološke značajke, čije dokazivanje je bilo predmet ovog istraživanja. Rezultati pokazuju da ni jedan od izolata ne stvara plin razgradnjom glukoze, svi pokazuju jednaku proteolitičku, lipolitičku i antimikrobnu aktivnost aktivnost te imaju visoki stupanj acidifikacijske sposobnosti. Tijekom izlaganja različitim uvjetima temperature, pH vrijednosti te koncentracijama soli rast je prisutan kod svih izolata od kojih *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1 pokazuje najbolji rast. Svi izolati bi se mogli primijeniti kao potencijalne sirarske kulture, a obzirom na navedena odstupanja odabir sojeva trebao bi se temeljiti na tehnološkom procesu i organoleptičkim svojstvima željene vrste sira.

Ključne riječi: *Lactococcus lactis*, sirarska kultura, sir

Summary

Of the master's thesis – student **Lucija Pajač,** entitled

CHARACTERIZATION OF *LACTOCOCCUS LACTIS* STRAINS ISOLATED FROM EWE'S MILK AND SELECTION OF POTENTIAL CHEESE CULTURE

Lactococcus lactis is one of the best described lactic acid bacteria and is commonly used as a commercial starter culture in the dairy industry. The use of indigenous strains of this bacterium in cheese production can affect the quality and safety, as well as the development of specific sensory characteristics of the product. Five strains of *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1-M5 isolated from raw sheep milk are believed to possess desirable biochemical and technological properties, the demonstration of which was the subject of this study. The results show that none of the isolates produce gas by glucose degradation, all show the same proteolytic, lipolytic and antimicrobial activity and have a high degree of acidifying ability. During exposure to different temperature conditions, pH values and salt concentrations, growth is present in all isolates, of which *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1 shows the best growth. All isolates could be used as potential cheese cultures and given the above variations, the selection of strains should be based on the technological process and organoleptic characteristics of the desired type of cheese.

Keywords: *Lactococcus lactis*, cheese culture, cheese

1. Uvod

Bakterije mliječne kiseline jedne su od najranije proučavanih bakterija u mikrobiologiji hrane. Dugi niz godina koriste se kao komercijalne starter kulture u mliječnoj industriji, a poznata su njihova probiotička svojstva i antimikrobni potencijal. Bakterije mliječne kiseline sastavni su dio prirodne mikroflore mlijeka te sudjeluju u spontanoj fermentaciji. Pojedini sojevi mogu biti i tehnološki prihvatljivi, odnosno primjenjivi u tehnološkim postupcima proizvodnje raznih mliječnih proizvoda zbog poželjnih biokemijskih karakteristika.

Bakterije mliječne kiseline povezane s hranom uključuju vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Fructobacillus*, *Oenococcus* i *Weissella* (Dillon 2014.). Naime, Mangia i sur. (2018.) ukazuju na važnost izolacije autohtonih bakterija mliječne kiseline iz tradicionalnih ovčjih sireva te njihovu primjenu u proizvodnji fermentiranih ovčjih mlijeka. Spojem tradicije i novih tehnologija mogu se stvarati tipični tradicionalni, ali i novi proizvodi od ovčjeg mlijeka te se uz to može povećati rast proizvodnje mliječne hrane sa specifičnim zemljopisnim podrijetlom.

Lactococcus lactis je jedna od najbolje i najviše opisanih vrsta bakterija mliječne kiseline. Prvi genom opisan je upravo u bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403. Genomskom sekvencom ovog mikroorganizma rekonstruirane su brojne reakcije i metaboliti kojima se opisuju fiziološke i biokemijske reakcije bakterija mliječne kiseline, važne za korištenje u prehrambenoj industriji (Samaržija 2015.). *Lactococcus lactis* je jedna od vrsta mikroorganizama koje mogu biti tehnološko korisne, ali i tehnološki štetne. Naime, kako se ova vrsta u mliječnoj industriji najviše koristi u proizvodnji sira, ovisno o željenim svojstvima sira, potrebno je ispitati karakteristike sojeva ove bakterije kako bi se mogao olakšati postupak proizvodnje i povećati kvalitetu takvih proizvoda. Ukoliko nastupi kontaminacija tzv. „divljim“ sojevima *Lc. lactis*, može doći do značajnijih gubitaka željenih organoleptičkih svojstava u konačnom proizvodu. Značajke bakterija mliječne kiseline kao što su rast, potrebe za hranjivim tvarima, metabolizam i proizvodnja antimikrobnih spojeva presudne su za inhibiciju rasta patogena i uzročnika kvarenja hrane, a samim time važne su i za sigurnost fermentirane hrane. Neki sojevi bakterija mliječne kiseline pokazuju toleranciju na različite nepovoljne uvjete poput niskog pH, visoke temperature i visoke koncentracije soli (Hatti-Kaul i sur. 2018.). Iz tog razloga potrebno je prije uvođenja određenih sojeva kao sirarskih kultura ispitati njihove biokemijske i tehnološke značajke kako bismo se uvjerili da će te značajke doprinijeti proizvodnji sira.

U ovome radu istraživana su određena svojstva vrste *Lc. lactis*, odnosno, pet sojeva *Lc. lactis* izoliranih iz sirovog ovčjeg mlijeka. Ovi izolati prikupljeni su u okviru

projekta K.K.01.1.1.04.0058. „*Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva*“ te su prethodno determinirani pomoću MALDI-TOF masene spektrofotometrije.

1.1. Cilj istraživanja i hipoteza

Cilj ovoga istraživanja je istražiti biokemijske i tehnološke značajke te ispitati antimikrobnu aktivnost pet sojeva *Lc. lactis* M1-M5 izoliranih iz sirovog ovčjeg mlijeka. Pretpostavka je kako ovi sojevi posjeduju poželjne biokemijske i tehnološke značajke te da uz to imaju i antimikrobnu aktivnost, što ih čini pogodnim mikrobnim kulturama u proizvodnji sira.

2. Pregled literature

2.1. Bakterije mliječne kiseline u sirovom ovčjem mlijeku

Ovčje mlijeko rjeđe je konzumirano i proizvedeno u odnosu na druga mlijeka poput kravljeg. Proizvodnja ovčjeg mlijeka čini otprilike 1,3 % ukupne svjetske proizvodnje mlijeka (FAO 2016.). Ovčje mlijeko važan je proizvod u gospodarstvu mediteranskih država, sa svojom važnom ulogom u proizvodnji visokokvalitetnih sireva i jogurta (Fotou i sur. 2011.). Sirovo ovčje mlijeko sadrži značajno veći broj mikroorganizama u odnosu na kravlje. Razlog tome su puno niži higijenski uvjeti u kojima se ovce drže te mjesto i način na koji se provodi mužnja. Mikrofloru sirovog ovčjeg mlijeka mogu činiti tehnološko korisni, tehnološko štetni, ali i patogeni mikroorganizmi. Patogeni mikroorganizmi mogu uzrokovati različite bolesti kod ljudi, a najčešće su to *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* te vrste iz roda *Salmonella* i *Streptococcus*. Tehnološko štetni mikroorganizmi poput enterobakterija, klostridija, koliformnih i psihrotrofnih bakterija uzrokuju neželjene promjene i poteškoće u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda (Antunac i Havranek Lukač 1999.).

Općenito, bakterije mliječne kiseline dominiraju u sastavu mikroflore sirovog ovčjeg mlijeka (Quigley i sur. 2013.). Ova skupina bakterija ima sposobnost stvaranja mliječne kiseline i upravo prema tome dobile su i svoj naziv. Uz to, mnoge bakterije iz ove skupine imaju druge brojne biokemijske karakteristike kao što su: slaba do umjerena sposobnost proteolize i lipolize, probiotička svojstva, antimikrobno djelovanje i druga tehnološki i higijenski prihvatljiva svojstva u procesima proizvodnje mliječnih proizvoda. Klasifikacija bakterija unutar ove skupine temelji se na morfologiji, tipu razgradnje glukoze, konfiguraciji proizvedene mliječne kiseline te rastu pri visokim koncentracijama soli i toleranciji prema kiselim ili lužnatim uvjetima (Choksi i Desai 2012.). Molekularne metode danas uvjetuju vrlo dinamične promjene u nomenklaturi i klasifikaciji, poput nedavno predloženih izmjena u rodu *Lactobacillus* (Zheng i sur. 2020.).

Skupinu bakterija mliječne kiseline u ovčjem mlijeku u najvećem broju sačinjavaju mezofilne i psihrofilne vrste (Issa i Tahergorabi, 2019.). U mlijeku se mezofilne bakterije mliječne kiseline nalaze u broju od otprilike 10^2 do 10^6 CFU/ml, dok se broj psihrotrofnih bakterija kreće od 10^2 do 10^4 CFU/ml (Fotou i sur. 2011.). Najčešće su u pitanju bakterije iz roda *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Streptococcus* (Antunac i Havranek Lukač 1999.). Alegría i sur. (2012.) su ustanovili u svom istraživanju kako je kao dominantna kultura u ovčjem mlijeku prevladavao upravo *Lc. lactis*.

2.2. Lactococcus lactis

2.2.1. Povijest – izolacija i klasifikacija

Prva čista bakterijska kultura koja je znanstveno opisana 1878. godine bila je kultura *Lactococcus lactis*, u tadašnje vrijeme nazvana *Bacterium lactis*. Osoba zaslužna za to je mikrobiolog Joseph Lister. U početku je ova bakterija klasificirana kao streptokok, ali je 1985. godine preklasificirana u zasebni rod *Lactococcus*. Pripada porodici *Streptococcaceae (Vos i sur. 2009.)*. Ovaj rod sastoji se od 22 vrste, a to su:

- *Lc. allomyrinae,*
- *Lc. carnosusus,*
- *Lc. chungangensis,*
- *Lc. cremoris,*
- *Lc. formosensis,*
- *Lc. fujiensis,*
- *Lc. garvieae,*
- *Lc. hircilactis,*
- *Lc. hodotermopsidis,*
- *Lc. insecticola,*
- *Lc. kimchii,*
- *Lc. lactis,*
- *Lc. laudensis,*
- *Lc. nasutitermitis,*
- *Lc. paracaranosus,*
- *Lc. petauri,*
- *Lc. piscium,*
- *Lc. plantarum,*
- *Lc. raffinolactis,*
- *Lc. reticulitermitis,*
- *Lc. taiwanensis,*
- *Lc. termiticola* (Euzéby, 1997., Parte, 2014., Parte, 2018., Parte i sur. 2020.).

Lactococcus lactis podijeljen je u četiri podvrste:

- *Lc. lactis* subsp. *lactis*,
- *Lc. lactis* subsp. *cremoris*,
- *Lc. lactis* subsp. *hordniae* i
- *Lc. lactis* subsp. *tructae* (Euzéby, 1997., Parte, 2014., Parte, 2018., Parte i sur. 2020.).

Iz biotehnološkog aspekta u proizvodnji sira značajne su *Lc. lactis* subsp. *lactis* i *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Uz njih, važan je i *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* koji se od prethodno navedenih razlikuje po sposobnosti korištenja citrata uz stvaranje

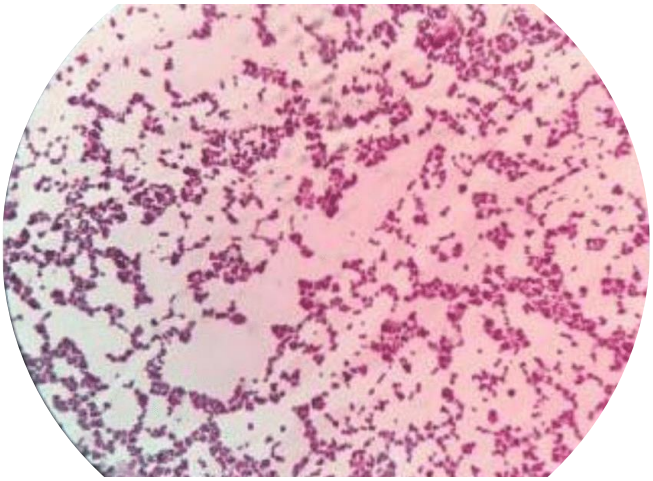
CO_2 i diacetila koji doprinosi aromi sira tijekom njegove proizvodnje (Samaržija i sur. 2001.). Zbog navedene karakteristike, danas je za *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* u upotrebi i naziv citrat+ (pozitivni) *Lc. lactis* (Stanley 2003.).

2.2.2. Morfologija

Lactococcus lactis je gram pozitivna, katalaza negativna, homofermentativna i fakultativno anaerobna nesporogena bakterija. Okruglog je, pomalo i ovalnog, izduljenog oblika, što se bolje može vidjeti na Slici 1. Stanice se mogu pojavljivati pojedinačno, u parovima ili povezane u lancima (Teuber 1995.), što je vidljivo i na Slici 2. Stvaraju male, okrugle i glatke kolonije pravilnog ruba te bijele do prozirne boje na krvnom agaru i na M17 agaru (Vos i sur. 2009.), koji se koristio i u ovome radu, prikazano na Slici 3.

Slika 1. Prikaz *Lactococcus lactis* pod elektronskim mikroskopom

(Izvor: Vos i sur. 2011.)



Slika 2. Morfološki izgled *Lactococcus* spp. pod mikroskopom (100x povećanje) nakon bojanja po Gramu

(Izvor: Research Gate. https://www.researchgate.net/figure/Morphological-view-of-Lactococcus-culture-under-microscope-100x-after-Gram-Staining_fig1_327238774 – pristup 10.7.2021.)

Slika 3. Izgled kolonija *Lactococcus lactis* na M17 podlozi

2.2.3. Izvori

Lactococcus lactis je sveprisutna bakterija u mnogim prirodnim materijalima. Može se pronaći u mnogim izvorima u prirodi kao što su probavni sustav ljudi i životinja, svježe voće i povrće, korijenje i žitarice, mlijeko i mliječni proizvodi te na površini kože životinja. Obzirom da se često nalazi na površini tijela muznih životinja, vjeruje se da se s površine vimena tijekom mužnje prenosi u svježe mlijeko u kojemu je gotovo uvijek prisutna (Vos i sur. 2009.). Prema tome, ova bakterija je često dio mikroflore mlijeka, a ujedno i prirodna starter kultura u mnogim fermentiranim namirnicama.

Vrste iz roda *Lactococcus* često su izolirane iz lanca proizvodnje mlijeka (Ayad 2001.), a važan su dio komercijalnih mliječnih starter kultura koje se koriste za proizvodnju fermentiranih mlijeka, kiselog vrhnja, maslaca i mnoštva različitih vrsta sireva (Narvhus i Axelsson 2003.).

2.2.4. Korištenje

Rod *Lactococcus* je dakle usko povezan sa mlijekom i mliječnim proizvodima, međutim, samo se *Lactococcus lactis* koristi u mljekarstvu. Kako je navedeno u klasifikaciji, postoje četiri podvrste *Lc. lactis*, ali samo su *Lc. lactis* subsp. *lactis* i *Lc. lactis* subsp. *cremoris* vezane uz mliječnu industriju (Vos i sur. 2009.).

Lactococcus lactis se dugi niz godina koristi kao starter kultura za proizvodnju sira i fermentiranih mlijeka. Američka uprava za hranu i lijekova (FDA) potvrdila joj je

GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) status, što znači da je sigurna, nepatogena i nije škodljiva za ljude. Ova bakterijska kultura najveći doprinos daje industriji proizvodnje sira, gdje čini najveći udio među korištenim bakterijama mliječne kiseline u te svrhe (Vos i sur. 2009.). Vrste iz roda *Lactococcus* se mogu upotrebljavati kao samostalne starter kulture ili miješane kulture sa drugim bakterijama mliječne kiseline kao što su laktobacili i streptokoki (Choksi i Desai 2012.). Općenito, mljekarske kulture dodaju se mlijeku pri proizvodnji sireva, najviše u svrhu stvaranja mliječne kiseline, čime se poboljšava aktivnost sirila i time ubrzava proces proizvodnje sira. Uz to, imaju ulogu i u stvaranju specifičnih okusa, mirisa i teksture konačnog proizvoda (Stanley 2003.).

Naime, poznato je kako „divlji“ sojevi *Lc. lactis* subsp. *lactis* mogu kontaminirati sireve i rasti tijekom njihove proizvodnje, te uslijed stvaranja estera uzrokovati neželjene voćne i gorke okuse sira. Iz tog razloga, sojevi *Lc. lactis* subsp. *cremoris* se smatraju boljim izborom pri stvaranju željenih aroma u siru. Međutim, određenim tehnikama probira sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* došlo se do spoznaje kako i on može imati dobre značajke za proizvodnju željenih organoleptičkih svojstava sira, a uz to, ono najvažnije, imaju i bolju sposobnost brze acidifikacije u odnosu na *Lc. lactis* subsp. *cremoris*. Stoga je sojeve *Lc. lactis* važno dobro tehnološki i biokemijski ispitati te u konačnici pažljivo odabrati sojeve poželjnih karakteristika kako ne bi proizveli neželjene arome ili druge nedostatke sira ili nekih drugih mliječnih proizvoda u čijoj se proizvodnji koristi (Stanley 2003., Hassan i Frank 2011.).

2.3. Biokemijske i tehnološke značajke *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis često je izložen nepovoljnim uvjetima tijekom proizvodnje sira te je stoga vrlo bitna otpornost odabranih sojeva na tzv. stresne uvjete kako bi u njima zadržali optimalnu aktivnost. Tipični čimbenici stresa su toplina, dostupnost kisika, nizak pH i visoka slanost. Uz navedene čimbenike, važno je spomenuti i osjetljivost na antibiotike iz razloga što u mlijeku mogu zaostati rezidue antibiotika korištenih u liječenju mastitisa. Iako se ovaj problem ostataka antibiotika u mlijeku smanjio zbog strožih kontrola kvalitete mlijeka, on i dalje postoji u određenoj mjeri (Stanley 2003.).

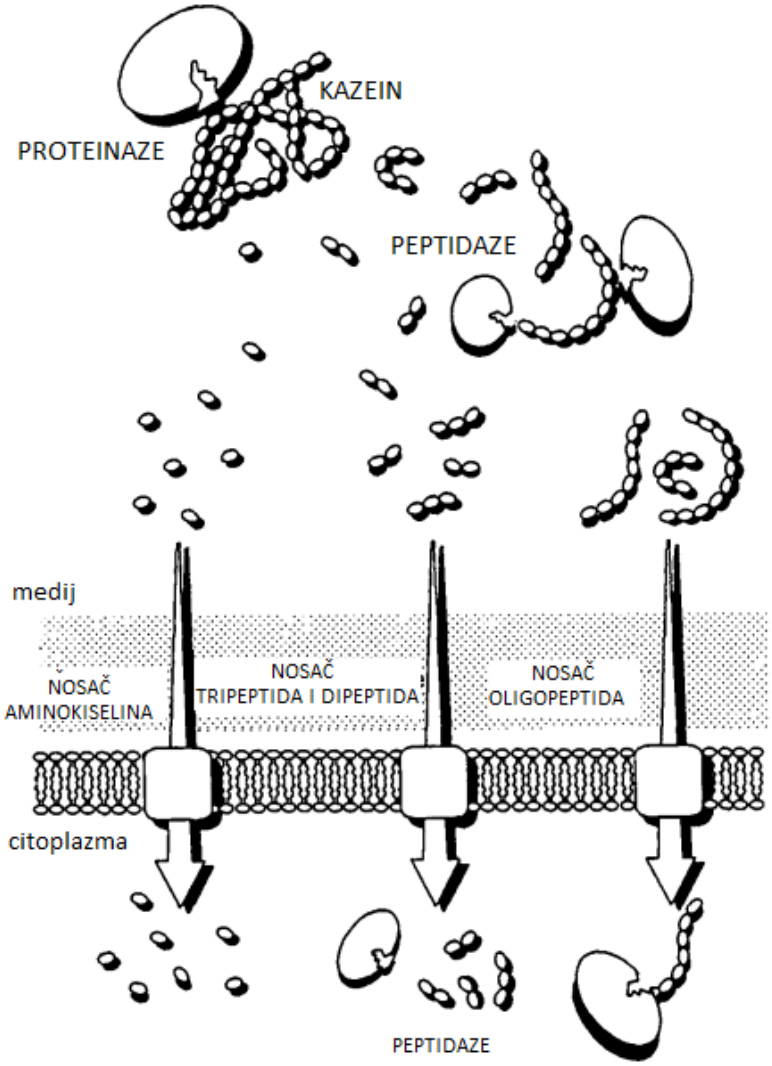
Poznato je kako bakterije mliječne kiseline imaju pozitivan utjecaj pri proizvodnji sireva. Jedna od tehnološki najvažnijih karakteristika laktokoka je sposobnost brze acidifikacije, čime se smanjuje i vrijeme proizvodnje određenih mliječnih proizvoda (Ahmed i sur. 2006.). Međutim, ako se uzme u obzir da je za potrošača jedna od najvažnijih karakteristika sira upravo njegov okus, tehnološki gledano, važne su brojne druge biokemijske reakcije koje se događaju pri proizvodnji sira. Veliku ulogu u stvaranju specifičnih okusa i mirisa imaju upravo glavni sastojci mlijeka iz kojeg se proizvodi sir. To su masti, bjelančevine i laktoza koji se različitim biokemijskim putevima razlažu na jednostavnije spojeve koji nose određene mirise i okuse. Enzimi

koji kataliziraju razgradnju navedenih sastojaka mlijeka mogu potjecati iz raznih izvora kao što su:

- enzimi iz mlijeka,
- enzimi sirila,
- enzimi prisutnih mikroorganizama (Ayad 2001.).

2.3.1. Proteolitička aktivnost

Rast mikroorganizama u mlijeku ubrzo bi se zaustavio jednom kada bi mikroorganizmi potrošili sav dostupan dušik i aminokiseline iz mlijeka. Iz tog razloga važnu ulogu igra proteolitički sustav bakterija mliječne kiseline jer se kroz taj proces glavni i najzastupljeniji protein mlijeka, kazein, razgrađuje na slobodne aminokiseline i peptide. Proteoliza doprinosi okusu sira sintezom peptida i slobodnih aminokiselina koji nose specifične okuse. Peptidi su važni i za razvoj ispravne teksture sira (Sousa i sur. 2001.). Postoje dvije glavne vrste enzima proteolitičkog sustava: proteinaze i peptidaze. Proteinaze su važne u početku degradacije kazeina kojega cijepaju u peptide različite dužine, dok peptidaze kataliziraju hidrolizu peptida. Proteinaze i peptidaze te transportni sustavi aminokiselina i peptida potrebni su za opskrbu stanica aminokiselinama potrebnim za rast (Tan i sur. 1993.). Proteolitički sustav laktokoka prikazan je na Slici 4.



Slika 4. Shema proteolitičkog sustava *Lactococcus* spp.
(preuzeto i prilagođeno prema Tan i sur. 1993.)

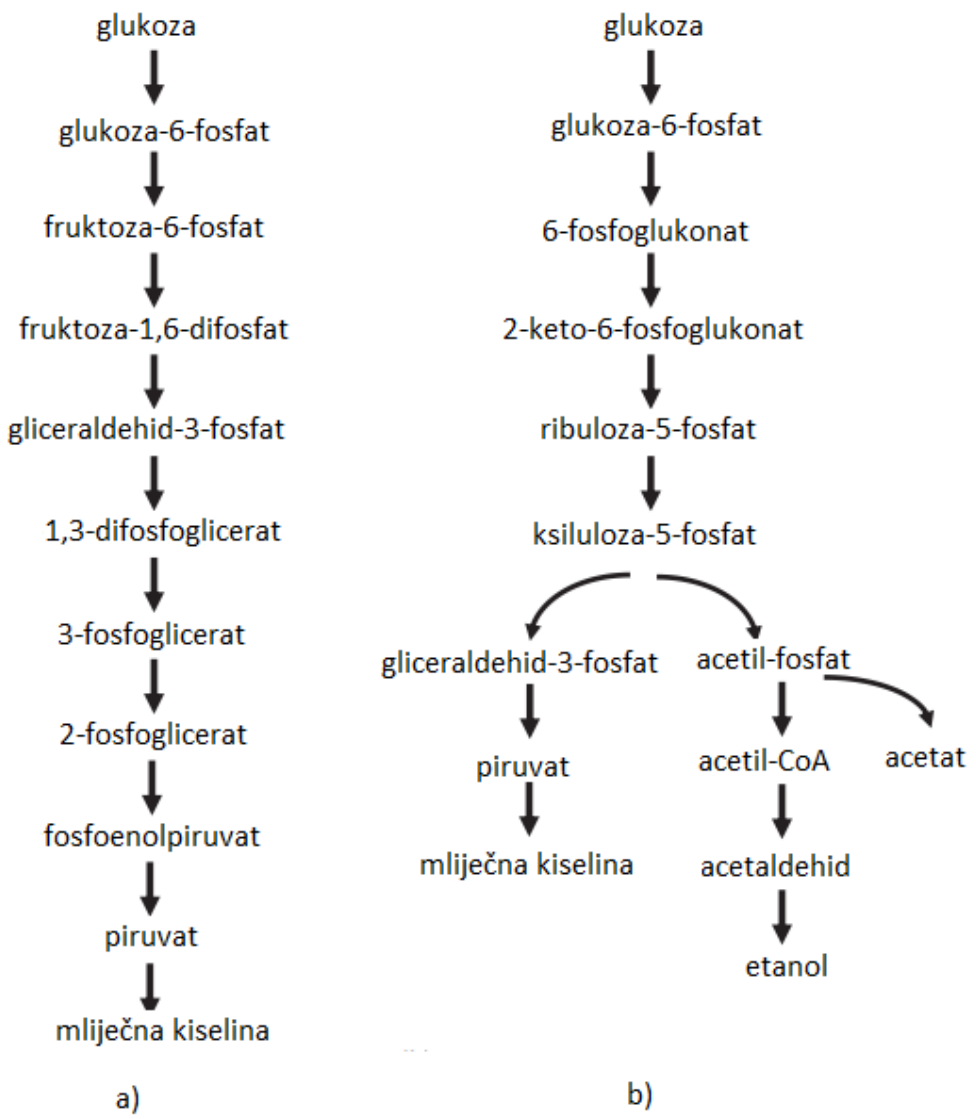
2.3.2. Lipolitička aktivnost

Lipoliza je enzimatski proces razgradnje mliječne masti. Enzimi koji razgrađuju mliječnu mast na slobodne masne kiseline i glicerol nazivaju se lipaze. Važno je spomenuti da je kod mlijeka i velikog broja mliječnih proizvoda proces lipolize nepoželjan, međutim, u proizvodnji odnosno zrenju sireva to nije slučaj (Perko 2015.). Naime, tijekom procesa lipolize oslobađaju se slobodne masne kiseline odgovorne za specifičnu aromu sira. Samo manji broj bakterija mliječne kiseline posjeduje lipolitičke enzime koji uistinu mogu hidrolizirati mliječnu mast u mlijeku i siru. Laktokoki i laktobacili posjeduju slabiju lipolitičku aktivnost u odnosu na tipične lipolitičke bakterije. Međutim, s obzirom da se *Lactococcus* spp. kao sirarska kultura u siru može pronaći u velikom broju kroz duži period tijekom sazrijevanja sira, poznato je da njegovi enzimi ipak mogu biti zaslužni za oslobađanje značajnijih količina slobodnih masnih kiselina

u siru te na taj način doprinose razvoju željenih organoleptičkih karakteristika (Vos i sur. 2009.).

2.3.3. Sposobnost acidifikacije

Bakterije mliječne kiseline svoj su naziv dobile upravo prema mogućnosti sinteze mliječne kiseline. Postoje dva tipa fermentacije glukoze te se bakterije mliječne kiseline prema tome dijele na heterofermentativne i homofermentativne. Kod homofermentativnog tipa fermentacije glukoze stvara se samo mliječna kiselina. Predstavnici bakterija mliječne kiseline koji imaju ovaj način fermentacije glukoze su *Pediococcus*, *Lactococcus* i *Streptococcus*. Za razliku od homofermentativnog, heterofermentativni put fermentacije glukoze podrazumijeva stvaranje mliječne kiseline uz druge metabolite kao što su CO_2 i etanol. Ovaj tip fermentacije glukoze prisutan je kod vrsta iz roda *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Weissella* (Rakhmanova i sur. 2018., Zotta i sur. 2018.). Navedena razlika ova dva tipa fermentacije glukoze može se vidjeti na Slici 5.



Slika 5. (a) homofermentativni i (b) heterofermentativni put fermentacije glukoze bakterija mliječne kiseline

(preuzeto i prilagođeno prema: Kumar i sur. 2015.)

Posebno važno svojstvo *Lc. lactis* u proizvodnji sira je sposobnost brzog zakiseljavanja. Sposobnost brzog zakiseljavanja odnosno stvaranja mliječne kiseline je željeno svojstvo bakterija u proizvodnji sira. Snižavanjem pH ova bakterija ima neizravan utjecaj na stvaranje okusa proizvoda jer se na taj način kontrolira proces proteolize i druge biokemijske reakcije koje su uključene u stvaranje aromatskih spojeva (Mozzi 2016.). Ono doprinosi sazrijevanju sira te sprječava kvarenje, iako ponekad stvaranje prevelike količine mliječne kiseline i posljedično preveliko snižavanje pH vrijednosti može dati neželjena organoleptička svojstva proizvoda i može rezultirati uništavanjem ili inhibicijom starter kulture (Rallu i sur. 1996.). U spontanoj fermentaciji mlijeka ostavljenog na temperaturi od 20 do 30 °C u vremenskom razdoblju od 10 do 20 sati, *Lc. lactis* proizvodi L(+)-mliječnu kiselinu iz

laktoze (Vos i sur. 2009.). Poznato je kako je stvaranje mliječne kiseline dugotrajno ili ga ponekad uopće ni nema na temperaturi nižoj od 20 °C (Ahmed i sur. 2006.). U odabiru komercijalne starter kulture u proizvodnji mliječnih proizvoda najvažniji kriterij je upravo sposobnost brzog zakiseljavanja, dok se sojevi sa slabijom i sporijom sintezom kiseline koriste kao dodatne kulture ukoliko imaju druge poželjne karakteristike u proizvodnji određenog proizvoda (Stanley 2003.).

Uz navedeno, stvaranje kiseline može rezultirati inhibicijom patogenih bakterija i bakterija uzročnika kvarenja hrane. Osim što stvorena kiselina može inhibirati rast mikroorganizama, snižavanjem pH vrijednosti mlijeka dolazi do taloženja kazeina i zgrušavanja te je zbog toga sposobnost brzog zakiseljavanja važna kod sirarskih kultura (Vos i sur. 2009.).

2.3.4. Sposobnost preživljavanja u različitim uvjetima

Tijekom fermentacije mlijeka i zrenja sireva, prisutne mikrobne kulture izložene su raznim uvjetima stresa kao što su varijacije temperature, pH vrijednosti, visoki osmotski tlak te nedostatak dostupnih hranjivih tvari (Ahmed i sur. 2006.).

Temeljem sposobnosti preživljavanja i rasta u različitim uvjetima kao što su pH, temperatura i koncentracija soli, mogu se razlikovati ne samo vrste iz roda *Lactococcus* već i sojevi unutar tih vrsta. Velika je genetička raznolikost bakterijske vrste *Lc. lactis* i to je ono što ih čini zanimljivima u biotehnološkim istraživanjima i njihovoj vrlo raznolikoj primjeni. Studija koju su proveli Smith i sur. (2015.) pruža jasne dokaze da se *Lc. lactis* može lako razvijati i prilagoditi stresnom okruženju, a da se pritom spontano nastali mutanti ne smatraju genetski modificiranima i prihvatljivi su za upotrebu u prehrambenoj industriji.

Koncentracija soli u siru varira ovisno o tipovima sireva, a uglavnom iznosi od 0,7 % do otprilike 6 %. Sol u proizvodnji sira ima nekoliko funkcija, a ono što je bitno, djeluje kao konzervans i izravno pridonosi okusu sira. Osim toga, koncentracija soli ima utjecaj na enzimske aktivnosti i biokemijske promjene koji se javljaju tijekom zrenja sireva (Guinee 2004.). Najznačajniji rast *Lc. lactis* u prisutnosti soli zabilježen je pri koncentraciji od 4 % NaCl-a (Vos i sur. 2009.).

Najbolji rast *Lc. lactis* zabilježen je u neutralnom pH području, a rast se smanjuje padom pH već pri vrijednosti od 4,5 (Vos i sur. 2009.), iako Beresford i sur. (2001.) navode pH vrijednost od 5,0 pri kojoj je rast ovih bakterija relativno slab. pH vrijednost sirnog gruša nakon proizvodnje varira od 4,5 do 5,3 zbog nakupljanja organskih kiselina, stoga tako niske pH vrijednosti sprječavaju daljnji rast *Lc. lactis* koji su osjetljivi na kiselost (Beresford i sur. 2001.).

Toplinski stres jedna je od najčešće ispitivanih oblika stresa bakterije *Lc. lactis*. Sojevi koji podnose veliki raspon temperature i u kojem se mogu umnažati važni su i zbog toga što visoka temperatura fermentacije može imati i druge prednosti poput

bržeg zakiseljavanja te stvaranja manjeg broja nusproizvoda (Chen i sur. 2015.). Raspon temperature rasta ovih bakterija je između 10 do 42 °C. Njihov rast je inhibiran na temperaturama većim od 39 °C, a optimalni raspon rasta je između 20 i 35 °C, zbog čega *Lc. lactis* pripada skupini mezofilnih bakterija. Mogu rasti i na nižim temperaturama, na primjer 10 °C, međutim, ove bakterije već pri 45 °C ne rastu (Cogan i Hill 1993.). Postoji razlika između podvrsta ove bakterije u osjetljivosti na visoke temperature, pri čemu je *Lc. lactis* subsp. *cremoris* osjetljivija na višu temperaturu (40 °C) nego što je to *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Ahmed i sur. 2006.). U proizvodnji sira se tijekom procesa sirenja temperatura često povisuje na oko 40 °C, nekada i više, a ukoliko se pri toj temperaturi značajno smanjuje rast ove bakterije, posljedično se smanjuje i proizvodnja laktata (Chen i sur. 2015.).

2.4. Antimikrobna aktivnost *Lactococcus lactis*

Određene vrste sira su podložne mikrobiološkom kvarenju, a mogu biti i izvor patogenih vrsta mikroorganizama. Patogeni mogu potjecati iz sirovog mlijeka, a u slučaju njihove termorezistencije i preživljavanja pasterizacije mogu ugroziti zdravstvenu ispravnost sira. Često se takvim proizvodima dodaju razni kemijski aditivi kojima se oni uništavaju u proizvodu. Međutim, ponekad takvi dodaci, a pogotovo u današnje vrijeme, mogu kod potrošača izazvati razne kontroverze. Iz tih razloga, u mljekarskoj se industriji u posljednje vrijeme intenzivno rade studije koje bi istražile potencijal upotrebe antimikrobnih spojeva koje proizvode bakterije mliječne kiseline *in situ* (Bukvicki i sur. 2020.). Naime, mnogim je istraživanjima (Mataragas i sur. 2003., Alegría i sur. 2010., Akbar i sur. 2019., Bragason i sur. 2020.) dokazano kako pojedine bakterije mliječne kiseline sintetiziraju određene spojeve koji posjeduju antimikrobnu aktivnost prema patogenim mikroorganizmima. Supstance sa antimikrobnim djelovanjem su najčešće mliječna kiselina, bakteriocini, vodikov peroksid i diacetil, čime inhibiraju rast i razmnožavanje patogena i bakterija koje uzrokuju kvarenje hrane. Danas se u svrhu biokonzerviranja hrane široko već koriste određeni mikroorganizmi koji upravo proizvode neke od navedenih tvari koje imaju antimikrobno djelovanje. Neke od tih bakterija koje se u tu svrhu koriste su: *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Pediococcus* (Mezaini i sur. 2009.). Istraživanja i karakterizacija autohtonih bakterija mliječne kiseline mogla bi pomoći u odabiru potencijalnih kultura koje bi poboljšale mikrobiološku sigurnost i produljile rok trajanja tradicionalnih fermentiranih mliječnih proizvoda kao što su sirevi.

2.4.1. Antimikrobno djelovanje bakteriocina

Bakteriocini bakterija mliječne kiseline su kemijske molekule odnosno ribosomski bioaktivni peptidi ili proteini s antimikrobnim djelovanjem prema gram pozitivnim i gram negativnim bakterijama, uključujući i bakterije koje uzrokuju kvarenje hrane i patogene bakterije, što im daje veliki biotehnološki potencijal. Stvaranje

bakteriocina od strane bakterija mliječne kiseline je poželjna značajka jer oni pomažu u kontroli populacije mikroba u fermentiranoj hrani čime se produljuje rok trajanja i sigurnost proizvoda (Mozzi 2016.). Bakteriocini se u industriji mliječnih proizvoda mogu primjenjivati u pročišćenom ili izvornom obliku, kao određena bakterija mliječne kiseline koja proizvodi bakteriocin unutar procesa fermentacije ili kao pomoćna kultura, a jedan od novijih trendova sastoji se od ugradnje bakteriocina ili bakterija mliječne kiseline koje proizvode bakteriocin u bioaktivne filmove i obloge koji se nanose izravno na površinu hrane i ambalažu. Razne vrste bakteriocina imaju i različite mehanizme djelovanja stoga se mogu podijeliti prema tome potiču li baktericidni ili bakteriostatički učinak (Mezaini i sur. 2009., Silva i sur. 2018.). Uvođenje bakterijskih kultura koje stvaraju bakteriocine u proizvodnju različitih fermentiranih proizvoda bi mogla biti ekonomičnija i prihvatljivija zamjena pročišćenim bakteriocinima (Alegría i sur. 2010.).

Bakteriocini bakterija mliječne kiseline aktivni su u velikom rasponu pH vrijednosti, otporni su na visoke temperature i djeluju protiv niza gram pozitivnih bakterija, a uz to su osjetljivi na probavne enzime, što ih čini pogodnima za korištenje u ljudskoj prehrani jer nemaju negativan učinak na crijevnu mikrofloru potrošača proizvoda u kojima je sadržan bakteriocin. Najpoznatiji bakteriocini koje proizvodi *Lc. lactis* su nizin, lakticini i laktokocini (Alegria i sur. 2010.). Nizin je jedan od najistraživanijih i danas često korištenih bakteriocina u konzerviranju hrane te se koristi kao aditiv oznake E324. Poznato je njegovo antimikrobno djelovanje prema patogenima *L. monocytogenes* i *S. aures* te sporogenim bakterijama kao što su *Bacillus* i *Clostridium*. Silva i sur. (2018.) navode kako se bakteriocini lakticin 3147 i lakticin 481 rijetko upotrebljavaju kao antimikrobni spojevi zbog prevelike količine koja bi bila potrebna za antimikrobni učinak i zbog nedovoljnog antimikrobnog učinka prema nekim bakterijama kao što je *L. monocytogenes*. Laktokokcin BZ ima antimikrobno djelovanje prema mnogim gram pozitivnim i gram negativnim bakterijama, a najveću aktivnost pokazuje prema *L. monocytogenes* (Silva i sur. 2018.).

Studije koje istražuju primjenu bakteriocina usredotočene su uglavnom na primjenu u proizvodnji sireva jer je većina otkrivenih bakteriocina bakterija mliječne kiseline učinkovita protiv *L. monocytogenes*. Sirevi su izrazito osjetljivi na kontaminaciju tom bakterijom jer pružaju odgovarajuće uvjete za njen rast. Ta patogena bakterija je od posebnog značaja kod proizvodnje tradicionalnih sireva od sirovog mlijeka, ali i kod sireva izrađenih od pasteriziranog mlijeka zbog naknadne kontaminacije. Mnogobrojni su zabilježeni slučajevi listerioze povezani s konzumacijom sireva, stoga je primjena bakteriocina kao prirodnih konzervansa za poboljšanje sigurnosti sira posljednjih godina privukla značajan interes (Silva i sur., 2018.).

2.5. Primjena *Lactococcus lactis* kao sirarske kulture

Kao što je već rečeno, *Lc. lactis* uglavnom je poznat po svojoj važnosti u mliječnoj industriji, gdje se godišnje više od 100 milijuna tona mlijeka inokulira ovom

bakterijom za proizvodnju raznih fermentiranih mliječnih proizvoda širom svijeta. Uz mliječnu industriju, njegova dugogodišnja uporaba pokazala se sigurnom, stoga se ova bakterija vrlo često koristi i u druge svrhe: sredstvo za isporuku cjepiva i terapijskih peptida za ljude te se koristi i kao platforma za proizvodnju raznih spojeva (Chen i sur. 2015.).

Obzirom da je *Lc. lactis* mezofilna kultura, ta se bakterija najčešće koristi u izradi polutvrdih i mekih sireva, jer u sirarstvu postoji pravilo koje govori kako se za izradu takvih vrsta sireva koriste mezofilne mikrobne kulture, dok se termofilne mikrobne kulture koriste pri izradi tvrdih sireva (Perko 2015.). Značajke podvrsta i biovara *Lc. lactis* te vrste sira u čijoj proizvodnji oni sudjeluju prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Predstavnici vrste *Lactococcus lactis* u sirarskim mikrobnim kulturama i njihove značajke

Skupine/vrste/podvrste	**Značajke**	**Vrste sira**
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	Mezofilna homofermentativna kultura, glavni produkt mliječna kiselina, tipični predstavnici u siru izrađenom s prirodnim kulturama	Polutvrdi, meki sirevi kao što su Gauda, Edam, Brie, Camembert
Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*	Fermentira citrate i stvara diacetil	Polutvrdi, meki sirevi poput Gaude, Edam, Brie
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*	Mezofilna homofermentativna kultura, glavni produkt mliječna kiselina	Polutvrdi, meki sirevi kao što su Gauda, Edam, Brie, Camembert

(preuzeto i prilagođeno prema: Rogelj 2015.)

Pri proizvodnji sira, mlijeku se prije sirenja dodaju željene mikrobne kulture čija vrsta i broj ovise o tehnici proizvodnje i vrsti samog sira (Perko 2015.). *Lactococcus lactis* smatra se primarnom sirarskom kulturom. Glavna uloga sirarskih kultura je zakiseljavanje odnosno fermentacija laktoze do mliječne kiseline. Posljedično s povećanjem koncentracije mliječne kiseline dolazi do pada pH vrijednosti, što uzrokuje koagulaciju (zgrušavanje) mlijeka. Ono se događa pri izoelektričnoj točci kazeina (pH = 4,6). Kako bi došlo do koagulacije mlijeka, pri proizvodnji većine sireva, dodaje se sirilo. Mikrobne kulture koje se dodaju u mlijeko za proizvodnju sira, pri zakiseljavanju povećavaju aktivnost sirila i time utječu na aktivnost prirodnih proteinaza u mlijeku. Zajedničkom proteolitičkom aktivnošću sirila, prirodnih enzima prisutnih u mlijeku i enzima mikrobne kulture stvaraju se razne arome i okusi sira (Rogelj 2015.).

Prema obliku pripreme, u uporabi su tekuće, osušene i smrznute starter kulture. Starter kulture moraju imati visok stupanj preživljavanja zajedno s optimalnom

aktivnošću za željene tehnološke performanse (Teuber 1995.). Postoje takozvane nedefinirane i definirane mikrobne kulture. Pojam „nedefiniranih mikrobnih kultura“ odnosi se na „prirodnu“ mikrobnu kulturu kojoj sastav i količina mikroorganizama nije određen odnosno definiran. Takve kulture prisutne su u tradicionalnom načinu proizvodnje sira i to na način da se mlijeko inkubira na temperaturi koja omogućava rast bakterijama mliječne kiseline do trenutka porasta kiselosti, nakon čega se ono koristi kao mikrobna kultura. Drugi način jest da se uz dodatnu inkubaciju koristi fermentirano mlijeko ili sirutka iz prethodno dobivenog sira. Obzirom na temperaturu inkubacije, sastav takvih mikrobnih kultura je raznolik i varijabilan. Takav tradicionalan način proizvodnje sireva daje specifične karakteristike sirevima i međusobno ih razlikuje od drugih vrsta sira. Definirane mikrobne kulture su one koje se izolacijom, pročišćavanjem i istraživanjem svojstava određenih bakterijskih vrsta i sojeva u laboratoriju često dobivaju iz prirodne mikrobne kulture kao što je mlijeko. Nakon toga, one se umnažaju kao čista kultura te se koriste samostalno ili u kombinaciji sa različitim sojevima iste ili različite vrste mikroorganizama (Rogelj 2015.).

Mikrobne kulture dodane u procesu proizvodnje sira trebale bi imati sposobnost sljedećega:

- stvaranja kiseline,
- razgradnje proteina,
- razgradnje lipida,
- tvorbe plina i arome,
- inhibicije tehnološki štetnih mikroorganizama (Perko 2015.).

Kako je već navedeno, sojevi *Lc. lactis* koji stvaraju bakteriocine eksperimentalno se ispituju u proizvodnji nekih vrsta sira (Garde i sur. 2006.). Kondrotiene i sur. (2018.) su u proizvodnji svježeg sira primjenili tri soja *Lc. lactis* koji stvaraju nizin te su uočili značajno smanjenje broja *L. monocytogenes* za gotovo 2 log unutar sedam dana skladištenja sira. Korištenje bakteriocina kao prirodnih konzervansa hrane ispunjava zahtjeve potrošača za visokokvalitetnom i sigurnom hranom bez upotrebe kemijskih konzervansa.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Sve navedene analize provodile su se u mikrobiološkom laboratoriju Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pri izradi ovoga rada koristili su se sljedeći navedeni materijali.

Aparatura:

- Spektrofotometar
- pH-metar
- Hladnjak
- Termostat
- Centrifuga
- Vortex miješalica
- Automatski pipetor
- Laboratorijska vaga
- Densimat
- Bunsenov plamenik
- Zaštitni kabinet

Laboratorijsko posuđe:

- Pipete od 10 ml
- Pipete od 1 ml
- Epruvete sa čepom
- Mikroepruvete
- Kivete
- Falcon epruvete
- Erlenmayerova tikvica
- Laboratorijska čaša
- Pasterova pipeta
- Durhamove cjevčice
- L-štapići

Kemikalije:

- 0,1 M NaOH
- 1 M HCl
- 1 M NaOH
- Fiziološka otopina
- Destilirana voda
- Fenolftalein

Dijagnostički kitovi:

- API 50 CHL

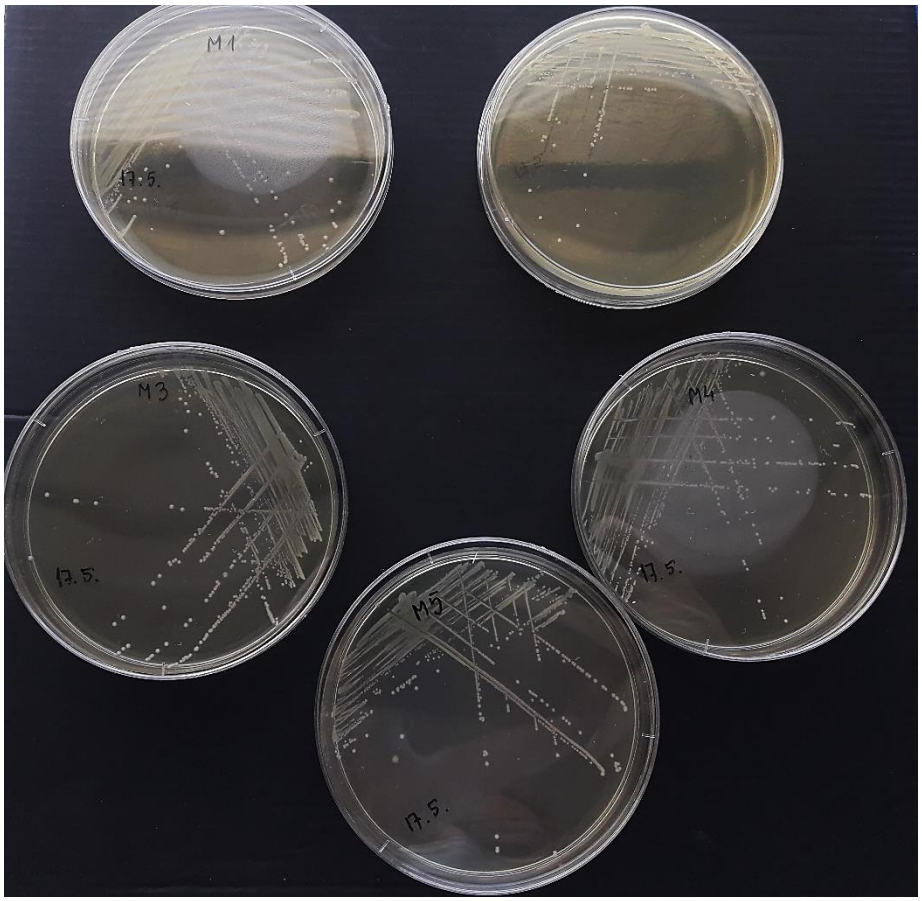
Hranjive podloge:

- M17 bujon
- M17 agar
- MRS bujon
- Mueller-Hinton agar
- Tween esteraza agar
- $CaCO_3$ agar
- Skim milk agar

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovome radu ispitivala su se svojstva sljedećih pet sojeva *Lactococcus lactis* izoliranih iz sirovog ovčjeg mlijeka (Slika 6):

- M1 – *Lc. lactis* subsp.*lactis*
- M2 – *Lc. lactis* subsp.*lactis*
- M3 – *Lc. lactis* subsp.*lactis*
- M4 – *Lc. lactis* subsp.*lactis*
- M5 – *Lc. lactis* subsp.*lactis*



Slika 6. Izgled kolonija radnih mikroorganizama na M17 agaru

3.1.2. Testni mikroorganizmi

Za provjeru proizvodnje plina pri razgradnji glukoze kao kontrolni mikroorganizmi koristili su se *Leuconostoc mesenteroides* i *Escherichia coli*, dok su za provjeru antimikrobnog djelovanja kao testni mikroorganizmi korišteni *L. monocytogenes* ATCC 7644 i *S. aureus* uz *Ln. mesenteroides* E131 kao pozitivna kontrola.

3.2. Metode

Preliminarna identifikacija izolata provedena je MALDI-TOF masenom spektrofotometrijom (Institut Ruđer Bošković), a potvrđena je utvrđivanjem njihovog biokemijskog profila pomoću API dijagnostičkog kita (BioMerieux, Francuska). Ostala svojstva izolata koja su se ispitivala u ovome radu su:

- Produkcija plina razgradnjom glukoze
- Sposobnost razmnožavanja pri različitim temperaturnim uvjetima, pH vrijednostima te koncentracijama soli,

- Acidifikacijska sposobnost,
- Proteolitička aktivnost,
- Lipolitička aktivnost,
- Antimikrobno djelovanje prema *L. monocytogenes* i *S. aureus*.

Tijekom manipulacije mikroorganizmima i svim materijalima i priborom poštivali su se sterilni uvjeti rada u mikrobiološkom laboratoriju, pri čemu su se koristile zaštitne rukavice, zaštitni kabinet i plamenik. Metode kojima su se ispitivala ranije navedena svojstva izolata opisane su u daljnjem tekstu:

I. Identifikacija mikroorganizama putem API dijagnostičkog kita

Pripremljene svježe kulture su prema uputama proizvođača API dijagnostičkog kita inokulirane u 10 ml API 50 CHL tekućeg medija kako bi se postigla gustoća od dvije McFarland jedinice. Tako pripremljeni medij sa kulturom dodao se u jažice API dijagnostičkih trakica nakon čega su se na vrh jažica stavile po dvije kapi mineralnog ulja kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Trakice su se poklopile te stavile inkubirati na 36 °C tijekom 24 sata. Rezultati API testa očitani su nakon 48 sati pomoću apiweb™ softvera. Ovim se testom utvrđuje fermentacija 49 različitih ugljikohidrata, a test se smatra pozitivnim ukoliko je uslijed zakiseljavanja došlo do promjene boje indikatora bromkrezola iz ljubičaste u žutu boju, a kod eskulin testa iz ljubičaste u crnu.

Slika 7. Provedba API dijagnostičkog testiranja

II. Provjera stvaranja plina razgradnjom glukoze

Kako bi se ustanovilo stvara li određeni soj *Lc. lactis* subsp. *lactis* plin, u epruvetu sa 8 ml MRS bujona inokulirano je 50 µL MRS bujona sa svježe pripremljenom kulturom. U epruvetu se potom postavila naopako okrenuta Durhamova cjevčica, pri čemu je bilo potrebno paziti da u nju ne uđe zrak. Ukoliko kultura pri razgradnji glukoze stvara plin, u Durhamovoj cjevčici bi se nakon petodnevne inkubacije na 30 °C trebao stvoriti prostor ispunjen plinom. Kao pozitivne kontrole korištene su bakterije koje produciraju plin, a to su *Ln. mesenteroides* i *E. coli*.

III. Sposobnost razmnožavanja sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* pri različitim temperaturnim uvjetima

U tri epruvete sa 9 ml M17 bujona inokuliran je 1 ml svježe pripremljene kulture *Lc. lactis* subsp. *lactis* u koncentraciji od 4 log CFU/ml (M1-M5) čime se postigla početna koncentracija u vrijednosti od 3 log CFU/ml. Svaka epruveta stavljena je na inkubaciju na određene temperature (10 °C, 30 °C i 45 °C) tijekom 24 sati. Nakon 24 sata, broj mikroorganizama određivao se mjerenjem apsorbancije (OD_{600}) te nasađivanjem na krutu M17 podlogu. 0,1 ml odabranih razrjeđenja je površinski inokuliran na M17 agar, nakon čega su ploče inkubirane na 30 °C tijekom 24 sata te je broj poraslih kolonija izražen kao log CFU/ml.

IV. Sposobnost razmnožavanja sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* pri različitim pH vrijednostima

Pripremljeno je pet epruveta s različitim pH vrijednostima M17 bujona: 6,5, 5,5, 4,5, 3,5 i 2,5. U svaku epruvetu inokuliran je 1 ml svježe pripremljene kulture *Lc. lactis* subsp. *lactis* u koncentraciji od 4 log CFU/ml (M1-M5). Tako pripremljeni bujoni inkubirani su na 30 °C tijekom 24 sata. Sposobnost rasta u takvim uvjetima promatrana je nakon 24 sata mjerenjem apsorbancije (OD_{600}) te nasađivanjem na krutu M17 podlogu. 0,1 ml odabranih razrjeđenja je površinski inokuliran na M17 agar nakon čega su ploče inkubirane na 30 °C tijekom 24 sata te je broj poraslih kolonija izražen kao log CFU/ml.

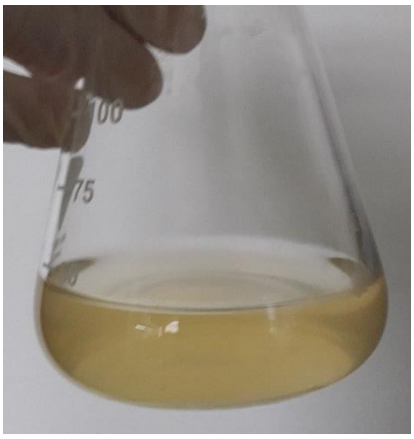
V. Sposobnost razmnožavanja sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* pri različitim koncentracijama soli

U tri Erlenmayerove tikvice odvagano je po 2,25 g, 2,75 g i 3,25 g natrijeva klorida te je u svaku od tih tikvica dodano po 50 ml M17 bujona. Time su se dobili bujoni sljedećih koncentracija soli: 4,5 %, 5,5 % i 6,5 %. Iz svake tikvice uzeto je po 9 ml bujona odgovarajuće koncentracije soli te je preneseno u pet novih epruveta. U svaku je dodan 1 ml svježe pripremljene kulture *Lc. lactis* subsp. *lactis* u koncentraciji od 4 log CFU/ml (M1-M5). Tako pripremljeni bujoni inkubirani su na 30 °C tijekom 24

sata. Sposobnost rasta u takvim uvjetima promatrana je nakon 24 sata mjerenjem apsorbancije (OD_{600}) te nasađivanjem na krutu M17 podlogu. 0,1 ml odabranih razrjeđenja je površinski inokulirano na M17 agar nakon čega su ploče inkubirane na 30 °C tijekom 24 sata te je broj poraslih kolonija izražen kao log CFU/ml.

VI. Acidifikacijska sposobnost sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis*

Jedna kolonija *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) inokulirana je u 10 ml MRS bujona te inkubirana na 30 °C tijekom 24 sata. Otopina je drugi dan prebačena u 100 ml MRS bujona i tako pripremljena stavljena na inkubaciju na 30 °C tijekom 7 sati. Svaki sat, uključujući i nulti, mjerila se pH vrijednost otopine te određivao titracijski stupanj acidifikacije. pH vrijednost je mjerena pomoću pH metra (Cyber Scan 510, Eutech, Nizozemska), a količina proizvedene kiseline određivana na način da je 10 ml uzorka pomiješano sa 20 ml destilirane vode te titrirano s 0,1 M natrijevom lužinom do pH vrijednosti 8,2 te pojave blijedoružičaste boje (Slika 8.) Kao indikator korišten je fenolftalein. Utrošak natrijeve lužine se potom uvrštava u formulu te se stupanj acidifikacije izražava u Tornerovim stupnjevima (°T).



Slika 8. Promjena boje pri titraciji uzoraka

Stupanj acidifikacije izračunava se prema sljedećoj formuli:

$$stupanj\ acidifikacije\ (\ °T\ ) = \frac{c\ x\ V\ x\ 100}{M\ x\ 0{,}1}$$

pri čemu je c (NaOH) = 0,1 M, V = utrošeni volumen NaOH, a M = masa uzorka.

Pored navedene metode, stupanj acidifikacije bakterijskih sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) provjerio se i na način da se čista kultura nacijepila na krutu podlogu MRS-a sa dodatkom kalcijeva karbonata u koncentraciji od 1,5%. Tako nacijepljena podloga inkubirana je na 30 °C kroz idućih 72 sata. Stupanj razgradnje

glukoze vidljiv je u obliku bistrih zona oko kolonija koje su rezultat reakcije laktata i kalcijevog karbonata pri čemu nastaje kalcijev laktat.

VII. Proteolitička aktivnost sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis*

Izolati *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) nacijepljeni su na Skim milk agar te inkubirani na temperaturi od 30 °C tijekom 72 sata. Proteolitička aktivnost sojeva dokazana je stvaranjem bistrih zona oko poraslih kolonija nastalih kao rezultat razgradnje kazeina.

VIII. Lipolitička aktivnost sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis*

Izolati *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) nacijepljeni su na Tween esteraza agar te inkubirani na temperaturi od 30 °C tijekom 72 sata. Pojava bistrih zona oko poraslih kolonija dokaz je njihove lipolitičke aktivnosti.

IX. Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis*

Kako bi se utvrdila antimikrobna aktivnost sojeva M1-M5 prema *L. monocytogenes* i *S. aureus*, korišten je Kirby-Bauer disk difuzijski test. Pripremljena je otopina bakterijskih stanica gustoće 0,5 McFarlanda (Densimat, BioMerieux, Francuska) te razmazana sterilnim brisom u tri smjera po površini Mueller-Hinton agara. Za svaku bakteriju pripremljeno je po pet takvih podloga za svaki soj (M1-M5). Tako pripremljene podloge sa *L. monocytogenes* i *S. aureus* podijeljene su na tri jednaka dijela te je na svaki postavljen sterilni disk. Svježe pripremljena kultura *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) u M17 bujonu centrifugirana je na 10 000 okretaja tijekom 10 minuta pri temperaturi od 4 °C. Na diskove se je nanijela po jedna kap čistog nadtaloga, jedna kap neutraliziranog nadtaloga (pH=7) i jedna kap nadtaloga tretiranog proteazom (Proteinaza K, Sigma-Aldrich, SAD). Podloge su potom inkubirane na 37 °C kroz 24 sata nakon čega su očitane zone inhibicije rasta patogenih bakterija. Kao pozitivna kontrola korišten je *Ln. mesenteroides* E131.

3.2.1. Statistička obrada

Rezultati su obrađeni metodama deskriptivne statistike (Statistica 13.5) te prikazani kao srednje vrijednosti dvaju mjerenja uz standardnu devijaciju (x±SD). Za utvrđivanje statistički značajnih razlika između brojnosti sojeva tijekom različitih uvjeta rasta korištena je jednosmjerna analiza varijance (One-Way ANOVA) za pokazatelje koji su slijedili normalnu raspodjelu te Kruskall-Wallis-ova analiza varijance kod pokazatelja koji nisu slijedili normalnu raspodjelu na razini vjerojatnosti od 0,05, a razlike između pojedinih izolata utvrđene su post-hoc analizom. Povezanosti između

stupnja zakiseljavanja izolata te pH vrijednosti medija provjerena je testom korelacije (r).

4. Rezultati i rasprava

- IDENTIFIKACIJA IZOLATA API TESTOM

Obzirom na dobivene rezultate fermentacijskih profila različitih supstrata, ustanovljeno je da svi izolati (M1-M5) pripadaju vrsti *Lc. lactis* subsp. *lactis*, što je u skladu s preliminarnom identifikacijom pomoću MALDI-TOF masene spektrofotometrije. Očitani postoci identifikacije (% ID) su za sve izolate iznosili više od 80 %. Fermentacijski profili izolata prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Fermentacijski profil bakterijskih izolata *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) temeljem analize provedene API 50 CHL testom

Ugljikohidrat	M1	M2	M3	M4	M5	Ugljikohidrat	M1	M2	M3	M4	M5
Kontrola	-	-	-	-	-	Arbutin	+	-	+	-	+
Glicerol	-	-	-	-	-	Eskulin	+	+	+	+	+
Eritriol	-	-	-	-	-	Salicin	+	+	+	+	+
D-arabinoza	-	-	-	-	-	Celobioza	+	+	+	+	+
L-arabinoza	+	-	+	-	+	Maltoza	+	+	+	+	+
Riboza	+	+	+	+	+	Laktoza	+	+	+	+	+
D-ksiloza	-	-	-	-	-	Melibioza	-	-	-	-	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	Saharoza	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	Trehaloza	+	+	+	+	+
β-metil-ksilozid	-	-	-	-	-	Inulin	-	-	-	-	-
Galaktoza	+	+	+	+	+	Melezitoza	-	-	-	-	-
D-glukoza	+	+	+	+	+	D-rafinoza	-	-	-	-	-
D-fruktoza	+	+	+	+	+	Amidon	-	+	-	+	-
D-manoza	+	+	+	+	+	Glikogen	-	-	-	-	-
L-sorboza	-	-	-	-	-	Ksilitol	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	-	β-gentobioza	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	D-turanoza	-	-	-	-	-
Inozitol	-	-	-	-	-	D-liksoza	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	+	-	+	D-tagatoza	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	D-fukoza	-	-	-	-	-
α-metil-D-manozid	-	-	-	-	-	L-fukoza	-	-	-	-	-
α-metil-D-glukozid	-	-	-	-	-	D-arabitol	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	+	+	+	+	+	L-arabitol	-	-	-	-	-
Amigdalin	+	-	+	+	+	Glukonat	+	-	+	-	+
2-keto-glukonat	-	-	-	-	-	5-keto-glukonat	-	-	-	-	-

- PRODUKCIJA PLINA RAZGRADNJOM GLUKOZE

Nakon inkubacije od 72 sata pri 30 °C nije zabilježeno stvaranje mjehurića zraka u Durhamovoj cjevčici, dok je kod kontrolnih mikroorganizama bio jasno vidljiv prostor ispunjen zrakom koji je istisnuo tekućinu iz Durhamove cjevčice (Slika 9). Ovaj rezultat ukazuje na homofermentativni način fermentacije glukoze svih pet izolata *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Bojanić Rasović i sur. (2017.) su ovom metodom također kod svojih 40 izolata *Lc. lactis* utvrdili homofermentativni način fermentacije glukoze.

Slika 9. Produkcija plina razgradnjom glukoze

- SPOSOBNOST RAZMNOŽAVANJA PRI TEMPERATURAMA OD 10, 30 i 45°C

Rast izolata *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1-M5 pri različitim temperaturama uvjetima prikazan je u Tablici 3. Pri temperaturi od 30 °C, kao što je i za pretpostaviti, svi izolati pokazuju izniman rast, što nije iznenađujuće obzirom da je ovo optimalna temperatura za rast ove bakterije. Većina izolata pri 10 °C pokazuje slabi, ali ipak prisutan rast, pri čemu M1 i M5 pokazuju izraženiji rast. Ipak, u uvjetima ovih dviju temperatura, nije zamijećena statistički značajna razlika između rasta pojedinih sojeva ($p>0,05$). Pri temperaturi od 45 °C postoje statistički značajne razlike u koncentracijama pojedinih izolata ($p<0,05$) pri čemu *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1 i M2 pokazuju najbolji rast (6 log CFU/ml). Iz rezultata je vidljivo da temperatura od 45 °C pogoduje rastu većine izolata u odnosu na temperaturu od 10 °C. Razmnožavanje bakterije *Lc. lactis* pri temperaturi

od 10 °C zabilježeno je i ranije (Cogan i Hill 1993., Gutiérrez-Méndez i sur. 2010., Choksi i Desai 2012.), no u sva tri istraživanja isto nije uočeno pri temperaturi od 45 °C. Sposobnost razmnožavanja *Lc. lactis* pri temperaturi od 45 °C zabilježili su i Piraino i sur. (2008.) i Kalbaza i sur. (2018.). Kim i sur. (2002.) istražili su kako određeni broj stanica *Lc. lactis* preživljava i nakon izlaganja stresnim uvjetima, uključujući i izlaganje temperaturi od 49 °C. Preživljene stanice su prikupljene i ponovo izložene istim stresnim uvjetima pri čemu su pokazale veću stopu preživljavanja u odnosu na prvi put, a smatra se da je to rezultat sinteze proteina koji im olakšavaju preživljavanje nepovoljnih uvjeta. U tom smislu bilo bi zanimljivo dalje istražiti naše izolate i vidjeti koji su njihovi mehanizmi kojima oni održavaju svoj rast u ovim temperaturnim uvjetima.

- SPOSOBNOST RAZMNOŽAVANJA U UVJETIMA KONCENTRACIJA SOLI OD 4,5, 5,5 i 6,5 %

Kako je prisutnost određenih koncentracija soli u siru jedan od ograničavajućih čimbenika razmnožavanja bakterija, bilo je potrebno analizirati pri kojim su koncentracijama soli naši sojevi sposobni preživjeti. Rast sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1-M5 pri različitim koncentracijama soli prikazan je u Tablici 3. Svi sojevi pokazali su jako dobar rast pri koncentraciji soli od 4,5 %, (>8 log CFU/ml), dok pri koncentraciji od 5,5 % i 6,5 % njihova vrijednost opada, a kreće se u rasponu 3-7,5 log CFU/ml. Pri koncentraciji soli od 6,5 % postoje statistički značajne razlike u koncentracijama pojedinih izolata ($p<0,05$) pri čemu *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1 pokazuje najbolji rast (>5 log CFU/ml). Ovisno o procesu proizvodnje određene vrste sira, važno je odabrati prikladan soj kako bi se osigurao njegov optimalan rast i tehnološki učinak. Gutiérrez-Méndez i sur. (2010.) su u svom istraživanju 18 sojeva *Lc. lactis* ustanovili kako samo jedan soj raste pri koncentraciji soli od 6,5 %, što su potvrdili i Kalbaza i sur. (2018.). Obzirom da sol u siru ima višestruka poželjna svojstva kao što su poboljšanje organoleptičkih svojstava te sprječavanje rasta nepoželjnih bakterija dobar je pokazatelj da naši sojevi mogu rasti pri njezinim visokim koncentracijama. Međutim, sa koncentracijama soli u siru valja biti oprezan iz razloga što visoki postoci nepovoljno utječu na zdravlje njihova redovitog potrošača (Guinee i Fox, 2004.), a na neke patogene bakterije takve koncentracije ne djeluju inhibitorno (Bisig 2014.), stoga bi u pogledu konzervansa mogle biti pogodnije određene bioprotektivne kulture sa djelovanjem na specifične mikroorganizme. Također, visoke koncentracije soli u siru mogu utjecati i na biokemijske procese kao što je usporavanje procesa proteolize (Bisig, 2014.). Uz navedeno, bitno je spomenuti kako nije tipično da isti sojevi laktokoka imaju sposobnost rasta pri koncentraciji soli od 6,5% i temperaturi od 45 °C (Kirmaci i sur. 2016.), što je dokazano kod naših izolata.

Tablica 3. Brojnost sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) pri različitim temperaturnim uvjetima i kocentracijama soli nakon inkubacije od 24 sata (log CFU/ml; OD_{600}, x±SD)

	T °C	log CFU/ml	OD_{600}	% NaCl	log CFU/ml	OD_{600}
M1		4,5±0,70	0,114		8,5±0,70	1,574
M2		2,5±0,70	0,104		9,0±0	1,131
M3	**10 °C**	3,5±0,70	0,112	**4,5 %**	8,5±0,70	1,602
M4		3,75±0,21	0,111		9,3±0	1,224
M5		4,42±0,82	0,102		8,5±0,70	1,590
M1		9,0±0	1,885		7,5±0,70	0,873
M2		9,0±0	1,785		6,0±1,4	0,202
M3	**30 °C**	9,0±0	1,843	**5,5%**	7,34±0,48	0,350
M4		9,3±0,7	1,852		7,5±0,70	0,155
M5		9,69±0	1,867		7,19±0,70	0,188
M1		$6,0±0^{a}$	0,219		$5,5±0,70^{a,b,c}$	0,127
M2		$6,0±0^{b}$	0,198		$3,0±0^{a,d}$	0,109
M3	**45 °C**	3,77±1,4	0,150	**6,5%**	$4,99±0,43^{b.d,e}$	0,122
M4		$2,0±0^{a,b,c}$	0,107		$3,0±0^{c,e}$	0,104
M5		$4,69±0^{c}$	0,151		4,5±0,70	0,120

^{a,b,c,d,e} vrijednosti u istom stupcu označene istim slovom statistički se značajno razlikuju na razini $p<0,05$

- SPOSOBNOST RAZMNOŽAVANJA U UVJETIMA pH VRIJEDNOSTI OD 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 i 6,5

Očekivano, najveći rast svih pet sojeva zabilježen je u uvjetima pH vrijednosti od 6,5, a nešto slabiji pri 5,5, no bez statistički značajnih razlika ($p>0,05$). Svi sojevi osim *Lc. lactis* subsp. *lactis* M2 pokazali su rast i pri pH vrijednosti od 4,5, iako su se njihove koncentracije značajno razlikovale ($p<0,05$). Pri nižoj pH vrijednosti od 3,5 blagi rast prisutan je kod sojeva M1, M3 i M5, dok je kod M2 i M4 on značajno manji (1 log CFU/ml). Kod pH vrijednosti od 2,5 dolazi do značajnog pada broja većine sojeva, osim M1 koji nakon 24 sata zadrži koncentraciju od 2 log CFU/ml. Statistički značajna razlika uočena je između brojnosti sojeva M3 i M5 u odnosu na ostale obzirom da im koncentracija nakon 24 sata iznosi <1 log CFU/ml. Obzirom da prema Beresford i sur. (2001.) pH vrijednost sirnog gruša nakon proizvodnje najčešće varira od 4,5 do 5,3, a rast naših izolata je, isključivši M2, i dalje relativno dobar u tom rasponu, oni bi u ovom smislu mogli biti pogodni kao sirarske kulture. Rast sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1-M5 pri različitim pH vrijednostima prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Brojnost sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) pri različitim pH vrijednostima nakon inkubacije od 24 sata (log CFU/ml; OD_{600}, x±SD)

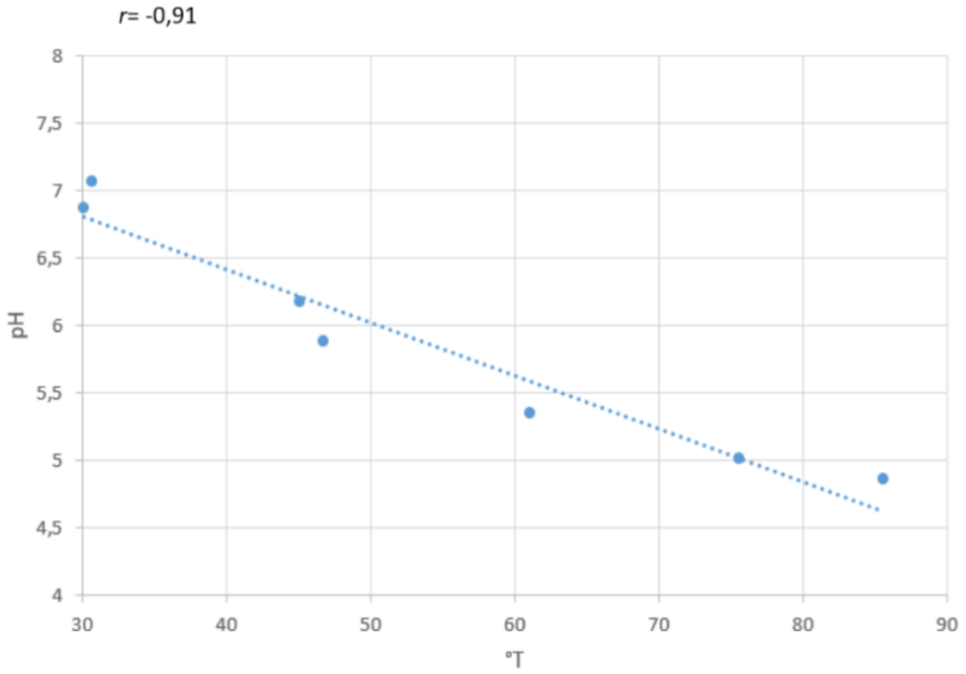
	pH	log CFU/ml	OD_{600}
M1	**2,5**	2,0±0[a,b]	0,160
M2		1,5±0,70[c,d]	0,087
M3		<1,0±0[a,c]	0,077
M4		1,0±0	0,080
M5		<1,0±0[b,d]	0,074
M1	**3,5**	4,0±0	0,120
M2		1,0±0	0,089
M3		3,95±0,07	0,103
M4		1,0±0	0,102
M5		3,8±0,21	0,100
M1	**4,5**	8,0±0[a,b,c]	0,480
M2		1,0±0[a,d,e,f]	0,091
M3		4,88±0,16[b,d,g]	0,095
M4		8,6±0[e,g,h]	0,780
M5		5,23±0,33[c,f,h]	0,097
M1	**5,5**	7,5±0,70	0,932
M2		6,0±1,4	0,719
M3		7,34±0,48	0,887
M4		7,5±0,70	1,284
M5		7,19±0,70	0,880
M1	**6,5**	9,5±0,70	1,575
M2		9,5±0,70	1,566
M3		8,8±0,28	1,112
M4		9,3±0	1,433
M5		9,12±0,49	1,152

[a,b,c,d,e,f,g,h] vrijednosti u istom stupcu određene kategorije označene istim slovom statistički se značajno razlikuju na razini $p<0,05$

- ACIDIFIKACIJSKA SPOSOBNOST

Kao što je već spomenuto, sposobnost brzog zakiseljavanja jedna je od glavnih karakteristika sojeva koji se koriste kao starter kulture u proizvodnji sira stoga je bilo od iznimnog značaja provjeriti posjeduju li naši izolati ovu sposobnost. Početna pH vrijednost MRS bujona s inokuliranim sojevima *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1-M5 bila je podjednaka, a kretala se u rasponu od 6,31-7,29. Svaki sljedeći sat, pH vrijednost postupno pada u podjednakim omjerima kod svih sojeva, a nakon 6 sati vrijednosti se kreću u rasponu od 4,86-5,24. Volumen utrošene natrijeve lužine izražen je u Tornerovim stupnjevima (°T) koji predstavljaju stupanj acidifikacijske sposobnosti, a kod naših izolata on se nakon 6 sati kretao u rasponu od 72,3-85,6. Slične rezultate pokazali su i Chen i sur. (2017.). Iako je soj *Lc. lactis* subsp. *lactis* M5 nakon 6 sati pokazao najveći stupanj acidifikacijske sposobnosti (85,6°T) i sukladno tome najnižu

pH vrijednost, između izolata nisu utvrđene statistički značajne razlike (p>0,05). Na Grafu 1 prikazana je acidifikacijska sposobnost izolata *Lc. lactis* subsp. *lactis* M5 tijekom 6 sati kroz korelacijsku analizu (r). Pored toga, stvaranje kiseline dodatno je provjereno na $CaCO_3$ agaru (MRS +1,5 % $CaCO_3$) na kojem su nakon inkubacije od 72 sata uočene bistre zone oko svih pet izolata nastale kao rezultat formacije kalcijevog laktata (Slika 10). Kako Beresford i sur. (2001.) navode, starter kulture bi trebale posjedovati brzu acidifikacijsku sposobnost koja će pH vrijednost mlijeka nakon šest sati sniziti na 5,3 ili manje pri temperaturi od 30 do 37 °C. Prema tome, naši izolati su unutar šest sati uspjeli sniziti pH medija ispod vrijednosti od 5,3, stoga bi prema ovom parametru mogli biti pogodni kao starter kulture. Za razliku od naših rezultata, Ma i sur. (2011.) u svom istraživanju na laktokokima nisu zabilježili istu sposobnost brze acidifikacije.

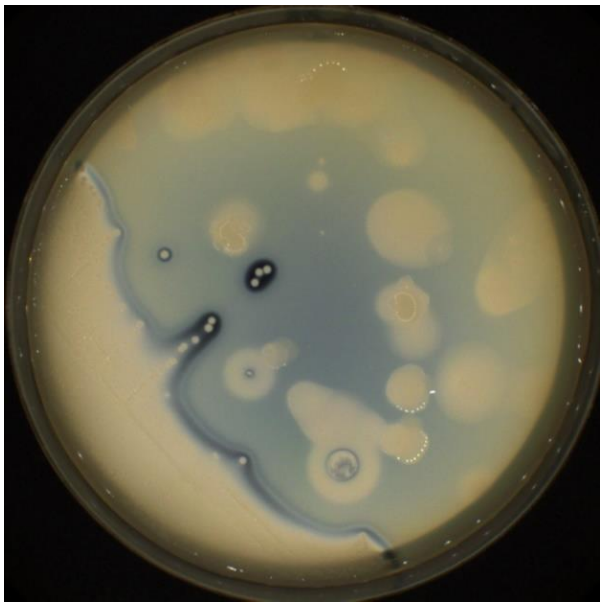


Graf 1 Prikaz acidifikacijske sposobnosti izolata *Lc. lactis* subsp. *lactis* M5 tijekom 6 sati kroz korelacijsku analizu (r)

Slika 10. Stvaranje kiseline *Lc. lactis* subsp. *lactis* na MRS agaru s dodatkom kalcijevog karbonata

- PROTEOLITIČKA AKTIVNOST

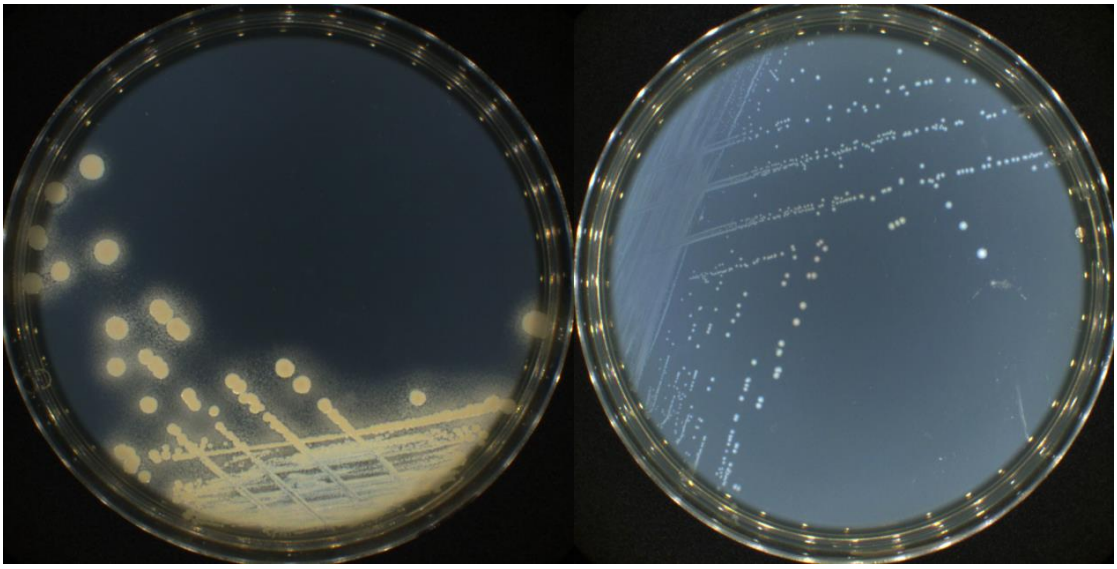
Nakon inkubacije od 72 sata na 30 °C na Skim milk agaru uočene su bistre zone različitih promjera oko svih pet izolata. Zone su nastale kao rezultat razgradnje kazeina i dokaz su postojanja proteolitičke aktivnosti (Slika 11). Obzirom da svi naši sojevi iskazuju proteolitičku aktivnost, to ih čini pogodnima u proizvodnji sira jer se njome osigurava razvoj specifičnih organoleptičkih svojstava. Phyu i sur. (2015.) su također metodom na Skim milk agaru dokazali proteolitičku aktivnost bakterija mliječne kiseline izoliranih iz raznih vrsta jogurta i fermentiranih mlijeka. Proteolitička aktivnost *Lc. lactis* zabilježena je i u drugim istraživanjima (Ma i sur. 2011., Kalbaza i sur. 2018.).



Slika 11. Proteolitička aktivnost izolata *Lc. lactis* subsp. *lactis* na Skim milk agaru

- LIPOLITIČKA AKTIVNOST

Nakon inkubacije od 72 sata na 30 °C na Tween esteraza agaru sa nacijepljenim kulturama *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1-M5 nisu uočene bistre zone oko kolonija koje bi bile dokaz lipolitičke aktivnosti. Kao pozitivna kontrola korišten je *S. aureus* kod kojeg je lipolitička aktivnosti bila jasno izražena (Slika 12). Za razliku od naših izolata, Kalbaza i sur. (2018.) bilježe lipolitičku aktivnost svih pet ispitivanih soja *Lc. lactis* subsp. *lactis*. Dellali i sur. (2020.) u svom radu navode kako sva tri ispitivana soja *Lc. lactis* subsp. *lactis* imaju lipolitičku aktivnost na tributirin agaru, dok isti na Tween esteraza agaru imaju slabu lipolitičku aktivnost, a jedan je uopće ne pokazuje.



Slika 12. Odsutstvo lipolitičke aktivnosti izolata *Lc. lactis* subsp. *lactis* na Tween esteraza agaru (desno); pozitivna kontrola (lijevo)

- ANTIMIKROBNO DJELOVANJE PREMA *LISTERIA MONOCYTOGENES* I *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Bakterije mliječne kiseline svoje antimikrobno djelovanje iskazuju stvorenom kiselinom, vodikovim peroksidom, diacetilom te bakteriocinima i drugim specifičnim tvarima. Iz tog razloga se u ovome radu antimikrobno djelovanje testiralo na način da je korišten čisti nadtalog, neutralizirani nadtalog (pH=7) i nadtalog sa dodanom proteazom, kako bi se utvrdio način antimikrobnog djelovanja, ukoliko on postoji. Međutim, nakon 24 sata inkubacije, izolati (M1-M5) nisu pokazali antimikrobnu aktivnost prema indikatorskim mikroorganizmima, što znači da nije bilo prisutnih zona inhibicije na podlozi. U usporedbi sa našim rezultatima, Yerlikaya (2018.) je u svom istraživanju utvrdio antimikrobnu aktivnost devet od 14 sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* prema *L. monocytogenes* te šest sojeva prema *S. aureus*. Bojanić Rasović i sur. (2017.) su kod svih 40 izolata *Lc. lactis* utvrdili slabi antimikrobni potencijal prema *L. monocytogenes*, dok je slaba do potpuna inhibicija rasta prema *S. aureus* bila prisutna tek kod manje od polovine izolata. Prema našim rezultatima očito je kako se ni jedan

od sojeva *Lc. lactis* subsp. *lactis* (M1-M5) ne bi mogao koristiti kao bioprotektivna kultura u proizvodnji sira.

5. Zaključak

Iz dobivenih rezultata ovoga rada zaključuje se sljedeće:

- API 50 CHL dijagnostičkim testiranjem potvrđeno je za sve izolate da pripadaju vrsti *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- Ni jedan od izolata ne stvara plin razgradnjom glukoze
- Sposobnost preživljavanja pri različitim temperaturnim uvjetima, pH vrijednostima te koncentracijama soli zabilježena je kod svih pet izolata od kojih *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1 pokazuje najveći rast
- Svi izolati pokazali su visoki stupanj acidifikacijske sposobnosti
- Svi izolati pokazali su jednaki stupanj proteolitičke i lipolitičke aktivnosti
- Ispitivani izolati nisu pokazali antimikrobnu aktivnost prema bakterijama *L. monocytogenes* i *S. aureus*
- U gotovo svim ispitivanim svojstvima ne postoje značajne razlike između *Lc. lactis* subsp. *lactis* M1-M5 izolata te bi se svi mogli primijeniti kao potencijalne sirarske kulture, a obzirom na navedena odstupanja odabir sojeva trebao bi se temeljiti na tehnološkom procesu i organoleptičkim svojstvima željene vrste sira.

6. Literatura

1. Ahmed T., Kanwal R., Ayub N. (2006). Influence of Temperature on Growth Pattern of Lactococcus lactis, Streptococcus cremoris and Lactobacillus acidophilus Isolated from Camel Milk. Biotechnology. 5:481-488.
2. Akbar A., Sadiq M.B., Ali I., Anwar M., Muhammad N., Muhammad J., Shafee M., Ullah S., Gul Z., Qasim S., Ahmad S., Anal A.K. (2019). Lactococcus lactis subsp. lactis isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential. CyTA - Journal of Food. 17(1):214-220.
3. Alegría Á., Delgado S., Roces C., López B., Mayo B. (2010). Bacteriocins produced by wild Lactococcus lactis strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. International Journal of Food Microbiology, 143(1-2):61–66.
4. Alegría Á., Szczesny P., Mayo B., et al. (2012). Biodiversity in Oscypek, a traditional Polish cheese, determined by culture-dependent and -independent approaches. Appl Environ Microbiol. 78(6):1890–1898.
5. Antunac N., Havranek Lukač J. (1999). Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. Mljekarstvo 49(4):241-254.
6. Ayad E.H.E. (2001). Characterisation of lactococci isolated from natural niches and their role in flavour formation of cheese. https://edepot.wur.nl/196943 – pristup 15.7.2021.
7. Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L., Cogan T. M. (2001). Recent Advances in Cheese Microbiology. International Dairy Journal. 11(4-7):259-274.
8. Bisig W. (2014). The importance of salt in the manufacturing and ripening of cheese.
9. Bojanić Rasović M., Mayrhofer S., Martinović A., Dürr K., Domig K. J. (2017). Lactococci of Local Origin as Potential Starter Cultures for Traditional Montenegrin Cheese Production. Food Technol. Biotechnol. 55(1): 55-66.
10. Bragason E., Berhe T., Dashe D., Sørensen K. I., Guya M. E., Hansen E. B. (2020) Antimicrobial activity of novel Lactococcus lactis strains against Salmonella Typhimurium DT12, Escherichia coli O157:H7 VT- and Klebsiella pneumoniae in raw and pasteurised camel milk. International Dairy Journal, 104832.
11. Bukvicki D., Siroli L., D'Alessandro M., Cosentino S., Fliss I., Ben Said L., Hassan H., Laciotti R., Patrignani F. (2020). Unravelling the Potential of Lactococcus lactis Strains to Be Use din Cheesemaking Production as Biocontrol Agents. Foods 9(12). 1815.
12. Chen J., Shen J,, Ingvar Hellgren L., Ruhdal Jensen P., Solem C. (2015). Adaptation of Lactococcus lactis to high growth temperature leads to a dramatic increase in acidification rate. Sci Rep. 5:14199.
13. Chen X., Zhao X., Qian Y., Li J., Chen L., Chen J., Zhang Y., Suo H. (2017). Screening and identification of lactic acid bacteria strains with high acid-producing from traditional fermented yak yogurt. BIO Web of Conferences. (8).

14. Choksi N., Desai H. (2012). Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from dairy sludge sample.Journal od Environmental Research And Development. 7(1):234-244.
15. Dellali A., Zadi Karam H., Karam N. E. (2020). Lipase and esterase activities of lactic acid bacteria isolated from different biotopes. African Journal of Biotechnology. 19(4): 156-164.
16. Dillon, V. M. (2014). NATURAL ANTI-MICROBIAL SYSTEMS | Preservative Effects During Storage. Encyclopedia of Food Microbiology. str. 941–947.
17. Euzéby J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. International Journal of Systematic Bacteriology. 47: 590-592. (https://lpsn.dsmz.de/ - pristup 2.8.2021.)
18. FAO. (2016). The Global Dairy Sector: Facts. http://www.fao.org/3/cb2992en/cb2992en.pdf – pristup 30.7.2021.
19. Fotou K., Tzora A., Voidarou C., Alexopoulos A., Plessas S., Avgeris I., … Demertzis P. G. (2011). Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. Anaerobe, 17(6); 315–319.
20. Garde S., Ávila M., Gaya P., Medina M., Nuñez M. (2006). Proteolysis of Hispánico Cheese Manufactured Using Lacticin 481-Producing Lactococcus lactis ssp. lactis INIA 639. Journal of Dairy Science. 89(3): 840-849.
21. Guinee T. P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. International Journal of Dairy Technology. 57(2-3), 99109.
22. Guinee T., Fox P.F. (2004). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 1: 207-259.
23. Gutiérrez-Méndez N., Rodríguez-Figueroa J. C., González-Córdova A. F., Nevárez-Moorillón G. V., Rivera-Chavira B., Vallejo-Cordoba B. (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of Lactococcus lactis strains isolated from different ecosystems. Can J Microbiol. 56(5):432-9.
24. Hassan A.N., Frank J.F. (2011). Microorganisms associated with milk. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). Str. 447-457.
25. Hatti-Kaul R., Chen L., Dishisha T., El Enshasy H. (2018). Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. FEMS Microbiology Letters. 365(20).
26. Issa A. T., Tahergorabi R. (2019). Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract. Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases. str. 265–275.
27. Kalbaza K., Zadi-Karam H., Karam N. E. (2018). Identification and major technological characteristics of Lactococcus and Lactobacillus strains isolated from „hamoum“, an Algerian fermented wheat. African Journal of Biotechnology. 17(5): 108-117.
28. Kim W. S., Park J. H., Tandianus J. E., Ren J., Su P., Dunn, N. W. (2002). A distinct physiological state of Lactococcus lactis cells that confers survival against a direct and prolonged exposure to severe stresses. FEMS Microbiology Letters. 212(2): 203–208.

29. Kirmaci H. A., Özer B. H., Akçelik M., Akçelik N. (2016). Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese. International Journal of Dairy Technology. 69(2):301-307.
30. Kondrotiene, K., Kasnauskyte, N., Serniene, L., Gölz, G., Alter, T., Kaskoniene, V., et al. (2018). Characterization and application of newly isolated nisin producing Lactococcus lactis strains for control of Listeria monocytogenes growth in fresh cheese. LWT Food Sci. Technol. 87: 507–514.
31. Kumar R., Kaur M., Garsa A., Shrivastava B., Reddy P.V., Tyagi A. (2015). Natural and Cultured Buttermilk. U: Fermented milk and dairy products. (ur. Puniya A.K.). CRC Press/Taylor and Francis, USA. str. 203-225.
32. Ma C. L., Zhang L., Yi H., Du M., Han X., Feng Z., Zhang Y., Li Q. (2011). Technological characterization of lactococci isolated from traditional Chinese fermented milks. Journal of dairy science. 94(4): 1691-6.
33. Mangia N. P., Saliba L., Deiana P. (2018). Functional and safety characterization of autochthonous Lactobacillus paracasei FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage. Annals of Microbiology, 69(2):161–170.
34. Mataragas M., Drosinos E. H., Metaxopoulos J. (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4±2°C. Food Microbiology, 20(2): 259–265.
35. Mezaini A., Chihib N. E., Bouras A. D., Nedjar-Arroume N., Hornez J. P. (2009). Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. Journal of environmental and public health, 678495.
36. Mozzi F. (2016). Lactic Acid Bacteria. Encyclopedia of Food and Health. Str. 501–508.
37. Narvhus J. A., Axelsson L. (2003). LACTIC ACID BACTERIA. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. str. 3465–3472.
38. Parte A.C. (2014). LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Nucleic Acids Research. 42(D1): D613–D616. (https://lpsn.dsmz.de/ - pristup 2.8.2021.)
39. Parte A.C. (2018). LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 68: 1825-1829. (https://lpsn.dsmz.de/ - pristup 2.8.2021.)
40. Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C., Göker M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 70: 5607-5612. (https://lpsn.dsmz.de/ - pristup 2.8.2021.)
41. Perko, B. (2015). Najnovija postignuća u proizvodnji sira. Sirarstvo u teoriji i praksi. Ur. Matijevič B. str. 133-148.
42. Phyu H. E., Khaing Oo Z., Aye K. N. (2015). Screening on proteolytic activity of lactic acid bacteria from various yogurts and fermented milk. International Journal of Advances in Science Engineering and Technology. (5):34-37.

43. Piraino P., Zotta T., Ricciardi A., McSweeney P. L. H., Parente E. (2008). Acid production, protelysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. International Dairy Journal. 18(2008):81-92.
44. Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford P. T., Ross P., Fitzgerald F. G., Cotter D. P. (2013). The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews 37(5): 664-698.
45. Rakhmanova A., Khan Z.A., Shah K. (2018). A mini review fermentation and preservation: role of Lactic Acid Bacteria. MOJ Food Process Technol. 6(5):414-417.
46. Rallu, F., Gruss, A., & Maguin, E. (1996). Lactococcus lactis and stress. Antonie van Leeuwenhoek, 70(2-4): 243–251.
47. Rogelj I. (2015). Mikrobne kulture u proizvodnji sira U: Sirarstvo u teoriji i praksi. Matijević B. (ur.) Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska. str. 113-123.
48. Samaržija D. (2015). Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga
49. Samaržija D., Antunac N., Lukač Havranek J. (2001). Taxonomy, physiology and growth of Lactococcus lactis: a review. Mljekarstvo 51(1): 35-48.
50. Silva C. C. G., Silva S. P. M., C. Ribeiro S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. Frontiers in Microbiology. 9:594.
51. Smith W. M., Thi Huong Pham and Lei L., Dou J., Soomro A. H., Beatson S. A., Dykes G. A., Turner M. S. (2012). Heat Resistance and Salt Hypersensitivity in Lactococcus lactis Due to Spontaneous Mutation of llmg_1816 (gdpP) Induced by High-Temperature Growth. Applied and Environmental Microbiology. 78(21): 7753-7759.
52. Sousa M., Ardö Y., McSweeney P. L. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. International Dairy Journal. 11(4-7): 327–345.
53. Stanley G. (2003). CHEESES | Starter Cultures Employed in Cheese-making. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, str. 1051–1056.
54. Tan P. S., Poolman B., Konings W. N. (1993). Proteolytic enzymes of Lactococcus lactis. Journal of Dairy Research, 60(02): 269.
55. Teuber M. (1995). The genus Lactococcus. The Genera of Lactic Acid Bacteria. str. 173–234.
56. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg R. N., Ludwig W., Rainey A. F., Schleifer K-H., Whitman B. W. (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes.
57. Yerlikaya O. (2018). Probiotic potential and biochemical and technological properties of Lactococcus lactis ssp. Lactis strains isolated from raw milk and kefir grains. J. Dairy. Sci. 102:124-134.
58. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., M.A.P. Franz C., M.B. Harris H., Mattarelli P., W. O'Toole P., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., E. Felis G., G. Gänzle M., Lebeer S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 70(4): 2782-2858.

59. Zotta T., Ricciardi A., Ianniello R. G., Storti L. V., Glibota N. A., Parente E. (2018). Aerobic and respirative growth of heterofermentative lactic acid bacteria: A screening study. Food Microbiology. 76: 117-127.

Životopis

Lucija Pajač rođena je 19. srpnja 1997. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu pohađala je u Svetome Ivanu Zelini. Srednjoškolsko obrazovanje stekla je u Srednjoj školi Dragutina Stražimira, smjer opća gimnazija. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja, 2016. godine upisuje preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva na Zdravstvenom veleučilištu Zagreb, gdje je 2019. godine stekla zvanje prvostupnice sanitarnog inženjerstva. Iste godine upisuje diplomski studij Agroekologije, smjer Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja kontinuirano obavlja studentske poslove i volontira. Ima vrlo dobro poznavanje engleskog jezika u govoru i pisanju, te posjeduje osnovno znanje njemačkog jezika. Od ostalih vještina ima vrlo dobro poznavanje rada na računalu i u MS Office.