

# Lactobacilus paraplantarum kao prirodni konzervans

---

Grubeša, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:513351>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

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

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

***LACTOBACILLUS PARAPLANTARUM* KAO PRIRODNI KONZERVANS**

**ZAVRŠNI RAD**

**JELENA GRUBEŠA**

**Matični broj: 129**

**Split, srpanj 2023**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ**  
**PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

***LACTOBACILLUS PARAPLANTARUM* KAO PRIRODNI  
KONZERVANS**

**ZAVRŠNI RAD**

**JELENA GRUBEŠA**

**Matični broj: 129**

**Split, srpanj 2023**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY**  
**FOOD TECHNOLOGY**

***LACTOBACILLUS PARAPLANTARUM* AS A NATURAL  
PRESERVATIVE**

**BACHELOR THESIS**

**JELENA GRUBEŠA**

**Parent number: 129**

**Split, July 2023**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Mentor:** Izv. prof dr. sc. Danijela Skroza

**Komentor:** Prof. dr. sc. Vida Šimat

### LACTOBACILLUS PARAPLANTARUM KAO PRIRODNI KONZERVANS

Jelena Grubeša, 129

**Sažetak:**

Bakterije mliječno-kiselog vrenja prisutne su u velikom broju prehrambenih proizvoda i odgovorne su za različite pozitivne (fermentacija, antimikrobno djelovanje, senzorska svojstva proizvoda, probiotski učinak) ali i negativne (bakterije kvarenja, antimikrobna rezistencija) procese u prehrambenim proizvodima. Metaboliti bakterija mliječno-kiselog vrenja u prehrambenim proizvodima imaju sposobnost inhibicije različitih patogenih bakterija kao i bakterija kvarenja zbog čega je moguća njihova primjena u konzerviranju nefermentiranih namirnica. U ovom radu ispitana je antimikrobna aktivnost bakterijske vrste *Lactobacillus paraplantarum* (talog) i uzgojnog medija nakon inkubacije (supernatant) protiv patogenih bakterija i bakterija kvarenja. Antimikrobna aktivnost procijenjena je metodom minimalne inhibitorne koncentracije (engl. Minimum Inhibitory Concentration, MIC), minimalne baktericidne koncentracije (engl. Minimum Bactericidal Concentration, MBC) i metodom difuzije u jažicama (engl. Well Diffusion Method). Najbolji antimikrobni učinak imao je supernatant *L. paraplantarum* dok je talog bakterijskih stanica *L. paraplantarum* pokazao jako slabo djelovanje ili nije imao učinak prema testiranim mikroorganizmima. Najniže MIC i MBC vrijednosti supernatanta *L. paraplantarum* zabilježene su prema patogenoj bakteriji *Enterococcus faecalis*, s MIC i MBC vrijednosti od 5% i prema bakteriji kvarenja *Pseudomonas fragi* s MIC i MBC vrijednosti od 2,5%. Najbolji inhibitorni učinak određen metodom difuzije u jažicama pokazali su supernatant i talog *L. paraplantarum* prema *Pseudomonas fragi*.

**Ključne riječi:** *Lactobacillus paraplantarum*, konzerviranje, antimikrobna aktivnost

**Rad sadrži:** 25 stranica, 11 slika, 4 tablice, 15 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

- |   |             |
|---|-------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić | predsjednik |
| 2. Prof. dr. sc. Vida Šimat                   | komentor    |
| 3. Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza         | mentor      |

**Datum obrane:**

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate study Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food Technology  
**Mentor:** Ph. D. Danijela Skroza, Associate Professor  
**Co-mentor:** Ph. D. Vida Šimat, Full Professor

### *LACTOBACILLUS PARAPLANTARUM AS A NATURAL PRESERVATIVE*

Jelena Grubeša, 129

#### **Abstract:**

Lactic acid fermentation bacteria are present in a large number of food products and are responsible for various positive (fermentation, antimicrobial activity, sensory properties of the product, probiotic activity) and negative (spoilage bacteria, antimicrobial resistance) processes in foods. Metabolites of lactic acid fermentation bacteria in food products have the ability to inhibit various pathogenic bacteria and spoilage bacteria in foods, making them useful for preservation of non-fermented foods. In this thesis, the antimicrobial activity of the bacterial species *Lactobacillus paraplantarum* (sediment) and the culture medium after incubation (supernatant) was tested against pathogenic bacteria and spoilage bacteria. Antimicrobial activity was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) method, minimum bactericidal concentration (MBC) and well diffusion method. The supernatant of *L. paraplantarum* showed the best antimicrobial effect, while the precipitate of bacterial cells of *L. paraplantarum* showed a very weak effect or had no effect against the tested microorganisms. The lowest MIC and MBC values of the supernatant of *L. paraplantarum* were found against the pathogenic bacterium *Enterococcus faecalis*, with MIC and MBC values of 5% and against the spoilage bacterium *Pseudomonas fragi* with MIC and MBC values of 2.5%. The best inhibitory effect determined by the diffusion method in wells was shown by the supernatant and sediment of *L. paraplantarum* against *Pseudomonas fragi*.

**Keywords:** *Lactobacillus paraplantarum*, food preservation, antimicrobial activity

**Thesis contains:** 25 pages, 11 figures, 4 tables, 15 references

**Original in:** Croatian

#### **Defence committee:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić – Associate Professor | chair person  |
| 2. Ph. D. Vida Šimat – Full Professor                   | co-supervisor |
| 3. Ph. D. Danijela Skroza – Associate Professor         | supervisor    |

#### **Defence date:**

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library

*Završni rad izrađen je u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Skroza, komentorstvom prof. dr. sc. Vide Šimat, te uz pomoć Roberte Frleta Matas, mag. ing. agr u razdoblju od veljače do srpnja 2023. godine.*

*Ovaj rad je sufinanciran sredstvima projekta BioProMedFood (Reference Number:1467; 2019 SECTION2-4).*

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Skroza na pomoći i uloženom trudu prilikom izrade ovog završnog rada. Također, zahvaljujem se Roberti Frleta Matas, mag. ing. arg. na pomoći pri provedbi eksperimentalnog dijela te udijeljenim savjetima. Zahvaljujem se i povjerenstvu na vremenu izdvojenom za pregled ovog rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima i sestrama na potpori tijekom studiranja, iako smo tek na pola puta.*

*Hvala mojim prijateljicama na zajednički provedenim trenutcima i moralnoj podršci.*

*I na kraju, hvala mom Kreši na strpljenju i razumijevanju.*



## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Ispitati antimikrobnu aktivnost bakterije *Lactobacillus paraplantarum* (taloga) i uzgojnog medija (supernatant) nakon inkubacije prema patogenim bakterijama (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*) i bakterijama kvarenja (*Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas aeruginosa*).
- Odrediti antimikrobnu aktivnost korištenjem metoda minimalne inhibitorne koncentracije (engl. Minimum Inhibitory Concentration, MIC), minimalne baktericidne koncentracije (engl. Minimum Bactericidal Concentration, MBC) te metode difuzije u jažicama (engl. Well Diffusion Method).
- Tumačenjem dobivenih rezultata donijeti zaključke o antimikrobnoj aktivnosti ispitanih uzoraka.

## SAŽETAK

Bakterije mliječno-kiselog vrenja prisutne su u velikom broju prehrambenih proizvoda i odgovorne su za različite pozitivne (fermentacija, antimikrobno djelovanje, senzorska svojstva proizvoda, probiotski učinak) ali i negativne (bakterije kvarenja, antimikrobna rezistencija) procese u prehrambenim proizvodima. Metaboliti bakterija mliječno-kiselog vrenja u prehrambenim proizvodima imaju sposobnost inhibicije različitih patogenih bakterija kao i bakterija kvarenja zbog čega je moguća njihova primjena u konzerviranju nefermentiranih namirnica. U ovom radu ispitana je antimikrobna aktivnost bakterijske vrste *Lactobacillus paraplantarum* (talog) i uzgojnog medija nakon inkubacije (supernatant) protiv patogenih bakterija i bakterija kvarenja. Antimikrobna aktivnost procijenjena je metodom minimalne inhibitorne koncentracije (engl. Minimum Inhibitory Concentration, MIC), minimalne baktericidne koncentracije (engl. Minimum Bactericidal Concentration, MBC) i metodom difuzije u jažicama (engl. Well Diffusion Method). Najbolji antimikrobni učinak imao je supernatant *L. paraplantarum* dok je talog bakterijskih stanica *L. paraplantarum* pokazao jako slabo djelovanje ili nije imao učinak prema testiranim mikroorganizmima. Najniže MIC i MBC vrijednosti supernatanta *L. paraplantarum* zabilježene su prema patogenoj bakteriji *Enterococcus faecalis*, s MIC i MBC vrijednosti od 5% i prema bakteriji kvarenja *Pseudomonas fragi* s MIC i MBC vrijednosti od 2,5%. Najbolji inhibitorni učinak određen metodom difuzije u jažicama pokazali su supernatant i talog *L. paraplantarum* prema *Pseudomonas fragi*.

**Ključne riječi:** *Lactobacillus paraplantarum*, konzerviranje, antimikrobna aktivnost,

## SUMMARY

Lactic acid fermentation bacteria are present in a large number of food products and are responsible for various positive (fermentation, antimicrobial activity, sensory properties of the product, probiotic activity) and negative (spoilage bacteria, antimicrobial resistance) processes in foods. Metabolites of lactic acid fermentation bacteria in food products have the ability to inhibit various pathogenic bacteria and spoilage bacteria in foods, making them useful for preservation of non-fermented foods. In this thesis, the antimicrobial activity of the bacterial species *Lactobacillus paraplantarum* (sediment) and the culture medium after incubation (supernatant) was tested against pathogenic bacteria and spoilage bacteria. Antimicrobial activity was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) method, minimum bactericidal concentration (MBC) and well diffusion method. The supernatant of *L. paraplantarum* showed the best antimicrobial effect, while the precipitate of bacterial cells of *L. paraplantarum* showed a very weak effect or had no effect against the tested microorganisms. The lowest MIC and MBC values of the supernatant of *L. paraplantarum* were found against the pathogenic bacterium *Enterococcus faecalis*, with MIC and MBC values of 5% and against the spoilage bacterium *Pseudomonas fragi* with MIC and MBC values of 2.5%. The best inhibitory effect determined by the diffusion method in wells was shown by the supernatant and sediment of *L. paraplantarum* against *Pseudomonas fragi*.

**Keywords:** *Lactobacillus paraplantarum*, food preservation, antimicrobial activity

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1 OPĆI DIO</b> .....	2
1.1. Rod <i>Lactobacillus</i> .....	2
1.2. Aktivnost <i>Lactobacillus paraplantaruma</i> .....	4
1.3. Spojevi zaslužni za antimikrobnu aktivnost bakterija mliječno-kiselog vrenja .....	6
1.3.1. Organske kiseline .....	6
1.3.2. Peptidi .....	7
1.3.3. Ostali metaboliti .....	7
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	8
2.1. Reagensi i uređaji .....	8
2.2. Priprema supernatanta i bakterijskog taloga <i>L. paraplantarum</i> .....	11
2.3. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti .....	13
2.3.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne vrijednosti (MIC) .....	14
2.3.2. Metoda određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC) .....	16
2.3.3. Metoda difuzije u jažicama .....	17
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	18
3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) .....	18
3.2. Rezultati određivanja metode difuzije u jažicama .....	21
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	23
<b>5. LITERATURA</b> .....	24

## UVOD

Biološko konzerviranje je proces produljenja roka trajanja prehrambenih proizvoda upotrebom mikroorganizama ili njihovih metabolita.<sup>1</sup> Vrste roda *Lactobacillus*, tzv. laktobacili, samo su neke od vrsta bakterija mliječno-kiselog vrenja koje se koriste u proizvodnji fermentirane hrane, kao starter kulture ili konzervansi. Osim njihove uloge u proizvodnji hrane, određeni sojevi koriste se kao probiotici ili pak kao nosači cjepiva zbog svojih potencijalnih terapijskih i profilaktičkih svojstava.<sup>2</sup>

U proizvodnji hrane, laktobacili su važni jer djeluju kao konzervansi te doprinose nutritivnim i senzorskim svojstvima hrane na način da joj poboljšavaju okus i teksturu. U proizvodnji različitih vrsta sireva, fermentirane biljne hrane, fermentiranog mesa, vina i piva, kruha s kiselim tijestom i silaže koriste se kao komplementarne ili starter kulture. Uzrokuju brzo snižavanje pH u sirovini kroz proizvodnju mliječne kiseline kao glavnog metaboličkog produkta.<sup>3</sup>

Osim u proizvodnji hrane, koriste se i za konzerviranje obzirom da mogu inhibirati druge mikroorganizme koje uzrokuju kvarenje hrane ili su uzročnici bolesti koje se prenose hranom. Rod *Lactobacillus* vrlo je bitan za suvremenu tehnologiju hrane, kao i proizvodnju stočne hrane, zbog svojih funkcionalnih svojstava. Prehrambena industrija i medicina aktivno promiču upotrebu laktobacila u ljudskoj prehrani zbog velikog broja njihovih zdravstvenih prednosti, a sve više se koriste i u proizvodnji hrane za životinje obzirom da mogu zamijeniti antibiotike.<sup>4</sup>

Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnost korištenja bakterije mliječno-kiselog vrenja *Lactobacillus paraplantarum* i njenih metabolita kao konzervansa u hrani.

# 1 OPĆI DIO

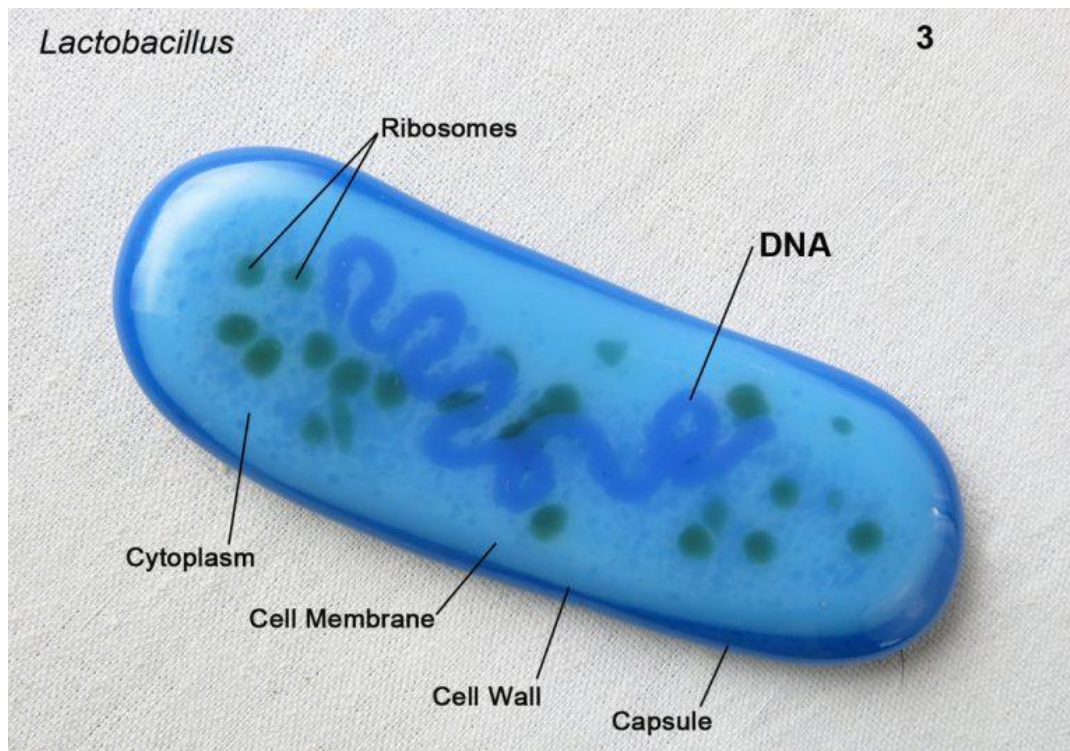
## 1.1. Rod *Lactobacillus*

Bakterije mliječno-kiselog vrenja roda *Lactobacillus* pripadaju skupini Gram-pozitivnih bakterija koje osim roda *Lactobacillus* uključuju i druge rodove poput *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. S preko 100 vrsta i podvrsta, rod *Lactococcus* predstavlja najveću skupinu unutar obitelji Lactobacillaceae. Karakterizira ih štapićast oblik, često organiziran u lance. Strogo su fermentativni i aerotolerantni, ali dobro rastu u anaerobnim uvjetima. Budući da je glavni metabolit mliječna kiselina, bakterije roda *Lactobacillus* preferiraju kisele uvjete s rasponom pH vrijednosti od 5,5 do 6,5 i temperaturni raspon od 2 do 53 °C.<sup>3</sup> Prisutne su u hrani koja obiluje ugljikohidratima (mliječni proizvodi, proizvodi od žitarica, meso i riba) koji im osiguravaju rast, međutim, moguće ih je pronaći u vodi, tlu i kanalizaciji. Dio su normalne flore usta, probavnog sustava i genitalnog trakta ljudi i životinja.<sup>2</sup> Laktobacili nemaju mogućnost stvaranja spora a za rast su im, osim ugljikohidrata, potrebne aminokiseline, peptidi, esteri masnih kiselina, soli derivati nukleinskih kiselina i vitamini.<sup>4</sup> Izvorno, grupiraju se na temelju njihove temperature rasta i fermentacije heksoza, a kasnije prema njihovom homo/heterofermentativnom potencijalu. Stoga, laktobacile dijelimo na<sup>2</sup>

- ***Obligatno homofermentativni*** – (obično se nazivaju metabolička skupina A) gotovo potpuno (85%) fermentiraju heksoze u mliječnu kiselinu putem Embden-Meyerhof-Parnasovog puta (EMP) ili glikolize. Ova skupina ne fermentira pentoze i glukonat.
- ***Fakultativno heterofermentativni*** – (metabolička skupina B) fermentiraju heksoze u mliječnu kiselinu putem EMP-a te imaju sposobnost razgradnje pentoze i glukonata putem inducibilne fosfoketolaze, koja rezultira proizvodnjom octene kiseline, etanola i mravlje kiseline pod ograničenjem glukoze.
- ***Obligatno heterofermentativni*** – (metabolička skupina C) posjeduju FDB aldolazu, ali ne i fosfoketolazu, te metaboliziraju pentoze i heksoze isključivo fosfoglukonatnim putem pri čemu proizvode mliječnu kiselinu, etanol (ili octenu kiselinu) i CO<sub>2</sub>.

Laktobacili su najopsežnije proučavani i najčešće korišteni probiotici unutar skupine bakterija mliječno-kiselog vrenja. Probiotik koristan za ljudsko zdravlje, mora ispunjavati nekoliko kriterija koji uključuju: dobra senzorska svojstva, otpornost na fage, sposobnost preživljavanja i stabilnost tijekom prerade. Također, probiotici moraju biti nepatogeni i netoksični te ne smiju nositi stečenu ili genetski zamjenjivu rezistenciju na antibiotike.<sup>3</sup> Prethodne studije ukazale su na potencijal laktobacila u promicanju općeg zdravlja, ublažavanja intolerancije na laktozu, pozitivnog djelovanja na crijevnu floru, stimulaciju imunološkog sustava te smanjenje upalnih i alergijskih reakcija. Također, čuvaju biljne ugljikohidrate homofermentacijom i konzerviraju biljne proteine deaminacijom i inhibiranjem proteolize.<sup>4</sup> Svi sojevi fermentiraju ribozu, galaktozu, D-glukozu, D-fruktozu, D-manozu, manitol, N-acetilglukozamin, amigdalín, arbutin, salicin, celebiozu, laktozu, maltozu, saharozu, trehalozu, melibiozu, melezitozu i glukonat. Zbog brojnih bioloških aktivnosti, sve se više istražuje korištenje laktobacila kao prirodnih konzervansa.

Soj *L. paraplantarum* (slika 1.) prvi put je izoliran iz piva i ljudskog izmeta u Francuskoj<sup>5</sup>, a prvi put opisan 1996. kada su Curk i sur.<sup>6</sup> uočili da sojevi slični *L. plantarum* nisu katabolizirali  $\alpha$ -metil-D-manozid. Ova vrsta je fenotipski bliska *L. plantarum* i *L. pentosus*.<sup>7</sup> *L. paraplantarum* je fakultativna heterofermentativna Gram-pozitivna bakterija u obliku štapića. Raste pojedinačno, u parovima, a ponekad i formira kratke lance. Stanice su nepokretne, katalaza negativne i fakultativno anaerobne, proizvode D-(-)- i L-(+)-mliječnu kiselinu. Raste na 15 °C (sporo) dok je, optimalna temperatura rasta između 30-37 °C. Raste u MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) mediju koji sadrži NaCl do koncentracije 8%. Kolonije uzgojene na MRS agaru su okrugle, glatke, kupolastog oblika i kremaste boje.<sup>5</sup>



*Slika 1.* Izgled stanice bakterije roda *Lactobacillus*<sup>8</sup>

## 1.2. Aktivnost *Lactobacillus paraplantarum*

Poznato je da laktobacili, pa tako i soj *L. paraplantarum*, imaju probiotičko djelovanje<sup>1,6,9,10</sup> ali i brojna druga biološka svojstva<sup>1,6</sup> što potvrđuju i brojne studije.

*L. paraplantarum* BT-11 izoliran iz bivoljeg mlijeka ima probiotički potencijal. Inhibitorna tvar slična bakteriocinu (engl. bacteriocin-like inhibitory substance, BLIS) koju proizvodi *L. paraplantarum* BT-11 pokazala je antibakterijsko djelovanje prema patogenim bakterijama *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella typhimurium*. Također, BLIS *L. paraplantarum* BT-11 inhibirao je rast *L. monocytogenes* inokulirane u goveđe meso i time je potvrđena mogućnost korištenja *L. paraplantarum* i njegovih metabolita kao prirodnih konzervansa.<sup>1</sup>



Tulini i sur.<sup>6</sup> izolirali su vrstu *L. paraplantarum* FT259 iz brazilskog polutvrđog sira. Metodom difuzije u jažicama potvrđena je antimikrobna aktivnost bakteriocina *L. paraplantarum* FT259 (spoja proteinske prirode). Uočeno je da proizvedeni bakteriocini inhibiraju rast patogene *L. monocytogenes* sa zonom inhibicije > 7cm. Kako bi potvrdili da je inhibicija uzrokovana proizvedenim bakteriocinom izolata FT259, ispitana je i osjetljivost na razgradnju proteolitičkim enzimima ( $\alpha$ -kimotripsin, proteinaza K, proteaza tipa XIV) metodom difuzije u jažicama. Budući da nije postojala zona inhibicije oko jažica koje sadrže proteolitički enzim, zaključeno je da inhibiciju rasta *L. monocytogenes* uzrokuje bakteriocin izolata *L. paraplantarum* FT259.

Endo i sur.<sup>9</sup> u svom su istraživanju izolirali soj *L. paraplantarum* D2-1 iz fermentiranog povrća. Soj se pokazao prikladnim u fermentaciji sojinog mlijeka obzirom da je njegova fermentacija uspješno provedena unutar 24 sata. Dobiveni proizvod imao je glatku teksturu, manje specifičan miris te blago-kiseli okus. Broj živih stanica *L. paraplantarum* D2-1 u sojinom mlijeku je porastao, što ukazuje na potencijal rasta i preživljavanja u fermentiranom sojinom mlijeku. Osim toga, zabilježen je i probiotički učinak soja kao i visoka sposobnost preživljavanja u umjetnom želučanom soku, svojstva adhezije sluzi te stvaranje biofilma.

Garzia-Lopez i sur.<sup>10</sup> istraživali su antimikrobnu aktivnost *L. paraplantarum* BPF2. Uočeno je da *L. paraplantarum* BPF2 proizvodi bakteriocin nazvan Leukocin K izoliran iz chorizoa (fermentirano, sušeno, dimljeno svinjsko meso). Djelovanjem spomenutog bakteriocina prema patogenim bakterijama *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *C. perfringens* dokazana je mogućnost korištenja *L. paraplantaruma* BPF2 kao prirodnog konzervansa.

### 1.3. Spojevi zaslužni za antimikrobnu aktivnost bakterija mliječno-kiselog vrenja

Za biološku aktivnost bakterija mliječno-kiselog vrenja zaslužni su različiti antimikrobni spojevi koji proizvode organske kiseline, vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), diacetil, ugljikov dioksid ( $CO_2$ ) i bakteriocine.<sup>1</sup> Jedan dio metabolita bakterija mliječno-kiselog vrenja inhibira i rast patogena koji se prenosi hranom. Antimikrobno djelovanje laktobacila povezuje se s proizvodnjom mliječne, octene, mravlje, kaprionske, propionske, maslačne i valerijanske kiseline, ali i drugih inhibicijskih tvari poput  $H_2O_2$ ,  $CO_2$ , diacetila i bakteriocina. Smanjenje količine dostupnih ugljikohidrata i stvaranje niza organskih molekula pozitivno utječe na produljenje roka trajanja prehrambenih proizvoda.<sup>11</sup>

#### 1.3.1. Organske kiseline

Laktobacili proizvode organske kiseline koje imaju nespecifične antimikrobne učinke.<sup>13</sup> Mliječna i octena kiselina smatraju se glavnim organskim kiselinama koje imaju antimikroban učinak.<sup>11</sup> Organske kiseline onemogućuju rast Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija, također su sigurne za ljudsku upotrebu. Antimikrobno svojstvo pripisuje se disociranim molekulama koje se deprotoniraju nakon ulaska u stanične membrane. Drugi uzrok je posljedica usklađenog učinka disociranih iona i ne disociranih molekula, koji rezultiraju oštećenjem bakterijskih stanica.<sup>12</sup>

### 1.3.2. Peptidi

Brojna fermentirana hrana prirodno sadrži laktobacile te posljedično i bakteriocine, koji inhibiraju rast bakterija koje su uzročnici kvarenja hrane. Bakteriocini su raznolika skupina antimikrobnih peptida. Sintetiziraju se ribosomima i mogu uništiti blisko povezane sojeve mikroba. Nemaju miris i boju te ne utječu na i senzorska svojstva hrane. Za razliku od tradicionalnih antibiotika, bakteriocini čiste probavni sustav proteolitičkim enzimima. Mehanizam djelovanja temelji se na inhibiciji sinteze DNK i/ili drugih metaboličkih procesa mikrobnog soja.<sup>12</sup>

### 1.3.3. Ostali metaboliti

Uz već navedene, laktobacili imaju sposobnost sinteze i drugih manjih molekula koje su pokazale antimikrobne učinke a to su diacetil, vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i reuterin.  $H_2O_2$  pokazao se visoko učinkovitim antimikrobnim sredstvom u sinergiji s toplinom. Antimikrobni učinak prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama uočen je kod diacetila i ruteina koji deaktivacijom ključnih enzima inhibiraju/modificiraju katalitičku aktivnost neželjenih mikroorganizama. Ova deaktivacija rezultat je djelovanja dikarbonilne skupine diacetila koja reagira s argininom u enzimima. U aerobnim uvjetima i nedostatku unutar stanične katalaze, pseudokatalaze ili peroksidaze laktobacili sintetiziraju  $H_2O_2$ . Karakteristično bakteriostatsko djelovanje  $H_2O_2$  znatno je izraženije u sirovom mlijeku stimulacijom laktiperoksidaza-tiocijatnog sustava. U prisutnosti vodikovog peroksida i laktoperoksidaze stvara se hipotiocijanatni anion, koji uzrokuje oštećenja različitih dijelova stanice bakterija poput membranskih proteina.<sup>12</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Reagensi i uređaji

#### Hranjive podloge i reagensi:

- *Fosfatni pufer (Phosphate Buffered Saline, PBS)* – u 100 mL destilirane vode otopi se 1 tableta PBS-a (*Biolife, Italija*) nakon čega se otopina sterilizira.
- *Mueller-Hinton bujon (MHB)* – u staklenoj boci 500 mL izvaže se 6,6 g MHB (*Biolife, Italija*) i 300 mL destilirane vode. Sadržaj se dobro promiješa te sterilizira u autoklavu 15 minuta pri 121 °C i tlaku od 1,2 bara.
- *Mueller-Hinton agar (MHA)* – u staklenoj boci od 500 mL izvaže se 11,4 g MHA (*Biolife, Italija*) te otopi u 300 mL destilirane vode. Sadržaj se promiješa te sterilizira u autoklavu 15 minuta pri 121 °C i tlaku od 1,2 bara.
- *De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)* – u staklenoj boci od 500 mL izvaže se 20,49 g dehidriranog medija (*Biolife, Italija*) te otopi u 300 mL destilirane vode. Sadržaj se promiješa te sterilizira u autoklavu 15 minuta pri 121 °C i tlaku od 1,2 bara.
- *De Man, Rogosa and Sharpe bujon (MRS bujon)* – u staklenoj boci od 500 mL izvaže se 16,54 g MRS bujona (*Biolife, Italija*) te otopi u 300 mL destilirane vode. Sadržaj se promiješa te sterilizira u autoklavu 15 minuta pri 121 °C i tlaku od 1,2 bara.
- *Jodonitrotetrazolijev klorid (INT, Sigma-Aldrich)* – 0,04 g reagensa otopi se u 20 mL sterilizirane bidestilirane vode. Otopina reagensa je osjetljiva na svjetlo te ju je potrebno zaštititi folijom i čuvati u hladnjaku (+4).

### Uređaji:

- Centrifuga, (Eppendorf, Centrifuge 5702, Hamburg, Njemačka)
- Inkubator (Pol Eko, Smart, Berlin, Njemačka)
- Mješalica (Tehtnica, Vibromic 313 EVT, Tehtnica, Slovenija)
- Termostatska mješalica mikrotitarskih pločica (Biosan, Plate Shaker-Termostat PST-60 HL, Riga, Latvija)
- Mikrotitarske pločice (Hamburg, Njemačka)
- Vortex mixer (Phoenix Instruments RS-VA 10, Garbsen, Njemačka)
- Autoklav (Astell AMA440, Kent, Velika Britanija)
- pH-metar (Hanna Edge HI2020-21, Velika Britanija)
- Denzitometar (DEN-1, Biosan, Riga, Latvija)



*Slika 2.* Centrifuga korištena za izdvajanje uzgojnog medija (supernatanta) od bakterijskih stanica *L. paraplantaruma* taloga (vlastita fotografija)



**Slika 3.** pH-metar korišten za mjerenje pH vrijednosti bujona prije i nakon inkubacije *L. paraplantarum* (vlastita fotografija)



**Slika 4.** Vortex korišten za homogenizaciju testiranih uzoraka bakterijskih stanica (taloga) i uzgojnog medija nakon inkubacije (supernatanta) *L. paraplantaruma* (vlastita fotografija)



**Slika 5.** Autoklav korišten u sterilizaciji hranjivih podloga (vlastita fotografija)

## **2.2. Priprema supernatanta i bakterijskog taloga *L. paraplantarum***

Revitalizacija *L. paraplantaruma* obavljena je metodom razmaza. Volumen od 100  $\mu\text{L}$  bakterijske kulture iz dubokog agara nasijan je na MRS podlogu. Nakon inkubacije, kultura je presijana u 10 mL MRS bujona u sterilne epruvete, te inkubirana 24 h na 30 °C. Nakon 24-satne inkubacije, 0,1 mL kulture dodano je 10 mL bujona te ponovo inkubirano 24 h uz stalno miješanje pri 230rpm. Nakon posljednje inkubacije bakterijska koncentracija iznosila je približno  $10^9$  CFU/mL (engl. Colony Forming Unit). S ciljem izdvajanja bakterijskih stanica iz bujona, dobivena bakterijska kultura centrifugirana je u sterilnim falkon epruvetama tijekom 5 min pri 4000rpm.



**Slika 6.** Izgled bujona s bakterijom *L. paraplantarum* prije centrifugiranja (vlastita fotografija)



**Slika 7.** Izdvojen uzgojni medij (supernatant – lijevo) i bakterijska kultura (talog - desno) *L. paraplantarum* nakon centrifugiranja (vlastita fotografija)



### **2.3. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti**

Antimikrobna učinkovitost supernatanta i bakterijskog taloga određena je metodom minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), minimalne baktericidne koncentracije (MBC) te difuzijom u jažicama (WELL).

#### ***Bakterijske kulture***

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korištene su kolonije patogenih bakterija te bakterija kvarenja, i to *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 i *Pseudomonas fragi* ATCC 4973.

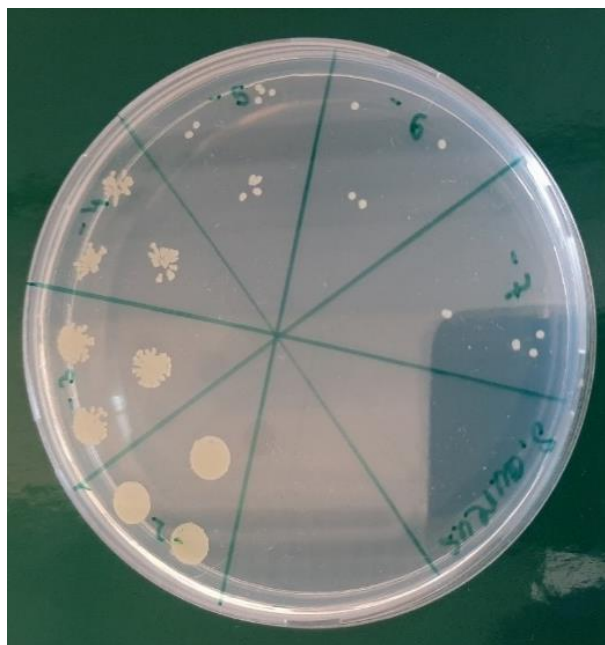
#### ***Priprema mikrobnih kultura i inokuluma***

Za pripremu prekonocne kulture, jedna bakterijska kolonija prenesena je ezom s krute podloge (MHA) u 3-5 mL bujona (MHB). Bakterijske kulture inkubirane su 14-16 h pri 37 °C (produljenje vremena inkubacije utječe na stvaranje metabolita koji usporavaju bakterijski rast). Nakon inkubacije, volumen od 3 mL prekonocne kulture dodan je u 27 mL MHB-a te inkubiran 1-1,5h (ovisno o bakteriji), pri 37 °C uz stalno miješanje od 110 rpm. Nakon inkubacije, bakterijska koncentracija određuje se denzitometrom a korištenjem krivulja rasta priprema se radni inokulum s koncentracijom bakterija  $10^5$ .

#### ***Kontrola inokuluma***

Kao potvrda koncentracije bakterijskih inokuluma korištena je metoda po Kochu.<sup>13</sup> Za određivanje bakterijske koncentracije korištenog inokuluma pripravi se do osam serija decimalnih koji se nasijavaju na hranjivi agar. Za pripravu prvog razrjeđenja, u mikro epruvete (2,0 mL, Eppendorf) pipetira se 50 µL bakterijskog inokuluma i 450 µL PBS-a te dobro promiješa. Drugo razrjeđenje pripremi se tako da se pipetira 50 µL prvog razrjeđenja

inokuluma i 450  $\mu\text{L}$  PBS te tako redom do šestog razrjeđenja. Volumen od 10  $\mu\text{L}$  nasijava se na MHA podlogu te inkubira 24 sata pri 37 °C. Pripremljena razrjeđenja nasijavaju se u tri ponavljanja. Nakon inkubacije, kolonije porasle na hranjivoj podlozi u Petrijevim posudama (slika 8.) se prebroje, a dobiveni rezultat potvrđuje broj jedinica koje formiraju kolonije (CFU) po 1 mL uzorka. Koncentracija inokuluma je potvrđena ukoliko broj kolonija ne prelazi 25 na razrjeđenju  $10^{-5}$ .

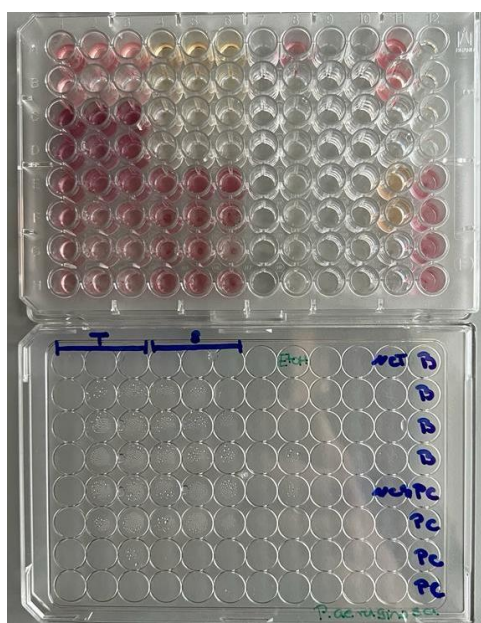


**Slika 8.** Izgled kontrole inokuluma bakterije *S. aureus* određene metodom po Kochu  
(vlastita fotografija)

### 2.3.1. Metoda određivanja minimalne inhibitorne vrijednosti (MIC)

MIC predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa koja inhibira rast mikroorganizama. Testirani bakterijski talog i supernatant razrijeđeni su korištenjem MHB tako da je udio talog ili supernatanta u razrjeđenju bio 80%. U sve otvore mikrotitarskih pločica dodano je 50  $\mu\text{L}$  MHB a potom je u prvi red otvora mikrotitarske pločice pipetirano

100  $\mu\text{L}$  pripremljenog bakterijskog taloga i supernatanta. Postupak se ponavlja sve do predzadnjeg reda mikrotatske pločice, dok se 50  $\mu\text{L}$  iz predzadnjeg reda odbaci. Pripremljeni radni inokulumi patogenih bakterija/bakterija kvarenja dodani su u sve otvore mikrotitarskih pločica u volumenu od 50  $\mu\text{L}$ . Pločice se miješaju na termostatskoj miješalici mikrotitarskih pločica te stavljaju na inkubaciju tijekom 24h pri 37 °C. Nakon inkubacije u sve otvore mikrotitarskih pločica dodano je 10  $\mu\text{L}$  INT reagensa koncentracije 2mg/mL. Nakon jedne minute miješanja na termostatskoj miješalici, svaka mikrotitarska pločica zamotana je u aluminijsku foliju (kako bi se spriječilo reagiranje INT reagensa sa svjetlom) te inkubirana 30 min pri 37 °C u mraku. MIC vrijednost se određuje kao koncentracija prisutna u pori gdje se nije stvorilo obojenje.<sup>13</sup>



**Slika 9.** Minimalna inhibitorna koncentracija uzgojnog medija (supernatanta – S) i bakterijske kulture (talog - T) *L. paraplantarum* prema bakteriji *P. aeruginosa* (vlastita fotografija)

### 2.3.2. Metoda određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

Minimalna baktericidna koncentracija (MBC)<sup>13</sup> ili minimalna fungicidna koncentracija (MFC) a također poznata i kao minimalna letalna koncentracija (MLC), najčešća je procjena baktericidne ili fungicidne aktivnosti. MBC se definira kao najniža koncentracija antimikrobnog agensa potrebna za ubijanje 99,9% konačnog inokuluma nakon inkubacije od 24 sata pod standardiziranim uvjetima rasta testnog mikroorganizma.<sup>13</sup> Koncentracija u kojoj je određena MIC vrijednost testirana je i za MBC. Iz jažice u kojoj je određena MIC otpipetirano je 10  $\mu$ L te nasijano na MHA podlogu u tri ponavljanja. Osim koncentracije koja je potvrđena za MIC vrijednost nasijano je i prethodno razrjeđenje odnosno dvostruko veća koncentracija. Koncentracija koja potvrđuje MBC vrijednost je ona u kojoj broj kolonija po kapljici, odnosno nasijavanju, ne prelazi 25.



**Slika 10.** Minimalna baktericidna koncentracija supernatanta *L.paraplantaruma* prema bakteriji *L. monocytogenes* (vlastita fotografija)

### 2.3.3. Metoda difuzije u jažicama

Cilj ove metode je odrediti inhibiciju rasta bakterija oko jažice. Ova metoda ne razlikuje baktericidne i bakteriostatske efekte s obzirom da bakterijska inhibicija rasta ne znači smrt bakterija. Metoda difuzije u jažicama izvodi se u Petrijevim zdjelicama na čvrstoj hranjivoj MHA podlozi. Na hranjivu podlogu nacjepkuje se bakterijska kultura koja ima koncentraciju bakterijskih stanica  $10^5$  CFU/mL. Nakon inokulacije i sušenja u trajanju od 2-3 minute, u agaru se buše jažice (rupice) promjera 7-8 mm. U svaku jažicu dodano je 50  $\mu$ L uzorka bakterijskog supernatanta i taloga, nakon čega se Petrijeve zdjelice stavljaju u hladnjak na 1 h kako bi se omogućilo prodiranje aktivnih komponenti iz supernatanta ili taloga u hranjivu podlogu. Pripremljene podloge inkubiraju se tijekom 24 h pri temperaturi 37 °C.

Nakon inkubacije, izmjeri se zona inhibicije bakterijskog rasta oko jažica korištenjem ravnala. Zona inhibicije  $\geq 12$  mm ukazuje na dobar inhibitorski učinak testiranog uzorka.<sup>14</sup>



**Slika 11.** Inhibicija rasta bakterije *P. fragi* uzgojnim medijom (supernatanta – S) i bakterijskom kulturom (talog - T) *L. paraplantarum* metodom difuzije u jažicama (vlastita fotografija)

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost mliječno-kiselinske bakterije *L. paraplantarum* (uzgojnog medija ili supernatanta te bakterijske kulture ili taloga) prema patogenim bakterijama i bakterijama kvarenja, korištenjem različitih antimikrobnih metoda. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 1-4.

#### 3.1. Rezultati određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

U tablici 1 prikazane su vrijednosti MIC i MBC taloga i supernatanta prema patogenim bakterijama. Obzirom da MIC vrijednosti predstavljaju minimalnu koncentraciju nekog uzorka koja može inhibirati rast i razmnožavanje bakterija, niže vrijednosti predstavljaju bolji učinak. Supernatant bakterije *L. paraplantarum* s MIC i MBC vrijednosti od 5% pokazao je najbolji antimikrobni učinak prema patogenoj bakteriji *E. faecalis*. Ovi rezultati ukazuju da koncentracija od 5% supernatanta *L. paraplantaruma*, osim što inhibira rast bakterije *E. faecalis*, ima i baktericidno djelovanje protiv iste. Supernatant *L. paraplantarum* koncentracije 20% pokazao je inhibitorni i baktericidni učinak prema bakteriji *E. coli*. Nadalje, 20%-tna koncentracija supernatanta pokazala je inhibitorni učinak na rast patogene bakterije *L. monocytogenes*, dok baktericidni učinak nije zabilježen pri koncentraciji od 40%. S druge strane, talog *L. paraplantaruma* pokazao je slabiji antimikrobni učinak prema svim testiranim patogenim bakterijama. Zabilježene MIC i MBC vrijednosti iznosile su 40% ili >40%.

**Tablica 1.** MIC i MBC vrijednosti taloga i supernatanta *L. paraplantaruma* prema patogenim bakterijama izražene u %

		<b>Talog (%)</b>	<b>Supernatant (%)</b>
<i>L. monocytogenes</i>	MIC	>40	20
	MBC	>40	40
<i>E. faecalis</i>	MIC	40	5
	MBC	40	5
<i>S. aureus</i>	MIC	>40	40
	MBC	>40	/
<i>E. coli</i>	MIC	40	20
	MBC	40	20

U tablici 2 su prikazane vrijednosti MIC i MBC taloga i supernatanta prema bakterijama kvarenja. Iz rezultata možemo zaključiti da supernatant *L. paraplantaruma* pokazuje izvrstan antimikrobni, odnosno, baktericidni, učinak prema bakteriji *P. fragi* sa inhibitornom/baktericidnom koncentracijom od samo 2,5%. Sličan učinak supernatanta *L. paraplantaruma* zabilježen je i prema bakteriji *P. aeruginose*, gdje je koncentracija supernatanta od 5% pokazala inhibitorni/baktericidni učinak. Talog *L. paraplantaruma* nije pokazao inhibitorni i baktericidni učinak prema bakterije *P fragi*, dok prema *Pseudomonas aeruginosa* pokazuje inhibiciju rasta s MIC od 20%, dok MBC vrijednost nije dokazana.

**Tablica 2.** MIC i MBC vrijednosti taloga i supernatanta *L. paraplantaruma* prema bakterijama kvarenja izražene u %

		Talog (%)	Supernatant (%)
<i>P. fragi</i>	MIC	-	2,5
	MBC	-	2,5
<i>P. aeruginosa</i>	MIC	20	5
	MBC	-	5

**Tablica 3.** Izmjerene pH vrijednosti bujona prije inkubacije i supernatanta nakon inkubacije bakterijom *L. paraplantarum*

Uzorak	pH vrijednost
MRS bujon	6,89±0,17
Supernatant (nakon 24-satne inkubacije)	5,22±0,25

S pH vrijednosti 5,22±0,25 supernatant nakon 24-satne inkubacije je blago kiseo. Zabilježene pH-vrijednosti možemo povezati sa rezultatima MIC metode budući da znamo da proizvodnja organskih kiselina snižava pH vrijednost. Možemo pretpostaviti da su upravo one nositelji antimikrobne aktivnosti supernatanta *L. paraplantaruma*. To nam potvrđuju zabilježene vrijednosti MIC-a gdje je supernatant *L. paraplantaruma* imao dobar antimikrobni učinak prema bakterijama *E. faecalis*, *P. fragi* i *P. aeruginosa*.

Kalhoru i sur<sup>1</sup> u istraživanju antimikrobne aktivnosti izolata *L. paraplantarum* BT-11 metodama MIC i MBC pokazali su da Izolat BT-11 ima dobar inhibitorski učinak prema patogenima Gram-pozitivnim bakterijama *L. monocytogenes* i *S. aureus* s MIC vrijednosti od 31,25 µg/mL. U usporedbi s rezultatima ovog završnog rada, samo je supernatant s MIC vrijednostima 20-40% pokazao inhibitorski učinak prema navedenim bakterijama, dok talog *L. paraplantaruma* nije pokazali inhibitorski učinak.



### 3.2. Rezultati određivanja metode difuzije u jažicama

Rezultati metode difuzije u jažicama taloga i supernatanta *Lactobacillus paraplantaruma* prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4.** Rezultati metode difuzije u jažicama taloga i supernatanta *Lactobacillus paraplantaruma* prema patogenim bakterijama izražene u mm

	Talog (mm)	Supernatant (mm)
<i>S. aureus</i>	-	12,1±1,41
<i>P. fragi</i>	23±1,73	25±0

Od svih testiranih patogenih bakterija te bakterija kvarenja, samo bakterije navedene u tablici 4. su pokazale inhibitorni učinak. Iz rezultata je vidljivo da talog *L. paraplantarum* nije uspio inhibirati rast Gram-pozitivne bakterije *S. aureus*. Najjači inhibitorni učinak supernatanta zabilježen je prema Gram-negativnoj bakteriji *P. fragi* sa zonom inhibicije od 25 mm. Gotovo jednako dobar inhibitorni učinak zabilježen je i za talog *L. paraplantarum* prema *P. fragi* sa zonom inhibicije od 23±1,73 mm, dok je najmanja zona inhibicije od 12,1±1,41 mm zabilježena za supernatant *L. paraplantarum* prema *S. aureus*.

Arokiyamy i Sivakumar<sup>15</sup> proveli su istraživanje usmjereno na izolaciju *Lactobacillus* spp. iz tradicionalnih mliječnih proizvoda koji se konzumiraju u Indiji (skuta, sir, maslac, mlijeko, topljeni maslac) i karakterizaciju izoliranih bakteriocina *Lactobacillus* spp. Za svih 5 bakterijskih izolata (LBC, LBL, LBB, LBH i LBF) dokazano je da su Gram-pozitivni, štapićastog oblika, katalaza negativni te da ne stvaraju spore. Za određivanje antimikrobne aktivnosti izolata korištena je metoda difuzije u jažicama. Ekstrakti pet izoliranih *Lactobacillus* vrsta inhibirali su rast patogenih bakterija: *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. typhi* i *S. dysenteriae*, te su zabilježeni promjeri inhibicije u rasponu od 9-15 mm.

Najjači inhibitorni učinak sa zonom inhibicije od 15 mm zabilježen je za ekstrakt *Lactobacillus* LBC prema *S. aureus*. Rezultati istraživanja Arokiyamy i Sivakumar<sup>15</sup> nisu usporedivi s rezultatima ovog završnog rada obzirom da talog *L. paraplantarum* nije pokazao inhibitorni učinak prema *S. aureus*.

Kalhero i sur.<sup>1</sup> ispitali su antimikrobnu aktivnost izolata *L. paraplantarum* BT-11 prema patogenim bakterijama *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* i *S. typhimurium* metodom difuzije u jažicama. Najbolji inhibitorni učinak pokazuje izolat *L. paraplantarum* BT-11 prema patogenoj bakteriji *L. monocytogenes* sa zonom inhibicije od 17,66 mm. Rezultate navedenog istraživanja nije moguće povezati s rezultatima ovog završnog rada, budući da ni talog ni supernatant nisu pokazali inhibitorni učinak prema *L. monocytogenes*.

Garcia-Lopez i sur.<sup>10</sup> su u svom istraživanju ispitali antimikrobnu aktivnost supernatanta *L. paraplantarum* BPF2 izoliranog iz andaluzijskih spontano fermentiranih kobasica. Antimikrobna aktivnost ispitana je metodom difuzije u jažicama prema patogenim bakterijama *L. monocytogenes*, *S. aureus* te *C. perfringens*. Najbolji inhibitorni učinak izoliranog soja BPF2 zabilježen je prema *L. monocytogenes* sa zonom inhibicije  $24 \pm 0,5$  mm. Dobar inhibitorni učinak uočen je i prema bakterijama *S. aureus* (zona inhibicije  $16 \pm 0,4$  mm) i *C. perfringens* (zona inhibicije  $18 \pm 0,5$  mm). Talog i supernatant *L. paraplantarum* nisu pokazali inhibitorni učinak prema *L. monocytogenes*, pa rezultati završnog rada nisu usporedivi s istraživanjem. Oba istraživanja potvrdila su dobar inhibitorni učinak supernatanta *L. paraplantarum* prema *S. aureus*.

Budući da je pregledom dostupne literature uočen jako mali broj istraživanja koji se bave određivanjem antimikrobnog učinka supernatanta *L. paraplantarum* teško je uraditi uspoređivanje rezultata, no zasigurno se može istaknuti potencijal i iznimno dobra aktivnost supernatanta.

## 4. ZAKLJUČAK

Na osnovu provedenog istraživanja i prezentiranih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

- Analizirani uzorci bakterijskog taloga i uzgojnog medija (supernatant) *L. paraplantarum* pokazali su dobru antimikrobnu aktivnost prema testiranim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.
- Najbolji antimikrobni učinak prema patogenoj Gram-pozitivnoj bakteriji *E. faecalis*, pokazao je supernatant bakterije *L. paraplantarum* s MIC i MBC vrijednosti od 5%.
- Najbolji antimikrobni učinak prema Gram-negativnoj bakteriji kvarenja *P. fragi*, pokazao je supernatant bakterije *L. paraplantarum* s MIC i MBC vrijednosti od 2,5%.
- Najbolji inhibitorni učinak supernatanta i taloga *L. paraplantarum* određen metodom difuzije u jažicama zabilježen je prema Gram-negativnoj *P. fragi* sa zonom inhibicije > 25 mm.
- Supernatant bakterije *L. paraplantarum* pokazuje izniman potencijal upotrebe u prehrambenoj industriji, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dokazala i potvrdila njegova opravdanost upotrebe kao konzervansa.

## 5. LITERATURA

1. M. S. Kalhoro, W. Visessanguan, L. T. Nguyen, A. K. Anal, Probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* BT-11 isolated from raw buffalo (*Bubalus bubalis*) milk and characterization of bacteriocin-like inhibitory substance produced, *J. Food Process Preserv* **43** (2019) 1-14, doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14015>.
2. E. Salvetti, S. Torriani, G. E. Felis, The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update, *Probiotics & Antimicro. Prot.* **4** (2012) 217-226, doi: <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8>.
3. G. Giraffa, N. Chanishvili, Y. Widyastuti, Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology, *Res. Microbiol.* **161** (2010) 480-487, doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.03.001>.
4. M. Bernardeau, M. Guguen, J. P. Vernoux, Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments, *FEMS Microbiol. Rev.* **30** (2006) 487-513, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>.
5. M. C. Curk, J. C. Hubert, F. Bringel, *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a New Species Related to *Lactobacillus plantarum*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46** (1996) 595-598, doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-595>.
6. F. L. Tulini, L. K. Winkelströter, E. C.P. De Martinis, Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese, *Anaerobe.* **22** (2013) 57-63, doi: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.06.006>.
7. S. Saito, M. Kobayashi, H. Kimoto-Nira, R. Aoki, K. Mizumachi, S. Miyata, K. Yamamoto, Y. Kitagawa, C. Suzuki, Intraspecies discrimination of *Lactobacillus paraplantarum* by PCR, *FEMS Microbiol. Lett.* **316** (2011) 70-76, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02193.x>.
8. URL: <https://www.biosciencenotes.com/lactobacillus-pathogenesis-diseases-diagnosis-prevention/> (10.05.2023.)

9. A. Endo, F. Sasaki, S. Maeno, Y. Kanasaki, Y. Hamaguchi, G. A.e Torres, S. Tomita, J. Nakagawa, In vitro and in silico characterisation of *Lactobacillus paraplantarum* D2-1, a starter culture for soymilk fermentation, *Int. J. Food. Sci. Nutr.* **69** (2018) 857-869, doi: <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1422701>.
10. J. D. García-López, C. Teso-Pérez, A. M. Martín-Platero, J. M. Peralta-Sánchez, J. Fonollá-Joya, M. Martínez-Bueno i A. Baños, *Lactiplantibacillus paraplantarum* BPF2 and *Pediococcus acidilactici* ST6, Two Bacteriocinogenic Isolated Strains from Andalusian Spontaneous Fermented Sausages, *Foods* **12** (2023) 2445, doi: <https://doi.org/10.3390/xxxxx>.
11. Z. Zalán, J. Hudáček, J. Štětina, J. Chumchalová, A. Halász, Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media, *Eur. Food. Res. Technol.* **230** (2010) 395–404, doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1179-9>.
12. S. A Ibrahim, R. D Ayivi, T. Zimmerman, S. A. Siddiqui, A. B Altemimi, H. Fidan, T. Esatbeyoglu, R. V. Bakhshayesh, Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents, *Foods*. **10** (2021) 3131, doi: <https://doi.org/10.3390/foods10123131>.
13. D. Skroza, Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveatrola u binarnim fenolnim smjesama. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015.
14. M. Balouiri, M. Sadiki, S. K. Ibnsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.* **6** (2016) 71-79, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
15. Arokiyamy i P.K. Sivakumar, Antibacterial activity of Bacterocin producing *Lactobacillus* sp., isolated from traditional milk products, India. *Curr. Bot.* **2** (2011) 5-8.