

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Domenika Gugić, Luka Han i Valentina Žuljević

**TEHNOLOŠKI I PROBIOTIČKI POTENCIJAL
BAKTERIJA *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES*
IZOLIRANIH IZ SPONTANO FERMENTIRANIH KOBASICA**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za mikrobiologiju namirnica Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirne Mrkonjić Fuka i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

POPIS KRATICA

A ₆₀₀	spektrofotometrijska apsorbancija pri valnoj duljini od 600 nanometara
BHI	moždano-srčani infuzijski medij (engl. <i>brain heart infusion agar</i>)
BMK	bakterije mliječne kiseline
CFU	broj jedinica koje tvore kolonije (engl. <i>colony forming units</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
MRS	De Man-Rogosa-Sharpe medij
p.i.	potpuna inhibicija
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
rep-PCR	lančana reakcija polimerazom repetitivnih ekstrageničkih palindromskih elemenata (engl. <i>repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction</i>)
rpm	broj okretaja u minuti (engl. <i>revolution per minute</i>)
spp.	vrsta (lat. <i>species</i>)
subsp.	podvrsta (lat. <i>subspecies</i>)
°C	stupanj Celzijusa
μl	mikrolitar
cm	centimetar
g	sila gravitacije
g	gram
h	sat
kb	kilobaza
l	litra
mol	množina tvari
mg	miligram
min	minuta
ml	mililitar
mm	milimetar
mM	milimol
nm	nanometar
pb	parovi baza
pH	negativan logaritam koncentracije vodikovih iona (H ⁺)
pmol	pikomol
U	jedinica (engl. <i>unit</i>); količina enzima koja će inkorporirati 10 nmol dNTP-a
UV	ultraljubičasti dio spektra elektromagnetskog zračenja (engl. ultraviolet)
V	volt

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Rod <i>Leuconostoc</i>	3
1.2. Primjena leukonostoka u prehrambenoj industriji	4
1.3. Probiotički potencijal roda <i>Leuconostoc</i>	4
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	6
2.1. Hipoteza	6
2.2. Opći i specifični ciljevi rada	6
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Osnovne kemikalije	8
3.2. Kompleti	8
3.3. Enzimi	8
3.4. Otopine i puferi	8
3.4.1. Fiziološka otopina (0,85 %)	8
3.4.2. McFarland standard (0,5)	9
3.4.3. PBS (phosphate-buffered saline) pufer, pH 7,2	9
3.4.4. Peptonska voda (0,1%)	9
3.4.5. Želučani sok	9
3.4.6. Duodenalni sok	9
3.5. Hranjive podloge	9
3.5.1. BHI tekuća hranjiva podloga (Brain Heart Infusion)	9
3.5.2. BHI kruta hranjiva podloga (Brain Heart Infusion)	10
3.5.3. BHI podloga obogaćena 3 % NaCl	10
3.5.4. BHI podloga obogaćena 6 % NaCl	10
3.5.5. BHI pH 4,5	10
3.5.6. BHI podloga obogaćena s 1,5 % obranog mlijeka	10
3.5.7. Obrano mlijeko (10 %)	10
3.5.8. Hranjiva podloga obogaćena sarkoplazmatskim proteinima	11
3.6. Odabir i uzgoj izolata	11
3.7. Praćenje rasta reprezentativnih izolata u različitim ekofiziološkim uvjetima	12
3.8. Metode za određivanje tehnoloških karakteristika reprezentativnih sojeva	12
3.8.1. Određivanje lipolitičke aktivnosti	12
3.8.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti	12
3.8.2.1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti na podlozi sa sarkoplazmatskim proteinima	13
3.8.2.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti na BHI krutoj hranjivoj podlozi s 1,5 % obranog mlijeka	13

3.8.3.	Određivanje sposobnosti acidifikacije	14
3.8.4.	Određivanje antimikrobne aktivnosti	14
3.9.	Određivanje probiotičkog potencijala reprezentativnih izolata	16
3.9.1.	Određivanje autoagregacije.....	16
3.9.2.	Preživljavanje u usnoj šupljini	16
3.9.3.	Preživljavanje u želucu	17
3.9.4.	Preživljavanje u duodenumu	18
3.9.5.	Statistička analiza.....	18
4.	REZULTATI.....	19
4.1.	Grupiranje izolata <i>Le. mesenteroides</i> rep-PCR metodom.....	19
4.2.	Rast reprezentativnih izolata u različitim ekofiziološkim uvjetima.....	19
4.3.	Tehnološka karakterizacija	22
4.3.1.	Lipolitička aktivnost	22
4.3.2.	Proteolitička aktivnost.....	22
4.3.3.	Acidifikacija.....	23
4.3.4.	Antimikrobna aktivnost.....	24
4.4.	Probiotički potencijal	26
4.4.1.	Autoagregacija	26
4.4.2.	Preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	26
5.	RASPRAVA	28
6.	ZAKLJUČCI.....	31
7.	ZAHVALE.....	32
8.	POPIS LITERATURE	33
9.	SAŽETAK	40
10.	SUMMARY	42
11.	PRILOZI	44

1. UVOD

Fermentacija spada u najstarije oblike konzerviranja namirnica i koristi se kako bi im se produžio vijek trajanja (Lücke, 1994). U ovaj prirodan proces uključeni su brojni složeni mikrobiološki, biokemijski i fizikalno-kemijski procesi koji značajno doprinose razvoju specifičnih kvalitativnih i organoleptičkih svojstava te utječu na sigurnost proizvoda (Hadžiosmanović i sur., 2005).

U Hrvatskoj se spontano fermentirane kobasice najčešće proizvode na malim obiteljskim gospodarstvima po tradicionalnim recepturama bez dodatka starter kultura i drugih aditiva, tako da njihova proizvodnja u potpunosti ovisi o fermentacijskoj sposobnosti autohtone mikrobiote. Mikrobiota spontano fermentiranih kobasica je iznimno složena i najvjerojatnije potječe iz mesa i ostalih sastojaka te opreme koja se koristi u proizvodnji (Stellato i sur., 2016), a uključuje korisne mikroorganizme, mikroorganizme kvarenja i potencijalne patogene (Ercolini, 2013). Obično spontano fermentirane kobasice ne predstavljaju zdravstveni rizik zbog sinteze organskih kiselina, progresivnog smanjivanja aktiviteta vode sa zrenjem i prisutnosti vrlo raznolike antagonističke mikrobiote koja uključuje bakterije mliječne kiseline (BMK) i koagulaza negativne stafilokoke (Dučić i sur., 2016). Međutim, nekoliko istraživanja je pokazalo da kontaminacija sirovina za proizvodnju kobasica mikrobiotom koja uzrokuje kvarenje ili patogenima zbog neadekvatnog odstrela divljači te obrade i skladištenja mesa, negativno utječe na mikrobiološku kvalitetu spontano fermentiranih kobasica i predstavlja povećani mikrobiološki i zdravstveni rizik (Gill, 2007; Hwang i sur., 2009; Rivera-Reyes i sur., 2017).

U posljednje vrijeme raste interes i potražnja za tradicijskim proizvodima. Tako su i spontano fermentirane kobasice prepoznate od potrošača kao visokokvalitetan proizvod specifičnih organoleptičkih svojstava te predstavljaju izvor vrijednih hranjivih tvari. Međutim, upotreba sirovina različitog porijekla, neujednačeni uvjeti obrade mesa i proizvodnje mesnih prerađevina kao i korištenje različitih dodataka mogu rezultirati proizvodima neujednačenog sastava i kvalitete upitnih organoleptičkih i mikrobioloških svojstava (Kos i sur., 2015; Markov i sur., 2013; Trichopoulou i sur., 2007). Standardizacija proizvodnje spontano fermentiranih kobasica može se postići primjenom starter ili bioprotektivnih kultura, a dodatna vrijednost ovakvih proizvoda može se postići aplikacijom probiotičkih kultura u

mesnu smjesu. Bakterije mliječne kiseline (BMK) se najčešće upotrebljavaju kao starter, bioprotektivne ili probiotičke kulture u industrijskoj proizvodnji čitavog niza fermentiranih proizvoda. Osim što predstavljaju najvažniju grupu fermentatora i proizvođača mliječne kiseline, često pozitivno utječu na organoleptička svojstva, teksturu i aromu krajnjih proizvoda (Smit i sur., 2005; Cenci–Goga i sur., 2012; Frece i sur., 2014). Ujedno, brojne vrste BMK sintetiziraju tvari s antimikrobnim djelovanjem, kao što su različite organske kiseline, bakteriocini i peptidi s antimikrobnom aktivnošću (Cleveland i sur., 2001).

Vrste roda *Leuconostoc*, naročito *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, spadaju među najčešće korištene heterofermentativne BMK u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. S obzirom da u mliječnim proizvodima više utječu na teksturu i aromu konačnih proizvoda, a manje na proizvodnju mliječne kiseline, obično se primjenjuju kao mješovite starter kulture u kombinaciji sa sojevima *Lactococcus* spp. kao glavnim producentima mliječne kiseline (Holland i Liu, 2011). Ujedno, vrste roda *Leuconostoc* imaju važnu ulogu u razvoju aroma tijekom fermentacije povrća (npr. kiselo zelje, kimči, masline) (Jung i sur., 2012), a pojedini sojevi vrste *Le. mesenteroides* pokazuju izrazita probiotička svojstva (Kekkonen i sur., 2008).

Iako uporaba *Leuconostoc* vrsta nije uobičajena u mesnoj industriji, *Le. mesenteroides* predstavlja dominantnu skupinu bakterija u spontano fermentiranim kobasicama s manje od 2,5 % natrij-klorida (Danilović i sur., 2011; Borović i sur., 2015; Žgomba Maksimović i sur., 2018). Pojedina istraživanja pokazala su da *Leuconostoc mesenteroides* čine oko 40 % BMK izoliranih iz spontano fermentiranih kobasica od mesa divljači (Žgomba Maksimović i sur., 2018). Uloga *Le. mesenteroides* u fermentaciji i zrenju kobasica nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da *Le. mesenteroides* mogu uzrokovati kvarenje mesa, razvoj neugodnih aroma, sluzi i promjenu boje (Jääskeläinen, i sur., 2013; Žgomba Maksimović i sur., 2018), ali i sudjelovati u razvoju pozitivnih organoleptičkih karakteristika fermentiranih kobasica zbog proizvodnje kiselina, produkcije bakteriocina, acetaldehida, diacetila i etanola (Danilović i sur., 2011; Wang i sur., 2018).

S obzirom na dualnu ulogu, ali i dominaciju *Le. mesenteroides* u spontano fermentiranim kobasicama, potrebno je detaljno genotipski i fenotipski okarakterizirati autohtone sojeve *Le. mesenteroides* i odrediti njihov tehnološki i probiotički potencijal prije selekcije i moguće

aplikacije kao starter, bioprotektivnih ili probiotičkih kultura za proizvodnju fermentiranih namirnica životinjskog ili biljnog podrijetla.

1.1. Rod *Leuconostoc*

Vrste roda *Leuconostoc* su Gram pozitivne, nepokretne i nesporulirajuće bakterije te se pojavljuju u obliku koka ili u obliku kratkih štapića. Fakultativno su anaerobni i mezofilni organizmi čija optimalna temperatura rasta iznosi 20 – 30°C. Rasprostranjeni su u prirodi te ih nalazimo u fermentiranim proizvodima kao što su povrće, meso i mliječni proizvodi (Holland i Liu, 2011). Tolerantni su na visoke koncentracije soli, do 7 % NaCl (de Paula i sur., 2015) te su katalaza negativni (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004). Kao i rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus*, rod *Leuconostoc* posjeduje intrinzičnu rezistenciju na vankomicin. Intrinzična rezistencija je kodirana kromosomskim genima, pa njezin transfer nije moguć (de Paula i sur., 2015).

Holland i Liu (2011) navode da rod *Leuconostoc* obuhvaća 13 heterofermentativnih vrsta bakterija, uključujući *Le. mesenteroides* (*Le. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Le. mesenteroides* subsp. *dextranicum* i *Le. mesenteroides* subsp. *cremoris*), *Le. lactis*, *Le. carnosum*, *Le. gasicomitatum*, *Le. gelidum*, *Le. fallax*, *Le. inhae*, *Le. kimchii*, *Le. citreum*, *Le. holzapfelii*, *Le. palmae*, *Le. miyukkimchii* i *Le. garlicum*.

Tijekom fermentacije sintetiziraju različite produkte koji se mogu primijeniti u prehrambenoj industriji kao poboljšivači okusa i teksture proizvoda. Razlikuju se tri tipa fermentacija koje mogu provoditi:

1. Primarna fermentacija - podrazumijeva metabolizam heksoza (glukoza i galaktoza) pri čemu nastaju laktat, etanol i CO₂ uz tvorbu ATP-a. U prisutnosti akceptora elektrona poput acetaldehida i piruvata, umjesto etanola nastaje octena kiselina i dodatna količina ATP-a. Pojedini sojevi *Le. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* i *Le. mesenteroides* subsp. *dextranicum* sintetiziraju enzim dekstransukrazu koji u prisutnosti saharoze kataliziraju stvaranje dekstrana koji doprinosi poboljšanju teksture proizvoda te pokazuje prebiotički potencijal (Holland i Liu, 2011).
2. Fermentacija citrata - podrazumijeva unos citrata u stanicu putem citrat permeaze gdje se citrat razgrađuje do acetata i oksaloacetata pomoću citrat liaze. Dekarboksilacija oksaloacetata dovodi do sinteze piruvata koji se potom reducira do laktata, a višak prelazi u acetat, diacetil, acetoin te 2,3 – butandiol (Holland i Liu, 2011).

3. Sekundarna fermentacija - podrazumijeva biosintezu aminokiselina kao nusprodukta metabolizmom citrata. Oksalacetat koji nastaje tijekom fermentacije citrata transaminacijom prelazi u aspartat. Sintetizirane aminokiseline vrste roda *Leuconostoc* koriste za svoj rast. Točan mehanizam biosinteze aminokiselina još se istražuje (Holland i Liu, 2011).

1.2. Primjena leukonostoka u prehrambenoj industriji

Bakterije roda *Leuconostoc* proizvode zanemarivu količinu mliječne kiseline. Primarno sintetiziraju spojeve koji utječu na teksturu i aromu konačnih proizvoda. Primjerice, CO₂ koji nastaje tijekom primarne fermentacije dovodi do formiranja 'sirnih očiju' u različitim tipovima sira, a diacetil, acetat i etanol su komponente okusa koje doprinose aromi namirnica poput sira i maslaca. Rod *Leuconostoc* može prevoditi diacetil u acetoin i 2,3-butandiol, što se smatra nepovoljnim budući da navedeni spojevi ne doprinose aromi namirnice. Međutim, proces se može usporiti skladištenjem namirnice pri niskim temperaturama (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004). Sintetizirani dekstran koristi se u prehrambenoj industriji kao aditiv koji povećava viskoznost, održava teksturu namirnice te doprinosi stabilnosti proizvoda i smanjenju sinereze. Ujedno, rod *Leuconostoc* fermentacijom fruktoze sintetizira manitol, niskokalorični šećer koji može zamijeniti glukozu, saharozu ili fruktozu u prehrambenim proizvodima (Hemme i Foucaud-Scheunemann, 2004).

1.3. Probiotički potencijal roda *Leuconostoc*

Probioticima se smatraju žive, nepatogene bakterije koje se unose i koloniziraju gastrointestinalni sustav čovjeka i pozitivno djeluju na probavu i imunološki sustav (FAO/WHO, 2002). Kako bi se određena bakterijska vrsta ili soj koristili kao probiotik, ne smije biti patogena, ne smije posjedovati gene za antibiotsku virulenciju, mora biti genetički stabilna i otporna na bakteriofage. Zatim, mora preživjeti u gastrointestinalnom sustavu i kolonizirati intestinalne stanice. I konačno, *in vitro* istraživanja moraju biti potvrđena *in vivo* (Reis i sur., 2012; Fontana i sur., 2015). Nekoliko istraživanja potvrdilo je probiotički potencijal pojedinih sojeva *Le. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Agarwal i Bhasin, 2003; Aswathy i sur., 2008; Tamang i sur., 2009; Shobharani i Agrawal, 2011; Allameh i sur., 2012; Seo i sur., 2012). Ujedno, pokazano je da neki sojevi *Le. mesenteroides* mogu preživjeti pri različitim koncentracijama žučnih soli. Također, pojedini sojevi mogu hidrolizirati žučne soli. Sojevi *Le. mesenteroides* koji mogu proizvoditi egzopolisaharide (EPS) lakše prijanjanju na crijevne epitelne stanice (de Paula i sur., 2015). Uz proizvodnju

EPS, hidrofobnost, agregacija i ko-agregacija pozitivno utječu na prijanjanje bakterija na epitelne stanice. Hidrofobna površina mikrobnih stanica omogućava njihovo učinkovitije prijanjanje na površinu hidrofobnih crijevnih epitelnih stanica (de Wouters i sur., 2015). Autoagregacija ili autoaglutinacija predstavlja nakupljanje bakterijskih stanica iste vrste što im omogućava preživljavanje stresnih uvjeta i formiranje biofilma. Taj proces posreduju aglutinini. Za razliku od autoagregacije, ko-agregacija je vezivanje bakterija različite vrste, što omogućava eliminaciju patogenih bakterija (Trunk i sur., 2018) ili formiranje ko-kulture *Leuconostoc-Lactococcus* (Hemme i sur., 2004). Također, sinteza antimikrobnih tvari poput bakteriocina, etanola, vodikovog peroksida i organskih kiselina suzbija rast patogenih mikroorganizama te održava optimalnu ravnotežu unutar gastrointestinalnog sustava (de Paula i sur., 2015). Većina bakteriocina koje sintetiziraju ima inhibitorno djelovanje na *Listeria monocytogenes*. Pojedini su bakteriocini pokazali antimikrobno djelovanje na Gram-negativne bakterije poput *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* te na neke Gram-pozitivne bakterije poput *Bacillus cereus* te *Staphylococcus aureus* (de Paula et al., 2015).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

2.1. Hipoteza

Spontano fermentirane kobasice izrazito su složene i bogat ekosustav u kojem dominiraju korisne bakterije poput bakterija mliječne kiseline (BMK). Stoga je pretpostavka ovog istraživanja da spontano fermentirane kobasice predstavljaju izvrstan izvor BMK kao što je *Leuconostoc mesenteroides* koje bi, nakon detaljne karakterizacije i selekcije, mogli biti primijenjeni kao starter, bioprotektivne ili probiotičke kulture u tradicijskoj ili industrijskoj proizvodnji fermentiranih namirnica životinjskog ili biljnog podrijetla.

2.2. Opći i specifični ciljevi rada

Opći cilj ovog istraživanja je detaljno okarakterizirati autohtone sojeve *Le. mesenteroides* izolirane iz tradicijskih, spontano fermentiranih kobasica od divljači, kako bi se selektirali sojevi s potencijalnom primjenom u proizvodnji fermentiranih namirnica, ali i dao doprinos u razrješavanju uloge *Le. mesenteroides* u fermentaciji i zrenju kobasica. U tu svrhu, potrebno je istražiti sposobnost rasta u različitim ekofiziološkim uvjetima, odrediti tehnološki potencijal koji uključuje sposobnost lipolize, proteolize, acidifikacije i antimikrobnu aktivnost te probiotički potencijal, uključujući sposobnost autoagregacije i *in vitro* sposobnost preživljavanja u gastrointestinalnom traktu.

Specifični ciljevi rada su:

1. Ispitati sposobnost rasta sojeva *Le. mesenteroides* u različitim ekofiziološkim uvjetima.
2. Odrediti lipolitičku, proteolitičku i acidifikacijsku aktivnost sojeva *Le. mesenteroides*.
3. Ispitati antimikrobnu aktivnost sojeva *Le. mesenteroides* prema najčešćim patogenima u hrani: *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Brochotrix termospachta* (LMG 17208), *Weissella viridescens* (DSM 20410), *Bacillus cereus* (DSM 6791), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231).

4. Ispitati probiotički potencijal sojeva *Le. mesenteroides* uključujući autoagregacijski potencijal i sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Osnovne kemikalije

- agar (Biolife, Italija)
- agaroza (Lonza, SAD)
- barijev klorid (BaCl_2) (Kemig, Hrvatska)
- dinatrij fosfat (Sigma Aldrich, Njemačka)
- glukoza (VWR Chemicals, Belgija)
- kalcijev klorid (CaCl_2) (Fluka™, Njemačka)
- kalij klorid (KCl) (Emsure, Njemačka)
- klorovodična kiselina (HCl) (VWR Chemicals, Belgija)
- monokalij fosfat (Sigma Aldrich, Njemačka)
- natrij hidroksid (NaOH) (Kemig, Hrvatska)
- natrijev klorid (VWR Chemicals, Belgija)
- sulfatna kiselina (H_2SO_4) (Kemig, Hrvatska)
- Triton X-100 (Fluka™, Njemačka)
- Tris baza (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Tween-80 (Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.2. Kompleti

- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, SAD)

3.3. Enzimi

- pepsin (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- lizozim (Sigma-Aldrich, Njemačka)

3.4. Otopine i puferi

3.4.1. Fiziološka otopina (0,85 %)

Fiziološka otopina (0,85 %) je pripremljena suspendiranjem 0,85 g natrijevog klorida u 1000 ml destilirane vode. Dobivena je sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

3.4.2. McFarland standard (0,5)

McFarland standard 0,5 je pripremljen miješanjem 1,175 % 0,05 ml barijevog klorida i 9,95 ml 1 % sulfatne kiseline. Turbiditet ovako pripremljene smjese odgovara zamućenju koje odgovara brojnosti bakterija od $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

3.4.3. PBS (phosphate-buffered saline) pufer, pH 7,2

PBS pufer je pripremljen suspendiranjem 3,7 g natrijevog klorida, 0,09 g kalijevog klorida, 0,57 g dinatrijevog fosfata, te 0,05 g monokalijevog fosfata u 250 ml destilirane vode. pH pufera namješten je na 7,2 dodavanjem 5M NaOH. Volumen otopine je dopunjen do 400 ml. Dobivena otopina je sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

3.4.4. Peptonska voda (0,1%)

Peptonska voda (0,1 %) je pripremljena resuspendiranjem 2,5 g peptona (Biolife, Italija) u 10 ml destilirane vode. Dobivena otopina u autoklavu na temperaturi od 121° C kroz 15 min.

3.4.5. Želučani sok

Želučani sok korišten u ovom istraživanju pripremljen je suspendiranjem 0,3 % pepsina u 0,50 % natrijevog klorida u destiliranoj vodi. pH otopine želučanog soka prilagođena je na pH 2,5 pomoću 1 M HCl. Otopina želučanog soka je sterilno filtrirana pomoću 0,22 µm filtera.

3.4.6. Duodenalni sok

Duodenalni sok korišten pripremljen je miješanjem 0,4 % otopine žučnih soli i 0,2 % pankreatitične otopine (Sigma-Aldrich, Njemačka). Otopina duodenalnog soka je sterilno filtrirana pomoću 0,22 µm filtera.

3.5. Hranjive podloge

3.5.1. BHI tekuća hranjiva podloga (Brain Heart Infusion)

BHI (Biolife, Italija) tekuća hranjiva podloga je pripremljena otapanjem 37 g BHI hranjive podloge u 1000 ml destilirane vode i sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

3.5.2. BHI kruta hranjiva podloga (Brain Heart Infusion)

Kruti BHI (Biolife, Italija) je pripremljen kao što je opisano u Odjeljku 3.5.1. uz dodatak 15 g agara (Biolife, Italija). Nakon dodavanja agara podloga je sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

3.5.3. BHI podloga obogaćena 3 % NaCl

Osnovna tekuća BHI podloga (Biolife, Italija) napravljena je kao što je opisano u Odjeljku 3.5.1. uz dodatak 30 g NaCl (Biolife, Italija) i sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

3.5.4. BHI podloga obogaćena 6 % NaCl

Osnovna tekuća BHI podloga (Biolife, Italija) napravljena je kao što je opisano u Odjeljku 3.5.1. uz dodatak 60 g NaCl (Biolife, Italija) i sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

3.5.5. BHI pH 4,5

Osnovna tekuća BHI podloga (Biolife, Italija) napravljena je kao što je opisano u Odjeljku 3.5.1., a pH podloge namješten je na 4,5 pomoću 1M HCl i sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 121 °C kroz 15 min.

3.5.6. BHI podloga obogaćena s 1,5 % obranog mlijeka

Osnovna kruta BHI podloga (Biolife, Italija) napravljena je kao što je opisano u Odjeljku 3.5.2. uz dodatak 15 g obranog mlijeka (Biolife, Italija) i sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 115 °C kroz 15 min.

3.5.7. Obrano mlijeko (10 %)

Obrano mlijeko (Biolife, Italija) je pripremljeno otapanjem 10 g obranog mlijeka u 100 ml destilirane vode i sterilizirana u autoklavu pri temperaturi od 115 °C kroz 15 min.

3.5.8. Hranjiva podloga obogaćena sarkoplazmatskim proteinima

Hranjiva podloga obogaćena sarkoplazmatskim proteinima je pripremljena prema Fadda i sur. (2010). Smjesa 60 g svinjskog mesa i 600 ml fosfatnog pufera (20 mM, pH 7,4) je homogenizirana u homogenizatoru Stomacher® 400 Circulator (Seward Medical, Engleska) kroz 8 minuta. Otopina je centrifugirana 20 min pri 11180 x g i 4 °C kako bi se precipitirali netopivi proteini i vezivno tkivo. pH supernatanta sa sarkoplazmatskim proteinima namješten je na 6,5 pomoću 1 M NaOH, dodana mu je otopina glukoze u konačnoj koncentraciji 1 % te je filtriran kroz Whatman filter. Neposredno prije upotrebe otopini sarkoplazmatskih proteina dodan je sterilan Tween-80 u konačnoj koncentraciji 0,01 %.

Sarkoplazmatski medij je pripremljen dodavanjem ekstrakta proteina u konačnoj koncentraciji od 1 mg/ml sterilnom mediju koji sadrži tripton, ekstrakt kvasaca, glukozu i agar (Mauriello i sur., 2002).

3.6. Odabir i uzgoj izolata

Svi istraživani izolati *Le. mesenteroides* prikupljeni su iz tradicionalnih, spontano fermentiranih kobasica od mesa divljači, identificirani i sigurnosno karakterizirani na temelju molekularno-bioloških metoda u okviru prijašnjih istraživanja (Žgomba Maksimović i sur., 2018). Reprezentativni izolati su odabrani na temelju rezultata rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic PCR*) analize. Dobiveni rep-PCR obrasci analizirani su pomoću računalnog programa BioNumerics 7.6.1. (Applied Maths, Belgija). Sličnost izolata određena je pomoću Dice koeficijenta. Dendrogram je kreiran na temelju UPGMA (engl. *Unweight Paired Group Arithmetic Average*) algoritma gdje je dopuštena toleranca iznosila 1 % i optimizacija 0,5 %.

Reprezentativni izolati *Le. mesenteroides*: MSE_92, LV_96, LV_27, MRS_532, MRS_506, LV_2, MRS_602, MRS_605, MSE_317, LV_116, MRS_104, MSE_349 i MRS_120 pročišćeni su do monokulture metodom iscrpljenja na krutoj BHI podlozi (Biolife, Italija). Podloge su anaerobno inkubirane pri temperaturi od 30 °C tijekom 48 h. Nakon inkubacije, po jedna kolonija za svaki izolat je sterilno naciepljena u 2 ml tekuće BHI podloge i anaerobno inkubirana pri temperaturi od 30 °C preko noći. Kulture su potom precijepljene na krute BHI podloge i anaerobno inkubirane 48 h pri 30 °C. Izrasle kolonije predstavljaju pročišćene monokulture i korištene su za ispitivanje rasta u različitim ekofiziološkim uvjetima, određivanje tehnoloških karakteristika i probiotičkog potencijala.

3.7. Praćenje rasta reprezentativnih izolata u različitim ekofiziološkim uvjetima

Za praćenje rasta u različitim ekofiziološkim uvjetima korištena je tekuća BHI, osnovna podlogu za uzgoj leukonostoka kojoj je dodan NaCl u konačnoj koncentraciji od 3 i 6 % u podlozi, odnosno tekući BHI pH 4,5 gdje je pH namješten pomoću 1 M HCl (Odjeljci 3.5.1.; 3.5.3. – 3.5.5.). Nekoliko kolonija pročišćenih do monokulture (Odjeljak 3.6.) sterilno je preneseno u 2 ml fiziološke otopine (0,85 % NaCl) do postizanja zamućenosti koja odgovara zamućenosti 0,5 McFarland standarda. Po 20 µl tako pripremljene suspenzije stanica svakog izolata nacjepljen je u duplikatima u 280 µl BHI s 3 % NaCl, BHI s 6 % NaCl, BHI pH 4,5 i BHI. Podloge su inkubirane pri 12 i 25 °C. Rast reprezentativnih izolata praćen je mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 630 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča (EL800, BioTek Instruments, Winooski, VT, SAD) nakon 24 i 48 h.

3.8. Metode za određivanje tehnoloških karakteristika reprezentativnih sojeva

3.8.1. Određivanje lipolitičke aktivnosti

Reprezentativni izolati za određivanje lipolitičke aktivnosti uzgojeni su kao što je opisano u Odjeljku 3.6.. Nakon inkubacije, nekoliko nasumično odabranih kolonija sterilno je preneseno u 2 ml fiziološke otopine (0,85 % NaCl) do postizanja zamućenosti koja odgovara zamućenosti 0,5 McFarland standarda. Alikvot od 10 µl tako pripremljene bakterijske suspenzije nanešeno je u duplikatima na celulozni disk (Biorad, SAD) koji je prethodno apliciran na tributirin agar (Sigma-Aldrich, Njemačka) te je 2 µl bakterijske suspenzije inokulirano je u duplikatima izravno u tributirin agar. Kao pozitivna kontrola korišten je *Pseudomonas fluorescens* (WCS 417r). Ploče su inkubirane anaerobno tijekom 72 h pri temperaturi od 30 °C. Lipolitička aktivnost je određena mjerenjem promjera čistih zona oko celuloznih diskova, uključujući i promjer diska, odnosno promjera čistih zona oko mjesta izravne aplikacije bakterijske suspenzije. Rezultati su izraženi u mm i prikazani kao srednja vrijednost promjera zone razgradnje tributirina.

3.8.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti

Proteolitička aktivnost reprezentativnih sojeva je određena na dva načina, na krutoj BHI hranjivoj podlozi obogaćenoj s 1,5 % obranog mlijeka (Biolife, Italija) i na podlozi koja sadrži sarkoplazmatske proteine.

3.8.2.1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti na podlozi sa sarkoplazmatskim proteinima

Hranjiva podloga sa sarkoplazmatskim proteinima je pripremljena prema Fadda i sur. (2010). Smjesa 60 g svinjskog mesa i 600 ml fosfatnog pufera (20 mM, pH 7,4) je homogenizirana u homogenizatoru Stomacher® 400 Circulator (Seward Medical, Engleska) kroz 8 minuta. Otopina je centrifugirana 20 min pri 11180 x g i 4 °C kako bi se precipitirali netopivi proteini i vezivno tkivo. pH supernatanta sa sarkoplazmatskim proteinima namješten je na 6,5 pomoću 1 M NaOH, dodana mu je otopina glukoze u konačnoj koncentraciji 1 % te je filtriran kroz Whatman filter. Neposredno prije upotrebe otopini sarkoplazmatskih proteina dodan je sterilan Tween-80 u konačnoj koncentraciji 0,01 %.

Sarkoplazmatski medij je pripremljen dodavanjem ekstrakta proteina u konačnoj koncentraciji od 1 mg/ml sterilnom mediju koji sadrži tripton, ekstrakt kvasaca, glukozu i agar (Mauriello i sur., 2002) (Odjeljak 3.5.8.). Volumen od 25 ml medija sterilno je izliven u petrijevke. Nakon polimerizacije u podlozi su izbušeni bunarčići promjera 6 mm. Reprezentativni izolati pripremljeni kao što je opisano u Odjeljku 3.6. su inokulirani u 2 ml tekućeg BHI i inkubirani pri 30 °C preko noći. Alikvot od 70 µl prekonoćne kulture pojedinog izolata je inokuliran u bunarčiće u duplikatima. Ploče su anaerobno inkubirane 48 h pri 30 °C. Nakon inkubacije, agar je izvađen iz petrijevih posuda te bojan 5 min otopinom koja sadrži 50 ml Brilliant Blue R razrijeđenog u metanolu (0,05 %), 10 ml octene kiseline, 40 ml destilirane vode. Gelovi su odbojani u otopini koja sadrži 25 ml metanola, 5 ml octene kiseline i 70 ml destilirane vode.

Proteolitička aktivnost je određena mjerenjem promjera zona razgradnje oko jažica. Rezultati su izraženi u mm i prikazani kao srednja vrijednost promjera zone razgradnje. Bakterijski soj *Pseudomonas fluorescens* WCS 417r je korišten kao pozitivna kontrola.

3.8.2.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti na BHI krutoj hranjivoj podlozi s 1,5 % obranog mlijeka

Proteolitička aktivnost je dodatno testirana i na BHI agaru obogaćenom obranim mlijekom u konačnoj koncentraciji 1,5 % (Biolife, Italija). Uzgoj reprezentativnih izolata i određivanje njihove proteolitičke aktivnosti je provedeno na isti način kao i određivanje lipolitičke aktivnosti (Odjeljak 3.8.1.), gdje je umjesto tributin agara korišten BHI agar obogaćen

obranim mlijekom. Za pozitivnu kontrolu je korišten soj *Pseudomonas fluorescens* WCS 417r.

3.8.3. Određivanje sposobnosti acidifikacije

Jedna kolonija reprezentativnih izolata uzgojena je kao što je opisano u Odjeljku 3.6. te je inokulirana u 10 µl sterilnog liofiliziranog mesnog medija (Baruzzi i sur., 2006) u dva ponavljanja. Inokulirani medij je anaerobno inkubiran pri 30 °C.

Acidifikacijska sposobnost reprezentativnih izolata je mjerena nakon 24 h i 7. dana. Nakon svakog mjerenja elektroda pH-metra (InPro® 3030, Metter Toledo, Greifensee, Švicarska) je sterilizirana s 3 % HCl i isprana sterilnom destiliranom vodom. Sposobnost acidifikacije je izražena kao promjena pH vrijednosti tijekom vremena prema formuli [1] (Jamaly i sur., 2010).

$$\Delta\text{pH} = \text{pH (krajnja vrijednost)} - \text{pH (početna vrijednost)} \dots\dots\dots [1]$$

3.8.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Ispitana je antimikrobna aktivnost reprezentativnih izolata prema sedam potencijalnih patogena ili mikroorganizama kvarenja (*Brochotrix thermospachta* (LMG 17208), *Weissella viridescens* (DSM 20410), *Bacillus cereus* (DSM 6791), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231)) prema Doming i sur. (2014). Reprezentativni izolati su uzgojeni u 10 ml tekuće BHI (Biolife, Italija) tijekom 24 h pri 30 °C. Pomoću sterilnog vatenog štapića umočenog u tekuću kulturu reprezentativnih izolata povučene su dvije paralelne crte međusobno udaljene 20 mm na sredini krute BHI podloge (Biolife, Italija). Ploče su inkubirane anaerobno, 24 h pri 30° C. Istovremeno indikatorske bakterije su naciepljene u 2 ml tekućeg BHI (Biolife, Italija) i inkubirane 24 h na 30 °C (*Brochotrix thermospachta*, *Weissella viridescens*, *Bacillus cereus*) i 37 °C (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*). Ukupno je 5 µl indikatorskih bakterija naciepljeno na svaku krutu BHI podlogu između kolonija reprezentativnih izolata i na rub svake podloge. Ploče su inkubirane tijekom 48 h pri prethodno navedenim temperaturama optimalnim za rast indikatorskih bakterija. Svaki reprezentativni izolat testiran je u duplikatima. Antimikrobna aktivnost je procijenjena

na temelju razlike između promjera kolonije indikatorske bakterije narasle između reprezentativnih izolata i promjera kontrolne kolonije nacijepljene na rubu petrijevke (Tablica 3.1.).

Tablica 3.1. Procjena antimikobne aktivnosti ispitivanih izolata na temelju razlike između promjera kolonije indikatorske bakterije i kontrolne kolonije.

Razlika između promjera kolonije indikatorske bakterije i promjera kontrolne kolonije	Interpretacija
< 1 mm	nema inhibicije (-)
1 -2 mm	slaba inhibicija (+)
2 – 4 mm	izražena inhibicija (++)
> 4 mm	vrlo jaka inhibicija (+++)
nema rasta	potpuna inhibicija (p.i.)

3.9. Određivanje probiotičkog potencijala reprezentativnih izolata

3.9.1. Određivanje autoagregacije

Autoagregacijski test proveden je prema Del Re i sur. (2000). Reprezentativni izolati nacijepljeni su u 2 ml tekućeg BHI (Biolife, Italija), te inkubirani u anaerobnim uvjetima pri 30 °C. Prekonoćne kulture su centrifugirane 15 min pri 10 000 x g/25 °C, nakon čega je uklonjen supernatant, a bakterijski pelet je opran i resuspendiran u 1xPBS puferu pH 7,2 do zamućenja koje odgovara zamućenju 0,5 Mc Farland standarda. Suspenzije su potom inkubirane pri sobnoj temperaturi. Absorbancija je mjerena spektrofotometrijski (Perkin Elmer Lambda 11 UV/VIS, SAD) pri 600 nm nakon 3 i 5 h. Za svaki izolat mjerena je absorbancija, u tri ponavljanja, gornjeg sloja suspenzije i absorbancija ukupne bakterijske suspenzije. Autoagregacijska sposobnost prikazana je kao postotak i računa se prema formuli [2] (Del Re i sur., 2000):

$$\text{Autoagregacija (\%)} = 1 - (A_{\text{gornja suspenzija}} / A_{\text{ukupna bakterijska suspenzija}}) \times 100 \dots \dots \dots [2]$$

gdje je $A_{\text{gornja suspenzija}}$ apsorbancija gornjeg sloja suspenzije mjerena pri 600 nm nakon $t=3$ h i $t=5$ h, a $A_{\text{ukupna bakterijska suspenzija}}$ absorbancija ukupne bakterijske suspenzije.

Reprezentativni izolati su na temelju % autoagregacije klasificirani u izolate koji jako (% autoagregacije nakon 1 h > 30), slabo (10 < % autoagregacije nakon 1 h > 30) ili uopće ne autoagregiraju (% autoagregacije nakon 1 h < 10) (Miljković i sur., 2015).

3.9.2. Preživljavanje u usnoj šupljini

Preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima koji vladaju u usnoj šupljini proveden je prema Morandi i sur. (2013). Prekonoćne kulture su uzgojene u 2 ml 10 % obranog mlijeka i

razrijeđene u PBS puferu (1x, pH=7,2) u omjeru 1:10. Tako pripremljene kulture su razrijeđene 10^{-1} do 10^{-7} i 100 μ l odgovarajućeg razrjeđenja je inokulirano na čvrstu BHI podlogu u 2 ponavljanja. Inokulirane podloge su inkubirane u anaerobnim uvjetima pri temperaturi od 30 °C stupnjeva, tijekom 72 h. Dobiveni CFU (engl. *colony forming unit*) predstavlja inicijalni broj bakterija.

Prekonoćnim kulturama razrijeđenim u PBS puferu (1x, pH=7.2) u omjeru 1:10 dodan je lizozim (Sigma-Aldrich) u konačnoj koncentraciji 100 mg/l, te su inkubirane pri temperaturi od 37 °C tijekom 5 min. Kulture su potom razrijeđene 10^{-1} do 10^{-7} . Po 100 μ l odgovarajućeg razrjeđenja je inokulirano na čvrstu BHI podlogu u 2 ponavljanja. Inokulirane podloge su inkubirane u anaerobnim uvjetima pri temperaturi od 30 °C stupnjeva tijekom 72 h. Tako dobiveni CFU predstavlja broj bakterija koje su preživjele digestiju lizozimom. Postotak preživljavanja izračunat je prema formuli [3].

Preživljavanje (%) = broj bakterija nakon digestije/inicijalni broj bakterija · 100.....[3]

3.9.3. Preživljavanje u želucu

Sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima želuca analizirana je prema Doleyres i sur. (2004). Reprezentativni izolati uzgojeni su u 2 ml tekuće BHI preko noći, u anaerobnim uvjetima pri temperaturi od 30 °C. Prekonoćne kulture su potom centrifugirane tijekom 10 min pri 10 000 x g/25 °C. Tako dobiven stanični pelet dva puta je opran u 0,1 % peptonskoj vodi i resuspendiran u 100 μ l 0,1 % peptonske vode. Tako dobivena suspenzija razrijeđena je 10^{-1} do 10^{-7} i 100 μ l odgovarajućeg razrjeđenja je inokulirano na čvrstu BHI podlogu u 2 ponavljanja. Podloge su inkubirane anaerobno pri temperaturi od 30 °C tijekom 72 h. Tako dobiveni CFU (engl. *colony forming unit*) predstavlja inicijalni broj bakterija. Kako bi simulirali uvjete koji vladaju u želucu pripremljena je otopina želučanih sokova (0,5 % NaCl, 0,3 % pepsin, pH 2,5) kao što je opisano u odjeljku 3.4.5.. U 270 μ l otopine želučanih sokova dodano je 30 μ l bakterijske suspenzije reprezentativnog izolata. Tretirani uzorci inkubirani su pri temperaturi od 37 °C tijekom 30 min. Tretirani uzorci su potom serijski razrijeđeni 10^{-1} do 10^{-6} i 100 μ l odgovarajućeg razrjeđenja inokulirano je na čvrstu BHI podlogu u 2 ponavljanja. Inokulirane podloge su inkubirane u anaerobnim uvjetima pri temperaturi od 30 °C tijekom 72 h. Tako dobiveni CFU predstavlja broj bakterija koje su preživjele digestiju želučanim sokovima. Postotak preživljavanja izračunat je prema formuli [3] (Odjeljak 3.9.2.).

3.9.4. Preživljavanje u duodenumu

Sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima duodenuma analizirana je prema Doleyres i sur. (2004) kao što je opisano u Odjeljku 3.9.3. uz manje preinake. Umjesto otopinom želučanih sokova, bakterijske suspenzije reprezentativnog izolata tretirane su otopinom duodenalnih sokova (0,4 % žučne soli, 0,2 % pankreatična otopina) koja je pripremljena kao što je opisano i odjeljku 3.4.6.. Postotak preživljavanja izračunat je prema formuli [3] (Odjeljak 3.9.2.).

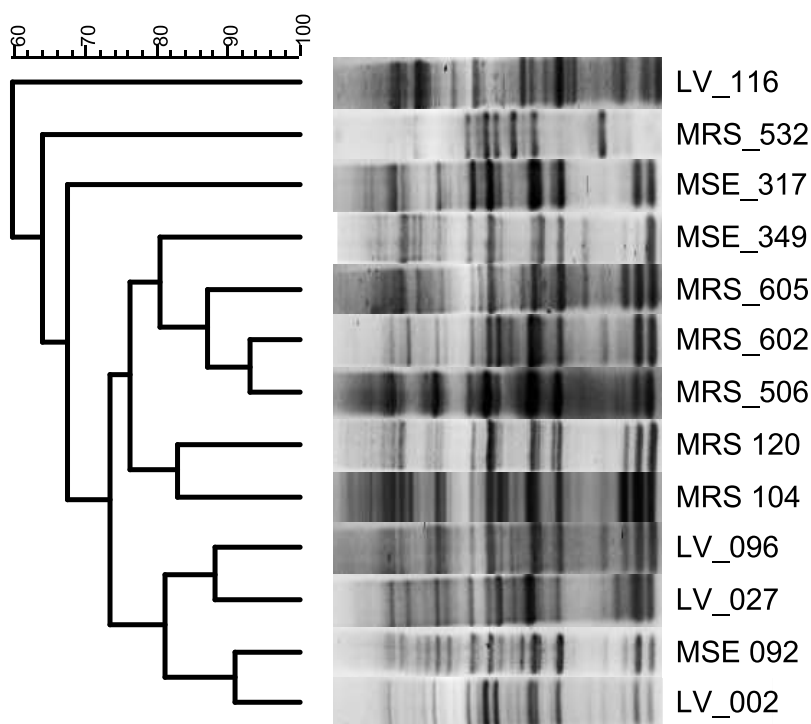
3.9.5. Statistička analiza

Za testiranje značajnosti autoagregacije i preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava korištena je dvofaktorska analiza varijance ANOVA (engl. *two-way ANOVA*), a za višestruko uspoređivanje Tukey HSD test. Razina statističke značajnosti (p) postavljena je na $p < 0,05$. Podaci su analizirani u računalnom programu Microsoft Excel 2016 pomoću dodatka Analysis ToolPak.

4. REZULTATI

4.1. Grupiranje izolata *Le. mesenteroides* rep-PCR metodom

Tijekom prijašnjih istraživanja prikupljena su 259 izolata *Le. mesenteroides* koji su grupirani na temelju rep-PCR obrazaca. U pojedinačnu grupu svrstani su izolati koji pokazuju više od 90 % sličnosti. Na temelju ovih parametara razlikuju se 22 grupe koje su sadržavale više od jednog izolata. Po jedan reprezentativan izolat iz svake grupe odabran je za sigurnosnu karakterizaciju. Od toga, 13 reprezentativnih izolata ocijenjeno sigurnima za primjenu u namirnicama (Žgomba Maksimović i sur., 2018), te su odabrani za tehnološku karakterizaciju i procjenu probiotičkog potencijala. Slika 4.1. prikazuje dendrogram izolata odabranih za ovo istraživanje.



Slika 4.1. rep-PCR obrasci reprezentativnih izolata *Le. mesenteroides* uključenih u ovo istraživanje. Dendrogram je konstruiran pomoću računalnog programa BioNumerics 7.6.1. (Applied Maths, Belgija), na temelju sličnost izolata izračunate pomoću Dice koeficijenta i UPGMA (engl. Unweight Paired Group Arithmetic Average) algoritma uz dopuštenu tolerancu od 1 % i optimizaciju 0,5 %.

4.2. Rast reprezentativnih izolata u različitim ekofiziološkim uvjetima

U ovom istraživanju ispitana je sposobnost rasta odabranih izolata *Le. mesenteroides* u različitim ekofiziološkim uvjetima (Tablice 4.1. i 4.2.). U odnosu na kontrolu izolati MRS_532, MSE_92, MRS_120 i MRS_104 dobro rastu pri 3 i 6 % NaCl pri 25 °C, dok

ostali izolati loše rastu ili uopće ne rastu u istim uvjetima. Pri pH 4,5 i 25 °C svi ispitivani izolati loše rastu u prva 24 h i počinju rasti tek nakon 48 h.

Rast većine ispitivanih izolata izostaje ili je vrlo slab pri 12 °C bez obzira na ostale uvjete inkubacije. Iznimka su izolati MRS_532, MSE_92, MRS_120 i MRS_104 koji pokazuju umjereni rast u prisutnosti 3 % NaCl-a na 12 °C.

Tablica 4.1. Rast izabranih izolata u različitim ekofiziološkim uvjetima nakon 24 h.

	12 °C				25 °C			
	3 % NaCl	6% NaCl	pH=4,5	BHI	3 % NaCl	6% NaCl	pH=4,5	BHI
MRS_532	+	+	+	+	+++	+++	+	+++
MSE_92	+	-	-	+	+++	+++	+	+++
MRS_120	+	-	-	+	+++	+++	+	+++
MRS_104	+	-	-	+	+++	+++	+	+++
MSE_349	+	-	+	+	++	++	++	+++
MSE_317	+	-	-	+	++	-	+	+++
LV_116	+	-	-	+	+++	+	+	+++
LV_96	-	-	-	+	++	+	+	+++
LV_27	-	-	-	+	++	-	+	++
LV_2	-	-	-	+	++	+	+	++
MRS_602	-	-	-	+	++	+	+	++
MRS_506	-	-	-	+	++	+	+	++
MRS_605	-	-	+	+	+	-	+	++

Rast izolata procjenjen je na temelju absorbance izmjerene pri 630 nm gdje je:

Abs₆₃₀ 0,000 – 0,070: - = nema rasta

Abs₆₃₀ 0,071 – 0,200: + = slab rast

Abs₆₃₀ 0,200 – 0,400: ++ = umjeren rast

Abs₆₃₀ 0,400 – 1,000: +++ = vrlo jak rast

Tablica 4.2. Rast izabranih izolata u različitim ekofiziološkim uvjetima nakon 48 h.

	12 °C				25 °C			
	3 % NaCl	6% NaCl	pH=4,5	BHI	3 % NaCl	6% NaCl	pH=4,5	BHI
MRS_532	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++
MSE_92	++	+	+	++	+++	+++	++	+++
MRS_120	++	+	-	+++	+++	+++	++	+++
MRS_104	+++	+	-	+++	+++	+++	++	+++
MSE_349	+	-	+	+++	++	++	++	+++
MSE_317	+	+	+	++	++	+	++	+++
LV_116	++	+	-	++	+++	++	+	+++
LV_96	+	-	+	+	+++	++	++	+++
LV_27	+	-	+	+	++	+	++	+++
LV_2	+	-	+	++	++	++	++	+++
MRS_602	+	-	+	+	+++	++	++	+++
MRS_506	+	-	+	++	++	++	++	+++
MRS_605	-	-	+	+	++	-	++	+++

Rast izolata procjenjen je na temelju absorbance izmjerene pri 630 nm gdje je:

Abs₆₃₀ 0,000 – 0,070: - = nema rasta

Abs₆₃₀ 0,071 – 0,200: + = slab rast

Abs₆₃₀ 0,200 – 0,400: ++ = umjeren rast

Abs₆₃₀ 0,400 – 1,000: +++ = vrlo jak rast

4.3. Tehnološka karakterizacija

4.3.1. Lipolitička aktivnost

Svi istraživani sojevi, osim MRS_104, pokazali su lipolitičku aktivnost (Tablica 4.3.). Izmjerene zone lipolitičke aktivnosti metodom difuzije diska u agaru kreću se od 7,25 mm do 8,50 mm. Najveću lipolitičku aktivnost, izmjerenu metodom difuzije diska u agaru, pokazao je izolat MRS_120 čiji je promjer zone iznosio 8,50 mm, a najmanju izolat LV_116 s promjerom zone od 7,25 mm. Izmjerene zone lipolitičke aktivnosti metodom direktne aplikacije u agaru kreću se od 2,25 mm do 4,50 mm. Najveća zona lipolize, izmjerena metodom direktne aplikacije u agar, iznosila je 4,50 mm za izolat MRS_532, a najmanja zona iznosila je 2,25 mm za izolat MSE_92. Najveću lipolitičku aktivnost, utvrđenu s obje metode, pokazali su sojevi MRS_532 i MRS_120 koji metodom difuzije diska pokazuju zonu razgradnje $\geq 8,25$ mm, odnosno metodom direktne aplikacije zonu razgradnje $\geq 3,50$ mm.

Tablica 4.3. Lipolitička aktivnost reprezentativnih sojeva *Le. mesenteroides* ($n = 13$).

Izolat	Lipolitička aktivnost mjerena na tributirin agaru	
	Metoda difuzije diska u agaru	Metoda direktne aplikacije kulture u agar
	Prosječna vrijednost (mm) \pm standardna devijacija	Prosječna vrijednost (mm) \pm standardna devijacija
MRS_532	8,25 \pm 1,06	4,50 \pm 0,71
MSE_92	7,75 \pm 0,35	2,25 \pm 0,35
MRS_120	8,50 \pm 0,00	3,50 \pm 0,00
MRS_104	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
MSE_349	8,00 \pm 0,00	3,00 \pm 0,00
MSE_317	8,25 \pm 0,35	3,00 \pm 0,00
LV_116	7,25 \pm 0,35	3,00 \pm 0,00
LV_96	8,25 \pm 0,35	3,00 \pm 0,00
LV_27	8,00 \pm 0,00	3,25 \pm 0,35
LV_2	8,00 \pm 0,00	3,25 \pm 0,35
MRS_602	8,00 \pm 0,00	2,50 \pm 0,71
MRS_506	7,75 \pm 0,35	2,75 \pm 0,35
MRS_605	8,00 \pm 0,00	2,75 \pm 0,35

4.3.2. Proteolitička aktivnost

Svi sojevi, osim MRS_605, pokazali su proteolitičku aktivnost (Tablica 4.4.). Izmjerene zone proteolitičke aktivnosti metodom difuzije diska u agaru kreću se od 7,00 mm do 15 mm. Najveća zona proteolize, izmjerena metodom difuzije diska u agaru, iznosila je 15,00 mm za soj MSE_317, a najmanja zona iznosila je 7,00 mm za sojeve MRS_120 i LV_27. Izmjerene zone proteolitičke aktivnosti metodom direktne aplikacije u agar kreću se od 2,75 mm do 8,50 mm. Najveća zona proteolize, izmjerena metodom direktne aplikacije u agar, iznosila je

8,50 mm za soj MSE_317, a najmanja zona iznosila je 2,75 mm za soj MRS_532. Na podlozi obogaćenoj proteinima sarkoplazme, samo sojevi MSE_317 i LV_96 pokazuju proteolitičku aktivnost (Tablica 4.3.). Najveću proteolitičku aktivnost pokazuju sojevi MSE_317, MSE_349, MSE_92 i MRS_506 koji metodom difuzije diska u agaru pokazuju zonu razgradnje $\geq 12,00$ mm, odnosno metodom direktne aplikacije $\geq 6,50$ mm.

Tablica 4.4. Proteolitička aktivnost reprezentativnih sojeva *Le. mesenteroides* (n = 13)

Izolat	Proteolitička aktivnost mjerena na BHI podlozi s obogaćenom s 1,5 % obranog mlijeka		Proteolitička aktivnost mjerena na podlozi s obogaćenoj proteinima sarkoplazme
	Metoda difuzije diska u agaru	Metoda direktne aplikacije kulture u agar	
	Prosječna vrijednost (mm) \pm standardna devijacija	Prosječna vrijednost (mm) \pm standardna devijacija	
MRS_532	7,25 \pm 0,35	2,75 \pm 0,35	-
MSE_92	13,50 \pm 0,71	7,00 \pm 0,00	-
MRS_120	7,00 \pm 0,00	5,50 \pm 0,71	-
MRS_104	7,25 \pm 0,35	5,50 \pm 0,71	-
MSE_349	13,50 \pm 0,71	8,00 \pm 0,00	-
MSE_317	15,00 \pm 0,00	8,50 \pm 0,71	+
LV_116	7,75 \pm 0,35	5,00 \pm 0,00	-
LV_96	8,25 \pm 0,35	5,50 \pm 0,71	+
LV_27	7,00 \pm 0,00	4,50 \pm 0,71	-
LV_2	8,00 \pm 0,00	6,00 \pm 0,00	-
MRS_602	7,25 \pm 0,35	5,50 \pm 0,71	-
MRS_506	12,00 \pm 0,00	6,50 \pm 0,71	-
MRS_605	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	-

4.3.3. Acidifikacija

Acidifikacija predstavlja sposobnost sojeva *Le. mesenteroides* da zakisele medij. Nakon 24 h inkubacije, srednja pH vrijednost se kreće od 3,60 do 5,31, a nakon 7 dana inkubacije od 3,25 do 3,65 (Tablica 4.5.). Nakon 24 h inkubacije prosječna pH vrijednost iznosi 3,99, a nakon 7 dana 3,42. Najveću acidifikacijsku pokazali su sojevi LV_116, MRS_120, MRS_104 i MSE_317.

Tablica 4.5. Acidifikacijska sposobnost reprezentativnih sojeva *Le. mesenteroides* (n = 13)

Izolati	pH vrijednost izmjerena nakon 24 h inkubacije	pH vrijednost izmjerena nakon 7 dana inkubacije
	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija
MRS_532	3,74 ± 0,02	3,38 ± 0,01
MSE_92	3,87 ± 0,05	3,39 ± 0,04
MRS_120	4,33 ± 0,54	3,52 ± 0,17
MRS_104	4,09 ± 0,25	3,48 ± 0,21
MSE_349	3,62 ± 0,31	3,41 ± 0,01
MSE_317	4,22 ± 0,49	3,65 ± 0,21
LV_116	5,31 ± 0,29	3,38 ± 0,24
LV_96	3,60 ± 0,04	3,37 ± 0,01
LV_27	3,99 ± 0,37	3,50 ± 0,21
LV_2	3,97 ± 0,48	3,48 ± 0,28
MRS_602	3,67 ± 0,21	3,25 ± 0,11
MRS_506	3,72 ± 0,10	3,36 ± 0,06
MRS_605	3,74 ± 0,01	3,34 ± 0,05

4.3.4. Antimikrobna aktivnost

U ovom istraživanju je utvrđeno da ispitivani sojevi slabo ili uopće ne inhibiraju indikatorske bakterije. Svega nekoliko sojeva je pokazalo izrazitu antimikrobnu aktivnost ili u potpunosti inhibiralo rast indikatorskih bakterija (Tablica 4.6.).

Soj MRS_532 je u potpunosti inhibirao rast bakterija *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231). Rast bakterije *Bacillus cereus* (DSM 6791) su u potpunosti inhibirali sojevi LV_27 i LV_2. Izraženu antimikrobnu aktivnost pokazao je još samo soj LV_96 i to samo prema bakteriji *Listeria innocua* (ATCC 33090).

Tablica 4.6. Antimikrobna aktivnost reprezentativnih sojeva *Le. mesenteroides* (n = 13) prema odabranim indikatorskim bakterijama.

Izolot	Indikatorske bakterije						
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (DSM 14221)	<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (DSM 20231)	<i>Brochotrix termospachta</i> (LMG 17208)	<i>Weissella viridescens</i> (DSM 20410)	<i>Bacillus cereus</i> (DSM 6791)
MRS_532	-	-	p.i.	p.i.	-	+	+
MSE_92	-	-	-	-	-	-	-
MRS_120	+	+	+	+	-	-	-
MRS_104	-	-	-	-	-	-	-
MSE_349	-	-	-	-	-	-	-
MSE_317	-	-	-	-	-	-	-
LV_116	-	-	-	-	-	-	-
LV_96	-	++	-	-	-	-	-
LV_27	+	-	+	-	-	-	p.i.
LV_2	+	+	+	-	-	+	p.i.
MRS_602	+	-	-	-	-	-	-
MRS_506	-	-	+	+	-	+	+
MRS_605	+	+	+	+	+	+	+

Indikatorske bakterije su uzgojene na hranjivoj podlozi između dvije testne linije s izraslim sojevima *Le. mesenteroides*. Izmjeren je promjer rasta indikatorskih bakterija između testnih linija, te uspoređen s rastom indikatorskih bakterija na rubu podloge (kontrola).

Dobiveni rezultati su izraženi na sljedeći način:

- = nema inhibicije (razlika u promjeru je < 1);
- + = slabo inhibirajuće djelovanje (izrasle kolonije su 1-2mm manje u usporedbi s izraslom kontrolom)
- ++ = izraženo inhibirajuće djelovanje (izrasle kolonije su > 2 do 4mm manje u usporedbi s izraslom kontrolom)
- +++ = vrlo jako inhibirajuće djelovanje (izrasle kolonije su > 4mm manje u usporedbi s izraslom kontrolom)
- p.i. = potpuna inhibicija (niti jedna kolonija nije izrasla između testnih linija)

4.4. Probiotički potencijal

4.4.1. Autoagregacija

Ovo istraživanje je pokazalo da svi ispitivani izolati pokazuju drugačiju sposobnost i dinamiku autoagregacije (Tablica 4.7.). Šest izolata uopće ne agregira unutar prva 3 sata, a nakon 5 h počinju slabo (MRS_120, MRS_104, MSE_317, LV_2 i MRS_602) ili jako agregirati (MSE_92). Izolati MSE_349, LV_27 i MRS_506 s vremenom manje autoagregiraju. Unatoč smanjenju autoagregacije MSE_349 i nakon 3 i nakon 5 h pokazuje jaku autoagregaciju, dok soj LV_27 prestaje autoagregirati nakon 5 h. Izolati MRS_532, MRS_104 i MRS_605 podjednako agregiraju i nakon 3 h i nakon 5 h, a LV_96 s vremenom snažnije autoagregira.

Autoagregacija se značajno razlikuje između 3 h i 5 h ($p < 0,05$), ali nema značajnih razlika u autoagregaciji između izolata.

Tablica 4.7. Autoagregacijska sposobnost reprezentativnih sojeva *Le. mesenteroides* ($n = 13$) nakon 3 i 5 h.

Izolat	Autoagregacija nakon 3 h (%)	Autoagregacija nakon 5 h (%)
	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija
MRS_532	12,50 ± 0,96	27,42 ± 1,86
MSE_92	3,92 ± 2,38	47,46 ± 5,96
MRS_120	0,00 ± 0,00	15,09 ± 2,86
MRS_104	1,86 ± 1,37	29,32 ± 1,84
MSE_349	37,08 ± 0,00	30,16 ± 1,28
MSE_317	5,06 ± 1,21	10,00 ± 4,49
LV_116	26,90 ± 3,10	33,03 ± 3,71
LV_96	10,55 ± 0,44	34,07 ± 0,84
LV_27	22,35 ± 1,42	6,00 ± 0,00
LV_2	5,71 ± 2,31	27,27 ± 1,96
MRS_602	2,58 ± 0,97	13,79 ± 2,49
MRS_506	35,93 ± 6,24	25,32 ± 5,67
MRS_605	11,21 ± 3,26	18,18 ± 2,86
Prosjek	13,51	24,39

Na temelju postotka autoagregacije nakon 1 h izolati su klasificirani u tri različite grupe:

% agregacije nakon 1 h > 30 % = izolati koji jako agregiraju

10 % < % agregacije nakon 1 h > 30 % = izolati koji slabo agregiraju

% agregacije nakon 1 h < 10 % = izolati koji ne agregiraju

4.4.2. Preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Ovo istraživanje je pokazalo da ispitivani sojevi najbolje preživljavaju u uvjetima usne šupljine, dok u uvjetima koji vladaju u ostalim dijelovima probavnog sustava kao što su

želudac i duodenum, postotak preživljavanja se izrazito smanjuje (Tablica 4.8.). U usnoj šupljini u prosjeku preživi 58,60 % , u želucu svega 9,70 % , a u duodenuma 8,88 % svih izolata. Najbolje preživljava izolat LV_27 u usnoj šupljini (85,71 %), a najslabije MRS_120 u duodenumu (0,17 %).

Dvofaktorska analiza varijance (*two-way* ANOVA) pokazala je da se zbog izlaganja uvjetima u gastrointestinalnom sustavu značajno smanjuje ($p < 0.01$) preživljavanje ispitivanih izolata i da se preživljavanje značajno razlikuje ($p < 0.01$) ovisno o dijelu probavnog trakta. Između izolata izloženih uvjetima gastrointestinalnog sustava uočena je najmanje signifikantnih razlika što bi se moglo pripisati činjenici da su ispitivani sojevi iste vrste te da slično reagiraju na stresne uvjete. Najviše signifikantnih razlika je detektirano između izolata koji su nisu izloženi uvjetima gastrointestinalnog sustava (Prilog: Tablica P1-P3).

Tablica 4.8. Postotak preživljavanja izolata u simuliranim uvjetima probavnog sustava.

Izolat	Preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta		
	Usna šupljina (%)	Želudac (%)	Doudenum (%)
	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija
MRS_532	83,08 ± 6,22	7,75 ± 0,83	0,19 ± 0,01
MSE_92	70,18 ± 1,04	4,12 ± 0,27	0,20 ± 0,02
MRS_120	64,59 ± 7,98	9,62 ± 0,47	0,17 ± 0,01
MRS_104	37,63 ± 2,09	11,40 ± 0,85	0,25 ± 0,08
MSE_349	33,33 ± 0,00	5,74 ± 2,17	2,98 ± 0,44
MSE_317	7,30 ± 0,39	18,21 ± 5,64	5,77 ± 0,80
LV_116	85,48 ± 8,31	5,74 ± 0,15	4,61 ± 0,19
LV_96	33,42 ± 1,36	9,76 ± 1,61	71,02 ± 8,57
LV_27	85,71 ± 2,95	11,13 ± 1,03	8,20 ± 0,45
LV_2	63,31 ± 2,71	7,42 ± 0,34	2,20 ± 0,23
MRS_602	53,62 ± 4,02	9,94 ± 0,50	7,19 ± 0,46
MRS_506	70,37 ± 0,00	8,56 ± 1,49	9,44 ± 1,99
MRS_605	73,72 ± 5,07	16,70 ± 2,45	3,17 ± 0,10
Prosjek	58,60	9,70	8,88

5. RASPRAVA

Autohtona mikrobiota spontano fermentiranih kobasica je izrazito složena i potječe iz mesa, različitih dodataka, okoliša i opreme koja se koristi u proizvodnji (Stellato i sur., 2016). S obzirom da se u Hrvatskoj takve tradicijske, spontano fermentirane kobasice proizvode bez dodatka starter kultura, fermentacija u takvim uvjetima u potpunosti ovisi o autohtonoj mikrobioti. Ujedno, obrada mesa i proizvodnja često se provode u neadekvatnim i varijabilnim uvjetima što može rezultirati proizvodima neujednačene i upitne kvalitete. Iako je do danas detaljno istražena raznolikost i uloga autohtonih bakterija mliječne kiseline (BMK) u proizvodnji spontano fermentiranih kobasica, naročito rodova *Enterococcus* i *Lactobacillus*, još uvijek se malo zna o ulozi roda *Leuconostoc* vrsta.

U prijašnjim istraživanjima prikupljeno je 259 izolata *Le. mesenteroides* koji su grupirani na temelju rep-PCR obrazaca u 22 grupe. Trinaest reprezentativnih izolata prošlo je sigurnosnu karakterizaciju. Kako bi se procijenilo mogu li se koristiti kao potencijalni starteri i/ili probiotičke kulture ovi izolati su detaljno tehnološki okarakterizirani i ispitan je njihov probiotički potencijal.

Proteolitička i lipolitička aktivnost imaju ključnu ulogu u formiranju organoleptičkih karakteristika i teksture namirnica. Produkti proteolize i lipolize, npr. peptidi, aminokiseline, karbonili i volatilne komponente doprinose karakterističnom okusu mesnih proizvoda. Masne kiseline, nastale lipolizom, degradiraju se do alkana, alkena, alkohola, aldehida i ketona, koji također doprinose razvoju okusa. Smatra se da su i endogene i bakterijske peptidaze potrebne za potpunu hidrolizu oligopeptida, čime uporaba starter kultura znatno utječe na kvalitetu krajnjeg proizvoda (Casaburi i sur., 2008).

Samo jedan od 13 testiranih *Le. mesenteroides* sojeva (MRS_104) nije pokazao nikakvu lipolitičku aktivnost dok se dva soja, MRS_532 i MRS_120, ističu izrazitom lipolitičkom aktivnošću u odnosu na druge sojeve. Sposobnost razgradnje proteina mlijeka pokazalo je 12 od 13 testiranih sojeva među kojima su se svojom proteolitičkom aktivnošću istaknula tri soja (MSE_317, MSE_349 i MSE_92), a samo dva soja (MSE_317 i LV_96) mogu razgraditi sarkoplazmatske proteine iz svinjskog mesa.

Acidifikacijska aktivnost je bitno svojstvo starter kultura koje predstavlja limitirajući faktor za rast patogena. Acidifikacijska sposobnost roda *Leuconostoc*, prema provedenim

istraživanjima, većinom je okarakterizirana kao niska u odnosu na druge BMK što je u korelaciji sa njihovim heterofermentativnim metabolizmom (Nieto-Arribas i sur., 2010). Prema smjernicama za industriju Američke agencije za hranu i lijekove (*eng.* Food and Drug Administration, FDA) iz 2018. godine, minimalna pH vrijednost za suzbijanje patogena kreće se od pH 3,7 – 4,9. Nakon 24 sata inkubacije, pH vrijednost medija kreće se od pH 3,60 – 5,31, ovisno o testiranom soju *Le.mesenteroides*, što još uvijek ne inhibira rast određenih patogena. Nakon 7 dana inkubacije, svaki je testirani soj *Le. mesenteroides* zakiselio medij na pH < 3,7 čime su stvoreni limitirajući uvjeti za rast patogena i bakterija koje uzrokuju kvarenje hrane. Četiri su soja pokazala izrazitu acidifikacijsku sposobnost (LV_116, MRS_602, MRS_605 i MRS_532) s najvećim padom pH vrijednosti nakon 7 dana inkubacije.

Bakterije mliječne kiseline imaju širok spektar inhibirajućih djelovanja koji se pripisuje biosintezi organskih kiselina ili vodikovog peroksid. Neke vrste pokazuju uski inhibitorski spektar, koji uključuje uglavnom homologne sojeve. To se povezuje sa sintezom i sekrecijom bakteriocina, molekula proteinske prirode, čija je aktivnost usmjerena prema ograničenom broju bakterijskih vrsta (Hechard i sur., 2009).

Da bi neka bakterijska kultura bila potencijalna starter i/ili bioprotektivna kultura, neophodno je ispitati i njezinu antimikrobnu aktivnost. Od svih sojeva, MRS_605 pokazao je slabo inhibirajuće djelovanje prema 100 % odabranih indikatorskih bakterija i jedini je od ispitanih koji djeluje protiv *Brochotrix termospatha* (LMG 17208). Istraživanjem je utvrđeno da je 5 sojeva imalo slabo inhibirajuće djelovanje na *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221). Nadalje, *Listeria innocua* (ATCC 33090) je slabo inhibirana od 3 soja, dok je 1 soj imao izraženo inhibirajuće djelovanje. Prema *Escherichia coli* (ATCC 25922) je slabo inhibirajuće djelovalo 5 sojeva, a 1 je uzrokovao potpunu inhibiciju. Također je utvrđeno da na *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231) 1 soj djeluje potpuno inhibirajuće, a 3 slabo inhibirajuće. Slabo inhibirajuće djelovanje na *Weissella viridescens* (DSM 20410) su imala 4 soja, dok je *Bacillus cereus* (DSM 6791) potpuno inhibiran od 2 soja, a slabo inhibiran od 3 soja. Važno je izdvojiti da su 3 soja pokazala znakove potpune inhibicije prema patogenima, i to 2 na *Bacillus cereus* (DSM 6791), a 1 na *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231). Ovakva antimikrobna aktivnost leukonostoka može biti rezultat produkcije bakteriocina, međutim, potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se isključila mogućnost da je antimikrobno djelovanje nastalo

zbog produkcije mliječne kiseline uslijed fermentacije, odnosno pada pH vrijednosti tijekom rasta leukonostoka. Čak 5 sojeva nije pokazalo nikakvu antimikrobnu aktivnost prema odabranim indikatorskim bakterijama, i stoga nisu pokazali potencijal za aplikaciju kao protektivne starter kulture.

Kako bi se ispitaio probiotički potencijal reprezentativnih izolata simulirani su uvjeti prisutni u gastrointestinalnom traktu, točnije uvjete u usnoj šupljini, želucu i duodenumu. Najveći postotak preživljavanja zabilježen je u tretmanu sa simulacijom usne šupljine i iznosi u prosjeku 58,60 %. Najveći postotak preživljavanja u tretmanu s usnom šupljinom zabilježen je kod soja LV_27 s 85,71 % te kod LV_116 s 85,48 %, a najmanji rast zabilježen je kod izolata MSE_317 s 7,30 % preživljavanja. Najmanji postotak preživljavanja svih izolata ostvaren je u tretmanu sa simulacijom uvjeta duodenuma i iznosi 8,88 %. No ipak jedan izolat se ističe u tretmanu s duodenumom s postotkom preživljavanja od 71,02 % (LV_96), dok najmanju vrijednost preživljavanja ima izolat MRS_120 od 0,17 %. Simulacija tretmana u uvjetima želuca predstavlja prijelaznu vrijednost između usne šupljine i duodenuma. Tretman sa želučanim sokovima ima veće vrijednosti preživljavanja od duodenuma, ali značajno manje od tretmana s usnom šupljinom. Tako je izolat MSE_317 ostvario najveći postotak preživljavanja s 18,21 %, dok MSE_92 najmanji s 4,12 % u simuliranim uvjetima želuca.

Dobiveni rezultati su heterogeni i nepredvidljivog slijeda što znači da su određeni sojevi pokazali visoke vrijednosti preživljavanja u jednom simuliranom uvjetu, a niske vrijednosti u drugim uvjetima i obrnuto. Razlog tome je što je svaki soj zaseban organizam i različito reagira na određene uvjete sredine. Bitna stavka provedenih tretmana je direktna izloženost bakterije tretmanu. U istraživanju koje su proveli Chavarri i sur., 2010. utvrđeno je da inkapsulacija probiotičkih bakterija rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* povećava razinu preživljavanja u uvjetima probavnog sustava i na taj način osigurava dovoljan broj vijabilnih stanica za kolonizaciju crijeva. Nadalje, probiotičkim bakterijama može se obogatiti neka namirnica koja služi kao nosač. Takvi nosači bakterija također znatno utječu na njihovo preživljavanje u probavnom sustavu (Bove i sur., 2013; Lee i sur., 2015). Sukladno spomenutim istraživanjima potrebno je još napraviti dodatna istraživanja kako prenijeti bakterijske stanice do krajnjeg odredišta u što većem broju i na koji način omogućiti stanicama da odole uvjetima probavnog trakta.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti sljedeće:

- svi ispitivani sojevi *Le. mesenteroides* rastu i pri 12 °C i pri 25 °C, ali u prisutnosti drugih stresora njihov rast je snažno suprimiran ili u potpunosti inhibiran pri 12 °C
- 92,3 % sojeva *Le. mesenteroides* pokazalo je lipolitičku aktivnost na tributirin agaru
- 92,3 % ispitivanih sojeva pokazalo je proteolitičku aktivnost na podlozi s dodatkom 1,5% obranog mlijeka, a 15,4 % sojeva sposobno je razgraditi sarkoplazmatske proteine iz svinjskog mesa
- svi ispitivani sojevi su dobro acidifikatori, a nakon 7 dana snižavaju pH medija < 3,7 čime su stvoreni inhibitorni uvjeti za razvoj patogena i uzročnika kvarenja
- kombinacija sojeva MRS_120, MSE_317 i MRS_602 zajedno bi pokazala dobru lipolizu, proteolizu i acidifikaciju, te bi se mogla primijeniti u obliku mješovite starter kulture
- 1 soj (MRS_532) je potpuno inhibirao *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (DSM 20231), a 2 soja (LV_27 i LV_2) su potpuno inhibirala *Bacillus cereus* (DSM 6791) te bi se mogle primijeniti kao bioprotektivne kulture
- 15,4 % sojeva jako i 30,8 % slabo autoagregira nakon 3 h, a nakon 5 h 7,7 % jako i 69,2 % slabo autoagregira
- svi ispitivani sojevi loše preživljavaju simuliranim gastrointestinalnim uvjetima, odnosno ne pokazuju probiotički potencijal

7. ZAHVALE

Posebno hvala izv. prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na mentorstvu, što nam je pružila priliku za stjecanjem neprocjenjivog iskustva kroz rad u laboratoriju, pisanju znanstvenih radova i na ukazanom povjerenju i vremenu.

Neizmjereno hvala mag. ing. agr. Irini Tanuwidjaja na poticanju našeg interesa za rad, velikom trudu, uloženom vremenu i stručnim savjetima.

Zahvaljujemo se svim članovima Zavoda za mikrobiologiju na pomoći i strpljenju. Hvala i djelatnicima Zavoda za kemiju i Zavoda za fitopatologiju na ustupanju svojih instrumenata.

Zahvaljujemo se i Hrvatskoj zakladi za znanost koja je omogućila sredstva za ovo istraživanje u sklopu projekta "Očuvanje mikrobne raznolikosti povezane s proizvodnjom tradicionalnih hrvatskih kobasica od mesa divljači: biotehnoška i sigurnosna karakterizacija" (miCROgame UIP-11-2013-6640).

8. POPIS LITERATURE

- Agarwal, K. N., Bhasin, S. K. (2003) Feasibility studies to control acute diarrhoea in children by feeding fermented milk preparations Actimel and Indian Dahi. *European Journal of Clinical Nutrition* 56(S4):S56.
- Allameh, S. K., Daud, H., Yusoff, F. M., Saad, C. R., Ideris, A. (2012) Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). *African Journal of Biotechnology* 11(16): 3810-3816.
- Aswathy, R. G., Ismail, B., John, R. P., Nampoothiri, K. M. (2008) Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. *Applied biochemistry and biotechnology* 151(2-3): 244-255.
- Baruzzi F., Matarante A., Caputo L., Morea M. (2006) Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. *Meat Science* 72: 261–269.
- Borović, B., Velebit, B., Moracanin, S. V., Lakicevic, B., Baltic, T. (2015) Molecular characterization of lactic acid bacteria in levačka sausage. *Procedia Food Science* 5: 14-17.
- Bove, P., Russo, P., Capozzi, V., Gallone, A., Spano, G., Fiocco, D. (2013) *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research* 168(6): 351–9.
- Casaburi, A., Di Monaco, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D., Villani, F. (2008) Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology* 25(2): 335-347.
- Cenci-Goga, B. T., Rossitto, P. V., Sechi, P., Parmegiani, S., Cambiotti, V., Cullor, J. S. (2012) Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and

sensory characteristics of swine and venison (Dama Dama) nitrite-free dry-cured sausages. *Meat Science* 90: 599–606.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., del Carmen Villarán, M. (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1-2): 185-189.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1 – 20.

Danilović B., Joković N., Petrović L., Veljović K., Tolinački M., Savić D. (2011) The characterisation of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovska Klobása). *Meat Science* 4: 668–674.

de Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Todorov, S. D., Penna, A. L. B. (2015). The two faces of *Leuconostoc mesenteroides* in food systems. *Food Reviews International* 31(2): 147-171.

de Wouters, T., Jans, C., Niederberger, T., Fischer, P., Rühls, P. A. (2015) Adhesion potential of intestinal microbes predicted by physico-chemical characterization methods. *PloS one* 10(8): e0136437.

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31: 438–442.

Doleyres, Y., Fliss, I., Lacroix, C. (2004) Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 97:527–539.

Domig, K.J., Kiss, H., Petricevic, L., Viernstein, H., Unger, F., Kneifel, W. (2014) Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an

exemplary study. *Beneficial Microbes* 5:263–272.

Dučić, M., Klisara, N., Markov, S., Blagojević, B., Vidaković, A., Buncic, S. (2016) The fate and pasteurization-based inactivation of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in dry, fermented sausages. *Food Control* 59: 400-406.

Ercolini, D. (2013) High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 3148–3155.

Fadda S., López C., Vignolo G. (2010) Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science* 86: 66–79.

Fontana, C., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G., Saavedra, L. (2015) Occurrence of antilisterial structural bacteriocins genes in meat borne lactic acid bacteria. *Food Control* 47: 53–59.

Frece J., Kovačević D., Kazazić S., Mrvčić J., Vahčić N., Ježek D., Hruškar M., Babić I., Markov, K. (2014) Comparison of Sensory Properties, Shelf-Life and Microbiological Safety of Industrial Sausages Produced with Autochthonous and Commercial Starter Cultures. *Food Technology and Biotechnology* 52:307–316.

Gill, C.O. (2007) Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Science* 77:149–160.

Hadžiosmanović, M., Gasparik-Reichardt, J., Smajlović, M., Vesković-Moračanin, S., Zdolec, N. (2005) Possible use of bacteriocins and starter cultures in upgrading of quality and safety of traditionally fermented sausages. *Tehnologija mesa* 46(3-4): 194-211.

- Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F., Cenatiempo, Y. (2009) Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology* 138(12): 2725–2731.
- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C. (2004) *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14(6): 467-494.
- Holland, R., Liu, S-Q. (2011) Lactic Acid Bacteria | *Leuconostoc* spp.. In: H. Roginski, J. W. Fuquay, P. F. Fox (eds) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd edition, Academic Press, Mississippi State, MS, USA, pp 138-142.
- Hwang, C. A., Porto-Fett, A. C., Juneja, V. K., Ingham, S. C., Ingham, B. H., Luchansky, J. B. (2009) Modeling the survival of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Typhimurium during fermentation, drying, and storage of soudjouk-style fermented sausage. *International journal of food microbiology* 129(3): 244-252.
- Jääskeläinen, E., Johansson, P., Kostianen, O., Nieminen, T., Schmidt, G., Somervuo, P., Björkroth, J. (2013) Significance of heme-based respiration in meat spoilage caused by *Leuconostoc gasicomitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 79(4): 1078-1085.
- Jamaly, N., Benjouad, A., Comunian, R., Daga, E., Bouksaim, M. (2010) Characterization of Enterococci isolated from Moroccan dairy products. *African Journal of Microbiology Research* 4(16): 1768-1774.
- Jung, J. Y., Lee, S. H., Lee, H. J., Seo, H. Y., Park, W. S., Jeon, C. O. (2012) Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International journal of food microbiology* 153(3): 378-387.

- Kekkonen, R. A., Kajasto, E., Miettinen, M., Veckman, V., Korpela, R., Julkunen, I. (2008) Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- γ production. World journal of gastroenterology: WJG, 14(8): 1192.
- Kos, I., Gredičak, M., Sinčić Pulić, B., Širić, I., Mrkonjić Fuka, M. (2015) Senzorna svojstva trajnih kobasica od mesa domaće i divlje svinje. Pedeseti hrvatski i deseti međunarodni simpozij agronoma. Opatija, 16. – 20. veljače. Zbornik radova, Opatija, 438 – 442.
- Lee, B., Tachon, S., Eigenheer, R.A., Phinney, B. S., Marco, M. L. (2015) *Lactobacillus casei* low-temperature, dairy-associated proteome promotes persistence in the mammalian digestive tract. Journal of Proteome Research 14(8): 3136–47.
- Lücke, F. K. (1994) Fermented meat products. Food Research International 27(3): 299–307.
- Markov, K., Pleadin, J., Horvat, M., Bevardi, M., Sokolić Mihalak, D., Delaš, F., Frece, J. (2013) Microbiological and mycotoxicological safety risks and characterization of homemade sausages of game meat. Veterinarska stanica 44:177–186.
- Mauriello, G., Casaburi, A., Villani, F. (2002) Proteolytic activity of *Staphylococcus xylosus* strains on pork myofibrillar and sarcoplasmic proteins and use of selected strains in the production of “Naples type” salami. Journal of Applied Microbiology 92: 482–490.
- Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., Kojic, S., Golic, N., Kojic, M. (2015) AggLb is the largest cell-aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64, functions in collagen adhesion, and pathogen exclusion in vitro. PLoS One, 10(5): e0126387.
- Morandi, S., Silveti, T., Brasca, M. (2013) Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. Antonie Van Leeuwenhoek 103: 239–249.

- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Palop, L., Cabezas, L. (2010) Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. *Food microbiology*, 27(1): 85-93.
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., Penna, A.L.B. (2012) Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews* 4: 124–140.
- Rivera-Reyes, M., Campbell, J. A., Cutter, C. N. (2017) Pathogen reductions associated with traditional processing of landjäger. *Food control*, 73: 768-774.
- Seo, B. J., Rather, I. A., Kumar, V. J. R., Choi, U. H., Moon, M. R., Lim, J. H., Park, Y. H. (2012) Evaluation of *Leuconostoc mesenteroides* YML003 as a probiotic against low-pathogenic avian influenza (H9N2) virus in chickens. *Journal of applied microbiology*, 113(1): 163-171.
- Shobharani, P., Agrawal, R. (2011) A potent probiotic strain from cheddar cheese. *Indian journal of microbiology*, 51(3): 251-258.
- Smit, G., Smit, B. A., Engels, W.J.M. (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS microbiology reviews* 29(3): 591-610.
- Stellato, G., La Stora, A., De Filippis, F., Borriello, G., Villani, F., Ercolini, D. (2016) Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. *Applied and Environmental Microbiology* 82(13): 4045-4054.
- Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C., Holzappel, W. H. (2009) Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *International Journal of Food Microbiology* 135(1): 28-33.
- Trichopoulou, A., Soukara, S., Vasilopoulou, E. (2007) Traditional foods: A science and society perspective. *Trends in Food Science & Technology* 18: 498 – 504.

Trunk, T., Salah Khalil, H., Leo, J. C. (2018) Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiology* 4(1): 140-164.

Wang, X., Zhang, Y., Ren, H., Zhan, Y. (2018) Comparison of bacterial diversity profiles and microbial safety assessment of salami, Chinese dry-cured sausage and Chinese smoked-cured sausage by high-throughput sequencing. *LWT - Food Science and Technology* 90: 108-115.

WHO/FAO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

Žgomba Maksimović, A., Zunabović-Pichler, M., Kos, I., Mayrhofer, S., Hulak, N., Domig, K. J., Mrkonjić Fuka, M. (2018) Microbiological hazards and potential of spontaneously fermented game meat sausages: A focus on lactic acid bacteria diversity. *LWT - Food Science and Technology* 89: 418–426.

9. SAŽETAK

Domenika Gugić, Luka Han i Valentina Žuljević

Tehnološki i probiotički potencijal bakterija *Leuconostoc mesenteroides* izoliranih iz spontano fermentiranih kobasica

Spontano fermentirane kobasice izrazito su složen i bogat ekosustav u kojem dominiraju korisne bakterije poput bakterija mliječne kiseline (BMK). Međutim, zbog upotrebe sirovina različitog porijekla i neadekvatnih uvjeta proizvodnje, njihova mikrobiološka sigurnost često je upitna. Zbog povećanog interesa i potražnje za tradicijskim fermentiranim proizvodima potrebno je standardizirati njihovu proizvodnju. Bakterije mliječne kiseline poput vrste *Leuconostoc mesenteroides* pokazale su izrazit probiotički i tehnološki potencijal, ali istovremeno mogu uzrokovati i kvarenje mesa. Stoga je u ovom istraživanju detaljno okarakteriziran tehnološki i probiotički potencijal 13 izolata *Le. mesenteroides* koji su ocjenjeni sigurnima za primjenu u obliku starter kultura. Ispitani izolati *Le. mesenteroides* pokazali su jako dobar tehnološki potencijal. Kod 12 izolata utvrđena je snažna lipolitička aktivnost na tributirin agaru, među kojima se ističu MRS_523 i MRS_120. Proteolitičku aktivnost na podlozi s obranim mlijekom pokazalo je 12 izolata, a samo 2 izolata (MSE_317, LV_96) pokazali su proteolitičku aktivnost na podlozi sa sarkoplazmatskim proteinima. Iako se smatra da *Leuconostoc* spp. ima slabu acidifikacijsku sposobnost, reprezentativni izolati pokazali su značajnu sposobnost zakiseljavanja medija. Antimikrobna aktivnost utvrđena je prema inhibiciji rasta indikatorskih patogena te su 2 izolata (LV_27 i LV_2) pokazala potpunu inhibiciju prema *Bacillus cereus* (DSM 6791), a izolat MRS_532 potpuno je inhibirao *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231). U simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava niti jedan izolat nije pokazao značajno preživljavanje. Najveće vrijednosti preživljavanja (58,6%) zabilježene su u uvjetima usne šupljine, dok u uvjetima želuca i duodenuma preživljava manje od 10%, što ukazuje na njihov izrazito slabi probiotički potencijal. Sposobnost i dinamika autoagregacije znatno varira, izolat MSE_349 je pokazao jaku autoagregaciju nakon 3 h i 5 h, a LV_96 s vremenom snažnije autoagregira. Autoagregacija se značajno razlikuje ($p < 0,05$) između 3 h i 5 h. Ispitivanjem rasta pri različitim ekofiziološkim uvjetima utvrđeno je da 4 izolata (MRS_532, MSE_92, MRS_120, MRS_104) dobro rastu pri 3 i 6 % NaCl pri 25 °C.

Ključne riječi: *Leuconostoc mesenteroides*, tehnološki i probiotički potencijal, fermentirane kobasice, starter kultura

10. SUMMARY

Domenika Gugić, Luka Han i Valentina Žuljević

Technological and probiotic potential of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from spontaneously fermented sausages

Spontaneously fermented sausages represent complex and abundant ecosystems dominated by useful bacteria such as lactic acid bacteria (LAB). However, because of the use of raw materials of different origin and inadequate production conditions, their microbiological safety is often questionable. Due to increased interest and demand for traditional fermented products it is necessary to standardize their production. Lactic acid bacteria such as *Leuconostoc mesenteroides*, showed significant probiotic and technological potential, but simultaneously may pose a risk as potential agent in meat spoilage. Therefore, in this study technological and probiotic potential of 13 isolates of *Le. mesenteroides* have been described in detail and isolates were marked as safe for application as starter cultures. Tested isolates of *Le. mesenteroides* showed significant technological potential. 12 isolates showed strong lipolytic activity on tributyrin agar with two isolates MRS_532 and MRS_120 emphasized due to their highest value of lipolytic activity. 12 isolates showed proteolytic activity measured on skim milk agar and only two isolates, MSE_317 and LV_96, showed proteolytic activity measured on sarcoplasmic proteins. Although it is considered that *Leuconostoc* spp. has a weak acidification ability, representative isolates tested in this study, showed significant ability to acidify their medium with four leading isolates: LV_116, MRS_120, MRS_104 and MSE_317. Antimicrobial activity was determined according to the ability to inhibit the growth of indicator pathogens with 2 isolates (LV_27 and LV_2) completely inhibiting the growth of *Bacillus cereus* (DSM 6791) and 1 isolate MRS_532 completely inhibiting the growth of *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231). None of the isolates showed significant survival rate in simulated digestive system conditions. The highest survival rate (58,6%) was determined in simulated oral cavity conditions, while in simulated stomach and duodenum conditions survival rate is less than 10% which indicates an extremely weak probiotic potential. The ability and dynamics of autoaggregation vary greatly among isolates, with MSE_349 showing strong autoaggregation after both 3 and 5 hours, and LV_96 which shows stronger autoaggregation ability with time. Autoaggregation significantly differs ($p < 0,05$) between 3 and 5 hours. By examining growth

at different ecophysiological conditions, it was established that 4 isolates (MRS_532, MSE_92, MRS_120, MRS_104) grow well at 3 and 6% NaCl and at 25°C.

Key words: *Leuconostoc mesenteroides*, technological and probiotic potential, fermented sausages, starter cultures

11. PRILOZI

Tablica P1. Preživljavanje u usnoj šupljini. Usporedba izolata neizloženih i izloženih simuliranim uvjetima usne šupljine.

	MSE_92	LV_96	LV_27	MRS_532	MRS_506	LV_2	MRS_602	MRS_605	MSE_317	LV_116	MRS_104	MSE_349	MRS_120
MSE_92	0,29												
LV_96	52,52	37,90											
LV_27	2,67	11,96	1,01										
MRS_532	14,34	0,29	12,68	3,17									
MRS_506	0,50	15,13	2,16	11,67	1,15								
LV_2	35,66	21,04	34,01	24,50	37,32	14,70							
MRS_602	49,35	34,73	47,69	38,18	51,01	28,39	24,93						
MRS_605	33,72	19,09	32,06	22,55	35,37	12,75	9,29	10,01					
MSE_317	22,26	7,64	20,60	11,09	23,92	1,30	2,16	1,44	24,71				
LV_116	0,07	14,55	1,58	11,09	1,73	20,89	24,35	23,63	2,52	0,65			
MRS_104	38,11	23,49	36,45	26,94	39,77	17,15	13,69	14,41	40,56	38,69	26,51		
MSE_349	4,25	10,37	2,59	6,92	5,91	16,71	20,17	19,45	6,70	4,83	7,35	5,76	
MRS_120	14,12	0,50	12,46	2,95	15,78	6,84	10,30	9,58	16,57	14,70	2,52	15,63	6,56

Prikazane su Q vrijednosti Tukey HSD testa gdje je kritična vrijednost za $Q = 2,92$ kod razine signifikantnosti ($p < 0.05$). Ako Q vrijednost $< 2,92$ razlike nisu značajne. Deblje otisnute vrijednost predstavljaju signifikantne razlike između izolata.

Tablica P2. Preživljavanje u želucu. Usporedba izolata neizloženih i izloženih simuliranim uvjetima želuca.

	MSE_92	LV_96	LV_27	MRS_532	MRS_506	LV_2	MRS_602	MRS_605	MSE_317	LV_116	MRS_104	MSE_349	MRS_120
MSE_92	14,78												
LV_96	4,03	4,21											
LV_27	13,13	13,31	12,24										
MRS_532	19,56	19,74	18,67	18,63									
MRS_506	14,48	14,66	13,58	13,55	13,82								
LV_2	9,19	9,37	8,29	8,26	8,53	9,09							
MRS_602	13,65	13,83	12,76	12,72	13,00	13,56	12,87						
MRS_605	5,38	5,56	4,48	4,45	4,72	5,28	4,59	5,01					
MSE_317	7,42	7,60	6,53	6,49	6,77	7,33	6,64	7,06	6,59				
LV_116	20,19	20,37	19,29	19,26	19,53	20,09	19,40	19,82	19,35	19,63			
MRS_104	21,03	21,20	20,13	20,10	20,37	20,93	20,24	20,66	20,19	20,47	19,19		
MSE_349	11,79	11,97	10,89	10,86	11,13	11,70	11,00	11,42	10,96	11,23	9,96	11,71	
MRS_120	17,47	17,65	16,57	16,54	16,81	17,37	16,68	17,10	16,63	16,91	15,63	17,39	16,36

Prikazane su Q vrijednosti Tukey HSD testa gdje je kritična vrijednost za $Q = 2,92$ kod razine signifikantnosti ($p < 0.05$). Ako Q vrijednost $< 2,92$ razlike nisu značajne. Deblje otisnute vrijednost predstavljaju signifikantne razlike između izolata.

Tablica P3. Preživljavanje u duodenumu. Usporedba izolata neizloženih i izloženih simuliranim uvjetima duodenuma.

	MSE_92	LV_96	LV_27	MRS_532	MRS_506	LV_2	MRS_602	MRS_605	MSE_317	LV_116	MRS_104	MSE_349	MRS_120
MSE_92	24,24												
LV_96	13,26	3,86											
LV_27	17,38	7,98	16,00										
MRS_532	34,49	25,09	33,11	34,48									
MRS_506	7,97	1,43	6,59	7,96	7,27								
LV_2	18,00	8,60	16,62	17,99	17,29	17,65							
MRS_602	18,25	8,85	16,87	18,23	17,54	17,90	16,98						
MRS_605	16,89	7,49	15,51	16,87	16,18	16,54	15,62	16,40					
MSE_317	21,57	12,17	20,19	21,55	20,86	21,22	20,30	21,08	20,37				
LV_116	32,71	23,31	31,33	32,70	32,00	32,36	31,45	32,22	31,51	31,25			
MRS_104	31,60	22,20	30,22	31,58	30,89	31,25	30,33	31,11	30,40	30,13	31,57		
MSE_349	18,47	9,07	17,09	18,45	17,76	18,12	17,20	17,98	17,27	17,01	18,44	17,97	
MRS_120	28,92	19,52	27,54	28,91	28,21	28,57	27,66	28,43	27,72	27,46	28,89	28,42	28,92

Prikazane su Q vrijednosti Tukey HSD testa gdje je kritična vrijednost za $Q = 2,92$ kod razine signifikantnosti ($p < 0.05$). Ako Q vrijednost $< 2,92$ razlike nisu značajne. Deblje otisnute vrijednost predstavljaju signifikantne razlike između izolata.