

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Helena Senko i Petra Špoljarić

**Tehnološki potencijal sojeva *Lactobacillus sakei* izoliranih iz  
tradicionalnih kobasica od mesa divljači**

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za mikrobiologiju hrane 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 2016./2017.

## POPIS KRATICA

<b>BA</b>	biogeni amini (engl. <i>biogenic amine</i> )
<b>BHI</b>	engl. <i>brain heart infusion</i>
<b>BMK</b>	bakterije mliječne kiseline
<b>°C</b>	stupanj celzijusa
<b>CFU</b>	broj formiranih kolonija (engl. <i>colony forming units</i> )
<b>cm</b>	centimetar
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>g</b>	gram
<b>g</b>	broj okretaja rotora centrifuge u minuti
<b>GI</b>	gastrointestinalni trakt
<b>GRAS</b>	generalno prepoznate kao sigurne (engl. <i>generally recognized as safe</i> )
<b>h</b>	sat
<b>IST</b>	ISO-SENSITEST™
<b>L</b>	litra
<b>LMM</b>	liofilizirani mesni medij

<b>LSM</b>	engl. <i>lactic acid bacteria susceptibility test medium</i>
<b>M</b>	mol, množina tvari
<b>mA</b>	miliamper
<b>μl</b>	mikrolitar
<b>mg</b>	miligram
<b>min</b>	minuta
<b>mL</b>	mililitar
<b>mM</b>	milimol
<b>mm</b>	milimetar
<b>MRS</b>	De Man-Rogosa-Sharpe medij
<b>pb</b>	parova baza
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>pH</b>	negativan logaritam koncentracije H <sup>+</sup> iona
<b>pmol</b>	pikomol
<b>rep-PCR</b>	lančana reakcija polimerazom repetitivnih ekstrageničkih palindromskih elemenata (engl. <i>repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction</i> )
<b>subsp.</b>	podvrsta (lat. <i>subspecies</i> )

**U** jedinica (engl. *activity unit*); količina enzima koja će inkorporirati 10 nmol dNTPa

**USFDA** engl. *United States Food and Drug Administration*

**UV** ultraljubičasti dio spektra elektromagnetskog zračenja (engl. *ultraviolet*)

**V** volt

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Rod <i>Lactobacillus</i> .....	3
1.1.1. Mogućnosti upotrebe <i>Lactobacillus sakei</i> u proizvodnji hrane .....	4
1.2. Zdravstveni rizici upotrebe sojeva <i>Lactobacillus sakei</i> u proizvodnji hrane .....	4
2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	6
2.1. Hipoteza.....	6
2.2. Opći i specifični ciljevi rada .....	6
3. MATERIJALI I METODE .....	7
3.1. Priprema korištenih otopina.....	7
3.1.1. Fiziološka otopina .....	7
3.1.2. McFarland standard (1) .....	7
3.1.3. McFarland standard (0,5) .....	7
3.1.4. Brilliant Blue R boja (0,05 %).....	7
3.1.5. Fosfatni pufer (20mM) .....	7
3.2. Priprema hranjivih podloga .....	8
3.2.1. MRS tekuća hranjiva podloga .....	8
3.2.2. MRS kruta hranjiva podloga .....	8
3.2.3. LSM hranjiva podloga.....	8
3.2.4. Tributirin agar hranjiva podloga .....	8
3.2.5. BHI tekuća hranjiva podloga.....	8
3.2.6. BHI kruta hranjiva podloga.....	9
3.2.7. BHI kruta podloga s 1,5 % obranog mlijeka .....	9
3.2.8. Podloga s dodanim proteinima sarkoplazme.....	9
3.2.9. Liofilizirani mesni medij (LMM).....	9
3.3. Metode za genotipsku karakterizaciju prikupljenih izolata.....	10
3.3.1. Grupiranje prikupljenih izolata <i>Lb. sakei</i> rep-PCR metodom.....	10
3.3.2. PCR detekcija gena koji kodiraju za biogene amine .....	11
3.4. Određivanje antibiotske osjetljivosti sojeva <i>Lb. sakei</i> .....	14
3.5. Određivanje hemolitičke aktivnosti.....	14
3.6. Metode za određivanje tehnoloških karakteristika sojeva <i>Lb. sakei</i> .....	15

3.6.1.	Određivanje lipolitičke aktivnosti .....	15
3.6.2.	Određivanje proteolitičke aktivnosti .....	15
3.6.2.1.	Ispitivanje proteolitičke aktivnosti na BHI krutoj hranjivoj podlozi s 1,5 % obranog mlijeka.....	15
3.6.2.2.	Ispitivanje proteolitičke aktivnosti na agaru s dodanim proteinima sarkoplazme.....	16
3.6.3.	Određivanje antimikrobne aktivnosti .....	16
3.6.4.	Određivanje acidifikacije .....	17
4.	REZULTATI.....	18
4.1.	Genotipska karakterizacija .....	18
4.1.1.	Grupiranje prikupljenih izolata rep-PCR metodom .....	18
4.1.2.	PCR detekcija gena koji kodiraju za produkciju biogenih amina .....	19
4.2.	Antibiotička osjetljivost sojeva <i>Lb. sakei</i> .....	21
4.3.	Hemolitička aktivnost.....	23
4.4.	Lipolitička aktivnost .....	24
4.5.	Proteolitička aktivnost .....	26
4.6.	Antimikrobna aktivnost .....	29
4.7.	Acidifikacija .....	32
5.	RASPRAVA .....	33
6.	ZAKLJUČCI.....	36
7.	ZAHVALE.....	37
8.	POPIS LITERATURE .....	38
9.	SAŽETAK .....	45
10.	SUMMARY .....	46

# 1. UVOD

Suhe fermentirane kobasice od divljači proizvode se u Hrvatskoj od mješavine mesa domaćih i divljih životinja, i to najčešće od mesa domaće svinje (*Sus scrofa domestica*) i mesa divlje svinje (*Sus scrofa*) ili jelena (*Cervus elaphus*). Kobasice se proizvode na mnogim malim obiteljskim gospodarstvima po tradicionalnim recepturama, bez dodatka starter kultura i aditiva, te su prepoznatljive zbog svojih specifičnih senzornih karakteristika. Posljednjih godina raste interes potrošača prema mesu i mesnim prerađevinama od divljači zbog njihovog specifičnog, jakog okusa, male količine masti, velike količine proteina te dobrog omjera između nezasićenih i zasićenih masnih kiselina. Također, danas je i evidentan trend povećane potražnje za hranom koja nosi oznaku autentično ili tradicionalno čime ovakvi proizvodi još više dobivaju na važnosti. Međutim, proizvodnja spontano fermentiranih kobasica od divljači je često nestandardizirana, krajnji proizvod je često neujednačene kvalitete te mikrobiološki upitan (Trichopoulou i sur., 2007; Markov i sur., 2013). Povećan mikrobiološki rizik naročito je vezan uz način odstrjela divljači i obrade mesa, zbog čega patogeni mikrobota može lako kontaminirati sirovinu i dospjeti u kobasice.

Jedan od mogućih načina standardizacije proizvodnje spontano fermentiranih kobasica od divljači i kontrole neželjene mikrobiote je upotreba starter kultura, čija je primjena imperativ u mesnoj industriji. Kao starteri najčešće se upotrebljavaju bakterije mliječne kiseline (BMK) koje imaju odlučujuću ulogu u fermentaciji te imaju dugu i sigurnu povijest upotrebe i aplikacije u fermentiranim proizvodima (Caplice i Fitzgerald, 1999; Ray, 1992; Wood, 1997; Wood i Holzapfel, 1995). BMK osiguravaju ne samo mikrobiološku kakvoću i stabilnost konačnog proizvoda, već svojim metabolizmom često pozitivno utječu na organoleptička svojstva krajnjeg proizvoda (Cenci – Goga i sur., 2012; Frece i sur., 2014). Njihov učinak na razvoj poželjne teksture proizvoda može se objasniti sposobnošću sinteze egzopolisaharida, a arome sintezom aromatskih spojeva (npr. alkoholi, ketoni, aldehidi) i metabolizmom citrata, aminokiselina i masti (Smit i sur., 2005). Poznato je da određeni sojevi BMK sintetiziraju tvari s antimikrobnim djelovanjem, među kojima se ističu organske kiseline i bakteriocini. U različitim istraživanjima istaknuta je uloga laktobacila kao dominantanog roda BMK-a tijekom fermentacije i zrenja kobasica, a najčešće izolirane vrste su *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus curvatus* (Andrighetto i sur., 2001; Fontana i sur.,



2005; Rantsiou i sur., 2005; Kozačinski i sur., 2008; Lebert i sur., 2007). Primjerice Papamanoli i sur. (2003) u svom istraživanju navode kako je 90 % izolata BMK prikupljenih iz grčkih suhih kobasica identificirano kao vrste roda *Lactobacillus*. Iako na tržištu postoje komercijalno dostupni starteri, danas se sve više istražuju različiti mikrobni ekosustavi, naročito tradicijske namirnice, kao izvori novih, korisnih mikroorganizama koji nakon detaljne karakterizacije i selekcije mogu biti aplicirani kao starter kulture. Upravo su kobasice od mesa divljači potencijalno vrijedan izvor korisnih mikroorganizama, od kojih vrste roda *Lactobacillus* predstavljaju naročito vrijednu mikrobiotu koju bi trebalo genotipski i fenotipski detaljno istražiti kako bi se utvrdio njihov tehnološki i sigurnosni potencijal te mogućnost aplikacije kao starter i/ili bioprotektivnih kultura.

## 1.1. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je najveći i najraznovrsniji rod BMK u koji je trenutno uključeno preko 150 vrsta (<http://www.bacterio.cict.fr>) koje pripadaju koljenu *Firmicutes*, red *Lactobacillales* unutar porodice *Lactobacillaceae*. Bakterije roda *Lactobacillus* su gram-pozitivne, nesporulirajuće bakterije koje se pojavljuju u obliku bacila ili kokobacila. Katalaza su negativni, iako neki laktobacili u određenim uvjetima mogu pokazati pseudokatalaznu aktivnost (Cai i sur., 2012). Bakterije roda *Lactobacillus* su široko rasprostranjene u prirodi, mogu se naći u hrani kao što su mliječni proizvodi, fermentirano meso, voće, povrće, bezalkoholna pića, ali i u respiratornom, gastrointestinalnom i genitalnom sustavu ljudi i životinja. Laktobacili pokazuju izuzetnu otpornost na kiseli medij te često sudjeluju u spontanom prirodnim fermentacijama (silaza, povrće) što ih razlikuje od ostalih rodova. Ove bakterije mogu rasti unutar temperaturnog raspona od 2 - 53 °C i pH vrijednosti u rasponu od 3 - 8, dok im je za rast optimalna temperatura 30 - 40 °C, a pH vrijednost 5,5 - 6,2 (Hammes i Hertel, 2009).

Ovisno o tipu fermentacije kojeg mogu provoditi, laktobacili se svrstavaju u 3 osnovne skupine. U prvu skupinu pripadaju obligatorni homofermentativi od kojih se najčešće koriste *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* u proizvodnji fermentiranih mlijeka, a za *Lb. acidophilus* utvrđeno je probiotičko djelovanje. Bakterije iz ove skupine rastu na višim temperaturama (> 45 °C) s obzirom na ostale dvije skupine te su najtolerantnije na kiseli medij. Za početni rast zahtijevaju pH u rasponu 5,5 i 6,2, a nakon fermentacije snižavaju pH < 4 (Bergey, 1974).

Drugu skupinu čine fakultativno heterofermentativni laktobacili od kojih su najvažnije komercijalne vrste *Lb. casei*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. plantarum* (Samaržija, 2015). *Lb. sakei* također pripada ovoj skupini i prirodno je prisutan u mesu (Berthier i sur., 1996). Obligatni heterofermentativi čine treću skupinu laktobacila od kojih je najzastupljeniji *Lb. reuteri* (Samaržija, 2015; Collins i sur., 1991; Vandamme i sur., 1996).

### **1.1.1. Mogućnosti upotrebe *Lactobacillus sakei* u proizvodnji hrane**

*Lactobacillus sakei* je prvi put opisan u sake', fermentiranom alkoholnom piću dobivenom iz riže (Katagiri i sur., 1934), prema kojem je vrsta dobila ime. Podijeljena je na dvije podvrste: *Lb. sakei* i *Lb. carnosus* (Berthier i Ehrlich, 1999; Torriani i sur., 1996). *Lb. sakei* je bakterija mliječne kiseline značajna u prehrambenoj industriji. Zbog dobrih tehnoloških karakteristika, često se upotrebljava kao starter kultura u mesnoj industriji za proizvodnju kobasica (Chaillou i sur., 2005; Hammes i Hertel, 1998) i to najčešće kao mješavina s drugim kulturama poput stafilokoka, pediokoka (Demeyer i Toldrá, 2004), mikorokoka ili kvasaca (Mäkelä i sur., 1992). *Lb. sakei* preživljava u težim uvjetima koji prevladavaju tijekom fermentacije, kao što su visoke koncentracije soli, nizak aktivitet vode i pH vrijednost kao i niske temperature zbog čega je jedna od najvažnijih psihrofilnih vrsta BMK (Schmidt i sur., 1999). Svojom metaboličkom aktivnošću može djelovati inhibitorno na bakterije kvarenja kao i patogene bakterije, odnosno imati bioprotektivnu ulogu (Bredholt i sur., 2001; Champomier-Verges i sur., 2002; Hammes i Hertel, 1998; Vermeiren i sur., 2004). Ovakvo djelovanje je uglavnom rezultat proizvodnje mliječne kiseline pri čemu se snižava pH vrijednost i inhibira neželjena mikrobiota, iako može biti rezultat djelovanja antagonističkih molekula bakteriocina (Axelsson i sur., 1993; Mortvedt i sur., 1991; Riley i Wertz, 2002). Mnogi sojevi *Lb. sakei* proizvode bakteriocine sakacin A ili P koji posjeduju snažnu aktivnost protiv *Listeria monocytogenes* (Schillinger i Lucke, 1989; Tichaczek i sur., 1994), patogene bakterije povezane s hranom. Osim antagonističkog djelovanja na *L. monocytogenes*, poznato je da bakteriocini mogu djelovati inhibitorno na rast drugih patogenih bakterija povezanih s hranom kao što su *Clostridium botulinum* i *Staphylococcus aureus* (Nettles i Barefoot, 1993).

### **1.2. Zdravstveni rizici upotrebe sojeva *Lactobacillus sakei* u proizvodnji hrane**

Većina BMK koje se koriste u proizvodnji hrane su generalno prepoznate kao sigurne, odnosno, imaju GRAS (engl. *generally recognized as safe*) status. Međutim, poznato je da BMK mogu biti rezistentne na neke od klinički značajnih antibiotika. Uporaba antibiotika tijekom poljoprivredne proizvodnje je povezana s razvojem rezistentnih bakterija, a hrana je jedan od mogućih transfernih puteva takvih bakterija u gastrointestinalni (GI) trakt (Carattoli, 2008; Mayrhofer i sur., 2006; Van Boxtael i sur., 2012). U GI traktu, BMK mogu horizontalnim transferom prenijeti gene koji kodiraju za antibiotsku rezistenciju na ostale

prisutne bakterije, uključujući patogene. Geni koji kodiraju za rezistenciju na tetraciklin, eritromicin i vankomicin su opisani i karakterizirani kod *Lactococcus lactis*, enterokoka te laktobacila izoliranih iz fermentiranih mesnih i mliječnih proizvoda (Mathur i Singh, 2005).

Jedan od potencijalnih zdravstvenih rizika je i sposobnost sojeva BMK da u određenim uvjetima produciraju biogene amine (BA). BA su organske baze, male molekularne mase sa alifatskom (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatskom (tiramin, 2-feniletilamin) i heterocikličnom (histamin, triptamin) strukturom. Mogu se naći u različitim tipovima hrane, u kojima su uglavnom proizvedeni dekarboksilacijom aminokiselina (Silla Santos, 1996) ili aminacijom i transaminacijom aldehida i ketona (Ascar i Treptow, 1986). Aktivni biogeni amini imaju fiziološki utjecaj na ljudski organizam, a djeluju na kardiovaskularni i živčani sustav. Na kardiovaskularni sustav mogu djelovati povećanjem (polietilamin i tiramin) ili sniženjem krvnog tlaka (histamin). Na živčani sustav djeluju ometajući rad neurotransmitera (Halász i sur., 1994). Za akumulaciju BA u hrani potrebni su prekursori (npr. aminokiseline), prisutnost mikroorganizama sa dekarboksilaznim djelovanjem te dobri uvjeti za njihov rast i dekarboksilaznu aktivnost (ten Brink i sur., 1990).

Suhe fermentirane kobasice predstavljaju pogodnu sredinu za tvorbu i akumulaciju biogenih amina. Visoka razina proteina prisutna u tim proizvodima kao i proteolitička aktivnost tijekom zrenja osiguravaju nastanak prekursora (aminokiselina) za dekarboksilaznu aktivnost bakterija. Visoka koncentracija biogenih amina je povezana s rastom mikrobnih zajednica i ovisi o svježini mesa (Hernandez-Jover i sur., 1997). Dodavanje starter kultura može dovesti do smanjenog nakupljanja BA u kobasicama, pri čemu je nužno starteri sami ne tvore BA i da imaju kompetitivnu sposobnost suzbijanja rasta spontane mikrobiote koja producira amine (Hammes i Hertel, 1996).

## 2. HIPOTEZA I OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

### 2.1. Hipoteza

Pretpostavka ovog istraživanja je da spontano fermentirane kobasice od mesa divljači predstavljaju izvor korisnih bakterija od kojih pojedini sojevi roda *Lactobacillus* imaju dobar tehnološki potencijal te mogu biti sigurni za aplikaciju kao mikrobne kulture u proizvodnji tradicionalnih ili industrijskih kobasica od mesa divljači.

### 2.2. Opći i specifični ciljevi rada

Cilj ovog istraživanja je detaljno karakterizirati i selektirati sojeve *Lb. sakei* koji bi mogli biti aplicirani kao strater i/ili bioprotektivne kulture u proizvodnji suhih fermentiranih kobasica od mesa divljači. Kako bi se ostvario željeni cilj potrebno je istražiti sojeve *Lb. sakei*, prethodno izolirane iz tradicionalno proizvedenih kobasica od divljači, s obzirom na sposobnost acidifikacije, proteolize, lipolize i antimikrobne aktivnosti te odrediti njihovu osjetljivost prema klinički značajnim antibioticima, hemolitički potencijal kao i prisustvo gena koji kodiraju za produkciju biogenih amina.

Specifični ciljevi rada su:

1. Genotipizacija 190 izolata *Lb. sakei* rep-PCR metodom i odabir reprezentativnih predstavnika za daljnju tehnološku i sigurnosnu karakterizaciju
2. Određivanje lipolitičke, proteolitičke, hemolitičke i acidifikacijske aktivnosti sojeva *Lb. sakei*
3. Određivanje osjetljivosti sojeva *Lb. sakei* prema klinički značajnim antibioticima
4. PCR detekcija gena koji kodiraju za biogene amine
5. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti sojeva *Lb. sakei* prema najčešćim patogenima u hrani

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Priprema korištenih otopina**

##### **3.1.1. Fiziološka otopina**

Fiziološka otopina je pripravljena otapanjem 8,5 g natrijevog klorida u 1 L destilirane vode, nakon čega je sterilizirana u autoklavu na 121 °C kroz 15 minuta.

##### **3.1.2. McFarland standard (1)**

McFarland standard 1 je pripremljen miješanjem 0,1 mL 1 % barijevog klorida i 9,9 mL 1 % sumporne kiseline. Kratko je vorteksiran, a zamućenje odgovara  $3 \times 10^8$  CFU/mL.

##### **3.1.3. McFarland standard (0,5)**

McFarland standard 0,5 je pripremljen miješanjem 0,05 mL 1 % barijevog klorida i 9,95 mL 1 % sumporne kiseline. Kratko je vorteksiran, a zamućenje odgovara  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL.

##### **3.1.4. Brilliant Blue R boja (0,05 %)**

0,05 % Brilliant Blue R boja je pripravljena otapanjem 0,5 g Brilliant Blue R u metanolu, octenoj kiselinu i destiliranoj vodi u omjeru 50:10:40.

##### **3.1.5. Fosfatni pufer (20mM)**

20 mM fosfatni pufer je pripravljen otapanjem 27,6 g natrijeva dihidrogenfosfat hidrata i 35,61 g natrijeva hidrogenfosfat dihidrata u destiliranoj vodi. Namještena je pH vrijednost na 7,4 te je dodana destilirana voda do ukupnog volumena od 1 L.

## **3.2. Priprema hranjivih podloga**

### **3.2.1. MRS tekuća hranjiva podloga**

MRS tekuća hranjiva podloga je pripremljena otapanjem 55,2 g MRS podloge (Biolife, Italija) u 1000 mL hladne destilirane vode. Sterilizirana je autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta.

### **3.2.2. MRS kruta hranjiva podloga**

MRS kruta hranjiva podloga je pripremljena suspendiranjem 55,2 g MRS podloge (Biolife, Italija) i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1000 mL hladne destilirane vode. Sterilizirana je autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta.

### **3.2.3. LSM hranjiva podloga**

LSM hranjiva podloga je pripremljena miješanjem 10 % MRS tekućeg medija i 90 % IST medija, a zatim je dodano 7 g agara. 90 % IST medij pripremljen je dodatkom 28,26 g ISO-SENSITEST agara (Oxoid, Engleska) u 900 mL destilirane vode. 10 % MRS tekući medij je pripremljen odvagom 5,52 g MRS podloge (Biolife, Italija) na koju je dodano 100 mL destilirane vode. Komponente su otopljene, pH je namješten na 6,7 – 6,8 uz pomoć klorovodične kiseline. LSM hranjiva podloga je sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta i nakon toga je još jednom ispitana pH vrijednost.

### **3.2.4. Tributirin agar hranjiva podloga**

Tributirin agar hranjiva podloga je pripremljena otapanjem 23 g podloge u 990 mL destilirane vode. Sterilizirana je autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta nakon čega je ohlađena na 80 °C i dodano je 10 mL tributirina. Podloga je homogenizirana ultrazvučnom sondom tijekom 2 minute na 20 V.

### **3.2.5. BHI tekuća hranjiva podloga**

BHI tekuća hranjiva podloga (Biolife, Italija) je pripremljena otapanjem 37 g podloge u 1 L destilirane vode. Podloga ima pH reakciju  $7,4 \pm 0,2$ . Sterilizirana je autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta.

### **3.2.6. BHI kruta hranjiva podloga**

BHI (Biolife, Italija) kruta podloga je pripravljena otapanjem 37 g BHI podloge i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Podloga ima pH reakciju  $7,4 \pm 0,2$ . Sterilizirana je autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta.

### **3.2.7. BHI kruta podloga s 1,5 % obranog mlijeka**

Podloga je pripravljena otapanjem 37 g BHI (Biolife, Italija) tekuće hranjive podloge i 10 g agara (Biolife, Italija) u 900 mL destilirane vode. Sterilizirana je autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta. Posebno je otopljeno 15 g obranog mlijeka u prahu (Biolife, Italija) u 100 mL destilirane vode i sterilizirano autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta. Nakon sterilizacije je otopina mlijeka u prahu dodana prethodno pripremljenoj sterilnoj BHI krutoj podlozi.

### **3.2.8. Podloga s dodanim proteinima sarkoplazme**

Ekstrahirani proteini sarkoplazme su dodani u koncentraciji od 1 mg/mL u podlogu koja sadrži 5 g triptona, 2,5 g ekstrakta kvasca, 1 g glukoze i 15 g agara. Pripremljen medij ima pH 6,9.

### **3.2.9. Liofilizirani mesni medij (LMM)**

Liofilizirani mesni medij je pripravljen otapanjem 10 g glukoze i 3,5 g škroba, u koje je zatim dodano 11,5 g liofiliziranog svinjskog mesa. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem na 121 °C kroz 15 minuta.



### 3.3. Metode za genotipsku karakterizaciju prikupljenih izolata

#### 3.3.1. Grupiranje prikupljenih izolata *Lb. sakei* rep-PCR metodom

Ukupno je prikupljeno 190 izolata *Lb. sakei*. Za grupiranje prikupljenih izolata *Lb. sakei* rep-PCR metodom pripremljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 25  $\mu$ L, a korišteni reagensi i njihovi volumeni i koncentracije su navedeni u Tablici 1. Reakcija je provedena u PCR uređaju ProFlex PCR System (Applied biosystems, SAD) pri uvjetima navedenima u Tablici 2. Korištena je početnica GTG5 (Tablica 3). Dobiveni rep-PCR produkti su razdvojeni na 2 % agaroznom gelu, a dobiveni obrasci analizirani pomoću BioNumerics 7.6.1. programa (Applied Maths, Belgium). Dice koeficijent je korišten za računanje genetske sličnosti izolata, a UPGMA (engl. *Unweight Paired Group Arithmetic Average*) metoda je korištena za klasteriranje. Izabrana je toleranca od 1.0 % i optimizacija od 0,5 % za kreiranje dendrograma.

Tablica 1. Reagensi korišteni za pripremanje reakcijske smjese za rep-PCR.

Reagens	Početni volumen ( $\mu$ L)	Početna koncentracija	Završna koncentracija
Pufer	3	10x	1x
dNTP	0,25	10 mM	0,1 mM
GTG5 početnica	1	50 pmol	2 pmol
DyNAzyme polimeraza	0,25	2 U/ $\mu$ L	1 U
Voda	19,5		
DNA	1		

Tablica 2. Temperaturni profil rep-PCR reakcije.

Dijelovi PCR reakcije	Temperatura ( °C)	Trajanje (min)
Početna denaturacija	95	7
30 ciklusa amplifikacije:		
• Denaturacija	95	1
• sparivanje klice s kalupom	36	1
• sinteza komplementarnih lanaca DNA	72	1
Završno produljivanje lanaca	72	8

### 3.3.2. PCR detekcija gena koji kodiraju za biogene amine

Multiplex PCR reakcijom je određena prisutnost gena koji kodiraju za produkciju histamina (*hdc*), tiramina (*tdc*) i putrescina (*odc*), pri čemu su korištena 3 para oligonukleotidnih početnica (JV16HC/JV17HC, 3/16, P1-rev/P2-for) (Tablica 3). Za detekciju gena koji kodira za kadaverin (*ldc*) je provedena zasebna PCR reakcija s 1 parom oligonukleotidnih početnica (CAD2-R/CAD2-F) (Tablica 3). Pripremljene su reakcijske smjese ukupnog volumena 25 µL, a korišteni reagensi i njihovi volumeni i koncentracije su navedeni u Tablici 4 za *hdc*, *tdc* i *odc*, dok su u Tablici 5 navedeni za *ldc*. Kao pozitivne kontrole korištena je DNA sojeva iz kolekcije Zavoda za mikrobiologiju, Agronomskog fakulteta za koje je u prethodnim istraživanjima potvrđeno prisustvo *hdc* i *tdc* gena (MSB 11), kao i *odc* gena (MSB 425). DNA *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (DSMZ 20346) je korištena kao pozitivna kontrola za detekciju *ldc* gena. Amplifikacija je provedena u PCR uređaju ProFlex PCR System (Applied biosystems, SAD) pri uvjetima navedenima u Tablicama 6 i 7.

Tablica 3. Oligonukleotidne početnice korištene za u ovom istraživanju.

Ciljani gen	Oligonukleotidna početnica	Sekvenca početnice (5' → 3')	Veličina očekivanog PCR produkta (pb)	Referenca
-	GTG5	GTGGTGGTGGTG GTG	-	Švec i sur., 2005
<i>hdc</i> (histidin dekarboksilaza)	JV16HC	AGATGGTATTGT TTCTTATG	367	De las Rivas i sur., 2005
	JV17HC	AGACCATACACC ATAACCTT		
<i>tdc</i> (tirozin dekarboksilaza)	P1-rev	CCRTARTCNGGN ATAGCRAARTCN GTRTG	924	
	P2-for	GAYATNATNGG NATNGGNYTNG AYCARG		
<i>odc</i> (ornitin dekarboksilaza)	3	GTNTTYAAYGCN GAYAARACNTA YTTYGT	1446	
	16	TACRCARAATAC TCCNGGNGGRTA NGG		
<i>ldc</i> (lizin dekarboksilaza)	CAD2-R	CAYRTNCCNGGN CAYAA	1185	
	CAD2-F	GGDATNCCNGGNG GRTA		

Tablica 4. Reagensi korišteni za pripremanje reakcijske smjese za detekciju gena koji kodiraju za produkciju histamina (*hdc*), tiramina (*tdc*) i putrescina (*odc*) multiplex PCR metodom.

Reagens	Početni volumen (μL)	Početna koncentracija	Završna koncentracija
Pufer	2,5	10x	1x
dNTP	0,5	10 mM	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,25	50 mM	2,5 mM
JV16HC	0,75	10 pmol	0,3 pmol
JV17HC	0,75	10 pmol	0,3 pmol
3	2,5	10 pmol	1 pmol
16	2,5	10 pmol	1 pmol
P1	5	10 pmol	2 pmol
P2	5	10 pmol	2 pmol
Taq polimeraza	0,25	2 U/μL	1 U
Voda	3		
DNA	1		

Tablica 5. Reagensi korišteni za pripremanje reakcijske smjese za detekciju gena koji kodiraju za produkciju kadaverina (*ldc*) PCR metodom.

Reagens	Početni volumen (μL)	Početna koncentracija	Završna koncentracija
Pufer	2,5	10x	1x
dNTP	0,5	10 mM	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,25	50 mM	2,5 mM
CAD2-F	2,5	10 pmol	1 pmol
CAD2-R	2,5	10 pmol	1 pmol
Taq polimeraza	0,25	2U/μL	1 U
Voda	14,50		
DNA	1		

Tablica 6. Temperaturni profil PCR reakcije za ispitivanje prisutnosti gena za proizvodnju histamina (*hdc*), tiramina (*tdc*) i putrescina (*odc*).

Dijelovi PCR reakcije	Temperatura ( °C)	Trajanje (min)
Početna denaturacija	95	10
<b>30 ciklusa amplifikacije:</b>		
• Denaturacija	95	0,5
• sparivanje klice s kalupom	52	0,5
• sinteza komplementarnih lanaca DNA	72	2
Završno produljivanje lanaca	72	10

Tablica 7. Temperaturni profil PCR reakcije za ispitivanje prisutnosti gena za proizvodnju kadaverina (*ldc*).

Dijelovi PCR reakcije	Temperatura ( °C)	Trajanje (min)
Početna denaturacija	94	10
<b>35 ciklusa amplifikacije:</b>		
• Denaturacija	94	1
• sparivanje klice s kalupom	50	1
• sinteza komplementarnih lanaca DNA	72	1,5

PCR produkti su razdvojeni horizontalnom gel elektroforezom na 1.5 % agaroznom gelu, tijekom 60 minuta na 90 V. Gel je obojan etidijevim bromidom (oko 30 minuta). Dobiveni PCR produkti su vizualizirani na UV transiluminatoru i fotografirani digitalnom kamerom.

### 3.4. Određivanje antibiotske osjetljivosti sojeva *Lb. sakei*

Za određivanje osjetljivosti *Lb. sakei* prema izabranim klinički značajnim antibioticima, prikupljeni sojevi su uzgojeni na MRS krutim hranjivim podlogama (vidi: 3.2.2.), tijekom 48 h na 30 °C u anaerobnim uvjetima. Izabrano je nekoliko naraslih kolonija koje su u aseptičkim uvjetima prenesene u 5 mL sterilne fiziološke otopine (vidi: 3.1.1.), dok nije postignuto zamućenje kao McFarland 1 standard (vidi: 3.1.2.). Sadržaj epruvete je vorteksiran, nakon čega je u inokulum uronjen sterilni vateni štapić pomoću kojeg je kultura nanesena na LSM kruti hranjivi medij (vidi: 3.2.3.) na način da je impregnirana cijela podloga. Na inokuliranu LSM hranjivu podlogu su dodani izabrani antibiotici. U Tablici 8 su prikazani svi korišteni antibiotici i njihove koncentracije. Inokulirane podloge s utisnutim antibioticima su inkubirane tijekom 24 sata, na 30 °C u anaerobnim uvjetima, nakon čega je izmjeren promjer zone inhibicije rasta oko antibiotskih diskova.

Tablica 8. Popis korištenih antibiotika, njihove oznake i koncentracije.

Korišteni antibiotici	Oznaka korištenih antibiotika	Koncentracija korištenih antibiotskih diskova (µg)
Eritromicin	E2	2
Ampicilin	AM2	2
Tetraciklin	Te5	5
Klindamicin	CC2	2
Kloramfenikol	C30	30
Gentamicin	GM10	10
Kanamycin	K30	30
Vankomicin	Va5	5

### 3.5. Određivanje hemolitičke aktivnosti

Hemolitička aktivnost prikupljenih laktobacila je istražena na način da je svaki soj iscrpljen na Columbia krvnom agaru (Biolife, Italija). Nakon inkubacije u anaerobnim uvjetima, tijekom 24 h na 30 °C je očitana rezultat temeljem vidljivih promjena na korištenoj podlozi.

## **3.6. Metode za određivanje tehnoloških karakteristika sojeva *Lb. sakei***

### **3.6.1. Određivanje lipolitičke aktivnosti**

Za određivanje lipolitičke aktivnosti, sojevi su uzgojeni na način kako je to opisano u odjeljku 3.4. Izabrano je nekoliko kolonija koje su prenesene u 5 mL sterilne fiziološke otopine do postizanja zamućenja ekvivalentnom McFarland 0,5 standardu (vidi: 3.1.3.). Lipolitička aktivnost je ispitana na tributirin agar hranjivim podlogama (vidi: 3.2.4.) na način da je 2  $\mu$ L kulture mikrobiološkom pipetom aplicirano direktno u podlogu, a na istu podlogu je apliciran i sterilan celulozni disk na kojeg je dodano 10  $\mu$ L kulture. Ploče su inkubirane 3 dana na 30 °C. Ispitivanje lipolitičke aktivnosti je napravljeno u 3 ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost promjera (mm) zone razgradnje tributirina oko celuloznog diska, odnosno oko mjesta direktne aplikacije kulture u agar. Kao pozitivna kontrola korišten je *Pseudomonas fluorescens* (WCS 417r).

### **3.6.2. Određivanje proteolitičke aktivnosti**

Proteolitička aktivnost prikupljenih sojeva je istražena na dva načina: na BHI krutoj hranjivoj podlozi s dodatkom 1,5 % obranog mlijeka (Biolife, Italija) i na agaru s dodanim proteinima sarkoplazme. Kao pozitivna kontrola za obje metode je korišten *Pseudomonas fluorescens* (WCS 417r).

#### **3.6.2.1. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti na BHI krutoj hranjivoj podlozi s 1,5 % obranog mlijeka**

Za ispitivanje proteolitičke aktivnosti, sojevi su uzgojeni na način kako je to opisano u odjeljku 3.4. Izabrano je nekoliko kolonija koje su prenesene u 5 mL sterilne fiziološke otopine do postizanja zamućenja ekvivalentno McFarland 0,5 standardu. Uzeto je po 2  $\mu$ L ovako pripremljenog inokuluma i aplicirano direktno u BHI krutu hranjivu podlogu s dodanim obranim mlijekom (vidi: 3.2.7.), te je također 10  $\mu$ L inokuluma dodano na sterilni celulozni disk postavljen na istu podlogu. Ispitivanje je provedeno u 3 ponavljanja, a rezultati su izraženi kao promjer zone razgradnje (mm) obranog mlijeka oko sterilnog celuloznog diska, odnosno mjesta direktne aplikacije u agar.

### 3.6.2.2. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti na agaru s dodanim proteinima sarkoplazme

Za pripremu agara s dodanim proteinima sarkoplazme, ovi su proteini najprije izolirani iz svinjskog mesa prema protokolu Mauriello i sur. (2002). Odvagano je 20 g mesa u koje je dodano 200 mL fosfatnog pufera (20 mM; pH 7,4 - vidi: 3.1.5.). Smjesa je homogenizirana u homogenizatoru Stomacher<sup>®</sup> 400 Circulator (Seward, Engleska) 8 minuta, nakon čega je centrifugirana 11,180 g tijekom 20 min na 4 °C. Supernatant koji sadrži proteine sarkoplazme (1,95 mg/ml) je filtriran kroz Whatman filter papir, te je dodan u koncentraciji od 1 mg/ml u hranjivi medij (vidi: 3.2.8.). Nakon polimerizacije, u agaru su u aseptičnim uvjetima napravljene udubine promjera 6 mm u koje je dodano 70 µl prekonoćne kulture *Lb. sakei*. Ploče su inkubirane u anaerobnim uvjetima na 30 °C tijekom 48 h, nakon čega je agar izvađen iz petrijevki i bojan 5 minuta u 0,05 % Brilliant Blue R (vidi: 3.1.4.) te zatim odbojan u smjesi metanola, octene kiseline i destilirane vode u omjeru 25:5:70, nakon čega je očitana zona razgradnje.

### 3.6.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost prikupljenih *Lb. sakei* je ispitana na način kako je to opisano u Domig i sur. (2014). Sojevi su najprije uzgojeni u tekućoj MRS hranjivoj podlozi (Biolife, Italija) tijekom 24 h na 30 °C, nakon čega je pomoću sterilnog vatenog štapića kultura inokulirana na BHI krutu hranjivu podlogu (Biolife, Italija) tako da su povučene dvije crte u razmaku od 2 cm. Ploče su inkubirane anaerobno, 24 h na 30 °C. Istovremeno su nacijepljene indikatorske bakterije u 5 mL tekuće BHI hranjive podloge (Biolife, Italija - vidi: 3.2.5.) i inkubirane prekonoćno, na način da su na 30 °C inkubirani *Brochotrix termospatha* (LMG 17208), *Weissella viridescens* (DSM 20410) i *Bacillus cereus* (DSM 6791), a na 37 °C *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (DSM 14221), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Escherichia coli* (ATCC 25922) i *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (DSM 20231). Zatim je na BHI krutim podlogama s naraslim laktobacilima dodano po 5 mL prekonoćne kulture indikatorske bakterije između dviju crta, kao i na rubu petrijeve zdjelice (kontrola). Ovako pripremljene ploče su inkubirane tijekom 48 sati prema potrebama indikatora. Antimikrobna aktivnost je provedena u 2 ponavljanja, a rezultat je određen usporedbom veličine naraslih indikatorskih kolonija apliciranih između naraslih laktobacila s istim indikatorima apliciranim na rubu petrijevke (kontrola).

#### **3.6.4. Određivanje acidifikacije**

Acidifikacija je ispitana na način da je uzeta po jedna kolonija naraslih sojeva laktobacila sa MRS krutih podloga (Biolife, Italija) i nacijepljena u 10 mL liofiliziranog mesnog medija (LMM; vidi: 3.2.9.). Sposobnost acidifikacije istraživanih sojeva, odnosno pH vrijednost inokuluma je mjerena nakon 1. i 7. dana inkubacije, a između svakog mjerenja elektroda pH metra je sterilizirana pomoću 3 % klorovodične kiseline i isprana sterilnom destiliranom vodom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost 3 neovisna mjerenja.

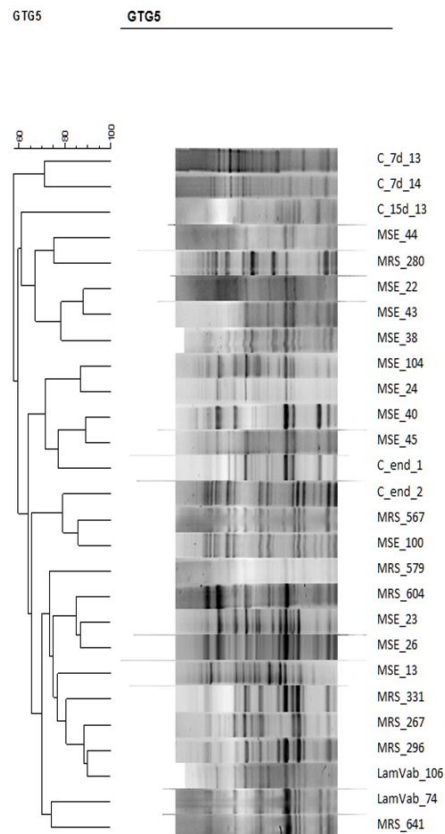


## 4. REZULTATI

### 4.1. Genotipska karakterizacija

#### 4.1.1. Grupiranje prikupljenih izolata rep-PCR metodom

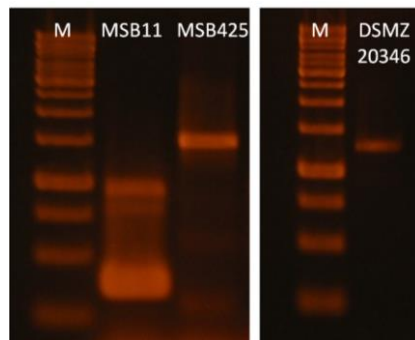
U prethodnom istraživanju prikupljeno je ukupno 190 izolata *Lb. sakei* koji su tijekom ovog istraživanja grupirani na temelju rep-PCR obrazaca. U različite grupe su odvojeni sojevi koji su pokazali manje od 90 % sličnosti. Pomoću BioNumerics 7.6.1. programa (Applied Maths, Belgium) je detektirano 27 grupa koje su sadržavale više od jednog soja te je iz svake grupe odabran jedan soj za daljnju tehnološku i sigurnosnu karakterizaciju. Na Slika 1 prikazan je dendrogram 27 odabranih sojeva.



Slika 1. Dendrogram izabranih 27 sojeva dobivenih temeljem rep-PCR obrazaca pomoću BioNumerics 7.6.1. programa, amplificiranih sa GTG5 početnicom i razdvojenih na 2 % agaroznom gelu. Korišten je Dice koeficijent za računanje genetske sličnosti izolata i UPGMA metoda za klasteriranje. Izabrana je toleranca od 1,0 % i optimizacija od 0,5 % za kreiranje dendrograma.

#### 4.1.2. PCR detekcija gena koji kodiraju za produkciju biogenih amina

PCR metodom je detektirano prisutstvo gena koji kodiraju za izabrane biogene amine. Kod niti jednog soja nije utvrđeno prisutstvo gena koji kodiraju za produkciju histamina (*hdc*), putrescina (*odc*) i kadaverina (*ldc*), dok je kod 4 soja detektiran *tdc* gen koji kodira za produkciju tiramina (Tablica 9). Na Slika 2 prikazani su PCR produkti sojeva korištenih kao pozitivne kontrole u ovim reakcijama.



Slika 2. PCR produkti dobiveni amplifikacijom DNA sojeva korištenih kao pozitivne kontrole. Oznake redaka: M=marker 1 kb, MSB11=pozitivna kontrola za *hdc* (367 pb) i *tdc* (924 pb) gene, MSB425=pozitivna kontrola za *odc* gen (1446 pb), M=marker 1kb, DSMZ 20346=pozitivna kontrola *ldc* gen (1185 pb).

Tablica 9. Rezultati PCR detekcije gena koji kodiraju za produkciju biogenih amina.

Naziv soja	PCR detekcija gena koji kodiraju za produkciju biogenih amina			
	Histamin <i>hdc</i> (histidin dekarboksilaza))	Putrescin <i>odc</i> (ornitin dekarboksilaza)	Tiramin <i>tdc</i> (tirozin dekarboksilaza)	Kadaverin <i>ldc</i> (lizin dekarboksilaza)
C_7d_13	-	-	-	-
C_7d_14	-	-	-	-
C_15d_13	-	-	-	-
C_end_1	-	-	-	-
MSE_24	-	-	-	-
MSE_44	-	-	-	-
MRS_280	-	-	+	-
LamVab_106	-	-	+	-
LamVab_74	-	-	+	-
MRS_641	-	-	+	-
MRS_604	-	-	-	-
MRS_579	-	-	-	-
MRS_567	-	-	-	-
C_end_2	-	-	-	-
MSE_40	-	-	-	-
MSE_45	-	-	-	-
MSE_38	-	-	-	-
MSE_43	-	-	-	-
MSE_104	-	-	-	-
MSE_100	-	-	-	-
MSE_23	-	-	-	-
MSE_22	-	-	-	-
MSE_26	-	-	-	-
MSE_13	-	-	-	-
MRS_267	-	-	-	-
MRS_296	-	-	-	-
MRS_331	-	-	-	-

+ detektiran je gen koji kodira za produkciju određenog biogenog amina

- nije detektiran gen koji kodira za produkciju određenog biogenog amina

## **4.2. Antibiotička osjetljivost sojeva *Lb. sakei***

Metodom difuzije u agar je ispitana antibiotička osjetljivost prikupljenih izolata na navedene antibiotike; eritromicin (E2), ampicilin (AM2), tetraciklin (Te5), klindamicin (CC2), kloramfenikol (C30), gentamicin (GM10), kanamicin (K30) i vankomicin (Va5). Temeljem izmjerene zone inhibicije rasta oko antibiotičkih diskova, a prema uputama proizvođača, određena je razina osjetljivosti izolata (Tablica 10). Većina sojeva (92,59 %) je pokazala rezistenciju na vankomicin. Na gentamicin je rezistentno 14,8 % sojeva, na kanamicin i klindamicin 11,1 % sojeva, a na eritromicin i tetraciklin 7,4 %, dok je na ampicilin rezistentno svega 3,7 % sojeva. Na kloramfenikol nije rezistentan niti jedan ispitivani soj.

Tablica 10. Razina osjetljivosti izabranih sojeva prema istraživanim antibioticima.

Naziv soja	Ampicilin (AM2)	Vankomicin (Va5)	Gentamicin (GM10)	Eritromicin (E2)	Tetraciklin (Te5)	Kanamicin (K30)	Klindamicin (CC2)	Kloramfenikol (C30)
C_7d_13	O	R	O	O	R	O	R	O
C_7d_14	UO	R	UO	O	O	O	O	O
C_15d_13	O	R	O	O	O	O	O	O
C_end_1	UO	R	O	O	O	UO	O	O
MSE_24	O	R	R	UO	O	R	R	O
MSE_44	O	R	R	O	O	R	O	O
MRS_280	O	R	O	O	R	UO	R	O
LamVab_106	O	O	O	O	O	O	O	O
LamVab_74	O	R	UO	O	O	O	O	O
MRS_641	O	R	O	O	O	O	O	O
MRS_604	O	R	O	R	O	O	O	O
MRS_579	O	R	O	O	O	O	O	O
MRS_567	O	R	UO	O	O	UO	O	O
C_end_2	O	R	O	O	O	UO	O	O
MSE_40	O	R	R	UO	UO	O	O	O
MSE_45	O	R	R	UO	UO	O	O	O
MSE_38	O	R	O	O	UO	UO	O	O
MSE_43	O	R	UO	UO	UO	UO	O	O
MSE_104	O	UO	O	O	UO	O	O	O
MSE_100	R	R	O	R	O	O	O	O
MSE_23	O	R	UO	UO	UO	R	O	O
MSE_22	O	R	UO	UO	UO	UO	O	O
MSE_26	O	R	UO	UO	UO	UO	O	O
MSE_13	O	R	O	UO	UO	UO	O	O
MRS_267	O	R	UO	O	O	UO	O	O
MRS_296	UO	R	UO	O	O	UO	O	O
MRS_331	UO	R	UO	O	O	UO	O	O

R=rezistentan na antibiotik; UO=umjereno osjetljiv; O=osjetljiv

### 4.3. Hemolitička aktivnost

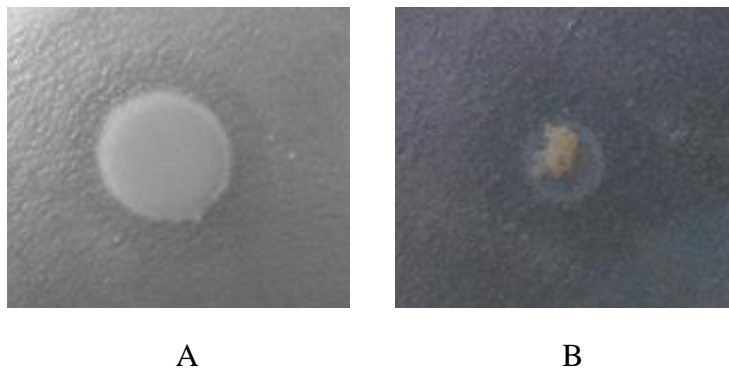
Nakon iscrpljenja sojeva *Lb. sakei* na Columbia krvnom agaru, kod nijednog testiranog soja laktobacila nisu primijećene vidljive promjene na podlozi. Stoga je za sve izolate potvrđena  $\gamma$ -hemoliza, odnosno, niti jedan od izolata nije hemolitički aktivan kao što je vidljivo na Slika 3.



Slika 3. Rast sojeva *Lb. sakei* na Columbia krvnom agaru. Nakon inkubacije nisu primijećene vidljive promjene u podlozi niti kod jednog testiranog soja, odnosno, niti jedan izolat nije hemolitički aktivan.

#### 4.4. Lipolitička aktivnost

Svi istraživani sojevi su pokazali određeni oblik lipolitičke aktivnosti (Tablica 11). Metodom difuzije diska u agaru je najmanja izmjerena zona lipolize iznosila 5,50 mm (MRS\_296), a najveća 9,75 mm (C\_end\_1). Izmjerene zone lipolize metodom direktne aplikacije u agaru su se kretale između 1,00 do 7,50 mm. Najveću lipolitičku aktivnost su pokazala 4 soja (C\_15d\_13, C\_end\_1, MSE\_44, MSE\_26) koji su metodom difuzije diska pokazali zonu razgradnje  $\geq 9$  mm, odnosno metodom direktne aplikacije u agar  $\geq 3,50$  mm kao što je vidljivo na Slika 4.



Slika 4. Lipolitička aktivnost određena metodom difuzije u agaru (A) i direktnom aplikacijom kulture u agar (B) za soj C\_end\_1, za kojeg je utvrđeno kako ima izraženu sposobnost razgradnje tributirina.

Tablica 11. Lipolitička aktivnost istraživanih sojeva mjerena metodom difuzije celuloznih diskova i direktnom aplikacijom kulture u agar.

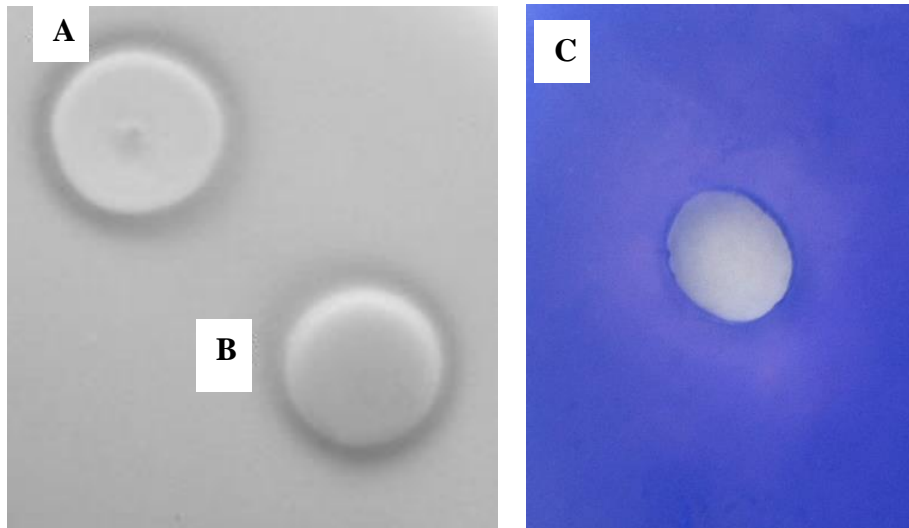
Naziv soja	Lipolitička aktivnost mjerena metodom difuzije diska u agaru	Lipolitička aktivnost mjerena metodom direktne aplikacije kulture u agar
	Prosječna vrijednost (mm) ± standardna devijacija	Prosječna vrijednost (mm) ± standardna devijacija
C_7d_13	8,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00
C_7d_14	8,25 ± 0,35	3,50 ± 0,00
C_15d_13	9,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
C_end_1	9,75 ± 0,35	3,50 ± 0,00
MSE_24	8,50 ± 0,71	3,00 ± 0,00
MSE_44	9,00 ± 0,00	7,50 ± 0,71
MRS_280	8,75 ± 0,35	3,25 ± 0,35
LamVab_106	8,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00
LamVab_74	8,00 ± 0,00	3,25 ± 0,35
MRS_641	7,25 ± 0,35	2,75 ± 0,35
MRS_604	7,75 ± 0,35	2,25 ± 0,35
MRS_579	8,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00
MRS_567	7,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00
C_end_2	8,75 ± 0,35	3,25 ± 0,35
MSE_40	6,75 ± 0,35	2,00 ± 0,00
MSE_45	5,75 ± 1,06	1,00 ± 1,41
MSE_38	6,50 ± 0,00	2,00 ± 0,00
MSE_43	7,50 ± 0,71	1,00 ± 0,00
MSE_104	6,75 ± 0,35	1,00 ± 1,41
MSE_100	7,50 ± 0,71	2,00 ± 0,00
MSE_23	6,75 ± 0,35	2,25 ± 0,35
MSE_22	7,25 ± 0,35	2,25 ± 0,35
MSE_26	9,50 ± 0,71	3,50 ± 2,12
MSE_13	8,50 ± 0,71	5,50 ± 0,71
MRS_267	6,25 ± 0,35	2,50 ± 0,71
MRS_296	5,50 ± 0,71	2,75 ± 0,35
MRS_331	5,75 ± 0,35	2,50 ± 0,00



## 4.5. Proteolitička aktivnost

Ispitivanje proteolitičke aktivnosti provedeno je na BHI krutoj hranjivoj podlozi s dodatkom obranog mlijeka (1,5 %) na dva načina: difuzijom diska u agaru i direktnom aplikacijom kulture u agaru (Slika 5). Proteolitička aktivnost prikupljenih laktobacila je također istražena pomoću hranjive podloge s dodanim proteinima sarkoplazme, prethodno ekstrahiranim iz svinjskog mesa. Rezultati su prikazani u Tablici 12.

Soj C\_7d\_13 je pokazao potpuni izostanak proteolitičke aktivnosti, odnosno nesposobnost da razgradi kazein u mediju s dodatkom obranog mlijeka. Slično tome, MRS\_604 je pokazao izostanak proteolitičke aktivnosti na istom mediju istražen metodom difuzije diska, odnosno vrlo slabu aktivnost kada je ispitan metodom direktne aplikacije kulture u agar. U prosjeku, sojevi su prilikom difuzije diska u agaru pokazali proteolitičku aktivnosti od 8,43 mm (0 – 12,50 mm), odnosno 4,89 mm (0 – 10,00 mm) kada je kultura direktno aplicirana u agar. Izrazita proteolitička aktivnost je zabilježena kod 10 sojeva (MSE\_24, MSE\_44, MRS\_280, MSE\_40, MSE\_45, MSE\_38, MSE\_43, MSE\_26, MRS\_267, MRS\_331), koji su svi pokazali zonu razgradnje obranog mlijeka (kazeina)  $\geq 10,00$  mm difuzijom diska u agaru, tj.  $\geq 5,00$  mm direktnom aplikacijom kulture u agaru. Na agaru s dodanim proteinima sarkoplazme jedino je soj C\_7d\_14 pokazao izrazitu proteolitičku aktivnost, dok je kod ostalih ona potpuno izostala (Tablica 12).



Slika 5. Proteolitička aktivnost određena na hranjivoj podlozi s dodanim obranim mlijekom, metodom difuzije diska u agaru (A) i direktnom aplikacijom kulture u agar (B) za soj C\_7d\_14 za kojeg je utvrđeno kako ima izraženu proteolitičku aktivnost. Također je prikazana sposobnost soja C\_7d\_14 da razgradi proteine sarkoplazme (C).

Tablica 12. Proteolitička aktivnost sojeva istražena na BHI podlozi s dodanim obranim mlijekom (1,5 %) i na podlozi s dodanim proteinima sarkoplazme koji su prethodno ekstrahirani iz svinjskog mesa.

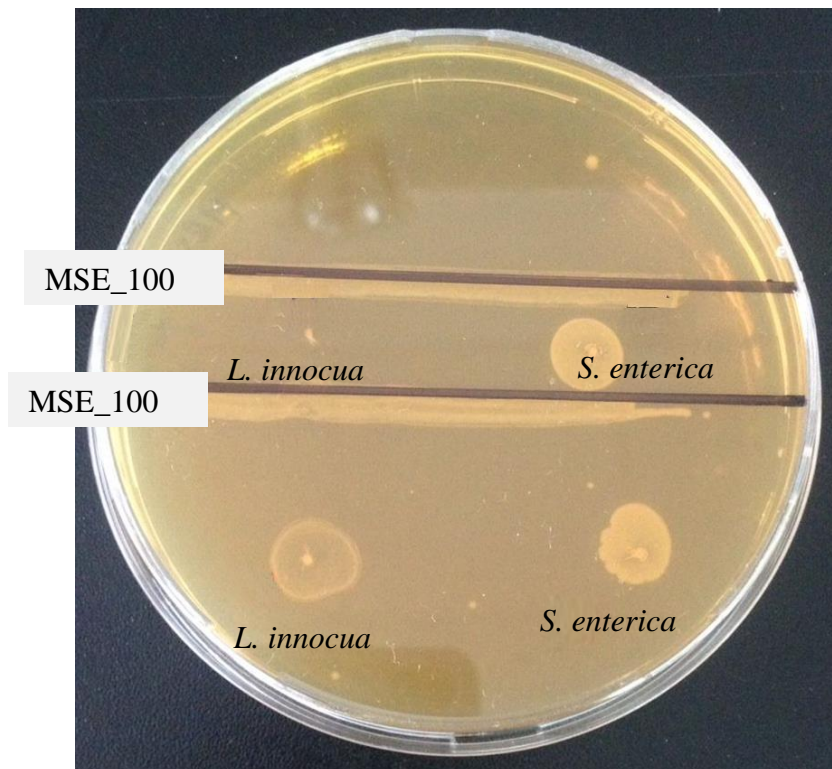
Naziv soja	Proteolitička aktivnost mjerena na BHI krutoj podlozi s dodanim obranim mlijekom (1,5 %)		Proteolitička aktivnost mjerena na podlozi s dodanim proteinima sarkoplazme
	Metoda difuzije diska u agaru	Metoda direktne aplikacije kulture u agar	
	Prosječna vrijednost (mm) ± standardna devijacija	Prosječna vrijednost (mm) ± standardna devijacija	
C_7D_13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
C_7D_14	7,25 ± 0,35	3,50 ± 0,71	+
C_15D_13	7,00 ± 0,00	4,50 ± 0,71	-
C_END_1	9,50 ± 0,71	3,50 ± 0,71	-
MSE_24	11,50 ± 0,71	6,75 ± 0,35	-
MSE_44	12,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	-
MRS_280	11,00 ± 1,41	9,50 ± 0,71	-
LAMVAB_106	7,75 ± 0,35	4,00 ± 0,00	-
LAMVAB_74	7,75 ± 0,35	4,50 ± 0,71	-
MRS_641	8,00 ± 0,00	5,75 ± 1,06	-
MRS_604	0,00 ± 0,00	2,75 ± 0,35	-
MRS_579	7,25 ± 0,35	3,50 ± 0,71	-
MRS_567	6,75 ± 0,35	4,50 ± 0,71	-
C_END_2	8,00 ± 0,00	4,25 ± 0,35	-
MSE_40	10,50 ± 0,71	6,00 ± 0,00	-
MSE_45	12,00 ± 0,00	5,50 ± 0,71	-
MSE_38	11,50 ± 0,71	5,50 ± 0,71	-
MSE_43	11,00 ± 1,41	5,00 ± 0,00	-
MSE_104	6,50 ± 0,71	3,50 ± 0,71	-
MSE_100	6,50 ± 0,71	3,00 ± 0,00	-
MSE_23	7,00 ± 0,00	4,50 ± 0,71	-
MSE_22	8,50 ± 0,71	4,50 ± 0,71	-
MSE_26	12,50 ± 0,71	7,00 ± 0,00	-
MSE_13	8,00 ± 0,00	4,50 ± 0,71	-
MRS_267	10,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	-
MRS_296	9,50 ± 0,71	5,00 ± 0,00	-
MRS_331	10,50 ± 0,71	6,00 ± 0,00	-

+ soj pokazuje proteolitička aktivnost na podlozi s dodanim proteinima sarkoplazme

- soj ne pokazuje proteolitičku aktivnost na podlozi s dodanim proteinima sarkoplazme

#### 4.6. Antimikrobna aktivnost

Rezultati antimikrobne aktivnosti sojeva *Lb. sakei* su prikazani u Tablici 13. Sojevi su kategorizirani su tri kategorije: oni koji nisu pokazali sposobnost antimikrobne aktivnosti (-), oni koji djelomično inhibiraju rast indikatorske bakterije (+/-) te oni koji u potpunosti inhibiraju rast indikatora. Na Slika 6 su prikazani rezultati antimikrobne aktivnosti soja MSE\_100 prema *Salmonella enterica* (DSM 14221) i *Listeria innocua* (ATCC 33090). Osam je sojeva koji nisu pokazali antimikrobnu aktivnost prema niti jednom indikatoru (*Brochotrix termospachta* (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). Suprotno tome, sojevi MSE\_23 i MSE\_13 su prema svim ispitivanim indikatorskim bakterijama pokazali potpunu inhibiciju. Najveći broj sojeva (17) je pokazao neki oblik antimikrobne aktivnosti (potpunu ili djelomičnu inhibiciju) prema *L. innocua* (ATCC 33090).



Slika 6. Rezultati antimikrobne aktivnosti soja MSE\_100 prema *Salmonella enterica* (DSM 14221) i *Listeria innocua* (ATCC 33090). Usporedbom naraslih indikatorskih kultura između istraživanog soja s naraslim kulturama na rubu ploče (kontrola) vidljivo je kako soj MSE\_100 pokazuje antimikrobnu aktivnost prema *L. innocua* (ATCC 33090), dok prema *S. enterica* (DSM 14221) nije zabilježena antimikrobna aktivnost.

Tablica 13. Rezultati antimikrobne aktivnosti sojeva *Lb. sakei* prema izabranim indikatorskim bakterijama.

Naziv soja	Korištene 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 termospahta</i> (LMG 17208)	<i>Weissella viridescens</i> (DSM 20410)	<i>Bacillus cereus</i> (DSM 6791)
C_7d_13	-	-	-	-	-	-	-
C_7d_14	-	-	-	-	-	-	-
C_15d_13	-	-	-	-	-	-	-
C_end_1	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
MSE_24	+	+	+/-	+	+	+	+
MSE_44	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+
MRS_280	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
LamVab_106	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-
LamVab_74	-	-	-	-	-	+/-	+
MRS_641	+	+/-	+	+	+	+	+
MRS_604	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-
MRS_579	-	+/-	-	-	-	-	-
MRS_567	-	-	-	-	-	-	-
C_end_2	-	-	-	-	-	-	-
MSE_40	+/-	+/-	+	+	+	+	+
MSE_45	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
MSE_38	-	+/-	-	-	-	-	-
MSE_43	+	+/-	-	-	-	+/-	-
MSE_104	-	-	-	-	-	-	-
MSE_100	-	+	+	+	+	-	+/-
MSE_23	+	+	+	+	+	+	+
MSE_22	-	-	-	-	-	-	-
MSE_26	-	-	-	-	-	-	-
MSE_13	+	+	+	+	+	+	+
MRS_267	-	+/-	+	+	+/-	-	+/-
MRS_296	+	+/-	+/-	+	+/-	-	+
MRS_331	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-

- nema inhibicije (nema razlike u veličini ispitivanih kolonija indikatorskih bakterija u odnosu na kontrolu)

+/- razlika između ispitivane kolonije (narasle između inokuliranih laktobacila) i kontrole (narasle na rubu petrijevke) iznosi 1 mm

+ potpuna inhibicija indikatorske bakterija od strane ispitivanog soja

## 4.7. Acidifikacija

Sposobnost sojeva *Lb. sakei* da zakisele mesni medij je prikazana je u Tablici 14. Rezultat je izražen kao srednja vrijednost 3 neovisna mjerenja, prvo nakon 24 h inkubacije, a zatim nakon 7 dana. Početni pH sterilnog mesnog medija je iznosio 5,93. Nakon 24 sata inkubacije raspon pH vrijednosti se kretao između pH = 3,76 do 5,89, a ukupno je 6 sojeva (C\_15d\_13, MRS\_280, MRS\_604, MRS\_267, MRS\_296, MRS\_331) snizilo pH vrijednost medija < 4.00. Nakon 7 dana inkubacije, Studentskim t-testom je sa 99 % sigurnosti ( $p < 0.01$ ) utvrđen signifikantan pad pH vrijednosti u odnosu na 24 h, te je iznosio između pH = 3,37 - 4,45.

Tablica 14. Prosječna promjena pH vrijednosti nakon 24 h i 7 dana inkubacije.

Naziv soja	pH vrijednost izmjerena nakon 24 h inkubacije	pH vrijednost izmjerena nakon 7 dana inkubacije
	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija	Prosječna vrijednost ± standardna devijacija
C_7d_13	5,35 ± 0,56	3,53 ± 0,24
C_7d_14	5,00 ± 1,14	3,54 ± 0,08
C_15d_13	3,77 ± 0,04	3,40 ± 0,03
C_end_1	5,71 ± 0,08	3,46 ± 0,08
MSE_24	4,41 ± 0,33	3,58 ± 0,08
MSE_44	5,33 ± 0,03	4,16 ± 0,57
MRS_280	3,77 ± 0,04	3,38 ± 0,03
LamVab_106	5,78 ± 0,01	3,39 ± 0,04
LamVab_74	4,93 ± 1,19	3,43 ± 0,11
MRS_641	4,64 ± 0,06	3,66 ± 0,08
MRS_604	3,79 ± 0,01	3,38 ± 0,02
MRS_579	5,35 ± 0,60	3,41 ± 0,06
MRS_567	5,33 ± 0,06	3,44 ± 0,01
C_end_2	4,11 ± 0,02	3,60 ± 0,04
MSE_40	5,80 ± 0,08	3,43 ± 0,13
MSE_45	5,69 ± 0,07	3,80 ± 0,05
MSE_38	5,79 ± 0,01	3,63 ± 0,01
MSE_43	5,14 ± 0,07	4,46 ± 0,06
MSE_104	5,88 ± 0,06	3,69 ± 0,11
MSE_100	4,63 ± 0,10	3,82 ± 0,08
MSE_23	5,21 ± 0,08	3,74 ± 0,02
MSE_22	5,71 ± 0,04	4,02 ± 0,15
MSE_26	5,76 ± 0,04	4,09 ± 0,25
MSE_13	5,89 ± 0,06	3,54 ± 0,06
MRS_267	3,84 ± 0,04	3,59 ± 0,12
MRS_296	3,88 ± 0,03	3,56 ± 0,06
MRS_331	3,98 ± 0,06	3,53 ± 0,06

## 5. RASPRAVA

Iako je autohtona mikrobiota mnogih tradicionalnih fermentiranih proizvoda od mesa domaćih životinja detaljno istražena, takva su saznanja o kobasicama od mesa divljači vrlo ograničena. Sastav mikrobiote suhих, fermentiranih kobasica od divljači može varirati ovisno o specifičnim čimbenicima povezanim uz način života životinje, odstrjela divljači i same obrade mesa (Gill, 2007; Kegalj i sur., 2012). Budući da se takve kobasice proizvode bez starter kultura i to često u varijabilnim uvjetima, gotov proizvod može rezultirati neujednačenom kvalitetom i upitnim mikrobiološkim sastavom. Primjerice, Markov i sur. (2013) su pokazali kako svaka od 15 analiziranih kobasica proizvedenih u Hrvatskoj od različitih vrsta mesa divljači može predstavljati zdravstvene rizike zbog velikog broja detektiranih oportunističkih patogena. Ovakvi rezultati ukazuju na nužnost standardizacije i kontrole čitavog proizvodnog procesa, a jedan od načina je dodavanje starter kultura, uz odabir mesa dobre kvalitete i pridržavanje pravila dobre proizvođačke prakse. U ovom radu prikupljeno je ukupno 190 izolata *Lactobacillus sakei*, te je nakon njihovog grupiranja rep-PCR metodom za daljnja istraživanja izabrano 27 sojeva, s ciljem njihove potencijalne upotrebe kao starter kultura u tradicionalnoj ili industrijskog proizvodnji fermentiranih kobasica. Tehnološka karakterizacija sojeva uključivala je istraživanje njihove lipolitičke i proteolitičke aktivnosti, kao i sposobnosti zakiseljavanja mesnog medija te antimikrobne aktivnosti. Također su istraženi i sigurnosni aspekti njihove primjene u hrani koji su uključivali detekciju biogenih amina, hemolitičku aktivnost i antibiotsku rezistenciju.

Poznato je da lipoliza ima centralnu ulogu u razvoju aroma. Nastanak slobodnih masnih kiselina uglavnom kataliziraju enzimi iz mesa (Kenneally i sur., 1998; Galgano i sur., 2003), a tek u manjoj mjeri enzimatska aktivnost autohtone mikrobiote. Također, mikroba proteolitička aktivnost tek u manjoj mjeri doprinosi cjelokupnim procesima razgradnje proteina (Sanz i sur., 1999; Fadda i sur., 2002). Međutim, lipolitička i proteolitička aktivnost autohtone populacije BMK nije zanemariva, te se uvelike razlikuje na razini sojeva i ovisi o broju prisutnih lipolitičkih ili proteolitičkih bakterija. Svih 27 istraživanih sojeva je pokazalo određeni oblik lipolitičke aktivnosti. Sposobnost razgradnje proteina mlijeka (kazeina) je pokazalo 25 sojeva. Suprotno tome, samo je jedan soj (C\_7d\_14) pokazao sposobnost razgradnje proteina sarkoplazme ekstrahiranih iz svinjskog mesa, a isti je soj također pokazao sposobnost razgradnje i proteina na mediju s obranim mlijekom. Jedna od najvažnijih karakteristika starter kulture je sposobnost brze acidifikacije, prilikom čega se inhibira rast



patogenih bakterija i bakterija kvarenje. Nakon 24 sata inkubacije u mesnom mediju, pH vrijednost se kretala između 3,76 - 5,89. Ukupno su 4 soja pokazala izraženu sposobnost acidifikacije i postizanje vrijednosti  $\text{pH} < 4,00$ . Nakon 7 dana inkubacije, pH vrijednost se kretala u rasponu od 3,37 - 4,45 što je prema zaključcima američke vladine komisije stručnjaka za sigurnost i stabilnost hrane i lijekova (USFDA, engl. *United States Food and Drug Administration*) dovoljno da inhibira rast patogena, jer kako oni navode pH vrijednost od 4,6 inhibira rast patogenih sporogenih bakterija, dok pH vrijednost od 4,2 inhibira rast vegetativnih oblika patogenih bakterija (USFDA, 2001). U sličnom istraživanju, Baruzzi i sur. (2006) navode kako su sojevi *Lb. sakei* zakiselili mesni medij na pH 4,6 - 5,7 nakon 24 sata, odnosno na 3,6 - 3,7 nakon 7 dana inkubacije. Osim acidifikacije, kao mehanizam sprječavanja proliferacije neželjene mikrobiote, sojevi *Lactobacillus sakei* mogu proizoditi bakteriocine, što je vrlo poželjna tehnološka karakteristika. Od svih korištenih indikatorskih bakterija, najviše je sojeva *Lb. sakei* (17) pokazalo antimikrobnu aktivnost prema *Listeria innocua*, od čega je 12 sojeva pokazalo djelomičnu inhibiciju, a 5 sojeva je potpuno inhibiralo rast. Ovakva antagonistička sposobnost istraživanih sojeva može biti rezultat produkcije bakteriocina, međutim potrebno je provesti daljnja istraživanja da se isključi antimikrobno djelovanje nastalo produkcijom mliječne kiseline uslijed metabolizma laktobacila, odnosno pada pH vrijednosti tijekom njihovog rasta.

Da bi se osigurala sigurnost primjene sojeva u proizvodnji kobasica, istražena je njihova hemolitička aktivnost, osjetljivost prema klinički značajnim antibioticima i prisutnost gena koji kodiraju za produkciju biogenih amina. Niti jedan od istraživanih sojeva nije pokazao sposobnost razgradnje krvi, nakon provedenog iscrpljenja na Columbia krvnom agaru. Dva soja nisu pokazala rezistenciju na niti jedan od istraživanih antibiotika. Većina sojeva (92,59 %) je pokazala rezistenciju na vankomicin (Va5), a izuzev vankomicina, 66,67 % sojeva nije pokazalo rezistenciju na ostale istraživane antibiotike. Mnogi sojevi laktobacila su nasljedno (intrinzično) rezistentni na vankomicin (Elisha i Courvalin, 1995), a osjetljivi na niske koncentracije kloramfenikola i tetraciklina. U ovom istraživanju niti jedan od istraživanih sojeva nije pokazao rezistenciju prema kloramfenikolu, dok je na tetraciklin bilo rezistentno 7,4 % sojeva. Antibiotička rezistencija naročito predstavlja zdravstveni rizik kada se geni koji kodiraju za antibiotičku rezistenciju nalaze na mobilnim genetičkim elementima poput plazmida i transpozona te postoji mogućnost horizontalnog transfera gena između bakterija. Kod laktobacila su opisani geni koji se nalaze na mobilnim genetičkim elementima, a kodiraju za rezistenciju na eritromicin, tetraciklin i kloramfenikol (Gueimonde i sur., 2013). Sojevi

koji pokazuju rezistenciju na jedan ili više antibiotika nisu pogodni za korištenje u proizvodnji hrane.

Sadržaj i sastav biogenih amina u kobasicama može ovisiti o kombinaciji raznih faktora, poput uvjeta zrenja, pH, temperature, aditiva, omjera vode i soli kao i proteolitičkoj i dekarboksilaznoj aktivnosti prisutne mikrobiote, stoga se mogu pronaći u različitim koncentracijama u istom tipu proizvoda (Latorre-Moratalla i sur., 2007). U ovom istraživanju je PCR metodom ispitano prisustvo gena koji kodiraju za produkciju histamina, putrescina, tiramina i kadaverina. Potvrđeno je jedino prisustvo gena koji kodiraju za produkciju tiramina (*tdc*), i to kod sojeva MRS\_280, LamVab\_106, LamVab\_74 i MRS\_641.

Nakon detaljne sigurnosne i tehnološke karakterizacije svih 27 sojeva *Lb. sakei* izoliranih iz kobasica od mesa divljači, kao najbolji kandidati za potencijalnu aplikaciju kao starter kulture izabrana su 4 soja (MSE\_13, C\_end\_1, C\_15d\_13 i MSE\_44). Svi selektirani sojevi nisu pokazali stečenu rezistenciju prema niti jednom antibiotiku, izuzev vankomicina čija je rezistencija intrinzična. Također, nemaju detektirane gene koji kodiraju za produkciju biogenih amina, a istodobno pokazuju dobre tehnološke karakteristike. MSE\_13 soj potpuno je inhibirao rast svih indikatorskih bakterija, pokazuje dobru acidifikacijsku sposobnost (nakon 7 dana pH = 3,54) te je pokazao dobru proteolitičku i lipolitičku aktivnost. Soj C\_end\_1 ističe se značajnim sniženjem pH vrijednosti koja nakon 7 dana pH iznosi 3,46. Također, odlikuje se izrazitom lipolitičkom i proteolitičkom aktivnošću koja je potvrđena metodom difuzije i direktnom aplikacijom kulture u agar. C\_15d\_13 soj ne pokazuje antimikrobnu aktivnost, ali se ističe brzim snižavanjem pH vrijednosti nakon samo 24 h (pH = 3,77), pokazuje izrazitu lipolitičku aktivnost, dok u proteolizi pokazuje prosječne rezultate. Ispitivani soj MSE\_44 ističe se iz grupe sojeva kao soj s najvećom lipolitičkom i proteolitičkom aktivnošću. Kombinacija sojeva sa izraženim jednim ili nekoliko tehnoloških svojstava, kao dio mješovitih starter kultura, također je jedno od mogućih rješenja i upravo bi kombinacija nekoliko sojeva iz ovog istraživanja bila i preporuka za daljnju aplikaciju.

## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- Rep-PCR metoda se pokazala učinkovitom za određivanje unutarvrstne raznolikosti vrsta roda *Lactobacillus*
- Na temelju rep-PCR analize odabrano je 27 reprezentativnih sojeva za daljnju tehnološku i sigurnosnu karakterizaciju
- Svi istraživani sojevi pokazali su lipolitičku aktivnost na podlogama s tributirinom
- 25 sojeva je pokazalo proteolitičku aktivnost na podlogama s dodanim obranim mlijekom dok je samo 1 soj pokazao sposobnost razgradnje proteina sarkoplazme ekstrahiranih iz svinjskog mesa
- Signifikantan pad pH vrijednosti zabilježen je kod svih sojeva i nakon 7 dana pH vrijednost pada na pH = 3,37 - 4,45
- Niti jedan od istraživanih sojeva nije pokazao hemolitičku aktivnost
- Od svih ispitanih antibiotika nijedan soj nije pokazao rezistentnost na kloramfenikol dok je najveći broj sojeva (92,59 %) pokazao rezistenciju na vankomicin. Na ampicilin je rezistentno svega 3,7 % sojeva, gentamicin 14,8 %, kanamicin i klindamicin 11,1 %, a na eritromicin i tetraciklin 7,4 % sojeva
- Kod 4 soja (MRS\_280, LamVab\_106, LamVab\_74 i MRS\_641) je detektiran *tdc* gen koji kodira za produkciju tiramina, dok kod nijednog soja nije utvrđeno prisustvo gena koji kodiraju za produkciju histamina (*hdc*), putrescina (*odc*) i kadaverina (*ldc*)
- Sojevi MSE\_23 i MSE\_13 su pokazali potpunu inhibiciju rasta potencijalno patogenih bakterija
- 17 sojeva je potpuno ili djelomično inhibiralo rast barem jedne potencijalno patogene bakterije, dok 8 sojeva nije pokazalo antimikrobnu aktivnost prema niti jednoj indikatorskoj vrsti
- 4 soja (MSE\_13, C\_end\_1, C\_15d\_13 i MSE\_44) imaju potencijal korištenja kao starter kultura zbog dobrih tehnoloških karakteristika i sigurne upotrebe

## **7. ZAHVALE**

Neizmjerne hvala našoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na pruženoj prilici da steknemo iskustvo rada u laboratoriju i pisanju znanstvenih radova te na ukazanom povjerenju i izdvojenom vremenu.

Veliko hvala mag. ing. agr. Ani Žgomba Maksimović na korisnim savjetima i pomoći u svim fazama istraživanja, velikom strpljenju, predanosti radu i brzim odgovorima na sva naša pitanja i nedoumice.

Hvala dr. sc. Nataši Hulak na pomoći, savjetima i iskustvima koja nam je prenijela.

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

- 1) Andrighetto, C., L. Zampese, A. Lombardi (2001): RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 26 – 30.
- 2) Askar, A., H. Treptow (1986): Biogene amine in Lebensmittel. Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung Eugen Ulmer, Stuttgart
- 3) Axelsson, L., A. Holck, S. E. Birkeland, T. Aukrust, H. Blom (1993): Cloning and nucleotide sequence of a gene from *Lactobacillus sake* Lb706 necessary for sakacin A production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2868–2875
- 4) Baruzzi, F., A. Matarante, L. Caputo, M. Morea (2006): Molecular and physiological characterization of natural microbial communities isolated from a traditional Southern Italian processed sausage. *Meat Sci.* 72, 261–269
- 5) Bergey, D. H. (1974): Bergey's manual of determinative bacteriology (8th ed.), Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- 6) Berthier, F., M. Zagorec, M. C. Champomier-Verges, S. D. Ehrlich, F. Morel Deville (1996): Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. *Microbiol.*, 142: 1273-1279.
- 7) Berthier, F. i S. D. Ehrlich (1999): Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:997–1007
- 8) Bredholt, S., T. Nesbakken, A. Holck (2001): Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *Int. J. Food Microbiol.* 66:191–196
- 9) Cai, Y., H. Pang, M. Kitahara, M. Ohkuma (2012): *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 62:1140–1144. doi 10.1099/ijvs.0.031781-0
- 10) Caplice, E. i G. F. Fitzgerald (1999): Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 131–149.
- 11) Carattoli, A. (2008): Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infec.* 14, 117–123.

- 12) Cenci-Goga, B. T., P. V. Rossitto, P. Sechi, S. Parmegiani, V. Cambiotti, J. S. Cullor (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 Sci.* 90, 599 – 606
- 13) Chaillou, S., M. C. Champomier-Verges, M. Cornet, A. M. Crutz-Le Coq, A. M. Dudez, V. Martin, S. Beaufile, E. Darbon-Rongere, R. Bossy, V. Loux, M. Zagorec (2005): The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* 23:1527–1533
- 14) Champomier-Verges, M. C., S. Chaillou, M. Cornet, M. Zagorec (2002): Erratum to “*Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects” [Research in Microbiology 152 (2001) 839]. *Res. Microbiol.* 153:115–123
- 15) Collins, M. D., U. M. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J. A. E. Farrow, A. Martinez-Murcia, B. A. Phillips, A. M. Williams, S. Wallbanks (1991): Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:5–12. doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04313.x
- 16) De las Rivas, B., A. Marcobal, A. V. Carrascosa, R. Muñoz (2006): PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *J. Food Protect.* 69, 2509–2514
- 17) De las Rivas, B., A. Marcobal, R. Muñoz (2005): Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines, *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 367–372
- 18) Demeyer, D. I. i F. Toldrá (2004): Encyclopedia of meat Science. Fermentation. Elsevier Science Ltd. London, 2004
- 19) Domig, K. J., H. Kiss, L. Petricevic, H. Viernstein, F. Unger i W. Kneifel (2014): Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an exemplary study. *Benef. Microbes* 5, 263-72.
- 20) Elisha, B. G. i P. Courvalin (1995): Analysis of genes encoding for D-alanine:D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. *Gene*, 152:79-83.
- 21) Fadda, S., G. Oliver, G. Vignolo (2002): Protein degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a sausage model system. *J. Food Sci.* 67, 1179 – 1183.

- 22) Fontana, C., S. P. Cocconcelli, G. Vignolo (2005): Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 131 – 42
- 23) Frece, J., D. Kovačević, S. Kazazić, J. Mrvčić, N. Vahčić, D. Ježek, M. Hruškar, I. Babić, K. Markov (2014): Comparison of sensory properties, shelf-life and microbiological safety of industrial sausages produced with autochthonous and commercial starter cultures. *Food Technol. Biotechnol.* 52, 307 – 316
- 24) Galgano, F., F. Favati, M. Schirone, M. Martuscelli, M. Crudele (2003): Influence of indigenous starter cultures on the free fatty acids content during ripening in artisan sausages produced in the Basilicata region. *Food Technol. Biotech.* 41, 253-258.
- 25) Gill, C. O. (2007): Microbiological conditions of meats from large game meat animals and birds. *Meat Sci.* 77, 149-160.
- 26) Gueimonde, M., B. Sánchez, C. G. de los Reyes-Gavilán, A. Margolles (2013): Antibiotic resistance in probiotic bacteria, *Front Microbiol.* 4: 202.
- 27) Hala'sz, A., A. Bara'th, L. Simon-Sarkadi, W. Holzapfel, (1994): Biogenic amines and their production by micro-organisms in food. *Trends Food Sci. Tech.* 5, 42–48.
- 28) Hammes, W. P. i C. Hertel (1998): New developments in meat starter cultures. *Meat Sci.* 49:125–138
- 29) Hammes, W. P. i C. Hertel (2009): Genus I. *Lactobacillus Beijerinck*, 1901. In: P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K. H. Schleifer, W. B. Whitman (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 465–510
- 30) Hammes, W. P. i C. Hertel (1996): Selection and improvement of lactic acid bacteria used in meat and sausage fermentation. *Lait* 76, 159–168.
- 31) Hernandez-Jover, T., M. Izquierdo-Pulido, M. T. Veciana-Nogues, A. Marine-Font, M. C. Vidal-Carou (1997): Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *J Agr Food Chem* 45: 2098-2102 humans in Belgium between 2001 and 2006. *Food Res. Int.* 2012, 45, 913–918.
- 32) Katagiri, H., K. Kitahara, K. Fukami (1934): The characteristics of the lactic acid bacteria isolated from moto, yeast mashes for sake manufacture. Part IV. Classification of the lactic acid bacteria. *Bull Agric Chem Soc Jpn* 10:156–157

- 33) Kegalj, A., M. Krvavica, I. Ljubičić (2012): Raznolikost mikroflore u mesu i mesnim proizvodima. *Meso* 14, 234 – 245
- 34) Kenneally, P. M., G. Schwarz, N. G. Fransen, E. K. Arendt (1998): Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages. *J. Food Sci.* 63, 538 – 543.
- 35) Kozačinski, L., E. Drosinos, F. Čaklović, L. Cocolin, J. Gasparik – Reichardt, S. Vesković (2008): Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. *Food Technol. Biotechnol.* 46, 93 – 106.
- 36) Latorre-Moratalla, M. L., S. Bover-Cid, T. Aymerich, B. Marcos, M. C. Vidal-Carou i M. Garriga (2007): Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Sci.* 75, 460-469.
- 37) Lebert, I., S. Leroy, P. Giammarinaro, A. Lebert, J. P. Chacornac, S. Bover – Cid, M. C. Vidal – Carou, R. Talon (2007): Diversity of microorganisms in environments and dry fermented sausages of French traditional small units. *Meat Sci.* 76, 112 – 122
- 38) Mäkelä, P., U. Schilliger, H. Korkeala, W. H. Holzapfel (1992): Classification ofropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconstoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products, *Int. J. Food Microbiol.* 16, 167–172
- 39) Markov, K., J. Pleadin, M. Horvat, M. Bevardi, D. Sokolić Mihalak, F. Delaš i J. Frece (2013): *Vet. stanica* 44, 177-186.
- 40) Mathur, S. i R. Singh (2005): Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 281–295. 14.
- 41) Mauriello, G., A. Casaburi, F. Villani (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. *J. App. Microbiol.* 92, 482–490
- 42) Mayrhofer, S., P. Paulsen, F. J. M. Smulders, F. Hilbert (2006): Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from muscle foods as related to the veterinary use of antimicrobial agents in food-producing animals in Austria. *Microb. Drug. Resist.* 12, 278–283.



- 43) Mortvedt, C. I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, I. F. Nes (1991): Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1829–1834
- 44) Nettles, C. G. i S. F. Barefoot (1993): Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Protect.*, 56, 338–356.
- 45) Papamanoli, E., N. Tzanetakis, E. Litopoulou – Tzanetaki, P. Kotzekidou (2003): Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry – fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 2, 859 – 867.
- 46) Rantsiou, K., E. H. Drosinos, R. Urso, J. Krommer, J. Gasparik – Reichardt, S. Tóth, I. Metaxopoulos, G. Comi, L. Coccolin (2005): Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiol.*, 22, 19 – 28
- 47) Ray, B. (1992): The need for food biopreservation. In B. Ray, & M. Daeschel (Eds.), *Food biopreservatives of microbial origin* (pp. 1–23). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- 48) Riley, M. A., J. E. Wertz (2002): Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84:357–364
- 49) Samaržija, D. (2015): *Fermentirana mlijeka*, Hrvatska mljekarska udruga, Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
- 50) Sanz, Y., S. Fadda, G. Vignolo, M. C. Aristoy, G. Oliver, F. Toldrá (1999): Hydrolysis of muscle myofibrillar proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. *Int. J. Food Microbiol.*
- 51) Schillinger, U. i F. K. Lucke (1989): Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1901–1906
- 52) Schmidt, G., C. Hertel, W. P. Hammes (1999): Molecular characterisation of the *dnaK* operon of *Lactobacillus sakei* LTH681, *System. Appl. Microbiol.* 22, 321–328
- 53) Silla Santos, M. H. (1996): Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213–231.
- 54) Smit, G., B. A. Smit, W. J. M. Engels, W.J.M. (2005): Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*

- 55) Švec, P., M. Vancanneyt, M. Seman, C. Snauwaert, K. Lefebvre, I. Sedláček, Swings (2005): Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. FEMS. Microbiol. Lett. 1, 59-63.
- 56) ten Brink, B., C. Damink, H. M. L. J. Joosten, J. H. J. Huis in't Veld (1990): Occurrence and formation of biologically amines in food. Int. J. Food Microbiol. 11, 73–84.
- 57) Tichaczek, P. S., R. F. Vogel, W. P. Hammes (1994): Cloning and sequencing of sakP encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. Microbiol. 140:361–367
- 58) Torriani, S., G. A. Van Reenen, G. Klein, G. Reuter, F. Dellaglio, L. M. Dicks (1996): *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *sake* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *carneus* subsp. nov., new subspecies of *Lactobacillus curvatus* Abo-Elnaga and Kandler 1965 and *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 (Klein et al. 1996, emended descriptions), respectively. Int. J. Syst. Bacteriol. 46:1158–1163
- 59) Trichopoulou, A., S. Soukara, E. Vasilopoulou (2007): Traditional foods: A science and society perspective Trends. Food Sci. Technol. 18, 498 – 504
- 60) USFDA – United States Food and Drug Administration (2001): <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/ucm2016794.htm>
- 61) Van Boxstael, S., K. Dierick, X. Van Huffel, M. Uyttendaele, D. Berkvens, L. Herman, S. Bertrand, C. Wildemaewe, B. Catry, P. Butaye (2012): Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella Typhimurium* isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. Food Res. Int. 45, 913–918.
- 62) Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters, J. Swings (1996): Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev 60:407–438
- 63) Vermeiren, L., F. Devlieghere, J. Debevere (2004): Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for biopreservation of cooked meat products. Int. J. Food. Microbiol. 96:149–164
- 64) Wood, B. J. B. (1997): Microbiology of fermented foods. London: Blackie Academic & Professional.

- 65) Wood, B. J. B. i W. H. Holzapel (1995): The genera of lactic acid bacteria.  
London: Blackie Academic & Professional.  
53, 115 – 125.  
URL izvori:
- 66) List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN):  
<http://www.bacterio.cict.fr> (Datum pristupa: 06.04.2017.)

## 9. SAŽETAK

Helena Senko

Petra Špoljarić

### **Tehnološki potencijal sojeva *Lactobacillus sakei* izoliranih iz tradicionalnih kobasica od mesa divljači**

Spontano fermentirane trajne kobasice od mesa divljači proizvode se u Hrvatskoj na brojnim malim obiteljskim gospodarstvima i dragocjen su izvor korisnih mikroorganizama, naročito bakterija mliječne kiseline (BMK). Međutim, nestandardizirani uvjeti proizvodnje često rezultiraju neujednačenom mikrobiološkom kvalitetom takvih kobasica što ih čini i potencijalnim izvorom patogenih mikroorganizama. S ciljem njihove standardizacije, u ovom istraživanju je ispitan tehnološki potencijal 27 sojeva *Lactobacillus sakei*, za potencijalnu primjenu kao starter kulture. Svi istraživani sojevi su pokazali lipolitičku aktivnost, dok je 25 sojeva pokazalo proteolitičku aktivnost na podlogama s dodanim obranim mlijekom, a samo je jedan od tih sojeva pokazao sposobnost razgradnje proteina sarkoplazme ekstrahiranih iz svinjskog mesa. Istraživani sojevi su pokazali dobru sposobnost acidifikacije mesnog medija, nakon 24 h (pH = 3,76 do 5,89), odnosno nakon 7 dana inkubacije (pH = 3,37 do 4,45). Većina sojeva (92,59 %) je pokazala rezistenciju na vankomicin (Va5), dok 66,67 % sojeva nije pokazalo rezistenciju na niti jedan od ostalih istraživanih antibiotika. Dva soja nisu pokazala rezistenciju na niti jedan od istraživanih antibiotika, uključujući vankomicin. PCR metodom detektirani su geni koji kodiraju za biogene amine; histamin (*hdc*), tiramin (*tdc*) i putrescin (*odc*) i kadaverin (*ldc*) od kojih je jedino detektiran *tdc* kod 4 soja. Hemolitički aktivan nije bio nijedan izolat. Temeljem dobivenih rezultata najpogodniji kandidati kao starter kultura su sojevi MSE\_13, C\_end\_1, C\_15d\_13 i MSE\_44. Selektirani sojevi ne pokazuju stečenu rezistenciju prema niti jednom antibiotiku, izuzev vankomicina, čija je rezistencija intrinzična. Također, nemaju detektirane gene koji kodiraju za produkciju biogenih amina, a istodobno pokazuju dobre tehnološke karakteristike.

**Ključne riječi:** tradicionalne kobasice, laktobacili, sigurnost hrane, molekularne metode

## 10. SUMMARY

Helena Senko

Petra Špoljarić

### **Technological potential of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional game meat sausages**

Spontaneously fermented game meat sausages are produced in Croatia on small family farms and they are precious source of beneficial microorganisms, in particular lactic acid bacteria (LAB). However, non-standard production conditions often result in uneven microbiological quality of such sausages, making them a potential source of pathogenic microorganisms. With the aim of their standardization, the technological potential of 27 *Lactobacillus sakei* strains were investigated in this study, for their potential application as a starter culture. All investigated strains showed lipolytic activity, while 25 strains showed proteolytic activity on substrates with added skim milk, and only one of these strain demonstrated the ability to degrade the sarcoplasmic proteins extracted from pork meat. Also, the strains showed a good ability to acidificate the meat medium after 24 h (pH = 3.76 to 5.89), or after 7 days of incubation (pH = 3.37 to 4.45). Most strains (92.59 %) exhibited resistance to vancomycin (Va5), while 66.67 % of the strains showed no resistance to any of the other tested antibiotics. Two strains showed no resistance to any of the investigate antibiotics, including vancomycin. By PCR method the presence of genes encodingh for biogenic amines were screened; histamine (*hdc*), tiramine (*tdc*), putrescine (*odc*) and cadaverine (*ldc*). Only *tdc* was detected in 4 strains. None of the strains was hemolitically active. Based on the obtained results, the most suitable candidates for starter cultures are strains: MSE\_13, C\_end\_1, C\_15d\_13, and MSE\_44. Selected strains showed no resistance towards any antibiotic, except vancomycin, whose resistance is intrinsic. Also, they have no detected genes encoding for production of biogenic amines and at the same time they show good technological characteristics.

**Key words:** traditional sausages, lactobacilli, food safety, molecular methods