

LAKTOBACILI U HIGIJENI HRANE

Smac¹, D., L. Kozačinski¹, N. Zdolec, B. Njari¹, M. Hadžiosmanović¹, I. Filipović¹, B. Mioković¹, V. Dobranić¹

SAŽETAK

U higijeni i tehnologiji namirnica gotovo sve vrste unutar skupine mliječnokiselinskih bakterija imaju svoje značenje, kako u pozitivnom (fermentacija, antimikrobno djelovanje, senzorna svojstva proizvoda, probiotski učinak) tako i u negativnom smislu (bakterije kvarenja, tvorci biogenih amina, antimikrobna rezistencija). Pojedine vrste laktobacila «specijalizirane» su za primjenu u nekim fermentiranim mliječnim ili mesnim proizvodima u kojima ispoljavaju svoj poželjni učinak u pogledu stvaranja ciljanih senzornih svojstava gotovih proizvoda. Osim toga, sintetiziranjem tvari koje djeluju kompetitivno prema drugim bakterijama, laktobacili unaprjeđuju mikrobiološku stabilnost proizvoda. Ti se mehanizmi mikrobne inhibicije mogu primijeniti i u konzerviranju «nefermentirane» hrane čime joj se znatno produžuje rok trajanja.

Ključne riječi: laktobacili, hrana, higijena

UVOD

Bakterije mliječne kiseline sastavni su dio prirodne mikroflore različitih animalnih namirnica. Tijekom fermentacije stvaraju metabolite i razgradne produkte koji mogu bitno utjecati na senzorna svojstva, ali i na mikrobiološku ispravnost proizvoda. U pogledu mikrobiološke ispravnosti, poznato je da su laktobacili oni koji često čine većinu mliječnokiselinskih bakterija u hrani, kompetitivni prema brojnim uzročnicima kvarenja i patogenim bakterijama. Tako su različiti autori izvjestili o antimikrobnom učinku laktobacila prema bakterijama *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus* i dr. (Leroy i sur., 2006). Istraživanja potvrđuju inhibicijsko djelovanje prema navedenim bakterijama u laboratorijskim uvjetima, no slični rezultati polučeni su i u nekim našim istraživanjima koja se odnose na tijek proizvodnje ili pohrane namirnica, primjerice u fermentiranim kobasicama, ribi ili svježem mesu (Zdolec i sur., 2007). Takva saznanja danas vode k razvoju sve većeg broja novih tzv. funkcionalnih starter kultura, sastavljenih od sojeva s poznatim metaboličkim profilom, te dokazanim antimikrobnim djelovanjem.

Antimikrobna aktivnost laktobacila ispoljava se preko sintetiziranih organskih kiselina (mliječna, octena), vodikovog peroksida, ugljičnog dioksida, enzima, reuterina, diacetila i bakteriocina (Holzapfel i sur., 1995). Stvaranje većih količina pojedinih od navedenih tvari ipak nije poželjno u nekim namirnicama, unatoč mogućoj antimikrobnoj aktivnosti. To se prvenstveno odnosi na vodikov peroksid, CO₂, diacetil ili octenu kiselinu u fermentiranim mesnim proizvodima (Kozačinski i sur., 2006). Spekter njihovog djelovanja ovisit će o genetsko-fenotipskim značajkama soja, odnosno sposobnosti sintetiziranja produkata s antimikrobnom aktivnošću.

BAKTERIJE RODA LACTOBACILLUS

Orla-Jensen još 1919. godine navodi da skupinu bakterija mliječne kiseline čine gram-pozitivni, nepokretni, nesporogeni bacili i koki koji fermentiraju ugljikohidrate i više alkohole stvarajući mliječnu kiselinu. Tijekom vremena pronalazile su se nove vrste, a taksonomske promjene bile su intenzivne, što je bilo uvjetovano stalnim napretkom u analitičkim metodama. U higijeni i tehnologiji namirnica gotovo svi rodovi unutar skupine mliječnokiselinskih bakterija imaju svoje značenje, i u pozitivnom (fermentacija, antimikrobno djelovanje, senzorna svojstva proizvoda, probiotski učinak itd.) i negativnom smislu (bakterije kvarenja, tvorci biogenih amina i dr.). Laktobacili su često dominantne mliječnokiselinske bakterije u različitim namirnicama čime doprinose razvoju specifičnih senzornih svojstava te utječu na mikrobiološku kakvoću proizvoda. Nalazimo ih u mliječnim proizvodima, proizvodima od žitarica, mesnim i ribljim proizvodima, vodi, silaži, pivu, vinu, voću i voćnim sokovima, mariniranom povrću, kiselom kupusu, otpadnim vodama, kiselom tijestu; dio su prirodne mikroflore usne šupljine i probavnog trakta ljudi i životinja; rijetko pokazuju patogena svojstva.

Mogu se svrstati u tri skupine (Stiles i Holzapfel, 1997), i to: 1. obligatno homofermentativne - fermentiraju glukozu do mliječne kiseline, a ne fermentiraju pentoze i glukonat. Neki od predstavnika su *Lactobacillus (L.) acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. gasseri*, *L. ruminis*; 2. fakul-

¹ Damir Smac, dr. vet. med.; dr.sc. Lidija Kozačinski, izvanredni profesor; dr.sc. Nevijo Zdolec, viši asistent; dr. sc. Bela Njari, redoviti profesor; dr. sc. Mirza Hadžiosmanović, Ivana Filipović, univ. mag. spec. dr. vet. med., dr. sc. Branimir Mioković, redoviti profesor, dr. sc. Vesna Dobranić, znanstveni suradnik

tativno heterofermentativne - fermentiraju heksozu do mliječne kiseline i mogu proizvesti plin iz glukonata, ali ne iz glukoze te fermentiraju pentoze do mliječne i octene kiseline. U namirnicama nalazimo fakultativno fermentativne *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *L. sakei*; i 3. obligatno heterofermentativne - fermentiraju heksoze do mliječne kiseline, octene kiseline, etanola i CO₂. Proizvodnja plina iz glukoze svojstvena je za ovu grupu laktobacila. Neki od predstavnika su *L. kefir*, *L. brevis*, *L. fermentum* i *L. reuteri*.

Bernardeau i sur. (2008) navode da su laktobacili heterogena mikrobna skupina koja sadrži 135 vrsta i 27 podvrsta, a njihova se klasifikacija neprestano izmjenjuje. Primjenom suvremenih molekularnih metoda sugerira se da ekstremna raznolikost genoma ovog bakterijskog roda može dovesti do novih subgeneričkih podjela. Kombinacija genotipskih i fenotipskih testova primjerice DNA-baziranih tehnika i konvencionalnih testova fermentacijskih profila (iskorištavanja ugljikohidrata) nužna je za determinaciju vrste. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) uspješno je primijenjena na sojeve podrijetlom iz mlijeka, te ujedno najdiskriminirajuća i ponovljiva metoda. Podaci iz literature podupiru hipotezu da unos laktobacila hranom nije rizičan budući da je laktobacilemija prouzrokovana hranom, posebno fermentiranim mliječnim proizvodima, izuzetno rijetka i nastaje samo kod predisponiranih pacijenata. Neka metabolička svojstva, poput stvaranja biogenih amina u fermentiranim proizvodima može dovesti do neprihvatanja nekih laktobacila u proizvodnji hrane. Vrlo malen broj laktobacila u starter kulturama i probioticima može pokazati prenosivu antimikrobnu rezistenciju. Ipak, to može biti podcijenjeno budući da istraživanja prijenosa rezistencije nisu sistematična. Autori smatraju da je prijenos antimikrobne rezistencije jedini relevantni razlog za oprez, što zahtjeva monitoring osjetljivosti prema antibioticima, jer bi takvi sojevi mogli biti nosioci rezistentnih gena i predstavljati potencijalni rizik za prijenos gena na druge bakterije. Ipak, kao opće pravilo, laktobacili imaju visoku prirodnu otpornost koja nije prenosiva, i to otpornost prema većini antibiotika, posebice vankomicinu. Procjena sigurnosti laktobacila značajnih s tehnološkog aspekta treba se ograničiti na antibiotske profile, i istraživanja prenosivosti antimikrobne rezistencije.

ANTIMIKROBNI UČINAK LAKTOBACILA BAKTERIOCINI

Bakteriocini su antimikrobne tvari, peptidi ili proteini različitog antimikrobnog spektra i načina djelovanja, molekularnih masa, genetskih i biokemijskih svojstava, koji u

slučaju bakteriocinogenih laktobacila oštećuju membrane srodnih, gram-pozitivnih bakterija (Tagg i sur., 1976; Jack i sur., 1995). Među laktobacilima pronađene su brojne vrste koje pored uobičajenih antimikrobnih metabolita sintetiziraju bakteriocine koji inhibiraju rast patogenih bakterija iz hrane poput *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.* i *Bacillus spp.* (Holzapfel i sur., 1995). Neke od bakteriocinogenih vrsta laktobacila su *L. sakei* (bakteriocin sakacin), *L. curvatus* (curvacin), *L. plantarum* (plantaricin), *L. acidophilus* (lactacin, acidocin) i *L. bavaricus* (bavaricin). Iako su istraživanja bakteriocina i njihovog učinka na sigurnost hrane vrlo opsežna, do danas je samo jedan bakteriocin (nizin; Federal Register, 1998) primjenjuje komercijalno u mlijebarskoj industriji.

ORGANSKE KISELINE

Smatra se da izravni antimikrobni učinak organskih kiselina kao metaboličkih produkata laktobacila i ostalih bakterija mliječne kiseline nastaje njihovim djelovanjem na citoplazmatsku membranu izmjenom potencijala i inhibicijom aktivnog transporta (De Vuyst i Vandamme, 1994). Mliječna kiselina, kao krajnji produkt homofermentacijske aktivnosti laktobacila, snižuje pH supstrata (hrane, hranjive podloge i dr.) čime patogene bakterije i bakterije kvarenja budu inhibirane ili uništene. U literaturi se posebno naglašava osjetljivost gram-negativnih bakterija značajnih za sigurnost hrane (poput *Salmonella spp.* i *Escherichia coli*) na uvjete acidifikacije (Adams i Nicolaidis, 1997). Octena kiselina pokazuje snažnije antimikrobno djelovanje od mliječne kiseline, a pojavljuje se u heterofermentacijskom putu razgradnje ugljikohidrata, primjerice aktivnošću vrsta roda *Leuconostoc* ili heterofermentacijskih laktobacila (npr. *L. brevis*). Veće količine octene kiseline mogu se očekivati u fermentaciji namirnica u prisutnosti autohtone mikroflore uz prevladavanje heterofermentacijskih vrsta. Naša iskustva ukazuju da octena kiselina osim poželjnog antimikrobnog učinka ima i nepoželjan utjecaj na senzorna svojstva nekih namirnica, poput fermentiranih kobasica, što se može spriječiti dodavanjem kompeticijskih homofermentacijskih laktobacila (Zdolec, 2007).

VODIKOV PEROKSID I UGLJIČNI DIOKSID

Vodikov peroksid stvaraju brojne mliječnokiselinske bakterije u prisutnosti kisika zajedno s laktatom, piruvatom i NADH preko flavinskih enzima (Holzapfel i sur., 1995). Njegovo antimikrobno djelovanje se očituje oksidacijskim učinkom na membranske lipide i stanične proteine, no stvarni doprinos smanjenju nepoželjnih bakterija u hrani je upitan poradi njegove prirodne razgradnje peroksidazama

(Caplice i Fitzgerald, 1999). Ugljični dioksid nastaje heterofermentacijskim putem i doprinosi nastanku anaerobnih uvjeta čime inhibira aerobne bakterije kvarenja interakcijom sa staničnom membranom mijenjanjem vanstaničnog i unutarstaničnog pH (De Vuyst i Vandamme, 1994).

DIACETIL

Diacetil je antimikrobni produkt kojeg sintetiziraju neki laktokoki, pediokoki i vrste roda *Leuconostoc* metaboliziranjem citrata. Prevladavanjem homofermentacijskih procesa, stvaranje diacetila je onemogućeno pa je njegov antimikrobni učinak u takvim uvjetima malen. Smatra se da su na diacetil osjetljivije gram-negativne bakterije, kvasci i plijesni, a način djelovanje pripisuje se interferencijom u iskorištavanju arginina (Caplice i Fitzgerald, 1999).

UMJESTO ZAKLJUČKA

Bakterije mliječne kiseline, a unutar njih bakterije roda *Lactobacillus*, pokazuju različite karakteristike koje se mogu iskoristiti u higijensko-tehnološkom smislu pri proizvodnji namirnica. Pojedine vrste laktobacila "specijalizirane" su za primjenu u nekim fermentiranim mliječnim ili mesnim proizvodima u kojima ispoljavaju svoj poželjni učinak u pogledu stvaranja ciljanih senzornih svojstava gotovih proizvoda. Osim toga, sintetiziranjem tvari koje djeluju kompetitivno prema drugim bakterijama, laktobacili unapređuju mikrobiološku stabilnost proizvoda. Ti se mehanizmi mikrobne inhibicije mogu primijeniti i u konzerviranju "nefermentirane" hrane čime joj se može produžiti rok trajanja.

SOMMARIO

LATTOBACILLI NELL'IGIENE ALIMENTARE

Nell'igiene e tecnologia alimentari quasi tutti i tipi di batteri hanno il loro significato nell'ambito di gruppo di batteri dell'acido lattico, sia nel senso positivo (fermentazione, azioni antimicrobiche, caratteristiche sensoriche di prodotto, effetto probiotico), che nel senso negativo (batteri di decomposizione, produttori di amine biogene, resistenza antimicrobica). Alcuni tipi di lattobacilli sono «specializzati» per l'applicazione in certi prodotti lattiero-caseari e prodotti di carne nei quali dimostrano il loro effetto gradevole con lo scopo di creare le volute caratteristiche sensoriche del prodotto finale. Tranne questo, sintetizzando le materie che agiscono competitivamente verso gli altri batteri, i lattobacilli aumentano la stabilità microbiologica del prodotto. Questi meccanismi dell'inibizione microbica sono applicabili nella conservazione degli alimenti «non fermentati», che prolunga la loro data di scadenza.

Parole chiave: *lactobacilli, alimenti, igiene*

LITERATURA

- Adams, M. R., L. Nicolaidis** (1997): Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8, 227-239.
- Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. H. Dubernet, M. Guéguen** (2008): Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 278-285.
- Caplice E., G. F. Fitzgerald** (1999): Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 131-149.
- De Vuyst, L., E. J. Vandamme** (1994): *Bacteriocins of Lactic Acid bacteria*, Blackie Academic and Professional, London.
- Federal register** (1988): Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Federal Register* 54, 11247-11251.
- Holzappel, W. H, R. Geisen, U. Schillinger** (1995): Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 343-362.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, B. Ray** (1995): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
- Kozačinski, L., N. Zdolec, M. Hadžiosmanović, Ž. Cvrtila, I. Filipović, T. Majić** (2006): Microbial flora of the Croatian fermented sausage. *Arch. Lebensmittelhyg.* 57, 141-147.
- Leroy, F., J. Verluyten, L. De Vuyst** (2006): Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 270-285.
- Orla-Jensen** (1919): *The Lactic Acid Bacteria*. Royal Danish Society of Sciences. Section for Natural Sciences and Mathematics, 8th Series, 2, 132.
- Stiles, M.E., W. H. Holzappel** (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-19.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani, L.W. Wannamaker** (1976): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40 (3), 722-756.
- Zdolec, N.** (2007): Utjecaj zaštitnih kultura i bakteriocina na sigurnost i kakvoću fermentiranih kobasica. Dizertacija, Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Zdolec, N., M. Hadžiosmanović, L. Kozačinski, Ž. Cvrtila, I. Filipović** (2007): Postupak biokonzerviranja u proizvodnji fermentiranih kobasica. *Meso* 9, 103-109.

*Rad je izrađen u okviru projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske 053-0531854-1853 i 053-0531854-1851. Prezentiran je na Četvrtom hrvatskom veterinarskom kongresu s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 5.-8. studenoga 2008.

Rad je izvadak iz diplomskog rada Daira Samca: Antimikrobni učinak laktobacila prema nekim patogenim bakterijama iz hrane. Veterinarski fakultet, 2008. Mentor: prof. dr. sc. Lidija Kozačinski

Prispjelo: 13. studenog 2008.

Prihvaćeno: 27. studenog 2008. ■