

# Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz "slavonskog kulena" kao probiotičke funkcionalne starter kulture

J. Frece<sup>1\*</sup>, D. Čvek<sup>1</sup>, D. Kovačević<sup>2</sup>, I. Gobin<sup>3</sup>, T. Krcivoj<sup>1</sup> i K. Markov<sup>1</sup>

Znanstveni rad

## Sažetak

U ovom je radu ispitana adhezija bakterijskog soja *L. plantarum* 1K izoliranog iz kulena na tanko i debelo crijevo miša u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Budući da je u preliminarnim istraživanjima *L. plantarum* 1K pokazao značajnu inhibiciju rasta prema patogenim mikroorganizmima iz hrane, proizveo značajnu količinu mliječne kiseline (21,96 g/l) te zadovoljio osnovne kriterije za selekciju probiotičkog soja u *in vitro* uvjetima, provedena su *in vivo* istraživanja na pokusnim miševima. *L. plantarum* 1K znatno smanjuje broj bakterijskih stanica *Salmonella sp.* u miševa inficiranih sa bakterijom *Salmonella sp.*, te smanjuje translokaciju *Salmonella sp.* u jetru miševa. *L. plantarum* 1K je pokazao osnovne funkcionalne kriterije za izbor probiotičkih sojeva, te se kao takav može upotrijebiti kao funkcionalna autohtona starter kultura za fermentirane mesne proizvode.

**Ključne riječi:** probiotik, funkcionalne starter kulture, *L. plantarum*, *in vitro* i *in vivo* adhezija, *Salmonella sp.*

## Uvod

Bakterije mliječne kiseline su najčešće korištene starter kulture u industrijskoj proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda, mesa i povrća. Duga tradicija upotrebe bakterija mliječne kiseline bez štetnog utjecaja na zdravlje čovjeka, pribavila im je GRAS (Generally Regarded As Safe) status prema US FDA, odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema legislativi Europske Unije (Frece, 2007).

Starter kulture su pripravnici koji sadrže žive mikroorganizme, a primjenjuju se za dobivanje različitih fer-

mentiranih namirnica s krajnjim ciljem oplemenjivanja tih namirnica s različitim proizvodima metabolizma upotrijebljenih starter kultura. Funkcionalne starter kulture se mogu definirati kao kulture koje posjeduju barem jedno funkcionalno svojstvo s krajnjim ciljem poboljšanja kvalitete konačnog proizvoda koji će imati pozitivan učinak na zdravlje i fiziologiju potrošača (Šušković i sur. 2001).

Dakle, hrana je funkcionalna ako sadrži sastojke koji pozitivno djeluju na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu. Stoga je sve više potrošača zainteresirano za potencijalna svojstva funkcionalne hrane radi poboljšanja

zdravlja, što bi smanjilo rizik od nastajanja bolesti, a samim time i upotrebu antibiotika, što bi dovelo do smanjenja antibiotske rezistencije (Šušković i sur. 2001).

Naši tradicionalni mesni proizvodi (kulen, domaće kobasice) su prirodno fermentirani bez upotrebe starter kultura i to djelovanjem autohtonih bakterija mliječne kiseline koje stvaraju karakteristična svojstva proizvoda. Ti prirodni izolati bakterija mliječne kiseline iz spontanog fermentiranja mogli bi se koristiti kao specifične starter kulture, nakon fenotipske i genotipske karakteriza-

<sup>1</sup> \* dr. sc. Jadranka Frece, docent; dr. sc. Ksenija Markov, docent, dr. sc. Domagoj Čvek, asistent, Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb; Tel. +385 1 4605 045; E-mail: jgoreta@pbf.hr

<sup>2</sup> dr. sc. Dragan Kovačević, redoviti profesor, Zavod za prehrambene tehnologije, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Kuhačeva 20, 31 000 Osijek

<sup>3</sup> Tihana Krcivoj, diplomantica u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva 6, Zagreb

**Tablica 1.** Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva (Šušković i sur. 2001, Frece 2007)**Table 1** Criteria for selection of probiotic strains (Šušković i sur. 2001, Frece 2007)

1.	točna taksonomska identifikacija / accurate taxonomic identification	Opći kriteriji / General criteria
2.	humano podrijetlo za humane probiotike / human origin for human probiotics	
3.	netoksičnost i nepatogenost / nontoxic and nonpathogenic	
4.	genetička stabilnost (nema prijenosa plazmida) / genetically stable (no plasmid transfer)	
5.	otpornost prema žučnim kiselinama / resistant to bile	
6.	otpornost prema niskim pH vrijednostima / resistant to low pH value	
7.	stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke / stability of desired characteristics during culture preparation, storage and delivery	Tehnološki kriteriji / Technological criteria
8.	visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu ( $10^6$ - $10^8$ mL <sup>-1</sup> ili g <sup>-1</sup> ), npr. 100 g proizvoda osigurava $10^8$ - $10^{10}$ živih stanica / viability at high populations preferred at $10^6$ - $10^8$ mL <sup>-1</sup> or g <sup>-1</sup> , which means that 100 g of probiotic product contains $10^8$ - $10^{10}$ viable cells	
9.	brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije / adequate growth, recovery, concentration, freezing and freeze-drying during the production of probiotic cultures and viability during storage and distribution	
10.	dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese / provision of desirable organoleptic qualities when included in fermentation processes	
11.	sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u "ciljanom" području primjene u organizmu / capable of survival, proliferation, and metabolic activity at the target site	Funkcionalni kriteriji / Functional criteria
12.	sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela / adherence and colonization potential preferred	
13.	produkcija antimikrobnih supstancija, uključujući bakteriocine, vodikov peroksid i organske kiseline / production of antimicrobial substances, including bacteriocins, hydrogen peroxide, and organic acids	
14.	antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama / antagonistic toward pathogenic and cariogenic bacteria	
15.	mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje proizvodi autohtona mikroflora / able to compete with the normal microflora, including the same or closely related species, potentially resistant to bacteriocins, acid, and other antimicrobials produced by residing microflora	
16.	imunomodulacijski učinak / immunostimulatory	
17.	sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje / able to exert one or more clinically documented health benefits	

cije, te predstavljaju mogući izvor potencijalno novih antimikrobnih metabolita (Frece i sur. 2010).

S gledišta funkcionalne hrane, osobito u mliječnoj, ali i mesnoj industriji, postoji sve veći interes za probiotičke proizvode koji sadrže bakterije mliječne kiseline. Probiotik je jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primjenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina." (Havenaar i Huis in't Veld, 1993, Šušković i sur. 2001, Frece, 2007, Frece i sur 2009).

Probiotičke vrste bakterija mliječne kiseline moraju biti sposobne preživjeti i kolonizirati intestinalni

trakt domaćina tijekom dovoljno dugog perioda za postizanje željenog učinka na zdravlje (Šušković 1996, Frece 2003, Frece, 2007). Jedno od najvažnijih svojstava probiotika je zaštita protiv patogena u intestinalnom traktu domaćina. Uloga antimikrobnih sastojaka proizvedenih od strane probiotičkih vrsta kao profilaktičkih agensa protiv entero infekcija je ključno i dobro dokumentirano (Frece 2007, Frece i sur., 2009).

Važno je naglasiti da bakterijski sojevi za probiotičku uporabu, prema znanstveno priznatoj strategiji, trebaju zadovoljiti velik broj zahtjeva koji su navedeni u tablici 1 (Šušković i sur. 2001, Frece 2007).

Odabir potencijalnih probiotičkih

sojeva temelji se na *in vitro* istraživanjima koja su dobar pokazatelj za utvrđivanje probiotičkih svojstava koja će bakterijski sojevi pokazati u *in vivo* uvjetima. Pri tome se koriste različiti statički i dinamički modeli koji simuliraju uvjete u gastrointestinalnom traktu (Šušković, 1996; 2004, Frece 2007). Glavnu prepreku preživljavanju potencijalnih probiotičkih sojeva u GI traktu predstavljaju niski pH želuca, lizozim, žučne soli i probavni enzimi, kao što su pepsin i enzimi gušterače (Frece, 2003).

Cilj rada je utvrditi da li bakterijski soj *L. plantarum* 1K izoliran iz kulena, posjeduje probiotička svojstva, te da li smanjuje infekciju uzrokovanu bakterijom *Salmonella* sp., te se kao takav može okarakterizirati

kao funkcionalna autohtona starter kultura za fermentirane mesne proizvode.

## Materijal i metode

### Miševi

Za testove adhezije korišteni su NIH (Swiss Albino) miševi, dobiveni sa Medicinskog fakulteta u Rijeci. Životinje su bile ženskog spola u dobi od tri mjeseca, prosječne težine 22-24 g. Hranjene su gotovom krmnom smjesom za laboratorijske miševe i štakore firme "Hope Farms", Nizozemska. Miševi su držani u plastičnim kavezima i čuvani pri sobnoj temperaturi. Raspoređeni su u 14 grupa i u svakoj grupi su bila po 4 miša. Rad s laboratorijskim životinjama bio je odobren od nadležnih povjerenstva i eksperimenti su rađeni prema propisima o zaštiti životinja. Svi eksperimenti s miševima rađeni su prema: "Guide for the Care and Use of Laboratory Animal's of the National Research Council" (1996).

### Priprava suspenzija bakterijskih stanica

Za pokuse adhezije bakterijska kultura *L. plantarum* 1K centrifugirana je pri 10000 okr./min. Stanice su isprane sa sterilnom otopinom natrijevog klorida (0,5 %), ponovno centrifugirane i resuspendirane u sterilnoj otopini natrijevog klorida (0,5 %) ( $10^8$  st/mL).

Za pokuse imunizacije prekonocna bakterijska kultura *L. plantarum* 1K centrifugirana je pri 10 000 okr./2 min. Stanice su isprane fiziološkom otopinom 3x, ponovno centrifugirane i resuspendirane u fiziološkoj otopini ( $2 \cdot 10^{10}$  stanica / 200  $\mu$ l).

Za pokuse infekcije sa *Salmonella* sp. bakterijske stanice centrifugirane su pri 10 000 okr./2 min. Stanice su isprane fiziološkom otopinom 3x, ponovno centrifugirane i resuspendirane u fiziološkoj otopini ( $2 \cdot 10^8$  stanica / 100  $\mu$ l).

### In vitro test na adheziju bakterijskih stanica na epitelne stanice ileuma i debelog crijeva

Test na adheziju proveden je prema Mayra-Makinen i sur. (1983), uz određene modifikacije (Frece i sur. 2005 a,b,c; Frece, 2007). U istraživanju je korišteno svježe tkivo ileuma i debelog crijeva NIH miševa. Nakon što je životinja anestezirana eterom pod staklenim zvonom, skalpelom je otvorena trbušna šupljina, te u potpunosti odvojeno debelo crijevo i ileum. Uzeti su uzorci tkiva veličine 1 cm<sup>2</sup>, koji su potom držani 30 min u fosfatnom puferu (pH = 7,2), pri 4 °C. Nakon trokrotnog ispiranja u fosfatnom puferu, uzorci tkiva dodani su u priređenu suspenziju bakterijskih stanica i inkubirani u termostatu 30 min, pri 37 °C.

U daljnjem postupku tkivo je fiksirano u 10 %-tnom formalinu, dehidrirano kroz rastuće koncentracije alkohola, uklopljeno u parafin i mikrotomom narezano na odsječke debljine 5  $\mu$ m. Pri bojenju tkivnih rezova korištena je metoda po Brown i Brenn (Švob, 1974). Primijenjenom metodom Gram-pozitivne bakterije boje se plavo, Gram-negativne crveno ili ružičasto, jezgre tkivnih stanica su crvene, a ostali tkivni elementi su žuti (Frece, 2007).

### Imunizacija miševa s *L. plantarum* 1K

Miševi su imunizirani oralno sa pripravljenim bakterijskim stanicama *L. plantarum* 1K, ( $2 \times 10^{10}$  stanica/200  $\mu$ l). Oralna imunizacija je provedena 5 dana za redom, s inzulinskom brizgalicom direktno u usta. Kontrolna grupa je dobila 200  $\mu$ l fiziološke otopine. Za vrijeme pokusa, miševi su hranjeni *ad libitum*.

### Infekcija miševa sa *Salmonella* sp.

Miševi su inficirani oralno sa pripravljenim bakterijskim stanicama *Salmonella* sp. ( $2 \times 10^8$  stanica/100  $\mu$ l). Oralna imunizacija je provedena

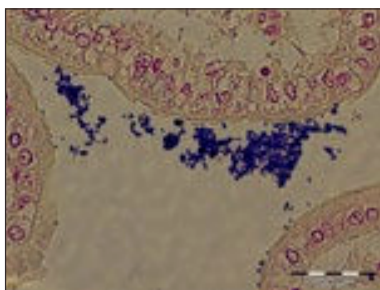
5 dana za redom, s inzulinskom brizgalicom direktno u usta. Kontrolna grupa je prethodno tri dana imunizirana sa bakterijom *Lactobacillus plantarum* 1K ( $2 \times 10^{10}$  stanica/200  $\mu$ l), a onda je treći dan inficirana sa bakterijom *Salmonella* sp. ( $2 \times 10^8$  stanica/100  $\mu$ l). Kontrolna grupa miševa dobila je 100  $\mu$ l fiziološke otopine. Za vrijeme eksperimenta, miševi su hranjeni *ad libitum*.

### Određivanje broja mikroorganizama u homogenatu tankog i debelog crijeva miša

Za određivanje broja živih mikroorganizama priređeni su uzorci tankog i debelog crijeva miševa, 14. dan nakon oralne imunizacije bakterijskim stanicama *Lactobacillus plantarum* 1K, te kontrolnih uzoraka. Uzorci tankog i debelog crijeva su odvagani i homogenizirani u homogenizatoru, u 2 ml fiziološke otopine. Načinjena su decimalna razrjeđenja i otpipetirano je po 0,1 ml u Petrijeve zdjelice s podlogama za: ukupni broj, ljubičasto crveni žučni agar, SS-agar, MRS-agar, te sulfadni agar.

### Rezultati i rasprava

Patogene enterobakterije su glavni uzročnici bolesti gastrointestinalnog trakta. Liječenje gastroenteritisa se većinom bazira na upotrebi antimikrobnih, kemoterapeutskih i kemoprofilirajućih agensa. Nadalje, široka uporaba antibiotika je dovela do poremećaja ravnoteže crijevne mikroflore, te do stvaranja rezistencije na antibiotike. Zato se traži alternativni, nefarmaceutski put za kontrolu i liječenje gastrointestinalnih infekcija. Već odavno je poznato, da fermentirani mliječni proizvodi, mogu pospješiti otpornost prema infekcijama s enteropatogenim bakterijama. Mehanizam djelovanja probiotičkih bakterija mliječne kiseline se očituje kroz natjecanje za mjesta vezanja, proizvodnju antimikrobnih supstancija i stimulaciju imunostava (Moineau i sur., 1989, Šušković,



**Slika 1.** Adhezija stanica *L. plantarum* 1K na epitelne stanice ileuma miša; Brown-Brenn; 40 x 2,5; mjerilo 100 µm.

**Figure 1** Adhesion of *L. plantarum* 1K to the intestinal epithelium cells of mouse; Brown-Brenn; 40 x 2,5; Bars represents 100 µm.

1996, Frece i sur. 2005 a,b,c, Frece, 2007). Antimikrobna aktivnost prema patogenim mikroorganizama je jedno od bitnih preduvjeta za izbor probiotičkih sojeva. *L. plantarum* 1K je pokazao značajnu antimikrobnu aktivnost prema patogenim test mikroorganizmima u *in vitro* uvjetima

(Frece i sur 2010).

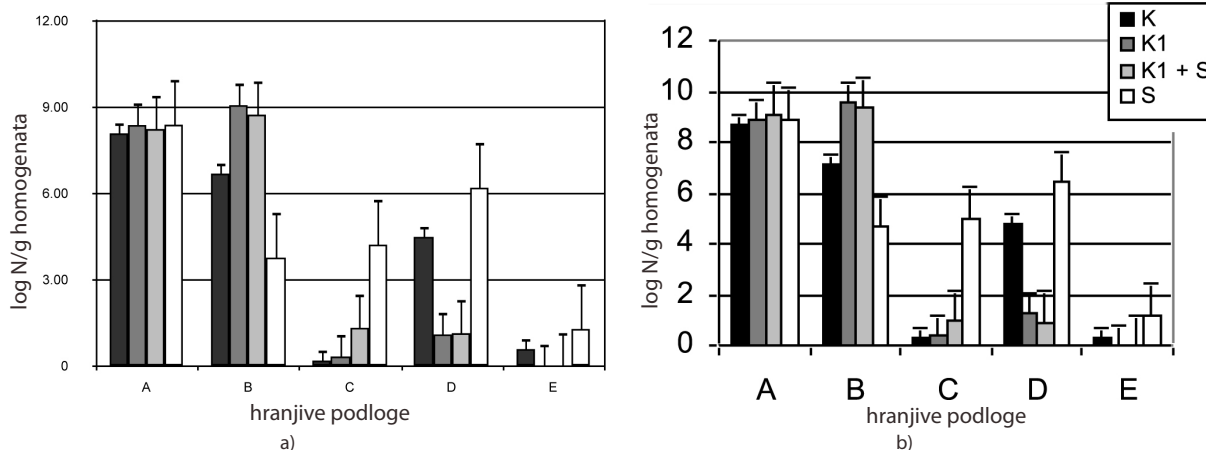
Sposobnost adhezije je bitan preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu. Stoga je proveden test, kojim se željelo vidjeti da li *L. plantarum* 1K adhezira tanko crijevo miša (slika 1).

U *in vivo* uvjetima, površine epitelnih stanica su gusto prekrivene autohtonom mikroflorom, koje su fizička barijera nadolazećim bakterijama da adheziraju površinu epitelnih stanica. Kolonizacija poželjnih probiotičkih sojeva sprječava kolonizaciju štetnih patogenih bakterija, te smanjuje njihov broj. Stoga je proveden test, kojim se istražilo da li *L. plantarum* 1K, nakon što adhezira i kolonizira tanko i debelo crijevo miša, smanjuje broj bakterijskih stanica *Salmonella* sp. u tankom i debelom crijevu miševa inficiranih sa bakterijom *Salmonella* sp. (Slika 2).

Rezultati nekih autora su pokazali da bakterije mliječne kiseline mogu

smanjiti infekciju enteropatogenim bakterijama kroz jačanje imunološkog sustava i proizvodnju specifičnih antitijela na unešene patogene bakterije (Shu i Gill, 2002; Shu i Gill, 2003, Frece 2003, Frece i sur. 2005 a,b i c). Obzirom da su rezultati *in vitro* istraživanja pokazali da *L. plantarum* 1K (izolat iz kulena) inhibira rast patogenih mikroorganizama, željelo se utvrditi da li će doći do smanjenja intestinalne infekcije u miševa inficiranih sa bakterijom *Salmonella* sp. u *in vivo* uvjetima, ako su miševi prethodno hranjeni sa probiotičkim sojem *L. plantarum* 1K. Pratila se translokacija *Salmonella* sp. u jetru miševa prethodno hranjenih sa *L. plantarum* 1K, koji su naknadno inficirani sa *Salmonella* sp. (*L. plantarum* 1K + *Salmonella* sp.) i miševa koji nisu hranjeni sa *L. plantarum* 1K, već su odmah inficirani sa *Salmonella* sp. (Tablica 2).

Adhezija na površinu epitelnih stanica bitan je preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastro-



**Slika 2.** Određivanje broja mikroorganizama u homogenatima tankog (a) i debelog (b) crijeva miševa, nakon prestanka hranjenja (14. dan) s *L. plantarum* 1K, *L. plantarum* 1K + *Salmonella* sp. (1K + S) i sa *Salmonella* sp. (S) K- kontrolni miš (fiziološka otopina), na hranjivim podlogama: A – podloga za ukupan broj B – podloga za bakterije mliječne kiseline (MRS agar); C – selektivna podloga za *Salmonella* sp. (SS agar); D – podloga za enterobakterije (VRB); E - podloga za sulfitoreducirajuće bakterije (natrij-sulfit)

**Figure 2** Bacterial counts in small intestine (a) and large intestine (b) of mice 14 days after the oral treatment with *L. plantarum* 1K, *L. plantarum* 1K in combination with *Salmonella* sp. (1K + S), or after the challenge with *Salmonella* sp. (S) K-control mouse: Total number of bacteria (A) on Peptone yeast extract glucose agar; total LAB (B) on MRS-agar; *Salmonella* sp. (C) on SS agar; *Enterobacteriaceae* (D) on Violet red bile glucose agar. Error bars represent standard deviations of the mean values of results from three replicates.

**Tablica 2.** Translokacija *Salmonella* sp. u jetru miša hranjenih sa *L. plantarum* 1K + *Salmonella* sp. i sa *Salmonella* sp.

**Table 2** Translocation of *Salmonella* sp. into the liver after infection of mice with (*L. plantarum* 1K + *Salmonella* sp.) and without probiotic treatment (*Salmonella* sp. alone).

Grupe miševa Groups of mice	log <sub>10</sub> CFU <i>Salmonella</i> sp. iz jetre miševa log <sub>10</sub> CFU <i>Salmonella</i> sp. from liver of the mice
<b>L. plantarum 1K + <i>Salmonella</i> sp.</b>	1,04 ± 0,12
<i>Salmonella</i> sp.	4,3 ± 0,16

intestinalnom traktu jer omogućava dugotrajnije djelovanje probiotičkih bakterija na crijevnu mikrofloru i imunološki sustav domaćina. Dosađanja istraživanja na probiotičkim sojevima *L. acidophilus* M92, *L. plantarum* L4 i *E. faecium* L3 su pokazala da uspješno adheziraju i koloniziraju intestinalne epitelne stanice svinje i miševa u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Kos i sur., 2003; Frece, 2003; Frece i sur., 2005 B). Preliminarna istraživanja su pokazala da *L. plantarum* 1K uspješno adhezira tanko crijevo miša (Slika 1).

Ileum, krajnji dio tankog crijeva, je dio intestinalnog trakta gdje je najpoželjnija kolonizacija i aktivnost probiotičkih bakterija, te je to mjesto inokulacije intestinalnog trakta tim bakterijama (Fuller i sur., 1978; Rojas i Conway, 1996). Prema Henrikson i sur. (1995), vezanje laktobacila na epitelne stanice crijeva, može spriječiti kolonizaciju nepoželjnih bakterija na crijevni epitel. Odnosno, adhezija laktobacila na epitelne stanice može doprinijeti kompetitivnoj ekskluziji, tj. uklanjanju štetnih i patogenih mikroorganizama iz probavnog sustava (Frece, 2007).

Stoga su provedena *in vivo* ispitivanja u probavnom sustavu Swiss Albino miševa kojima se željelo utvrditi da li potencijalni probiotički soj *L. plantarum* 1K ima sposobnost enteropatogene ekskluzije. U tu svrhu provedeni su pokusi s tri grupe miševa. Prva grupa je bila kontrola,

miševi koji nisu bili tretirani s *L. plantarum* 1K. Druga grupa miševa je 5 dana bila hranjena sa *L. plantarum* 1K, s tim da je treći dan inficirana sa *Salmonella* sp. i treća grupa miševa je odmah inficirana sa bakterijom *Salmonella* sp.. U tu svrhu priređeni su homogenati tankog i debelog crijeva miševa kojima je ispitan sastav mikrobne populacije. Dobiveni rezultati su pokazali porast ukupnog broja bakterija, kao i porast ukupnog broja bakterija izraslih na selektivnoj podlozi za bakterije mliječne kiseline (BMK) u homogenatima tankog i debelog crijeva miševa hranjenih sa *L. plantarum* 1K + *Salmonella* sp. u odnosu na kontrolu (Slika 2). U homogenatima debelog crijeva miševa određen je veći broj BMK, nego u homogenatima tankog crijeva što bi se moglo objasniti rigoroznijim uvjetima preživljavanja u tankom crijevu gdje je prisutna visoka koncentracija žučnih soli i jača peristaltika nego u debelom crijevu (Slika 2). Ispitivani soj *L. plantarum* 1K je utjecao na smanjenje broja enterobakterija za četiri logaritamske jedinice, te smanjenje broja *Salmonella* sp. za tri logaritamske jedinice u homogenatima tankog i debelog crijeva miševa uzetih 14. dan nakon prestanka hranjenja s probiotičkim sojem *L. plantarum* 1K. Ovaj rezultat je posljedica većeg ukupnog broja BMK određenog u homogenatima crijeva miševa hranjenih s *L. plantarum* 1K, a ukazuje i na kolonizaciju ovog soja u probavnom sustavu miša. Miševi koji su bili inficirani sa *Salmonella* sp.

u homogenatima tankog i debelog crijeva imaju smanjen broj BMK u odnosu na kontrolu, a povećan broj enterobakterija i *Salmonella* sp. na selektivnim podlogama za određivanje tih bakterija (Slika 2).

Prema Bombi i sur. (1996), adhezirani laktobacili proizvode organske kiseline, koje predstavljaju efikasnu barijeru za naseljavanje i adheziju patogena na intestinalne stanice. Prema Molly i sur. (1993), rezultati dinamičkog modela, koji je simulirao uvjete u GI traktu su pokazali da se broj bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* smanjio za vrijeme tretmana probiotičkim sojevima. Ti su rezultati u skladu s rezultatima dobivenim ovim radom. Tijekom rasta i fermentacije, bakterije mliječne kiseline proizvode značajne količine organskih kiselina. Organske kiseline djeluju inhibicijski na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Lipofilne kiseline, kao što su mliječna i octena u nedisociranom obliku mogu prodrijeti u mirobnu stanicu i interferirati s osnovnim metabolizmom, te sniziti intracelularni pH. To je, vjerojatno razlog, da primijenjeni potencijalni probiotički soj *L. plantarum* 1K djeluju na smanjenje broja enterobakterija, u ovom slučaju *Salmonella* sp., jer niska pH vrijednost nije povoljna za rast enterobakterija, dok bakterije mliječne kiseline, mogu održati citoplazmatski pH između 5,1 i 6,4, čak i pri pH vrijednosti okolnog medija manjeg od 3,8 (Kashet, 1987, Frece, 2007).

Održavanje intracelularne pH vrijednosti osigurava proton-translokacijska ATP aza ( $H^+$  ATP aza) koja prenosi protone, nakupljene u staniци zbog nastajanja mliječne kiseline, kroz staničnu membranu, uz istovremenu hidrolizu ATP. Prema tome, za aktivni prijenos  $H^+$  iona, potrebna je dobra metabolička aktivnost stanica, jer nedostatak ATP smanjuje aktivnost proton-translokacijske ATP aze i zaustavlja rast stanica (Perez Chaia

i sur., 1994, Frece 2007).

Nakon što je potencijalni probiotički soj *L. plantarum* 1K smanjio broj *Salmonella* sp. u homogenatima tankog i debelog crijeva (Slika 2), možemo reći da je došlo do smanjenja intestinalne infekcije u miševa inficiranih sa *Salmonella* sp. sa potencijalnim probiotičkim sojem *L. plantarum* 1K. Nadalje, željelo se utvrditi da li *L. plantarum* 1K smanjuje translokaciju *Salmonella* sp., nazočne u crijevima miševa, putem krvi u jetru (Tablica 2). Iz tablice 2, se vidi da je translokacija *Salmonella* sp. putem krvi u jetru miševa znatno smanjena pomoću potencijalnog probiotičkog soja *L. plantarum* 1K, u odnosu na miševe inficirane sa *Salmonella* sp..

Ovi rezultati se podudaraju sa rezultatima Shu i Gill (2002, 2003), koji su također smanjili smrtnost miševa inficiranih sa *E. coli*, translokaciju *E. coli* putem krvi u jetru i slezenu pomoću *B. lactis* HNO19 i *L. rhamnosus* HNO01 te sa dosadašnjim rezultatima Frece 2007, Frece i sur 2009.

### Zaključak

Iz dobivenih rezultata, proizlazi da bi se izolirani soj *L. plantarum* 1K iz kulena mogao upotrijebiti kao probiotički soj za uspostavljanje poremećene ili narušene ravnoteže crijevne mikroflore jer smanjuje prekomjerni rast nepoželjnih sudionika crijevne mikroflore, tj. oportunističkih patogena. Također, rezultati istraživanja pokazuju da bi se *L. plantarum* 1K, budući da je izoliran iz kulena, mogao upotrijebiti kao funkcionalna starter kultura za kontroliranu fermentaciju mesnih proizvoda, jer inhibira rast patogenih mikroorganizama, te bi na taj način produljio vijek trajnosti mesnih proizvoda.

### Literatura

**Bomba, A., R. Kastel, S. Gancarcikova, R. Nemcova i M. Cizek (1996).** The effect of *Lactobacilli* inoculation on organic acid levels in the mucosal film and small intestine contents

in gnotobiotic pigs. *Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.* 109, 428-430.

**Frece, J. (2003).** *In vitro* i *in vivo* istraživanja probiotičkog mehanizma djelovanja bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. *Magistarski rad*, Prehrambeno biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

**Frece, J. (2007).** Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3, Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

**Frece, J., B. Kos, I.K. Svetec, Z. Zgaga, V. Mrša, J. Šušković (2005a):** Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92, *J. Appl. Microbiol.* 98, 285-292.

**Frece, J., B. Kos, I.K. Svetec, Z. Zgaga, J. Beganović, A., Leboš, J. Šušković (2009):** Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *J. Dairy Res.* 76, 98-104.

**Frece, J., B. Kos, J. Beganović, S. Vuković, J. Šušković (2005b):** *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strain, *World J. Microbiol. & Biotechnol.* 21, 1401-1408.

**Frece, J., J. Šušković, B. Kos, J. Beganović (2005c):** Immunomodulatory effect of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 in mice. *Current studies of Biotechnology, Immunomodulatory drugs*, IV, 153-165.

**Frece, J., K. Markov i D. Kovačević (2010),** Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina, te karakterizacija potencijalnih starter kultura u Slavonskom kulenu, *MESO*, XII, 2, 92-98.

**Fuller, R., A. Barrow, B. E. Brooker (1978).** Bacteria associated with the gastric epithelium of neonatal pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 582-591.

**Henriksson, A., i A. P. L. Conway (1995).** Distribution of lactobacilli in the porcine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Ecology.* 16, 55-60.

**Huis in't Veld, J.H.J. i R. Havenaar (1993).** Selection criteria for microorganisms for probiotic use. U: *Probiotics and Pathogenicity*, Flair No 6, J.F. Jensen, M.H. Hinton, R.W.A.W. Mulder (ured.), DLO Spelderholt Centre for Poultry Research and Information Services, str. 11-19.

**Kashet, E.R. (1987).** Bioenergetics of lactic

acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol.Rev.* 46, 233.

**Kos, B., J. Šušković, S. Vuković, M. Šimpraga, J. Frece, S. Matošić (2003).** Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94, 981-987.

Mayra-Makinen, A., M. Manninen, H. Gyllenberg (1983). The adherence of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effect of bile. *J. Dairy Sci.* 80, 1031-1037.

**Moineau, S., Y. Boutin and J. Goulet (1989).** Effect of fermented milks on the immune response in mice. *J. Dairy Sci.* 72 (Suppl.), 174.

Molly K., M. Woestyne, W. Verstraete (1993). Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 39, 254-258.

Perez Chaia, A., A.M. Strasser de Saad, A.A: Pesce de Ruiz Holgado i G. Oliver (1994). Proton-ATP-ase activity in cells of lactobacilli in the presence of propionate. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 37-41.

Rojas M., P. L. Conway (1996). Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 474-480.

Shu, Q. i H. S. Gill (2002). Immune protection mediated by the probiotic *L. rhamnosus* HN001 against *E. coli* 0157 infection in mice. *Immunol. Med. Microbiol.* 34, 59-64.

Shu, Q. i H. S. Gill (2003). Dietary bifidobacterium lactic enhances resistance to oral *S. typhimurium* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* 44, 213-222.

Šušković, J. (1996). Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**Šušković, J., B. Kos, J. Goreta, S. Matošić (2001):** Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* 39, 227-235.

**Švob, M. (1974).** *Histološke i histokemijske metode*, Svjetlost, Sarajevo, str. 297-298.

National Research Council (1996). *Guide for the care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press.

Dostavljeno: 21.5.2010.

Prihvaćano: 23.7.2010.

m

### Characterization of bacterial strain *Lactobacillus plantarum* 1K isolated from Slavonian "kulen", as probiotic functional starter culture

#### Summary

The aim of this work was to investigate adhesion ability of bacterial strain *L. plantarum* 1K, isolated from Slavonian "kulen", on small and large intestine of mice *in vitro* and *in vivo* conditions. Considering that in preliminary investigation *L. plantarum* 1K has shown good antimicrobial activity against pathogen microorganisms from food, it has produced significant amount of lactic acid (21,96 g/l) and satisfied the basic criteria for selection of probiotic strains in *in vitro* conditions, *in vivo* studies in experimental mice were carried out. *L. plantarum* 1K significantly reduced the number of bacterial cells of *Salmonella sp.* in mice infected with bacterium *Salmonella sp.* and reduced the translocation of bacteria *Salmonella sp.* in the liver of mice. Considering that *L. plantarum* 1K has demonstrated the basic functional criteria for the selection of probiotic strains, so as such, it can be used as functional autochthonous starter culture for fermented meat products.

**Key words:** probiotic, functional starter-cultures, *L. plantarum*, *in vitro* and *in vivo* adhesion, *Salmonella sp.*

### Charakterisierung der Bakteriengattung *Lactobacillus Plantarum* 1K isoliert aus „Slavonski kulen“ als probiotische funktionelle Starterkultur

#### Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Adhäsion der Bakteriengattung *L. Plantarum* 1K, isoliert aus "Kulen", auf den Dünndarm und den Dickdarm des Mause in Bedingungen *in vitro* und *in vivo* geprüft. Da bei den präliminaren Untersuchungen *L. Plantarum* K1 eine bedeutende Inhibition des Wachstums gegenüber pathogenen Organismen aus Nahrung zeigte, eine bedeutende Menge der Milchsäure erzeugte (21,96 g/l) und die Grundkriterien für die Selektion der probiotischen Gattung in *in vitro* Bedingungen befriedigte, wurden *in vivo* Untersuchungen auf Mäusen durchgeführt. *L. Plantarum* 1K vermindert bedeutend die Zahl der Bakterienzellen *Salmonella sp.* bei den Mäusen infiziert mit *Salmonella sp.* und verhindert die Translokation von *Salmonella sp.* in die Leber der Mäuse. *L. Plantarum* 1K zeigte funktionelle Grundkriterien für die Wahl der probiotischen Gattungen, und kann somit als funktionelle autochtone Starterkultur für Fleischerzeugnisse verwendet werden.

**Schlüsselwörter:** Probiotik, funktionelle Starterkulturen, *L. Plantarum*, *in vitro* und *in vivo* Adhäsion, *Salmonella sp.*

### Caratterizzazione di tipo di batteri *Lactobacillus plantarum* 1K, isolato dal kulen di Slavonia, come una funzionale cultura starter probiotica

#### Sommario

In questo lavoro è stata esaminata l'adesione del tipo di batteri *Lactobacillus plantarum* 1K isolato dal kulen sull'intestino tenue e quello crasso di topo, nelle condizioni *in vivo* e *in vitro*. Siccome le ricerche preliminari hanno rivelato che *L. plantarum* 1K possiede una notevole inibizione di crescita nel paragone con i microorganismi patogeni negli alimenti, *L. plantarum* ha prodotto una quantità significativa dell'acido lattico (21,96 g/l), ma ha anche accontentato i criteri di base necessari per la selezione del tipo probiotico nelle condizioni *in vitro*, sono state fatte anche le ricerche *in vivo* sui topi di laboratorio. *L. plantarum* fa diminuire notevolmente il numero di cellule batteriche *Salmonella sp.* dai topi contagiati con il batterio *Salmonella sp.*, e fa diminuire traslocazione di *Salmonella sp.* nel fegato di topi. *L. plantarum* 1K ha fatto vedere i criteri funzionali di base necessari per scegliere i tipi probiotici, e come tale può essere usato come una cultura starter, funzionale e autoctona, per i prodotti di carne fermentati.

**Parole chiave:** probiotico, culture starter funzionali, *L. plantarum*, adesione *in vitro* e *in vivo*, *Salmonella sp.*

[www.meso.hr](http://www.meso.hr)