

## ISPITIVANJE POTENCIJALNOG PROBIOTIKA - *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SOJ L6 IZOLOVANOG IZ "KARLOVSKE KOBASICE"

D. Indzhelieva<sup>1</sup>, A. Kuzelov<sup>2</sup>, N. Taškov<sup>2</sup>, D. Saneva<sup>2</sup>, D. Metodievski<sup>2</sup>

**Izvod:** Upotreba probiotskih starter kultura u proizvodnji sirovih - sušenih proizvoda od mesa predstavlja aktuelan naučni i praktični interes za istraživanje u industriji mesa. Cilj ove studije je da se ispituju potencijalna probiotska svojstva soja *Lactobacillus plantarum* (L6), izolovanog iz "Karlovske kobasice". Utvrđeno je da soj L6 poseduje potencijalna probiotska svojstva, što je potvrđeno sposobnošću ovog soja da opstane u kiselim sredinama, kao i da u prisustvu 0,15% i 0,30% žučnih soli formira biofilm na polipropilenskim površinama. Utvrđena je sposobnost za adheziju na crevne epitelne ćelije. Ispitivani *L. plantarum* L6 soj može efektivno da posluži kao antimikrobna prepreka za razvoj patogenih bakterija u proizvodnji sirovo sušenih mesnih proizvoda.

**Ključne reči:** proizvodi od mesa, starter kulture, probiotici

### Uvod

Tokom protekle dve decenije interesovanje za različite vrste bakterija mlečne kiseline poreklom iz proizvoda od mesa dramatično se povećalo, što odražava sve veći značaj ovih bakterija kao starter kultura i njihov rastući tržišni potencijal kao probiotika (Erkkilä i sar., 2001; Valkova - Jorgova i sar., 2008). Probiotski mikroorganizmi su definisani kao "nepatogeni organizmi koji uneti u određenim količinama, vrše pozitivan uticaj na fiziologiju i ljudsko zdravlje prisustvom u opštoj ishrani" (Erkkilä i sar., 2000; Ouvehand i sar., 2002). Veliki broj ovih bakterija se konzumira kako bi se obezbedila zdrava mikrobna ravnoteža u crevima, i uvećala korist od njihove aktivnosti u sprečavanju efekata štetnih populacija (Ouvehand i sar., 2002). Fermentisani proizvodi od mesa se obično termički ne obrađuju, i stoga se smatraju kao pogodni za transport probiotika (Hugas i sar., 1996; Incze, 1998). Promovisane su probiotske mesne starter kulture koje ne menjaju tehnološki i senzorni kvalitet proizvoda i koriste se u proizvodnji sirovo sušenih proizvoda od mesa (Erkkilä i sar., 2001; Gradinarska i sar., 2010; Valkova - Jorgova i sar., 2009). Mlečno kiselinske bakterije poseduju mnoštvo poželjnih osobina koje mogu biti korisne u proizvodnji fermentisanih proizvoda kao što su sirove kobasice (Danov i sar., 2010). One imaju još veću vrednost u pogledu bezbednosti proizvoda, poboljšanja senzornih svojstava i dobrobiti za zdravlje (Metakopoulos i sar, 1981; Gilliland, 1990; Gradinarska i sar., 2009). Uprkos obilnog teorijskog i eksperimentalnog materijala o upotrebi starter kultura u industriji mesa, naučni i praktični interes za ispitivanje predstavljaju mikroorganizmi sa probiotskim

<sup>1</sup>Univercity College of Tourism Burgas, Park „Ezero” ([dindjelieva@abv.bg](mailto:dindjelieva@abv.bg))

<sup>2</sup>Univerzitet Goce Delchev, Štip, Ul. Krste Misirkov bb Štip, R. Makedonija ([aco.kuzelov@ugd.edu.mk](mailto:aco.kuzelov@ugd.edu.mk))

svojevremena. Cilj ovog rada je da se ispita soj *Lactobacillus plantarum* (L6) izolovan iz "Karlovske kobasice" na potencijalna probiotska svojstva.

### Materijal i metode rada

U eksperimentalnom radu je korišćena čista kultura *Lactobacillus plantarum* soja L6, izolovanog iz "Karlovske kobasice" proizvedene u Mesokombinatu Karlovo, Bugarska. Ispitivani soj je dobijen ljubaznošću privatne laboratorije za analizu i kontrolu hrane "Sveti Đorđe" iz Burgasa, Bugarska, i čuvan je na -18 °C. Pre upotrebe, soj je subkultivisan dva puta u Man-Rogosa-Sharp agaru (MRS, Biokar diagnostics 070), i kultivisan na 30 °C tokom 24 sata. Bi inokulacija kultura je inkubirana preko noći, a uzročnik zatim izolovan centrifugiranjem. Dalje, kultura je isprana dva puta, a zatim resuspendovana u 0,5 % NaCl. Broj bakterija u suspenziji je procenjen upoređivanjem sa standardom 0,5 McFarland (bioMerieux B-70900, McFarland Kit). Soj *Laktobacilusa* je izrastao u MRS bujonu ili MRS agaru (Biokar diagnostics 089).

Potencijalna probiotska svojstva soja *Lactobacillus plantarum* L6 se utvrđuju tolerancijom na kiselu sredinu, prema postupku koji su predložili Erkkilä & Petäjä (2000). Za ovu svrhu, količina od 0,5 mL bakterijske suspenzije je inokulisana u 10 mL rastvora slanog fosfatnog pufera (Phosphate buffered saline - PBS) čiji je pH bio 2.0 , 2.5, 3.0 i 6.0. Podešavanje pH je sprovedeno sa 5 mol/L HCl. Uzorci su inkubirani tokom 3 časa na 37 °C, nakon čega se apsorbiraju merila na 600 nm, i izvršena su zasejavanja u MRS agar ploče za određivanje ostale životno sposobne populacije. Apsorbiraju uzoraka je merena na spektrofotometru M 550 Camspec UK.

### Rezultati istraživanja i diskusija

Tolerancija na delovanje kiselina je suštinska osobina koja ukazuje na sposobnost probiotskih organizama da prežive prolaz kroz gastro-intestinalni trakt ljudi (Erkkilä & Petaja, 2000, Pennacchia i sar., 2004). Rezultati opstanka *L. plantarum* soj L6 pri različitim pH vrednostima sredine (2.0, 2.5, 3.0 i 6.0) su prikazani u Tabeli 1.

Pod opisanim eksperimentalnim uslovima, nakon trećeg sata kultivacije, promena u apsorbiranju nije bila značajna i posmatrane vrednosti nisu indikativne za razvoj ispitivane bakterije.

Tabela 1. Promene u otpornosti *L. plantarum* soj L6 na niske pH vrednosti (pH 2.0, 2.5, 3.0 i 6.0), merene posle 3 sata kultivisanja

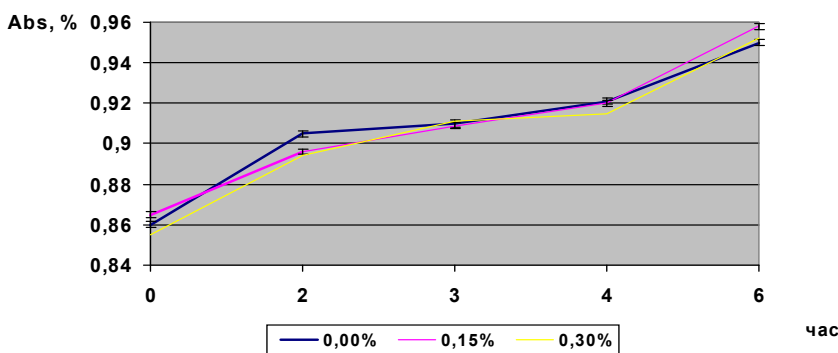
Table 1. Changes in the resistance of *L. plantarum* L6 strain at a low pH (pH 2.0, 2.5, 3.0 and 6.0), measured after 3 hours of cultivation

Vrsta testa	L.plantarum soj L <sub>6</sub>	
	$\Delta A_{600}$	Log CFU/g nakon 3 časa kultivirane
pH 6.0	0,265	7,08 ± 0,13 ***
pH 2.0	0,010	3,49 ± 0,10**
pH 2.5	0,055	3,70 ± 0,25**
pH 3.0	0,068	4,19 ± 0,30**

(-) Ne mogu da tolerišu nizak pH; (\*) sposobnost da tolerišu niske pH: < 2,99 log CFU/g; (\*\*) umerena sposobnost da tolerišu pH: 2.99-4.99 log CFU/g (\*\*\*) jaka sposobnost da tolerišu pH:  $\geq 4,99$  log CFU/g;

U evaluaciji ukupnog broja bakterija na kraju eksperimenta, utvrđen je opstanak ispitivanog bakterijskog soja. Početna izmerena apsorbancija uzoraka *Lactobacillus plantarum* soj L6 je u opsegu od 0.05 do 0.10. Rast ispitivanog soja posle 3 sata na pH 2.0, 2.5 i 3.0 je bio veoma usporen (Tabela 1). Zasejane kulture za ispitivanje ukupnog broja ispitivanog soja bakterija su međutim pokazale da ova vrsta ostane životno sposobna tokom celog perioda ispitivanja. a pored toga je zapaženo smanjenje broja životno sposobnih ćelija od početne bakterijske koncentracije koja je bila  $6,54 \pm 0,41$  log cfu/mL, a kasnije smanjena na  $4,19 \pm 0,30$ ,  $3,70 \pm 0,25$ ,  $3,49 \pm 0,10$  log CFU/g respektivno, pri pH 3.0, 2.5 i 2.0. Na pH 6.0 izolat je pokazao dobru sposobnost rasta ( $7,08 \pm 0,13$  log CFU /g

Nakon prolaza kroz kiselu sredinu želuca, bakterije koje treba da budu upotrebljene kao probiotici treba da su u stanju da prežive efekte žučnih soli u crevima. Rezultati ovog ispitivanja prikazani su na grafikonu 1 i ukazuju da soj L6 opstaje u prisustvu žučnih soli u koncentracijama od 0,15 % i 0,30 % .



Graf. 1. Promene u otporu *L. plantarum* soj L6 različitim koncentracijama žučnih soli: 0 %, 0,15 % i 0,30 % .

Graph. 1 Changes in the resistance of *L. plantarum* strain L6 different concentrations of bile salts: 0%, 0.15% and 0.30%.

U prvom satu inkubacije, uočen je nizak rast, pa stoga ovi podaci nisu prikazani na grafikonu 1. Nakon 2 sata inkubacije, rast izolata u kontrolnom uzorku počinje da se povećava do maksimalne vrednosti apsorbancije od  $0.905 \pm 0,006$ . U drugim uzorcima, povećanje je takođe značajno, jer mora se napomenuti da je u MRS bujonu dopunjenom sa 0,15 % i 0,30 % žučnih soli, što je više za oko 3,6 % i 4,6 % od njihove osnovne apsorbancije. U šestom satu izolat je pokazao visok rast, a apsorbancija je dostigla vrednost od  $0,950 \pm 0,005$  u kontrolnom uzorku i  $0.958 \pm 0,006$ , u eksperimentalnim uzorcima sa 0,15 % i  $0,952 \pm 0,009$  u eksperimentalnim uzorcima sa 0,30 % žučnih soli (grafikon 1).

## Zaključak

Analizom rezultata se dolazi do zaključka da *Lactobacillus plantarum* soj L6 može preživeti u kiseloj sredini stomaka, kao i da preživi toksični efekat žuči tokom njenog prolaska kroz gastrointestinalni trakt čoveka, da se mogu "priljubiti" i kolonizovati crevni trakt, gde se očekuje da imaju pozitivan efekat.

## Literatura

- Gradinarska, D., K. Danov, K. Vůlkova-Jorgova, Prilozhenie na bioprotekturni kulturi za proizvodstvoto na bezopasni mesni produkti. Mezhdunarodna nauchna konferentsiya „Khranitelna nauka, tekhnika i tekhnologii' 2009", UKHT-Plovdiv, Oktomvri 23-24, 2009. Nauchni trudove, 56 (1): 443-448
- Gradinarska, D., Danov, K., Valkova-Jorgova, K., Yordanov, D., Vasilev, K., Proteolytic effect of starter cultures used in the production of Bulgarian dry – cured sausages. Proc. 56 International Congress of Meat Science and Technology, August 15-20, 2010, Jeju, South Korea, E057.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and Nutritional Benefits from Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 87, 175-188.
- Danov, K., Gradinarska, D., Valkova-Jorgova, K., Yordanov, D., Karaivanova, E., Effect of Starter Cultures on the Amino Acid Composition of Traditional Bulgarian Semi-dried Raw Sausages. Proc. First International Food Symposium "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus", April 15-17, 2010, Tekirdag, Turkey, 371-373.
- Valkova-Jorgova, K., Danov K., Gradinarka D., Dragoev, St. (2008). Effect of probiotic starter culture on the cell fraction of semi-dried raw sausages. Proc. 54 International Congress of Meat Science and Technology, August 10-15, 2008, Cape Town, South Africa, 3B(6): 1-3.
- Valkova-Jorgova, K., Danov, K., Gradinarska, D., Yordanov, D., Vasilev, K., Karaivanova E. (2009) Research on the Impact of Bulgarian Starter Cultures on the Colour Characteristics of Quick-Ripened Raw-Cured Sausages, 55th International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen, Denmark, PE 4 (03).110
- Erkkilä, S. & Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, 55, 297–300.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T., & Suihko, M. L. (2001). Flavor profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. Meat Science, 58, 111–116.
- Ouweland, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an over View of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek, 82, 279–289.
- Hugas, M., Neumeyer, B., Pages, F., Garriga, M., & Hammes, W.P. (1996) Antimicrobial activity of bacteriocin-producing cultures in meat products: 2 Comparison of bacteriocin producing lactobacilli on *Listeria* growth in fermented sausages. Fleischwirtschaft, 76, 649–652.
- Incze, K. (1998). Dry fermented sausages. Meat Science, 49, 169–177.

- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M., Franti, E. and Cosma, E. ( 1981): Production of Italian salami: Effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 863– 871.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., & Villani F.(2004): Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67, 309–317.

## INVESTIGATION OF POTENTIAL PROBIOTIC STRAIN LACTOBACILUS PLANTARUM L6 ISOLATED FROM "KARLOVSKA SAUSAGE"

D. Indzhelieva<sup>1</sup>, A. Kuzelov<sup>2</sup>, N. Taškov<sup>2</sup>, D. Saneva<sup>2</sup>, D. Metodievski<sup>2</sup>

### Abstract

The use of probiotic starter cultures in the production of crude - of dried meat products are topical scientific and practical interest for research in the meat industry. The aim of this study was to investigate the strain *Lactobacillus plantarum* (L6) isolated from "Karlovska sausage" with potential probiotic properties. It was found that the L6 strain possesses a potential probiotic properties. This is evidenced by an ability of this strain to survive in acidic environments and in the presence of 0.15% and 0.30% bile salts to form a biofilm on polypropylene surfaces, thereby demonstrating the ability of adhesion to the intestinal epithelial cells, Examined *L. plantarum* strain L6 can effectively serve as an antimicrobial barrier to the development of pathogenic bacteria in the production of dried raw meat products.

**Keywords:** meat, starter cultures, probiotics

---

<sup>1</sup>University College of Tourism Burgas, Park „Ezero” ([dindjelieva@abv.bg](mailto:dindjelieva@abv.bg))

<sup>2</sup>Goce Delchev, Stip Ul. Krste Misirkov bb Stip R. Macedonia ([aco.kuzelov@ugd.edu.mk](mailto:aco.kuzelov@ugd.edu.mk))