

# Probiotička karakterizacija bakterija mliječne kiseline izoliranih iz kozjeg mlijeka

---

Milardović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:017312>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2023.

Ana Milardović

**PROBIOTIČKA  
KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA  
MLIJEČNE KISELINEIZOLIRANIH  
IZ KOZJEG MLIJEKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jadranka Frece te uz pomoć dr. sc. Denija Kostelca.

## ZAHVALA

*Ovim putem se zahvaljujem dr. sc. Deniju Kostelcu na pomoći pri izradi diplomskog rada, svim savjetima, strpljenju i uloženom trudu i vremenu.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

## PROBIOTIČKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ KOZJEG MLIJEKA

Ana Milardović, univ. bacc. nutr. 0058212509

### Sažetak:

Probiotici su živi mikroorganizmi koji, primijenjeni u adekvatnim količinama, pokazuju zdravstvenu korist za domaćina. Tradicionalno korištene namirnice s prepoznatim korisnim učincima na zdravlje prikladan su izvor novih probiotičkih sojeva. Jedna od takvih namirnica je i kozje mlijeko čija se konzumacija od davnina prepoznala kao korisna za zdravlje. U ovom istraživanju izolirano je 20 izolata bakterija mliječne kiseline te je provedena probiotička karakterizacija. Izolati pod oznakama AM1 i AM3 su pokazali najviši probiotički potencijal. Oba izolata pokazala su se sigurnima za upotrebu (ne pokazuju hemolitičku aktivnost ili rezistenciju na antibiotike), imaju izražen potencijal kolonizacije gastrointestinalnog (GI) sustava (visok stupanj sposobnosti formiranja biofilma, autoagregacije i koagregacije s najčešćim patogenima) te visok stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima GI trakta. Biokemijska identifikacija izolata AM1 i AM3 potvrdila je da su oba izolata vrste *Lactiplantibacillus plantarum*. Dodatno, sojevi *Lpb. plantarum* AM1 i AM3 su pokazali visok stupanj antimikrobne i antioksidacijske aktivnosti.

**Ključne riječi:** *kozje mlijeko, probiotik, Lactiplantibacillus plantarum, antioksidacijska aktivnost, antimikrobna aktivnost*

**Rad sadrži:** 56 stranica, 7 slika, 6 tablica, 132 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Deni Kostelac

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Ksenija Markov (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jadranka Frece (mentor)
3. prof. dr. sc. Jasna Novak (član)
4. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (zamjenski član)

**Datum obrane:** 27. studenog 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for general microbiology and food microbiology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

### PROBIOTIC CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM GOAT MILK

*Ana Milardović, univ. bacc. nutr. 0058212509*

#### **Abstract:**

Probiotics are live microorganisms that, applied in adequate amounts, show health benefits for the host. Traditionally used foods with recognized beneficial effects on health are a suitable source of new probiotic strains. One of such foods is goat milk, the consumption of which has long been recognized as beneficial for health. In this research, 20 isolates of lactic acid bacteria were isolated and probiotic characterization was performed. Isolates labeled AM1 and AM3 showed the highest probiotic potential. Both isolates have been shown to be safe for use (they do not show hemolytic activity or resistance to antibiotics), have a pronounced colonization potential of the gastrointestinal (GI) tract (a high degree of ability to form biofilms, autoaggregation and coaggregation with the most common pathogens) and a high degree of survival in simulated GI conditions tract. Biochemical identification of isolates AM1 and AM3 confirmed that both isolates are *Lactiplantibacillus plantarum* species. Additionally, strains of *Lpb. plantarum* AM1 and AM3 showed a high degree of antimicrobial and antioxidant activity.

**Keywords:** *goat milk, probiotic, Lactiplantibacillus plantarum, antioxidant activity, antimicrobial activity*

**Thesis contains:** 56 pages, 7 figures, 6 tables, 132 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

**Technical support and assistance:** dr. sc. Deni Kostelac

#### **Reviewers:**

1. Ksenija, Markov, PhD, Full professor (president)
2. Jadranka, Frece, PhD, Full professor (mentor)
3. Jasna, Novak, PhD, Full professor (member)
4. Andreja, Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** November 27<sup>th</sup>, 2023

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. KOZJE MLJEKO .....	3
2.1.1. Funkcionalni aspekti kozjeg mlijeka.....	4
2.1.2. Kemijski sastav kozjeg mlijeka .....	5
2.1.3. Mikrobni sastav kozjeg mlijeka.....	6
2.2. BAKTERIJE MLJEČNE KISELINE .....	7
2.2.1. Rod <i>Lactobacillus</i> .....	8
2.2.2. Primjena BMK.....	9
2.2.2.1. Industrijska primjena.....	10
2.2.2.2. Primjena u medicini .....	11
2.2.2.3. Primjena u prehrambenoj industriji .....	12
2.3. PROBIOTICI.....	13
2.3.1. Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva .....	14
2.3.2. Korisni učinci probiotika.....	15
2.3.2.1. Antioksidacijska svojstva probiotika .....	16
2.3.2.2. Antimikrobna svojstva probiotika .....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Mikroorganizmi .....	18
3.1.2. Hranjive podloge.....	19
3.1.3. Aparatura i pribor.....	20
3.1.4. Kemikalije .....	21
3.2. METODE RADA.....	22
3.2.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka kozjeg mlijeka .....	22
3.2.2. Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline .....	22
3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	23
3.2.4. Opća morfološka i probiotička karakterizacija dobivenih izolata .....	23
3.2.4.1. Katalaza test.....	23
3.2.4.2. Ispitivanje otpornosti izolata na niske pH vrijednosti.....	23
3.2.5. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala .....	24
3.2.6. Antimikrobna aktivnost prema odabranim patogenima .....	24
3.2.7. Određivanje autoagregacijske sposobnosti bakterija mliječne kiseline .....	25
3.2.8. Određivanje sposobnosti koagregacije izolata s odabranim patogenima .....	25
3.2.9. Određivanje hidrofobnosti stanične površine bakterija mliječne kiseline .....	26



3.2.10.	Sposobnost formiranja biofilмова bakterija mliječne kiseline .....	26
3.2.11.	Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima probavnog sustava.	27
3.2.12.	Analiza fermentacijskog profila (API 50 CHL metoda) .....	28
3.2.13.	Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike disk difuzijskom metodom.....	28
3.2.14.	Hemolitička aktivnost izolata bakterija mliječne kiseline .....	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	29
5.	ZAKLJUČCI .....	45
6.	LITERATURA .....	46

# 1. UVOD

Popularnost proizvodnje kozjeg mlijeka intenzivno raste (Tarola i sur., 2019). Budući da je koza otporna na ekstremne klimatske i ekološke uvjete sve se više uzgaja u siromašnim dijelovima svijeta (Lohani i Bhandari, 2021). Potražnja također raste među bogatijim i obrazovanim dijelom stanovništva zbog korisnih prehrambenih svojstava, kao i zbog brige o nižem ekološkom otisku (Lohani i Bhandari, 2021). Glavni nutritivni razlozi sve većeg interesa za kozje mlijeko su dokazi o manjem alergenom potencijalu od kravljeg mlijeka, bolja probavljivost (Tarola i sur., 2019) te visok sadržaj vitamina, minerala, proteina i bioaktivnih spojeva (linolne kiseline, oligosaharidi, sfingolipidi i poliamini) (Verruck i sur., 2019). U kozjem mlijeku očekivano dominiraju bakterije mliječne kiseline (BMK) (Quigley i sur., 2013). Pomoću njih se u prehrambenoj industriji tradicionalno proizvode fermentirani mliječni proizvodi i fermentirano povrće (Castellone i sur., 2021). Osim što produžuju trajnost proizvoda, doprinose okusu, teksturi i hranjivoj vrijednosti (Bintsis, 2018). Istražuju se kao rješenje za probleme kvarenja hrane i infekcija koje se prenose hranom (Perez i sur., 2014). Mogu poboljšati probavljivost mliječnih proizvoda, posebno kod ljudi koji pate od intolerancije na laktozu (Li i sur., 2023). Pokazale su se odličnima i u komercijalnoj primjeni kao biognojiva (Raman i sur., 2022) te u biorafinerijama za fermentaciju primarnih usjeva i agroindustrijskog otpada (Polanowska, 2023). Mliječna kiselina se čak koristi u proizvodnji bioplina (Pandey i sur., 2019), biogoriva (Mazzoli i sur., 2014) i razgradive bioplastike (Alvarez Chavez i sur., 2022). U farmaceutskoj industriji BMK se koriste kao nosači za dostavu lijekova u organizam (što može poboljšati biodostupnost lijekova) (Batista i sur., 2021). Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se uzimaju u odgovarajućim količinama, pružaju zdravstvene dobrobiti domaćinu (Hill i sur., 2014). Na tržištu dolaze u obliku hrane, dodataka prehrani i lijekova (Poljak, 2016). Aktualna tema u medicini su probiotici nove generacije (PNG) kojima se planiraju liječiti i prevenirati specifične bolesti na temelju mikrobioma pojedinca (Singh i Natraj, 2021). Sinergizam kombinacije probiotika i konvencionalnih lijekova pokazuju prednosti kao što su: brže zacjeljivanje, prepolavljanje potrebne doze konvencionalnog lijeka, smanjenje nuspojava uzrokovanih klasičnom terapijom i povećanje stope iskorjenjivanja nekih perzistentnih mikrobnih infekcija (Kosgey i sur., 2019). Dulje izlaganje oksidativnom stresu dovodi do niza kroničnih bolesti (Sharifi-Rad i sur., 2020), stoga je stavljen fokus na istraživanje prirodnih antioksidansa iz

bio-resursa kao što su probiotici (Farak i Rahmani, 2020).

Cilj ovoga rada bio je izolirati i probiotički okarakterizirati bakterije mliječne kiseline iz kozjeg mlijeka. Sveobuhvatnaom probiotičkom karakterizacijom ispitani su sigurnosni kriteriji; osjetljivost na antibiotike i hemolitička aktivnost. Također je određena antimikrobna aktivnost, antioksidacijski potencijal i sposobnost kolonizacije gastrointestinalnog (GI) trakta (preživljavanje u simuliranim uvjetima GI sustava, sposobnost formiranja biofilma, autoagregacija, koagregacija i hidrofobnost stanične površine) dobivenih izolata.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KOZJE MLIJEKO

Koza (*Capra aegagrus hircus*) se smatra jednom od prvih pripitomljenih životinja, a njen uzgoj veže se uz siromašne krajeve (Nomura i sur., 2013). Svjetska populacija koza povećala se za više od 30 % u posljednjem desetljeću, kao i proizvodnja kozjeg mlijeka (Issa i Tahergorabi, 2019), a tržišni trendovi sugeriraju da će se do 2030. povećati za dodatnih 53 % (Verruck i sur., 2019). Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu, kozje mlijeko je druga najproizvedenija vrsta mlijeka nakon kravljeg (Tarola i sur., 2019) i trenutno predstavlja oko 2,1 % globalne proizvodnje mlijeka. Iako je populacija koza koncentrirana u Aziji (52,7 %) i Africi (25,7 %), proizvodnja kozjeg mlijeka je najveća u Europi, pogotovo u Francuskoj, Grčkoj, Italiji i Španjolskoj (Quigley i sur., 2013). Potražnja raste među bogatijim i obrazovanim dijelom stanovništva zbog korisnih prehrambenih svojstava, kao i zbog brige o nižem ekološkom otisku (Lohani i Bhandari, 2021). Uzgoj koza zahtjeva puno manje zemlje, vode, hrane i medicinskih tretmana u usporedbi s uzgojem krava (Quigley i sur., 2013). S druge strane, potražnja raste i među rastućim siromašnim dijelom stanovništva (Lohani i Bhandari, 2021). Zbog širenja pustinja, životinja otporna na ekstremne klimatske i ekološke uvjete kao što je koza jedina može opstati (Lohani i Bhandari, 2021). Glavni razlozi sve većeg interesa za kozje mlijeko su dokazi o manjem alergenom potencijalu od kravljeg mlijeka, veća razina biorasploživosti željeza u odnosu na onu iz kravljeg i ovčjeg mlijeka, bolja probavljivost (Tarola i sur., 2019) te visok sadržaj vitamina, minerala, proteina i bioaktivnih spojeva (linolne kiseline, oligosaharidi, sfingolipidi i poliamini) (Verruck i sur., 2019). Zbog navedenih svojstava, smatra se posebno prikladnim za djecu, starije i osjetljive osobe, pogotovo pacijente sa smetnjama poput čira i kolitisa (Quigley i sur., 2013). Kozje mlijeko industriji je zanimljivo i kao potencijalna funkcionalna hrana jer sadrži funkcionalne komponente kao što su prebiotici ili probiotičke bakterije (Verruck i sur., 2019). Najčešće se koristi za proizvodnju sira, pogotovo u mediteranskim zemljama i jugoistočnoj Europi (Miller i Lu, 2019). Nutritivna svojstva mlijeka su se pokazala pod jakim utjecajem prehrane, genotipa to jest pasmine i zdravlja životinja, ali također i sezone te proizvodnih sustava (Quigley i sur., 2013).

### 2.1.1. Funkcionalni aspekti kozjeg mlijeka

Razlozi bolje probavljivosti kozjeg mlijeka su manja veličina masnih kuglica u kozjem mlijeku (devet puta manje no one u kravljem) te veći udio malih micela kazeina. Također,  $\beta$ -kazeina i kapa-kazeina ima više u kozjem nego u kravljem mlijeku, stoga se dobiva slab gel koji je koristan za bolju probavljivost (Tarola i sur., 2019). Iako kozje mlijeko sadrži manje laktoze no kravlje, ona je ipak prisutna (Lad i sur., 2017). Zbog generalno dobre probavljivosti u debelom crijevu, fermentira manje neprobavljenih ostataka, što relativno prikriva intoleranciju na prisutnu laktozu (Tarola i sur., 2019). Sastavnice mlijeka;  $\alpha$ -S1-kazein,  $\beta$ -kazein i  $\beta$ -laktoglobulin imaju potencijal uzrokovati alergiju (Rahmatalla i sur., 2022). Zanimljivo je da je razina alfa s-1 kazeina u kozjem mlijeku 89 % niža nego u kravljem mlijeku (Tarola i sur., 2019). Haeilein (2004) je ukazao da liječenje kozjim mlijekom obično liječi 30 – 40 % problematičnih slučajeva alergije na kravlje mlijeko u djetinjstvu. Kozje mlijeko sadrži brojne komponente s korisnim učinkom na zdravlje. Bogato je konjugiranom linolnom kiselinom, koja je u *in vivo* istraživanjima na životinjama i *in vitro* na ljudima pokazala antikancerogeno djelovanje (Lad i sur., 2017). S aspekta antimikrobne aktivnost, u mlijeku se nalaze imunoglobulini i drugi antimikrobni peptidi poput laktoferina, laktoperoksidaze, lizozima, isracidina, laktofericina koji su učinkoviti protiv više uzročnika bolesti i organizama kvarenja (npr. *Vibrio cholera*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* i *Staphylococcus aureus*) (Sonu i Basavaprabhu, 2020). Također, u fermentiranom kozjem mlijeku se nalazi angiotenzin konvertirajući enzim s antihipertenzijskim učinkom (Rubak i sur., 2022). Kozje mlijeko može aktivirati otpuštanje NO iz krvnih stanica i potaknuti proizvodnju citokina (IL-10, TNF-a i IL-6). Oslobođanje NO moglo bi imati kardio-zaštitne učinke kod potrošača mlijeka i također pokazati antibakterijsko djelovanje i time spriječiti infekcije (Lad i sur., 2017). Za razliku od kravljeg mlijeka, kozje sadrži manje kolesterola, a više mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina te triglicerida srednjeg lanca (snižava kolesterol u plazmi i inhibira taloženje u tkivima) što doprinosi očuvanja srčanožilnog zdravlja (Kompan i Komprij, 2012). Kozje mlijeko se svakako razmatra kao sinergistički (probiotički i prebiotički) napitak s ciljem očuvanja kvalitetne crijevne mikroflore. Prirodno je bogato oligosaharidima (nutrijentom za bifidobakterije koje pokazuju širok raspon zdravstveni dobrobiti) i specifičnim bakterijama mliječne kiseline (Tarola i sur., 2019).

### 2.1.2. Kemijski sastav kozjeg mlijeka

Lipidna frakcija sastoji se uglavnom od triacilglicerola (~98 % ukupne masti), s manjim količinama fosfolipida, kolesterola, slobodnih masnih kiselina te mono- i diacilglicerola (Sonu i Basavaprabhu, 2020). Masne kuglice kozjeg mlijeka manje su od onih u kravljem mlijeku (promjera 3,0 – 4,0  $\mu\text{m}$ ) i nedostaje im aglutinin. Zbog toga se kozje mlijeko smatra „samohomogeniziranim” mlijekom (Lad i sur., 2017). Mast kozjeg mlijeka ima značajno veće količine masnih kiselina kratkog i srednjeg lanca u usporedbi s kravljim i ljudskim mlijekom (Sonu i Basavaprabhu, 2020). Kaprinska, kaprilna i kapronska masna kiselina čine 15 – 18 % svih masnih kiselina prisutnih u kozjem mlijeku (Mollica i sur., 2021). Bogato je konjugiranom linolnom, mononezasićenom i polinezasićenom masnom kiselinom (Sonu i Basavaprabhu, 2020). U odnosu na mlijeko drugih sisavaca, kozje je puno bogatije sfingolipidima, ključnima za formiranje stanica (Tarola i sur., 2019). Mliječni proteini dijele se na nestabilnu micelarnu fazu, sastavljenu od kazeina i topljivu fazu sastavljena od proteina sirutke (Lad i sur., 2017). Kazein je glavna proteinska frakcija koja čini 74 % ukupnih mliječnih bjelančevina ( $\kappa$ ,  $\beta$ ,  $\alpha\text{S1}$ ,  $\alpha\text{S2}$  i  $\gamma$ -kazeini), dok proteini sirutke ( $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, serumski albumin i imunoglobulini) doprinose s gotovo 17 %, a udio neproteinskih dušikovih spojeva je 9 % (Sonu i Basavaprabhu, 2020). Beta-kazein je najznačajniji protein u kozjem mlijeku jer čini do 50 % ukupnog sadržaja kazeina (Rahmatalla i sur., 2022). Laktoza je glavni slobodni ugljikohidrat u mlijeku koza (u prosjeku 4,1 %, dok je kod kravljeg 4,5 %) (Stergiadis i sur., 2019). Uz nju su također prisutni oligosaharidi, glikopeptidi, glikoproteini i nukleotidi šećera u malim količinama (Sonu i Basavaprabhu, 2020). Koncentracija oligosaharida je niža u odnosu na ljudsko mlijeko (250 – 300 mg/L u odnosu na 12 – 13 g/L), ali im je struktura poprilično slična jer je izvedena iz laktoze (Tarola i sur., 2019). Glavni minerali koji se u njemu nalaze su Ca, P, Mg, K i Na, dok su u manjoj koncentraciji prisutni Mn, Zn, Fe i Cu (Park, 2007). Jedna šalica kozjeg mlijeka osigurava 35 % dnevnih potreba za kalcijem (Lad i sur., 2017). Zbog većeg sadržaja većine minerala u usporedbi s kravljim, u ljudskoj prehrani prednost treba dati kozjem mlijeku (Lad i sur., 2017). Kozje mlijeko ima veći sadržaj vitamina A od kravljeg mlijeka jer se kod koza pretvara sav  $\beta$ -karoten iz hrane u vitamin A zbog čega je i bjelje (Park, 2007). Bogato je niacinom, tiaminom, riboflavinom i pantotonom, ali ima značajan nedostatak folne kiseline i vitamina E (Sonu i Basavaprabhu, 2020). Osim navedenih mikro i

makronutrijenata, kozje mlijeko sadrži i brojne bioaktivne spojeve (poliamini, putrescin, spermidin i spermin) koji su aktivni u staničnom rastu i diferencijaciji te su također unutarstanični glasnici (Tarola i sur., 2019). Ishrana koza mediteranskim biljem, kaduljom, ružmarinom, majčinom dušicom i boražinom, rezultira porastom koncentracije flavonoida, galne kiseline i terpena te višestruko nezasićenih masnoća u mlijeku što povećava njegova antioksidativna svojstva (Tarola i sur., 2019).

### 2.1.3. Mikrobni sastav kozjeg mlijeka

U kozjem mlijeku očekivano dominiraju BMK, uključujući rodove *Lactococcus* ( $3,7 \cdot 10^6$  CFU/mL), *Lactobacillus* ( $1,34 \cdot 10^5$  CFU/mL), *Leuconostoc* ( $3,27 \cdot 10^3$  CFU/mL) i *Enterococcus* ( $2,95 \cdot 10^2$  CFU/mL). Međutim, prisutne su i *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae*, plijesni (filamentozne gljive) i kvasci (Quigley i sur., 2013). Identificirani su i rodovi koje se obično ne povezuju s kozjim mlijekom ili koje su prije bile povezane samo sa sirevima, uključujući brojne vrste iz rodova *Corynebacterium* i *Brachy bacterium* (Callon i sur., 2007). Još jedno neočekivano otkriće bila je prisutnost nekoliko halofilnih vrsta koje prethodno nisu bile povezane s mlijekom, uključujući *Jeotgalicoccus psychrophilus*, *Salinicoccus sp.*, *Dietzia maris*, *Exiguobacterium*, *Ornithinococcus sp.* i *Hahella chejuensis*. Značaj prisutnosti ovih mikroorganizama s obzirom na zdravlje, sigurnost ili razvoj proizvoda nije poznat (Callon i sur., 2007). U radu (Issa i Tahergorabi, 2019) spominje se i nalaz *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*, a jesu li prisutne zbog krvarenja ili imaju potencijalno korisne učinke na zdravlje tek treba utvrditi. Kao što je spomenuto, sastav mlijeka ovisi o brojnim čimbenicima pa tako ovisi i mikrobni sastav. Otkriveno je da u mlijeku prikupljenom tijekom zime dominiraju *Lactococcus* i *Pseudomonas*, u ljetnom *Pantoea agglomerans* i *Klebsiella*, a u jesenskom *Chryseobacterium indologenes*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus*, *Corynebacteria* i kvasci (Quigley i sur., 2013). Metaanalizom (Gonzales-Barron i sur., 2017) zaključeno je da je u sirovom kozjem mlijeku najčešća učestalost otkrivanja sljedećih patogenih mikroorganizama; *Listeria monocytogenes* (3,6 %), *Salmonella spp.* (2,4 %), *Staphylococcus aureus* (39 %) i *Escherichia coli* koja proizvodi shiga-toksin (4,8 %). S druge strane, kozjim sirevima, učestalost otkrivanja *S. aureus* je 16,0 %, *L. monocytogenes* 12,8 %, a *E. coli* O157 s genima virulencije 4,3 % (Gonzales-Barron i sur., 2017). Očekivano, shiga-

toksin ima veću združenu učestalost u sirevima od sirovog mlijeka nego u sirevima od pasteuriziranog mlijeka (Condoleo i sur., 2022). Poticaj je to na strožu provedbu preventivnih mjera na farmama (npr. iskorjenjavanje bolesti) i dostizanje što viših higijenskih standarda u proizvodnji sira (sterilizacija mljekarske opreme).

## 2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline pripadaju redu *Firmicutes*, razredu *Bacilli*, rodu *Lactobacillales*, te uključuje obitelji *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*. Rod *Bifidobacterium* (obitelj *Bifidobacteriaceae*) se također smatra sastavnicom BMK budući da s njima dijeli fenotipske karakteristike, unatoč tome što pripada u red *Actinobacteria* (Vinderola i sur., 2019). Različite obitelji obuhvaćaju različite vrste i sojeve bakterija s različitim karakteristikama, što ih čini prilagodljivima za različite primjene u prehrambenoj i zdravstvenoj industriji (Ayivi i sur., 2020). Riječ je o gram-pozitivnim bakterijama koje ne stvaraju spore, štapičaste su ili okrugle morfologije, negativne su na katalazu i oksidazu, a većina ih je nepokretna (Ringø i sur., 2018). Fakultativno su aerobne te one najbitnije, mliječnom fermentacijom proizvode mliječnu kiselinu iz laktoze (Ayivi i sur., 2020). Dijele se na homofermentativne koje proizvode samo mliječnu kiselinu i heterofermentativne koje proizvode još i octenu kiselinu ili alkohol te ugljikov dioksid (Ringø i sur., 2018). Biosintetičke sposobnosti BMK-a nisu ograničene samo na sintezu aminokiselina i vitamina, već se njihove sposobnosti proširuju na proizvodnju različitih spojeva od interesa kao što su, selenoproteini, egzopolisaharidi, fruktooligosaharidi, konjugirane linolne kiseline i masne kiseline kratkog lanca (Daba i sur., 2021). Također proizvode tvari za inhibiciju rasta drugih mikroorganizama kao što su bakteriocini, vodikov peroksid, organske kiseline i druge. Time sprječavaju proliferaciju patogenih bakterija i bakterija kvarenja u hrani i probavnom traktu (Li i sur., 2019). Duga tradicija upotrebe BMK 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 i sur., 2010).

Iako većina BMK nosi GRAS status, budući da su se tijekom duge povijesne uporabe pokazale sigurnima, ne znači da iznimaka nema. Genetski modificirane BMK nisu odobrene (Plavec i Berlec, 2020).



### 2.2.1. Rod *Lactobacillus*

*Lactobacillus* čini najveći rod unutar skupine BMK, a kod čovjeka njegove vrste koloniziraju ponajviše probavni trakt (uključujući usnu šupljinu) i ženski spolni trakt (Dempsey i Corr, 2022). Do danas je identificirano više od 70 različitih *Lactobacillus*, od kojih je samo 34 identificirano na razini vrste. Najčešće izolirane vrste iz probavnog trakta su *L. brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Lpb. plantarum*, *L. fermentum* i *L. salivarius* (Slover i Danziger, 2008). Tradicionalno se *Lactobacillus* vrste dijele u tri skupine na temelju njihovog metabolizma: obligatno homofermentativna (*Lactobacillus acidophilus* i *Ligilactobacillus salivarius*), fakultativno heterofermentativna (*L. casei* i *Lpb. plantarum*) i obligatno heterofermentativna skupina (*L. reuteri* i *L. fermentum*) (Dempsey i Corr, 2022). Mliječna kiselina ipak je glavni metabolički produkt laktobacila tijekom fermentacije glukoze, iako se u manjim količinama proizvode i octena te jantarna kiselina (Slover i Danziger, 2008). Optimalan uvjeti za kultivaciju bakterija iz roda *Lactobacillus* su pri pH 6,0 na temperaturi od 37 °C tijekom 48 sati (Śliżewska i Chlebicz-Wójcik, 2020). Nije ih uvijek lako uzgojiti jer pojedine vrste zahtjevaju pažljiv odabir medija te im je vrijeme inkubacije produljeno (Slover i Danziger, 2008). Budući da je većina laktobacila anaerobna, pri uzgoju mora se dobro paziti da nisu u kontaktu s kisikom (Lidbeck i Nord, 2015). Pod mikroskopom su laktobacili štapići različitih duljina, od dugih do kratkih. Budući da morfološki podsjećaju na druge rodove može doći do njihovog pogrešnog identificiranja s *Corynebacterium*, *Clostridium* i *Streptococcus* (Slover i Danziger, 2008). Vjeruje se da inhibiraju rast patogenih organizama putem proizvodnje mliječne kiseline i drugih metabolita čime pridonose održavanju zdravog GI trakta i obično se ne smatraju patogenima kod zdravih osoba, osim kada su povezani s karijesima na zubima (Aguirre i Collins, 1993). Iako se njihova upotreba smatra sigurnom, zabilježeno je da su prouzročile infekcije kod bolesnih ili imunosuprimiranih pacijenata (sindrom stečene imunodeficijencije, transplatacija organa, preuranjen porođaj, dijabetes) (Aguirre i Collins, 1993). Tri najčešće infekcije uzrokovane *Lactobacillus* spp. su endokarditis, bakterijemija i lokalizirane infekcije, kao što su apscesi (Slover i Danziger, 2008). Probiotički sojevi roda *Lactobacillus* mogu imati niz pozitivnih učinaka na zdravlje kao što su ravnoteža mikrobioma GI trakta, ali i vagine (konkurentsko isključivanje, poboljšanje funkcije epitelne barijere i proizvodnja antipatogenih spojeva), jačanje imunološkog sustava čime se smanjuje rizik

od infekcije, ali i već prisutna upala (Zhang i sur., 2018) te olakšavanje probave (Remes-Troche i sur., 2020).

### 2.2.2. Primjena BMK

U prehrambenoj industriji, BMK su nezaobilazni sastojak kod proizvodnje fermentiranih mliječnih proizvoda kao što su jogurt, kefir i sir, ali i fermentiranog povrća (krastavci, kupus) (Castellone i sur., 2021). Putem fermentacije laktoze, ove bakterije proizvode mliječnu kiselinu, čime se snižava pH vrijednost proizvoda i stvaraju se neprijateljski uvjeti za rast patogenih mikroorganizama (Ibrahim i sur., 2021). Osim što produžuju trajnost proizvoda, bakterije mliječne kiseline doprinose i okusu, teksturi i hranjivoj vrijednosti (Bintsis, 2018). Prema istraživanju Li i sur. (2023), BMK također mogu poboljšati probavljivost mliječnih proizvoda, posebno kod ljudi koji pate od intolerancije na laktozu. Aktualna tema u medicini su probiotici nove generacije kojima se planiraju liječiti i prevenirati specifične bolesti na temelju znanja o mikrobiomu pacijenta ponaosob (Singh i Natraj, 2021). Bakteriocini koje proizvode BMK istražuju se kao potencijalni borci protiv urinarnih infekcija koje uzrokuju rezistentni patogeni (Mozzi i sur., 2010). Uspostavljanje stabilne kolonizacije vaginalne sluznice rodom *Lactobacillus* ističe se kao dobra metoda liječenja perzistentnih vaginoza (Bagnall i Rizzolo, 2017). U farmaceutskoj industriji BMK se koriste kao prirodni proizvođači riboflavina i kobalamina (Averianova i sur., 2020; Fang i sur., 2017) i kao nosači za dostavu lijekova u organizam (što može poboljšati biodostupnost lijekova) (Batista i sur., 2021). BMK su se pokazale odličnima u komercijalnoj primjeni kao biognojiva (Raman i sur., 2022) i u biorafinerijama za fermentaciju primarnih usjeva i agroindustrijskog otpada (Polanowska, 2023). Produkt od najvećeg interesa te fermentacije je mliječna kiselina (Upadhyaya i sur., 2014) čije su najzanimljivije primjene među ostalima, proizvodnja bioplina (Pandey i sur., 2019), biogoriva (Mazzoli i sur., 2014) i razgradive bioplastike (Alvarez Chavez i sur., 2022). Kako bi unaprijedili proizvodnju željenog mikrobnog produkta, nakon što se pronade odgovarajući soj, proizvodnja se može povećati modificiranjem uvjeta kulture i korištenjem mutagenoze i tehnika rekombinantne DNA (Patra i sur., 2017). U prehrambenoj industriji, ova je mogućnost ograničena propisima i stavom potrošača (Plavec i Berlec, 2020). U nastavku će se kontinuirano spominjati primjene egzopolisaharira (EPS) koje

proizvode BMK. Njih prirodno štite od biotičkih i abiotičkih čimbenika stresa, a može ih se upotrebljavati u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj industriji i u medicinskim proizvodima (Daba i sur., 2021).

#### 2.2.2.1. Industrijska primjena

U funkciji gnojiva BMK mogu pospješiti razgradnju organske tvari, detoksificirati opasne kemikalije, regulirati biokemijski ciklus biljaka i sadržaj organskih tvari u tlu te proizvesti metabolite organske kiseline i bakteriocine (inhibicija gljivičnih i bakterijskih infekcija u rizosferi i filiosferi) (Raman i sur., 2022). Time povećavaju prinos usjeva te se stoga preporučuju za komercijalnu primjenu u vidu biognojiva (Raman i sur., 2022). Posljednjih se godina istražuje njihova primjena u biorafinerijama za fermentaciju primarnih usjeva i agroindustrijskog otpada (Polanowska, 2023). Produkt od najvećeg interesa te fermentacije je mliječna kiselina, prirodni spoj s različitim primjenama u prehrambenoj i neprehrambenoj industriji (Upadhyaya i sur., 2014). Koristi se u proizvodnji razgradive bioplastike kao što su polilaktična kiselina i poli(laktid-ko-glikolidna) kiselina kao alternative polimerima dobivenim iz petrokemijskih proizvoda (Polanowska, 2023; Alvarez Chavez i sur., 2022). Također se koristi kao zeleno otapalo, a može se preraditi i u korisne intermedijere poput akrilne kiseline, propilen glikola i 2,3-pentandiona (Kim i sur., 2022). Fermentacijom LAB nastaju i biogoriva kao što su etanol i butanol, biorazgradivi plastični polimeri, egzopolisaharidi, antimikrobna sredstva, tvari za promicanje zdravlja i nutraceutike (Mazzoli i sur., 2014). Isplativost proizvodnje mliječne kiseline fermentacijom ometaju visoke cijene hidrolitičkih enzima za saharifikaciju celuloze i hemiceluloze (potrebni su učinkovitiji mikrobi koji koriste lignoceluloznu biomasu), kao i proces separacije (Kim i sur., 2022). Riješenje leži u metaboličkom inženjeringu, biotehnoškom alatu kojim se manipulacijom genetskim materijalom ovih organizama poboljšavaju parametri fermentacije, tolerancija na kiseline i iskorištavanje supstrata (Upadhyaya i sur., 2014). Glavni izazovi prilikom provedbe fermentacije ovako velikih razmjera su postizanje što većeg prinosa i postizanje optičke čistoće (Rawoof i sur., 2021). U istraživanju Pandey i sur. (2019) ističu potencijal *Lactobacillus acidophilus* kao izvor obnovljive energije proizvodnjom bioplina/biovodika iz organskog otpada. Proizvodnja bioplina bila je popraćena proizvodnjom drugih vrijednih metabolita u obliku organskih kiselina uključujući piruvat, propionat, acetat,

laktat, format i butirat. Proizvodnja polisaharida nastalog u biljci je jeftina, no osjetljiva na klimu, a biljni proizvodi imaju veliku varijabilnost u svojim fizičkim svojstvima, čistoći i dostupnosti. Zato se preporuča proizvodnja polisaharida mikrobnog podrijetla (jeftina sirovina i mogućnost dobre kontrole fermentacije) (Punia Bangar i sur., 2022).

#### 2.2.2.2. *Primjena u medicini*

Probiotici nove generacije se istražuju u vidu personalizirane medicine za liječenje specifičnih bolesti na temelju mikrobioma crijeva pojedinca (Singh i Natraj, 2021). Mogu se koristiti kao profilaktički i terapijski agensi što su pokazali na životinjskim modelima i *in vitro* studijama (De Jesus i sur., 2020). Genomska analiza, procjena sigurnosti, razumijevanje molekularnih mehanizama interakcija domaćin-probiotik, kliničke studije i potrebne doze ključni su koraci u razvoju PNG (Singh i Natraj, 2021). Probiotičke bakterije mogu biti korisne kao adjuvansi sluzničkog imunološkog sustava, potičući povećanje broja IgA+ stanica (prva linija obrane protiv infekcija), stoga se istražuju u liječenju bolesti donjnjeg respiratornog trakta i genitalnih karcinoma uzrokovanih HPV-om (Mozzi i sur., 2010). Bakteriocini BMK su heterogena skupina bioaktivnih antimikrobnih proteina koji imaju inhibitorno djelovanje prema mnogim mikrobnim vrstama i ne stvaraju rezistentnost (Hernández-González i sur., 2021). To ih čini dobrim kandidatom za liječenje okorjelih urinarnih infekcija (Mrša, 2021). Mozzi i sur. (2010) ističu potencijal bakteriocina kao što su nizin i lakticin u liječenju otpornih patogena (Meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vankomicin-rezistentni enterokoki i *Clostridium difficile*). Treba istraživati mehanizme ciklizacije jer takvi kružni bakteriocini imaju bolju stabilnost (Perez i sur., 2014). Liječenje vaginalnih infekcija uglavnom je ograničeno na metronidazol ili klindamicin, pri čemu približno 50 % žena ima recidiv unutar jedne godine (Bagnall i Rizzolo, 2017). Dodavanje probiotika može pospješiti stabilnost *Lactobacillus* unutar ženskog reproduktivnog sustava (pri tome vodikov peroksid i mliječna kiselina smanjuju pH i upalu), međutim transplatacije vaginalnog mikrobioma nisu se pokazale uspješnima (Lev-Sagie i sur., 2019). Prvi živi bioterapijski proizvod nazvan Lactin-V, koristi soj *Lactobacillus crispatus* izoliran iz vagine zdrave žene (Rizzo i sur., 2021). Izlučivanje terapijskih proteina, sustavi površinskog prikaza i integracija genoma, mogućnosti su koje pruža genetsko inženjerstvo BMK (Plavec i Berlec, 2019). Rekombinantne BMK u liječenju infekcija uspješno dostavljaju antigene derivirane od virusa,

bakterija, gljivica ili parazita kako bi potaknule sluznički odgovor na infekcije i potaknule proizvodnju specifičnih protutijela (Szatraj i sur., 2017). Istražuju se kao moguća terapija za liječenje raka (posebno raka debelog crijeva), autoimunih bolesti poput alergija i dijabetesa tipa I (Plavec i Berlec, 2019) te upalnih bolesti crijeva kao što su ulcerozni kolitis i Crohnova bolest (Shigemori i Shimosato, 2017). Čak i u medicini EPS je privukao veliku pozornost te se koristi u inteligentnim sustavima za kontinuiranu dostavu lijekova, međuprožimajućim polimernim mrežama, lijekovima protiv raka, rekombinantnoj makromolekularnoj biofarmaceutici, isporuci gena, inženjerstvu tkiva i dijagnostici (Daba i sur., 2021). Određeni sojevi BMK pokazali su sposobnost proizvodnje riboflavina i kobalamina. Iako su prirodna i sigurna alternativa sintetskim oblicima, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se istražili mehanizmi biosinteze i optimizirala proizvodnja (Mozzi i sur., 2010).

#### *2.2.2.3. Primjena u prehrambenoj industriji*

BMK igraju ključnu ulogu u procesu fermentacije, drevnoj tehnologiji prerade hrane, koja se koristi za očuvanje, poboljšavajući kvalitetu hrane, okus, nutritivnu vrijednost, rok trajanja i uklanjanje toksina (Mozzi i sur., 2010). Razvoj arome u procesima fermentacije hrane proizlazi iz međusobnog djelovanja dva različita mikroba procesa: enzimске aktivnosti mikroba koji sudjeluju u fermentaciji i metaboličkih puteva u aktivnim mikrobnim stanicama (Smid i Kleerebezem, 2014). Mjera u kojoj BMK doprinose stvaranju okusa ovisi o njihovoj sposobnosti da metabolički transformiraju sastojke hrane u aromatske spojeve i o njihovom relativnom doprinosu u usporedbi s drugim mikroorganizmima ili enzimima koji su istovremeno aktivni u hrani (Thierry i sur., 2015). Problem pretilosti, dijabetesa i kardiovaskularnih bolesti u razvijenim zemljama povećale su potražnju za prirodnim niskokaloričnim šećerima. Eritritol se komercijalno proizvodi mikrobnom fermentacijom dok se psikoza proizvodi pomoću mikrobnih enzima (Mozzi i sur., 2010). Prema nedavnim tvrdnjama, šećerni alkoholi također mogu djelovati kao prebiotici (Mozzi i sur., 2010). Drugi se šećeri proizvode kemijski i zbog određenih nedostataka proizvodnja im je skupa (Patra i sur., 2017). Zbog preferencija potrošača prema minimalno prerađenim prehrambenim proizvodima bez uporabe kemijskih konzervansa, BMK se istražuju kao rješenje za probleme kvarenja hrane i infekcija koje se prenose hranom (Perez i sur., 2014). Učinak konzervacije uglavnom je posljedica proizvodnje mliječne kiseline, ali i spojeva kao što su diacetil,

reuterin i bakteriocini (Lübeck i Lübeck, 2019). Unatoč brojnim identificiranim bakteriocinima, danas su samo nizin i pediocin PA-1 komercijalno primijenjeni za zaštitu od kvarenja i patogenih organizama (Mozzi i sur., 2010). Nedostatak je što bakteriocini ne pokazuju istu aktivnost u različitim prehrambenim matricama ili protiv različitih ciljnih mikroorganizama. Osim toga, njihova učinkovitost varira ovisno o vremenu i temperaturi skladištenja te pH rasponu proizvoda (Mokoena i sur., 2021). Kombinacija biokonzervansa s drugim metodama konzerviranja hrane mogla bi dati bolje rezultate (Mokoena i sur., 2021). Sve je veći broj bakteriocina nastalih bioinženjeringom s uskim spektrom djelovanja (minimalno štete prirodnoj crijevnoj flori), dobrom bioaktivnošću i stabilnošću (Perez i sur., 2014). Iako se sojevi BMK koji proizvode EPS tradicionalno primjenjuju u proizvodnji mliječnih proizvoda kao što su kiselo mlijeko i jogurti, njihova upotreba u proizvodnji nemasnih sireva, mesnih prerađevina s niskim udjelom masnoće, raznih vrsta kruha s kiselim tijestom i kruha bez glutena te određenih pića neke su od novih primjena (Jurášková i sur., 2022; Torino i sur., 2015). EPS-i dobiveni iz BMK koriste se kao pojačivači viskoznosti, zgušnjivači, sredstva za želiranje, emulgatori i stabilizatori (Abid i Azabou, 2022).

### 2.3. PROBIOTICI

Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se uzimaju u odgovarajućim količinama, pružaju zdravstvene dobrobiti domaćinu (Hill i sur., 2014; FAO/WHO, 2001). Opisani su rodnom, vrstom i oznakom soja (Sanders i sur., 2018). Glavni probiotički mikroorganizmi koji se koriste su: *L. casei*, *Lpb. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, nekoliko iz rodova *Pediococcus*, *Bacillus* kao i kvasci *Saccharomyces boulardii*, *S.cerevisiae* (Stavropoulou i Bezirtzoglou, 2020; Markowiak i Ślizewska, 2017). Probiotici na tržištu Republike Hrvatske dolaze u obliku hrane, dodataka prehrani i lijekova (Poljak, 2016). Vrlo efikasnim su se pokazale sinbiotičke formulacije koje osim probiotika sadrže i prebiotik kao što su inulin ili laktuloza (Frece i sur., 2009; Frece, 2007). Studije su pokazale da je potrebno barem  $10^7$  CFU/mL ili po gramu proizvoda za postizanje korisnog učinka (Silva i sur., 2020). Razlikuju se oblici za oralnu primjenu (primjena u usnoj šupljini, ciljana dostava u GI traktu i suhi oralni oblici), vaginalnu (kapsule, tablete i supozitorij) i

topikalnu primjenu (masti, kreme, transdermalni flasteri i oftalmički, ušni i nazalni pripravci) (Poljak, 2016). Cilj je što veće preživljavanje živih organizama prilikom prolaska kroz nepovoljne uvjete do mjesta dostave u organizmu te njihova aktivacija, rast i razmnožavanje na ciljanom mjestu djelovanja (Poljak, 2016). Čini se da probiotičke formulacije s više sojeva ili više rodova pokazuju bolji učinak nego one koje sadrže samo jednu vrstu/soj (Chapman i sur., 2011).

### 2.3.1. Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva

Da bismo ga nazvali probiotikom, soj mora biti dovoljno okarakteriziran, siguran za upotrebu, broj živih stanica u proizvodu treba biti u učinkovitoj dozi tijekom cijelog roka trajanja, a njegovo djelovanje mora biti potkrijepljeno najmanje jednim pozitivnim kliničkim ispitivanjem na ljudima provedenim u skladu s općeprihvaćenim znanstvenim standardima ili u skladu s preporukama i odredbama lokalnih/nacionalnih vlasti kada je primjenjivo (Binda i sur., 2020). Karakterizacija podrazumijeva identifikaciju soja i imenovanje (Parker i sur., 2019). „Zlatni standard” za identifikaciju soja je sekvenciranje cijelog genoma, međutim i fenotipsko ispitivanje može pružiti indikacije funkcije ili biti korisno u početnim strategijama probira (Binda i sur., 2020). U svom radu Parker i sur. (2019) podrobno su objasnili pravilnu internacionalnu nomenklaturu prokariota. Iako probiotici imaju GRAS status, inicijative Europske zajednice (The European Union Novel Food regulation, Qualified presumption of safety i PROSAFE), Sjedinjenih Američkih Država (Food and Drug Administration i World Health Organization) i Kanade (Natural Health Products Regulations) utvrdile su kriterije za procjenu sigurnosti probiotika za ljudsku upotrebu (evidencija povijesti izolacije, taksonomska identifikacija i odsutnost štetnih metaboličkih aktivnosti, patogenosti, toksičnosti i prenosivih gena otpornosti na antibiotike) (Sanders i sur., 2010). Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) održava popise vrsta za koje se pretpostavlja da su sigurne za ljudsku prehranu u hrani prema konceptu QPS (EFSA, 2007). De Melo Pereira i sur. (2018) naglašavaju i važnost sposobnosti preživljavanja soja u gastrointestinalnom traktu te procesu proizvodnje, procesiranja i skladištenja hrane. Probiotik bi trebao biti otporan na enzime proteine, mucine, peptide i imunoglobuline prisutne u usnoj šupljini, antimikrobne čimbenike u želucu (nizak pH, pepsin, mehaničko gibanje) i crijevima (pankreatin i žučne soli) te blagi porast unutarnje tjelesne topline (Han i sur., 2021). Kolonizacija GIT-a povezana je s autoagregacijskim

i koagregacijskim kapacitetom te hidrofobnim svojstvima stanične površine (Pan i sur., 2017). Autoagregacija je prvi korak u procesu adhezije, omogućujući bakterijama da stvore barijeru i spriječe adheziju nepoželjnih bakterija (Krausova i sur., 2019). Hidrofobnost površine stanica također doprinosi boljoj adheziji, ali omogućuje i poboljšanu interakciju između mikroba i ljudskih epitelnih stanica (Krausova i sur., 2019).

### 2.3.2. Korisni učinci probiotika

U preglednom članku (Stavropoulou i Bezirtzoglou, 2020) autori su nabrojali i objasnili istraživane korisne učinke probiotika; sinteza nutrijenata, održavanje integriteta sluznice, poboljšana funkcija crijevne barijere, regulacija motiliteta crijeva, prevencija osteoporoze, smanjivanje razine kolesterola, antikancerogeno, antimutageno i antialergijsko djelovanje, antimikrobno djelovanje, djelovanje na imunološki sustav crijeva, smanjenje pojavnosti i simptoma gastrointestinalnih bolesti (gastroenteritis, dijareja, upalne bolesti crijeva, celijakija, intolerancija na laktozu), alergija (alergijski rinitis, astma, atopijski dermatitis i alergija na hranu), bolesti dišnog sustava (astma, cistična fibroza, respiratorne infekcije), neuroloških i psihijatrijskih bolesti, bolesti jetre i jetrene encefalopatije, genito-urinarnih infekcija, metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih bolesti (dijabetes, pretilost, povišen kolesterol), karcinoma, osteoporoze, oralnih bolesti (gingivitis, karijes, halitoza, oralna kandidijaza), autoimunih bolesti (reumatoidni artritis, sistemski eritematozni lupus i multipla skleroza) te učinkovitost u ulozi adjuvansa cjepiva. Navode probiotike kao moderan pristup prevenciji i smanjenju simptoma ovih bolesti ili kao pomoćnu terapiju održavanjem odgovarajuće ravnoteže crijevne mikrobiote. Probiotici izlučuju funkcionalne molekule, uključujući antioksidanse, enzime, masne kiseline kratkog lanca, peptide, esencijalne vitamine i minerale korisne za normalo funkcioniranje ljudskog organizma (de Melo Pereira i sur., 2018). Budući da su probiotici „živi organizmi“, njihova se primjena ne preporučuje kod liječenja imunokompromitiranih pacijenata, kao što su oni koji primaju terapiju kortikosteroidima i druge imunosupresivne terapije, transplantirani i onkološki pacijenti, posebno oni koji su podvrgnuti kemoterapiji (Stavropoulou i Bezirtzoglou, 2020). Gram-negativne bakteroidete i gram-pozitivne firmikute dva su bakterijska koljena koja dominiraju u GI traktu (Kobyliak i sur., 2016). Izgleda da su pretilost i rezistencija na inzulin povezane s povećanjem



broja bakteroideta tijekom vremena i istovremenim smanjenjem broja firmikuta (Kobyliak i sur., 2016). Intervencija probioticima i prebioticima osim korekcije nepovoljnog omjera bakterijskih koljena, potakla je i stvaranje crijevnih hormona kao što su želučani inhibitorni polipeptid i glukagonu sličan peptid-1, koji doprinose održavanju homeostaze glukoze (George Kerry i sur., 2018). U svom radu (de Melo Pereira i sur., 2018) objasnili su mehanizam kojim probiotici djeluju na smanjenje topljivosti kolesterola čime smanjuju njegovu apsorpciju u crijevu. Naime, BSH enzimi koje proizvode probiotici pretvaraju konjugirane žučne soli u dekonjugirane žučne soli, pri čemu se lakše izbacuju defekacijom. Potom se kolesterol konvertira u žučne soli kako bi zamijenio one izgubljene izmetom što dovodi do smanjenja kolesterola u serumu. Antikarcinogena aktivnost temelji se na mehanizmima proizvodnje spojeva s antikancerogenom aktivnošću, vezanju i razgradnji potencijalnih mutagena, smanjenju aktivnosti enzima uključenih u stvaranje karcinogena, smanjenju genotoksičnih imunosupresivnih i nefrotoksičnih mikotoksina, inhibiciji proliferacije tumorskih stanica i indukciji apoptoze u stanicama raka (Śliżewska i sur., 2021; Górska i sur., 2019). Probiotici imaju različite regulacijske učinke kojima utječu na imunitet domaćina, kao što su regulacija ekspresije gena, sinteze proteina i signalnih putova u imunološkim stanicama i u stanicama crijevnog epitela (Yan i Polk, 2010). Reguliraju urođene i adaptivne imunološke odgovore domaćina modulirajući funkcije dendritičnih stanica, makrofaga te T i B limfocita (Yan i Polk, 2010). „Os mikrobiota-crijeva-mozak“ je interaktivna, dvosmjerna komunikacija uspostavljena razmjenom regulatornih signala između GIT-a i centralnog nervnog sistema koja prema sadašnjim saznanjima može promijeniti mikrobnii sastav crijeva i ponašanje osobe putem autonomnog živčanog sustava (Mayer i sur., 2015). Za utvrđivanje učinkovitosti probiotičkog proizvoda potrebno je provesti randomizirana, dvostruko slijepa, placebo kontrolirana klinička ispitivanja (Fijan, 2016).

### *2.3.2.1. Antioksidacijska svojstva probiotika*

Oksidativni stres je stanje u kojem je ravnoteža prooksidansa i antioksidansa u stanici poremećena, što rezultira hidroksilacijom DNA, denaturacijom proteina, peroksidacijom lipida i apoptozom (Wang i sur., 2017). Dulje izlaganje dovodi do niza kroničnih bolesti, uključujući aterosklerozu, artritis, dijabetes, Alzheimerovu bolest, neurodegenerativne bolesti i kardiovaskularne bolesti (Sharifi-Rad i sur., 2020). Evolucijom je većina organizama stekla sposobnost enzimske obrane

(superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza) i neenzimske antioksidativne obrane (glutation, tioredoksin, vitamin C, vitamin E) (Mishra i sur., 2015). Reaktivne kisikove vrste (uključujući ione kisika i perokside) mogu nastati endogeno (normalni metabolički procesi koji troše kisik u mitohondriju, peroksisomima, citokrom p450, NADPH oksidaza, ciklooksigenaza) i egzogeno (pušenje, patogeni, UV zračenje, citokini) (Sharifi-Rad i sur., 2020). Budući da se pojavila sumnja da sintetički antioksidansi (npr. butilirani hidroksianizol i butilirani hidroksitoluen) oštećuju jetru i da su potencijalno kancerogeni, fokus je stavljen na istraživanje sigurnijih i prirodnih antioksidansi iz bio-resursa kao što su probiotici (Faraki i Rahmani, 2020). Iako je *in vivo* i *in vitro* uspješno dokazivana njihova antioksidativna sposobnost, upitno je da li se *in vitro* rezultati pokusa na životinjama mogu odnositi i na ljude. Također, antioksidacijski mehanizmi nisu u potpunosti shvaćeni, stoga su potrebna daljnja istraživanja (Feng i Wang, 2020). Predloženi mehanizmi kojim probiotici mogu modulirati redoks status domaćina su; keliranjem iona željeza i bakra koji kataliziraju reakcije oksidacije, posjedovanjem vlastitog sustava antioksidativnih enzima (superoksid dismutaza, katalaza i glutationa peroksidaza), sposobnošću sinteze različitih metabolita s antioksidativnim djelovanjem (glutation, butirat i folat), regulacijom signalnih putova (Nrf2-Keap1-ARE, NFκB, MAPK, PKC), regulacijom enzima koji proizvode ROS (COX, CYP) i modifikacijom sastava crijevne mikrobiote (Wang i sur., 2017). Kada je crijevna mikrobiota poremećena, štetne bakterije se pretjerano razmnožavaju, inducirajući epitelni ROS, endotoksin u krvi i uzrokujući značajan oksidativni stres. Probiotici mogu inhibirati prekomjernu proliferaciju štetnih bakterija, što može pridonijeti smanjenju oksidativnog stresa (Mishra i sur., 2015). Štoviše, mikrobiom utječe i na metabolizam stanica u tkivima izvan crijeva (jetra i masno tkivo) i time regulira homeostazu lipida i glukoze, kao i sustavnu upalu u domaćinu (Cani i Delzenne, 2009).

#### 2.3.2.2. Antimikrobna svojstva probiotika

Antimikrobno djelovanje probiotičkih bakterija prema patogenim mikroorganizmima u GI traktu objašnjava se sljedećim mehanizmima: 1. smanjivanjem broja živih bakterija: a) proizvodnjom antibakterijskih supstancija (bakteriocina, organskih kiselina, enzima, hidrogen peroksida, peptida niske molekularne mase), b) natjecanjem za hranjive tvari, c) natjecanjem za mjesta vezanja na crijevnoj epitelnoj površini; 2. izmjenom metabolizma mikroorganizama: a) povećanjem ili b)

smanjenjem enzimne aktivnosti i 3. stimulacijom imunološkog sustava povećanjem: a) razine antitijela i b) makrofagne aktivnosti (de Melo Pereira i sur., 2018; Bermudez-Brito i sur., 2012; Šušković i sur., 1997). Postoje dokazi o djelotvornosti probiotika u liječenju i prevenciji zaraznih bolesti, što je pogotovo zanimljivo kao alternativa do sada korištenim antibioticima koji uz niz nuspojava pokazuju i rezistenciju (Rabetafika i sur., 2023). Gonzalez-Ochoa i sur. (2017) dokazali su da je kombinacija probiotika, kao što su neke vrste iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, u kombinaciji s prebioticima, smanjila zaraznost, učestalost ponovnih infekcija, trajanje i težinu dijareje uzrokovanu rotavirusom skupine A. U pregledu, Silva i sur. (2020) izdvojili su obećavajuće rezultate istraživača u vidu liječenja čestih patogena *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa* i *C. albicans* probioticima. Također su istaknuli da trenutno ne postoji konsenzus ili standardizacija za kliničku upotrebu probiotika kao antimikrobne terapije, a definicija doziranja, mehanizma djelovanja i kliničke učinkovitosti tek treba utvrditi. Sinergizam kombinacije probiotika i konvencionalnih lijekova pokazuju prednosti kao što su: brže zacjeljivanje, prepolavljanje potrebne doze konvencionalnog lijeka, smanjenje nuspojava uzrokovanih klasičnom terapijom i povećanje stope iskorjenjivanja nekih mikrobnih infekcija (Kosgey i sur., 2019). Funkcionalnost probiotika u liječenju ili prevenciji može se utvrditi preventivnom studijom (klinička studija kojom se provjerava je li izloženost tom patogenu spriječena nakon uporabe probiotika) ili intervencijskom studijom (prethodna izloženost patogena i naknadni tretman probiotikom ili njegovim supernatantom) (Fijan, 2016).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Mikroorganizmi**

Ispitivanja su provedena na BMK izoliranim iz kozjeg mlijeka. Ustanovljeno je da su izdvojeni izolati AM1 i AM3 sojevi vrste *Lactiplantibacillus plantarum*.

Test-mikroorganizmi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti i sposobnosti koagregacije preuzeti su iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju

namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a korišteni su sljedeći test-mikroorganizmi: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella* Typhimurium ATCC®29631™ i *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™.

### 3.1.2. Hranjive podloge

Tijekom izrade ovog istraživanja korištene su sljedeće hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama:

#### a) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- ❖ MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava: pepton 10,0 g/L; goveđi ekstrakt 10,0 g/L; ekstrakt kvasca 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g/L; natrijev acetat 5,0 g/L; amonijev citrat 2,0 g/L; magnezijev sulfat 0,2 g/L; manganov sulfat 0,05 g/L; agar 15,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija pri 121 °C/15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promiješan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.
- ❖ MRS bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodanog agara. Sterilizacija se provela pri 121 °C/15 min.

#### b) Podloga za određivanje hemolitičke aktivnosti

- ❖ Columbia krvni agar (Biolife, Italija) sastava: pepto-kompleks 10 g/L; triptoza 10 g/L; pepton 3 g/L; kukuruzni škrob 1 g/L; natrijev klorid 5 g/L; agar 12 g/L. pH vrijednost podloge je 7,3. Podloga sadrži 5 % defibrirane ovčje krvi.

#### c) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj patogenih mikroorganizama

- ❖ HB (hranjivi bujon) (Biolife, Italija) sastava: pepton 15,0 g/L; mesni ekstrakt 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g/L; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/15min.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

- ❖ ampule API 50 CHL stripa (bioMerieux, Francuska)
- ❖ anaerokult (Merck KgaA, Njemačka)
- ❖ analitička vaga, Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ antibiotski diskovi (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija)
- ❖ autoklav (Sutjeska, Beograd, Srbija)
- ❖ automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ❖ centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- ❖ čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- ❖ denzitometar (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- ❖ Eppendorf tubice (2 mL) (Eppendorf, Njemačka)
- ❖ Erlenmeyerove tikvice staklene (100 mL i 300 mL) (Rasotherm, Njemačka)
- ❖ filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0.22 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- ❖ identifikacijski softver Api-web™ (BioMerieux, Francuska).
- ❖ jednokratni štapići za razmazivanje po Drygalski (LLG, Njemačka)
- ❖ kalkulator (Casio, Japan)
- ❖ kivete za spektrofotometrijsko mjerenje (Brand GmbH + Co. KG, Njemačka)
- ❖ laboratorijske čaše (100 mL i 200 mL) (Tlos, Hrvatska)
- ❖ laboratorijske menzure (50 mL i 100 mL) (Tlos, Hrvatska)
- ❖ laboratorijski stalci (VWR International Austria, Austrija)
- ❖ medicinske šprice (5 mL i 10 mL) (BD Plastipak, SAD)
- ❖ mikrobiološka ušica (CNWTC, Japan)
- ❖ mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm) (VWR International Austria, Austrija)
- ❖ mikroskop, Olympus 20 (Olympus, Japan)
- ❖ mikrotitarske polistiranske pločice s 24 jažica Falcon (Corning, Corning, SAD)
- ❖ Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm) (Golias, Slovenija)
- ❖ pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ❖ plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala

- ❖ plastične kivete (15 mL i 50 mL) (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Njemačka)
- ❖ spektrofotometar, Helios  $\beta$  UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- ❖ staklena predmetnica (Tlos, Hrvatska)
- ❖ sterilni pamučni štapići (CNWTC, Japan)
- ❖ tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ Thomasova komora za brojanje stanica (Hirschmann, Njemačka)
- ❖ vibracijska miješalica, V<sup>-1</sup> plus (Biosan, Riga, Latvija)
- ❖ hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)

#### 3.1.4. Kemikalije

- ❖ 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ API 50 CHL medij (bioMerieux, Francuska)
- ❖ deionizirana sterilna voda (PBF, Hrvatska)
- ❖ dikalijev hidrogenfosfat (Kemika, Hrvatska)
- ❖ etanol, 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ fiziološka otopina (Braun, Njemačka)
- ❖ fosfatni puffer pH 7,2 (Hach, SAD)
- ❖ glicerol, 30 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ heksan (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ kalijev dihidrogenforfat (Kemika, Hrvatska)
- ❖ kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ kloroform (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ kozje mlijeko (OPG Moravec, Hrvatska)
- ❖ kristal-violet 1 % otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ ksilen (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ magnezijev sulfat (Kemika, Hrvatska)
- ❖ metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ mononatrijev fosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- ❖ natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ octena kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- ❖ pankreatin (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ pepsin (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ toluene (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ toluen (Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- ❖ urea (Biolife, Milano, Italija)
- ❖ vodikov peroksid, 3 % (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ žučne soli (Merck, Darmstadt, Njemačka)

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka kozjeg mlijeka**

Kako bi se uspješno izolirale kulture BMK iz uzorka kozjeg mlijeka temperiranog na sobnu temperaturu, po 1 mL uzorka prebačen je u 5 mL MRS bujona (Biolife) u triplikatu te je inkubiran na 37 °C tijekom 24 h, aerobno i anaerobno u anaerokultu. Po 0,1 mL porasle kulture razmazano je štapićem po Drygalskom na MRS agar i inkubirano tijekom 24 – 48 h na 37 °C aerobno i anaerobno. Porasle pojedinačne kolonije precjepljene su u zasebne MRS bujone te inkubirane na 37 °C u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Nacjepljivanjem na MRS-agar dobiveni su pročišćeni izolati. Morfološki ujednačene kulture spremljene su pod oznakom izolata na -20 °C u 30 % glicerolu za buduću upotrebu.

### **3.2.2. Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline**

Prekonoćna kultura uzgojena u MRS bujonu na 37 °C je centrifugirana 10 minuta na 6000 okretaja

u minuti. Odliven je supernatant i bakterije su resuspendirane u 9 mL sterilne vode pomoću vibromješača. Centrifuga je ponovno provedena na 6000 okretaja u minuti kroz 10 min i supernatant je ponovno dekantiran kako bi se izdvojio talog stanica. Talog je resuspendiran u 9 mL sterilne vode i homogeniziran.

### 3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Nacjepeljivanjem niza decimalnih razrijeđenja uzoraka na MRS agar određen je broj bakterijskih stanica u uzorcima na način da je za svaki uzorak izračunat broj jedinica koje tvore kolonije (engl. *colony forming units, CFU*) po mililitru. Porasle kolonije su izbrojane na brojaču stanica nakon 24h inkubacije, a CFU vrijednost izračunata je prema izrazu:

$$\text{CFU (mL)} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen inokuluma (mL)}} \cdot \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad [1]$$

### 3.2.4. Opća morfološka i probiotička karakterizacija dobivenih izolata

#### 3.2.4.1. *Katalaza test*

Prekonočna kultura izolata BMK prenesena je na predmetnicu te su dodane dvije kapi 3 % vodikovog peroksida. Obzirom na pojavu mjehurića uslijed enzimskog cijepanja peroksida, katalaza test smatra se pozitivnim (došlo je do pojave mjehurića) ili negativnim (nema pojave mjehurića).

#### 3.2.4.2. *Ispitivanje otpornosti izolata na niske pH vrijednosti*

1 mL prekonočne kulture je nakon ispiranja sterilnom vodom resuspendirano u 5 mL otopine kojoj je pH podešen na 2 pomoću klorovodične kiseline. Nakon 30 minuta određen je broj živih stanica indirektnom metodom nacjepeljivanja na MRS agar i izračunata je CFU vrijednost. Potom je određen postotak preživljenja u usporedbi s početnim brojem i kontrolnim uzorkom kojemu nije podešen pH.



### 3.2.5. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala

Prema prilagođenoj metodi Son i Lewis (2002) određena je ukupna antioksidacijska aktivnost dobivenih izolata BMK. Metoda se temelji na sposobnosti stanica pri uklanjanju 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnih radikala u otopini. Bakterijske stanice, uzgojne u MRS bujonu, odvojene su od hranjivog medija centrifugiranjem na 6000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta.

1 mL pripremljene suspenzije bakterijskih stanica dodan je u 2 mL etanolne otopine DPPH radikala (0,07 mM). Otopina je dobro izmiješana i prebačena na inkubaciju 30 minuta u mraku. Uzorak se potom centrifugirao 2 minute, nakon čega mu je izmjerena apsorbancija supernatanta na valnoj duljini od 517 nm. Slijepa proba sadržavala je 2 mL etanola i 1 mL uzorka bakterijskih stanica, dok su kontrole uključivale 1 mL fiziološke otopine i 2 mL otopine DPPH. Preostali DPPH (% inhibicije) izračunat je prema jednadžbi:

$$\text{Sposobnost uklanjanja (\%)} = [1 - (A_u - A_{sp}/A_k)] \cdot 100 \quad [2]$$

gdje je:

$A_u$  = apsorbancija uzorka

$A_{sp}$  = apsorbancija slijepe probe

$A_k$  = apsorbancija kontrolnog uzorka

### 3.2.6. Antimikrobna aktivnost prema odabranim patogenima

Kako bi se ispitala antimikrobna aktivnost supernatanta, iz prekonoćne kulture, centrifugiranjem na 6000 okretaja u minuti tijekom 10 min, izdvojile su se bakterije mliječne kiseline uzgojene u MRS bujonu. Dekantiranjem se odvojio supernatant koji je mehanički steriliziran kroz filtre veličine 0,22  $\mu\text{m}$ .

Određivana je antimikrobna aktivnost prema sljedećim test-mikroorganizmima: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella* Typhimurium ATCC®29631™ i *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™.

U jažice mikrotitarske pločice dodano je po 240  $\mu\text{L}$  ispitivanih supernatanta bakterija mliječne kiseline, 30  $\mu\text{L}$  medija za patogene (hranjivi bujon) te po 10  $\mu\text{L}$  ispitivanih patogenih test-

mikroorganizama. Tijekom 24 sata provedena je inkubacija na 37 °C te je mjerena apsorbancija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. U navedenom razdoblju praćen je rast te je inhibicija izračunata pomoću formule:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100 \quad [3]$$

Gdje je:

- $A_t$  = apsorbancija u vremenu  $t$
- $A_0$  = apsorbancija u vremenu  $0$

Kontrolni uzorci su umjesto supernatanta sadržavali sterilan MRS, a slijepe probe su bili uzorci bez dodataka patogenih organizama. Cijeli postupak rađen je u triplikatu, osim slijepih proba koje su obrađivane u duplikatu.

### 3.2.7. Određivanje autoagregacijske sposobnosti bakterija mliječne kiseline

Stupanj autoagregacije određen je prilagođenom metodom prema Kos i sur. (2003). Centrifugiranjem su izdvojene bakterije prekonocne kulture iz MRS bujona te isprane deioniziranom sterilnom vodom istim postupkom. Resuspendirane su u 5 mL fosfatnog pufera pH 7,2. Oprezno odvojenom gornjem sloju suspenzije izmjerena je apsorbancija na 620 nm pomoću spektrofotometra u intervalima: 0, 30, 60 i 90 min. Uzorci su ostavljeni u mirovanju te se mjerenje ponovilo 24 h nakon prvog mjerenja. Stopa autoagregacije je izračunata prema sljedećem izrazu:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100 \quad [4]$$

Gdje je:

- $A_t$ - apsorbancija u vremenu  $t$
- $A_0$ - apsorbancija u vremenu  $0$

### 3.2.8. Određivanje sposobnosti koagregacije izolata s odabranim patogenima

Za određivanje stupnja koagregacije, pomiješani su jednaki volumeni suspenzija bakterija mliječne kiseline iz prethodnog poglavlja (5 mL) i suspenzija odabranog test-mikroorganizma. Na

isti se način mjerila i izračunala stopa koagregacije kao što je opisano u navedenom odjeljku. Test-mikroorganizmi bili su *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™, *Salmonella* Typhimurium ATCC® 29631™ i *Listeria monocytogenes* ATCC® 23074™.

### 3.2.9. Određivanje hidrofobnosti stanične površine bakterija mliječne kiseline

Pomoću metode Mishra i Prasad (2005), uz poneku izmjenju, određena je sposobnost adhezije bakterija mliječne kiseline na ugljikovodike (kloroform, heksan, toluen i ksilen). Ona je odraz hidrofobnosti njihove stanične površine. Prekonoćne kulture, uzgojene u MRS bujonu, odvojene su od supernatanta centrifugiranjem na 6000 okretaja u minuti 10 minuta. Istim postupkom pročišćene su sterilnom deioniziranom vodom te su resuspendirane u PUM (fosfat urea magnezij sulfatnom) puferu. U 3 mL suspenzije bakterijskih stanica dodano je po 1 mL ispitivanog ugljikovodika. Kako bi se faze razdvojile, uzorci su inkubirani na 37 °C tijekom jednog sata. Pažljivo se uklonila donja, vodena faza te joj se izmjerila apsorbancija na 600 nm pomoću spektrofotometra.

Postotak hidrofobnosti se izračunao prema sljedećoj formuli:

$$\text{Hidrofobnost (\%)} = \left( \frac{A-A_0}{A} \right) \cdot 100 \quad [5]$$

Gdje je:

A=početna apsorbancija

A<sub>0</sub>=konačna apsorbancija

### 3.2.10. Sposobnost formiranja biofilmova bakterija mliječne kiseline

Koristeći metodu prema Kostelac i sur. (2021) određena je sposobnost formiranja biofilmova ispitivanih izolata prema jačini nastalih biofilmova nakon inkubacije. U polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 24 jažice dodano je po 2 mL MRS bujona te nacjepljeno po 100 µL suspenzije prethodno uzgojenih bakterijskih kultura. Pločice su inkubirane na 37 °C tijekom 48 h, a potom je sadržaj jažica ispražnjen pažljivim pipetiranjem kako ne bi došlo do grebanja dna jažica. Talog bakterijskih stanica ispran je s 2 mL sterilne vode uz lagano miješanje. Preostale stanice

(adhezirane u biofilm) fiksirane su dodatkom 2 mL metanola te inkubacijom tijekom 15 min. Potom je metanol uklonjen, a pločice osušene na zraku. Dodatkom 1 %-tnog kristal violeta tijekom 5 min obojane su adhezirane stanice te je višak boje ispran deioniziranom vodom. Dodatkom 2 mL 33 % octene kiseline otpuštena je vezana boja te je spektrofotometrom mjerena apsorbancija pri 595 nm. Negativna kontrola bili su neinokulirani uzorci. Dobivene vrijednosti optičke gustoće (engl. *Optical Density*, *OD*) uspoređene su s optičkom gustoćom negativne kontrole te su klasificirani prema Borges i sur. (2012). Klasifikacije su prikazane u tablici 1.

**Tablica 1.** Klasifikacija formacije biofilмова usporedbom optičke gustoće uzorka i negativne kontrole prema (Borges i sur., 2012)

Usporedba OD i ODC vrijednosti	Klasifikacija proizvodnje biofilma
$OD < ODC$	nema formacije biofilma
$ODC < OD < 2 \times ODC$	slaba formacija biofilma
$2 \times ODC < OD \leq 4 \times ODC$	umjerena formacija biofilma
$4 \times ODC < OD$	jaka formacija biofilma

### 3.2.11. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima probavnog sustava

Prekonoćna kultura ispitivanih bakterija, izdvojena je centrifugiranjem, isprana sterilnom deioniziranom vodom te ponovno resuspendirana u 9 mL iste. Po 2,5 mL suspenzije pomiješana su s po 10 mL pripremljenih otopina simuliranog sadržaja želuca i crijeva. Inkubacija se provela pri 37 °C. Trajanje inkubacije uzoraka bilo je 2h za održavanje stope preživljenja u uvjetima želuca i 4h za ispitivanje preživljenja u simuliranim uvjetima crijeva.

Indirektnom metodom nacjepljivanja na MRS agar određen je broj bakterijskih stanica u suspenziji te nakon izlaganja simuliranih uvjeta želuca i crijeva. Postotak preživljenja u simuliranim uvjetima probavnog sustava uspoređen je s početnim brojem stanica u suspenziji.

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 g/L), KCl (0,8946 g/L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8878 g/L), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,680 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (1,680 g/L), CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,1981 g/L), kojoj je pH podešen na 3,1 s koncentriranom HCl.

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) i žučnih soli (3

g/L) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 g/L), KCl (0,8946 g/L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8878 g/L), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,680 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (1,680 g/L), CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,1981 g/L), kojoj je pH podešen na 7,3 s NaOH.

### 3.2.12. Analiza fermentacijskog profila (API 50 CHL metoda)

Biomasa BMK resuspendirana je pomoću mikrobiološke ušice u API 50 CHL mediju. Na denzitometru je mjerena gustoća suspenzije koja je u konačnici iznosila 2 McF. U ampule API 50 CHL stripa dodane su suspenzija i mineralno ulje. Nakon inkubacije (48 h, 37 °C), očitani su rezultati na način da promjena boje u ampuli iz žute u plavu znači da je došlo do fermentacije šećera. Naime, fermentacija rezultira zakiseljavanjem i promjenom boje bromkrezol-purpurnog indikatora iz ljubičaste u žutu. Iznimka je ampula 25 gdje se pozitivnim rezultatom smatra promjena boje iz ljubičaste u crnu. Rezultati su očitani pomoću identifikacijskog softvera Api-web™ (BioMerieux, Francuska).

### 3.2.13. Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike disk difuzijskom metodom

U ovom radu ispitivana je osjetljivost izolata bakterija mliječne kiseline na odabrane antibiotike; kloramfenikol, klindamicin, tetraciklin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, gentamicin, ampicilin i vankomicin. Postupak je proveden prema smjernicama Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST) uz minimalne izmjene u svrhu prilagodbe metode bakterijama mliječne kiseline. Prekonoćna kultura uzgojena u MRS agaru u kivetama za centrifugu je centrifugirana 10 minuta na 6000 okretaja u minuti. Odliven je supernatant i bakterije su resuspendirane u 3 mL sterilne vode pomoću vibro mješača. Suspenzije mikroorganizama su razmazane pomoću sterilnih pamučnih štapića po MRS agar pločama u tri smjera. Unutar 15 minuta od naciepljivanja na MRS agar ploče postavljena su po tri diska ispitivanih antibiotika te su odložene u termostat na inkubaciju pri 37 °C. Ukoliko je došlo do pojave zone inhibicije rasta bakterija oko diska nakon inkubacije, smatra se da je ispitivani soj nije rezistentan na testirani antibiotik što predstavlja afirmativni čimbenik za daljnje ispitivanje soja. Tada se mjere promjeri zona inhibicije koji se izražavaju u milimetrima.

### 3.2.14. Hemolitička aktivnost izolata bakterija mliječne kiseline

Prema metodi Halder i sur. (2017) određena je hemolitička aktivnost ispitivanih BMK. Prekonoćne kulture nacijepljene su na Columbia krvni agar i inkubirane 24 do 48 h na 37 °C kako bi se promatrale zone koje se oko njih formiraju. Vidljive prozirne zone oko kolonija ukazuju na  $\beta$ -hemolizu, zelene zone rezultat su  $\alpha$ -hemolize dok izostanak zona oko kolonija ukazuje na  $\gamma$ -hemolizu, odnosno izostanak hemolitičke aktivnosti.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka kozjeg mlijeka. Dobiveni izolati morfološki su opisani te je provedena probiotička karakterizacija dobivenih izolata. Nakon prekonoćnog uzgoja i dobivanja čistih kultura uspješno je izvojeno 10 izolata u aerobnim te 10 izolata u anaerobnim uvjetima. Dobivenim izolatima pridružene su oznake te su morfološki opisani, provedeni su testovi bojenja po Gramu i katalazne aktivnosti. Nakon morfološkog opisivanja, 20 izolata izloženo je 30 min uvjetima niskog pH kako bi se odredila otpornost izolata na stresne uvjete gastrointestinalnog trakta te na taj način izdvojili probiotički kandidati. Rezultati morfološkog definiranja, bojenja po Gramu, katalaza test te otpornosti na izlaganje niskim vrijednostima pH prikazani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Uvjeti uzgoja, katalaza test, bojanje po Gramu i preživljavanje pri niskom pH

Oznaka izolata	Uvjeti uzgoja	Katalaza test	Bojanje po Gramu	Preživljenje nakon izlaganja niskom pH (%)
AM1	aerobni	negativan	pozitivan	81
AM2	aerobni	negativan	pozitivan	54
AM3	aerobni	negativan	pozitivan	74
AM4	aerobni	negativan	pozitivan	63
AM5	aerobni	negativan	pozitivan	48

**Tablica 2.** Uvjeti uzgoja, katalaza test, bojanje po Gramu i preživljavanje pri niskom pH (nastavak)

AM6	aerobni	negativan	pozitivan	36
AM7	aerobni	negativan	pozitivan	49
AM8	aerobni	negativan	pozitivan	12
AM9	aerobni	negativan	pozitivan	-
AM10	aerobni	negativan	pozitivan	-
AM11	anaerobni	negativan	pozitivan	-
AM12	anaerobni	negativan	pozitivan	-
AM13	anaerobni	negativan	pozitivan	45
AM14	anaerobni	negativan	pozitivan	11
AM15	anaerobni	negativan	pozitivan	-
AM16	anaerobni	negativan	pozitivan	-
AM17	anaerobni	negativan	pozitivan	-
AM18	anaerobni	negativan	pozitivan	21
AM19	anaerobni	negativan	pozitivan	7
AM20	anaerobni	negativan	pozitivan	-

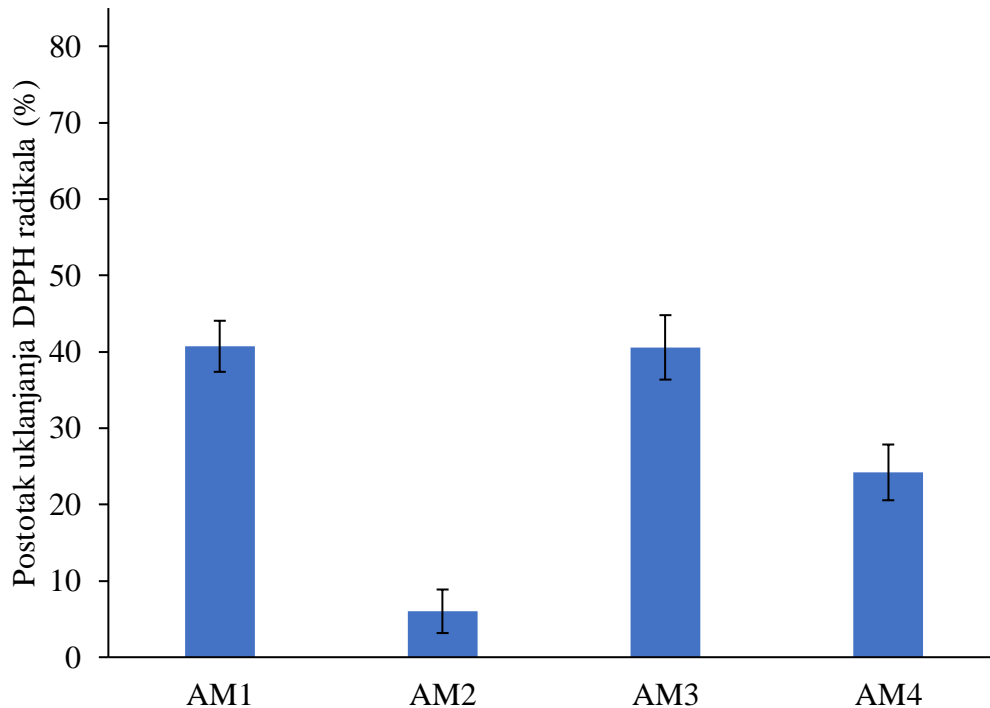
Provedbom katalaza testa potvrđeno je da je svih 20 ispitivanih izolata katalaza-negativno te je metodom bojanja po Gramu utvrđeno da su svi sojevi gram-pozitivni. Jedna od osnovnih mikrobioloških tehnika korištena pri morfološkom opisivanju novih izolata je bojanje po Gramu jer omogućuje procjenu sastava stanične stijenke bakterija i oblika stanice. Sloj peptidoglikana igra važnu ulogu u fiziologiji bakterija budući da održava oblik i cjelovitost stanice tijekom rasta i diobe te djeluje kao sučelje između bakterije i njezine okoline (Chapot-Chartier i Kulakauskas, 2014). U ovom radu, svih 20 dobivenih izolata su štapićastog oblika (bacili). Za obje navedene karakteristike (reakcija katalaze i bojanje po Gramu) isti rezultati su dobiveni za izolate bakterija mliječne kiseline u istraživanju Ahmad i sur. (2018). Katalaza je enzim koji bakteriji omogućuje razgradnju vodikovog peroksida u stresnim uvjetima. Dok je ovaj enzim prisutan u većini aerobnih mikroorganizama prisutna, anaerobni ju ne posjeduju jer im nije potrebna (Singh i Kumar, 2019).

Enzim katalazu produciraju i određene vrste mikroaerofila, no njena prisutnost u ispitivanim izolatima u ovom istraživanju nije evidentirana.

Preživljavanje pri niskom pH je ključno pri selekciji probiotičkih izolata jer da bi ispoljile svoja funkcionalna svojstva probiotičke bakterije trebaju ostati vijabilne do ciljnog mjesta u GI sustavu. Većina ispitivanih izolata nije pokazala velik uspjeh u preživljavanju pri pH 2 te su nadalje isključene iz ovog istraživanja. Neki izolati su imali umjerenu stopu preživljavanja od 50 ili više %. Vrlo uspješnima su se pokazali izolati AM1 s više od 80 % preživjelih stanica i AM3 s više od 70 %. Slične razine preživljenja izolata bakterija mliječne kiseline pri pH 2 zabilježene su i u ranijim istraživanjima (Sharoba i sur., 2015).

U sferi funkcionalne hrane, trenutačno se ponajviše istražuju antioksidacijska svojstva namirnica, odnosno dodataka prehrani, budući da se radi o trendu u brizi za zdravlje i mladolikosti (Ghosh i sur., 2022). Kako bi se odredila ukupna antioksidacijska aktivnost ispitivanih izolata koji su u prethodnom eksperimentu pokazali stopu preživljenja pri niskom pH >50 % (AM1, AM2, AM3 i AM4) korištena je DPPH metoda. Pri tome je spektrofotometrijski izmjerena sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala. Ukupna antioksidacijska sposobnost prikazana je kao postotak uklonjenih DPPH radikala (slika 1).

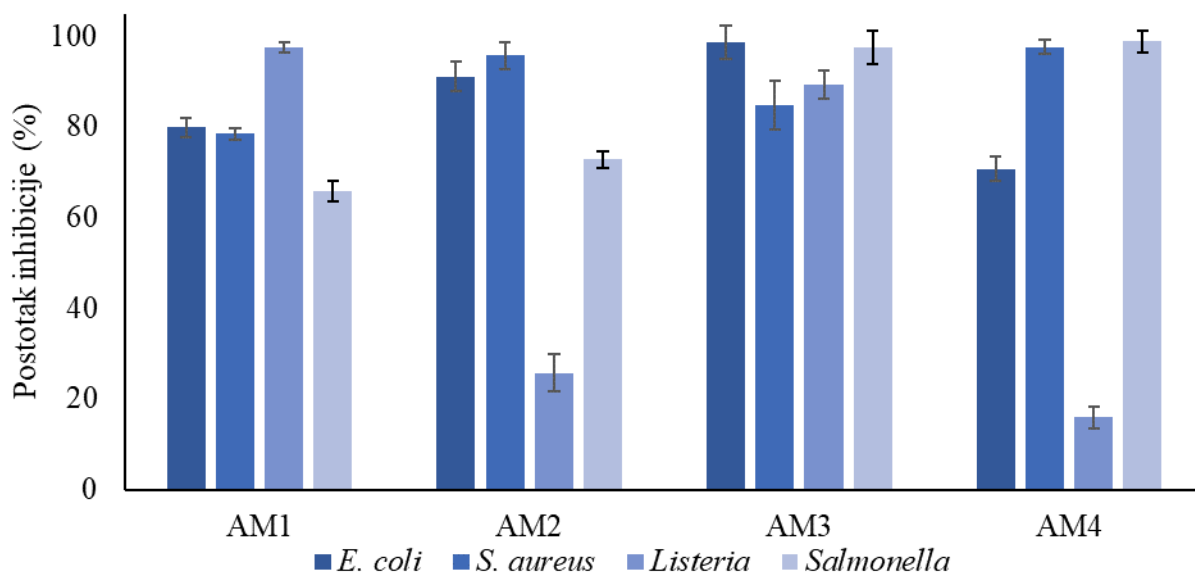




**Slika 1.** Sposobnost izolata AM1, AM2, AM3 i AM4 pri uklanjanju DPPH slobodnih radikala prikazano kao postotak  $\pm$  SD, uz statističku značajnu razliku  $p \leq 0,05$

S obzirom na rezultate, može se reći da izolati AM1 i AM3 imaju značajnu antioksidacijsku sposobnost budući da su u uvjetima eksperimenta uspješno uklonili približno 40 % DPPH slobodnih radikala. Za razliku od njih, izolat AM4 je pokazao nešto slabiju sposobnost uklanjanja, dok je antioksidacijski kapacitet izolata AM2 zanemariv. Rezultati su uspoređeni s istraživanjem (Milardović, 2021), gdje je istom metodom ispitivana antioksidativna sposobnost soja *Lactiplantibacillus plantarum* S1 pokazala sposobnost uklanjanja 35 % DPPH radikala.

Budući da je inhibitorni utjecaj ispitivanih izolata prema patogenim mikroorganizmima jedan od osnovnih karakteristika funkcionalnog probiotika (Šušković i sur., 2010), ispitivana je antimikrobna aktivnost izolata AM1, AM2, AM3 i AM4 prema čestim patogenim mikroorganizmima. Turbidimetrijskom metodom je praćen rast patogena u prisutnosti supernatanata ispitivanih izolata čime je određena antimikrobna aktivnost. Rezultati su prikazani na slici 2.

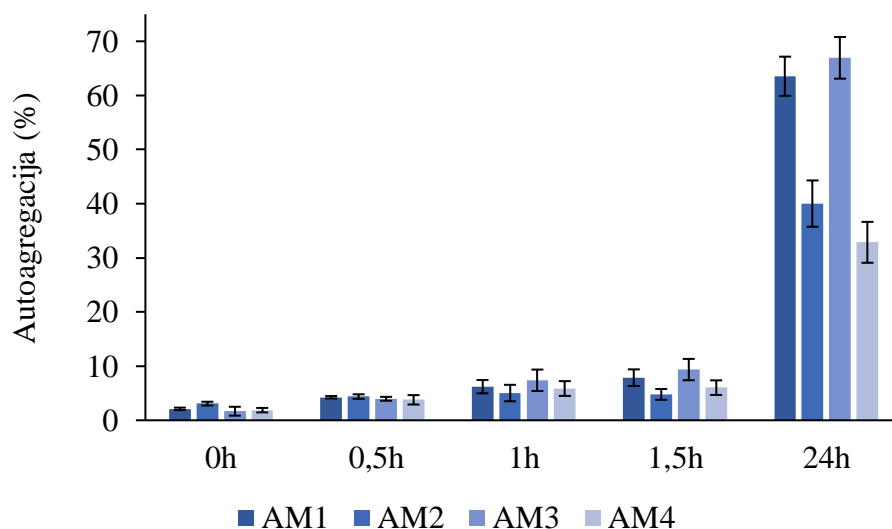


**Slika 2.** Antimikrobna aktivnost izolata AM1 i AM2, AM3 i AM4 prema odabranim patogenima izražena kao postotak inhibicije rasta  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Kao što je prikazano na slici 2, izolat AM3 ima izuzetno dobru sposobnost inhibicije svih ispitivanih patogenih mikroorganizama. *E. coli* i *Salmonella* inhibirane su gotovo u potpunosti, dok su *Listeria* i *S. aureus* inhibirane u postotku većem od 80 %. Izolat AM1 također pokazuje dobru učinkovitost protiv *E. coli*, *S. aureus* i *Salmonella* te iznimno dobro inhibira rast *Listeria*. Može se reći da su oba izolata (AM1 i AM3) pokazala odličnu sposobnost inhibicije čestih patogenih mikroorganizama. S druge strane, izolati AM2 i AM4 pokazali su vrlo slabu sposobnost inhibicije *L. monocytogenes* (<30 %, odnosno <20 %). Nije neobično da različiti sojevi iste bakterijske vrste imaju značajno različite sposobnosti inhibicije patogena, što se vidi i u radu (Arena i sur., 2016) gdje je proučavana antimikrobna aktivnost čak 79 sojeva *Lpb. plantarum* dobivenih iz vina. Ipak, supernatanti većine ispitivanih sojeva u navedenom istraživanju imaju sposobnost inhibicije *E. coli* i *S. aureus* iznad 60 %. U radu (Haraguchi i sur., 2019) je također potvrđeno da *Lpb. plantarum* snažno inhibira bakterije roda *Slamonella* i *Listeria*.

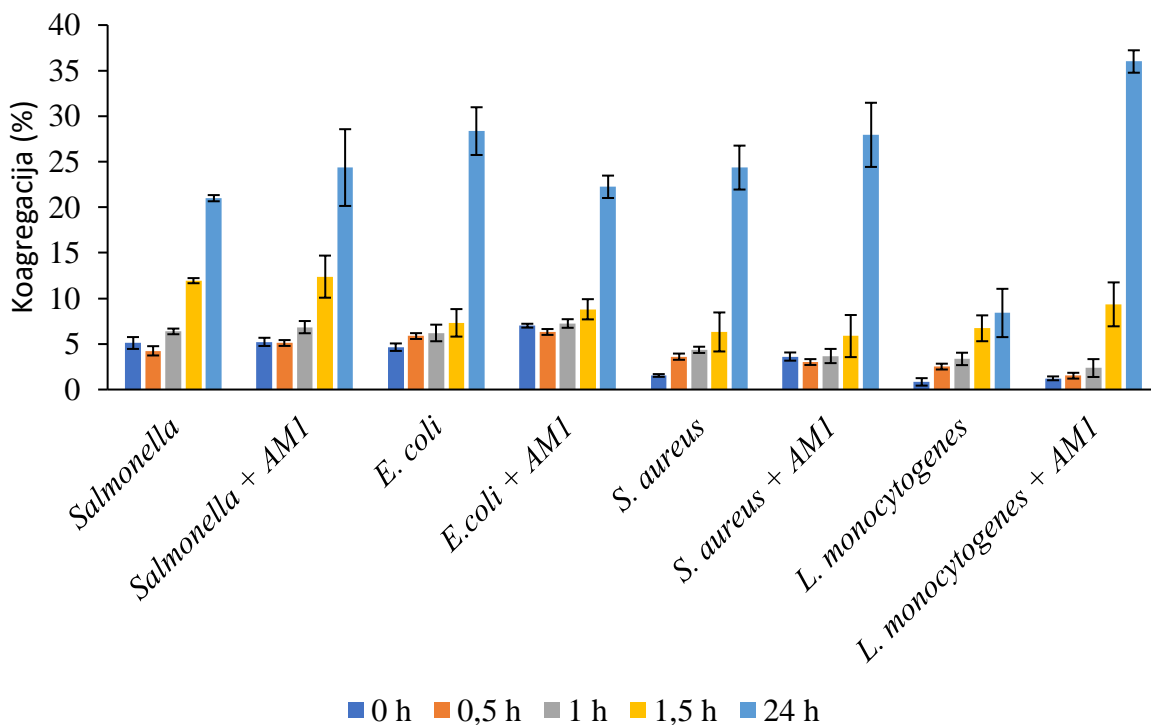
Važni probiotički kriteriji prilikom kolonizacije gastrointestinalnog trakta, osim sposobnosti

formiranja biofilma, su također sposobnost autoagregacije i koagregacije s patogenima. Svojstvo autoagregacije je sposobnost bakterijskih stanica da se međusobno povezuju dok svojstvo koagregacije probiotika sa stanicama patogena ima posredno antimikrobno djelovanje na način da smanjuje kolonizaciju GI sustava patogenim mikroorganizmima (Ahmed i sur., 2021). U ovom radu su izolati AM1, AM2, AM3 i AM4 iskazali različitu sposobnost autoagregacije i koagregacije s čestim patogenim mikroorganizmima kao što je prikazano na slikama 3, 4 i 5.

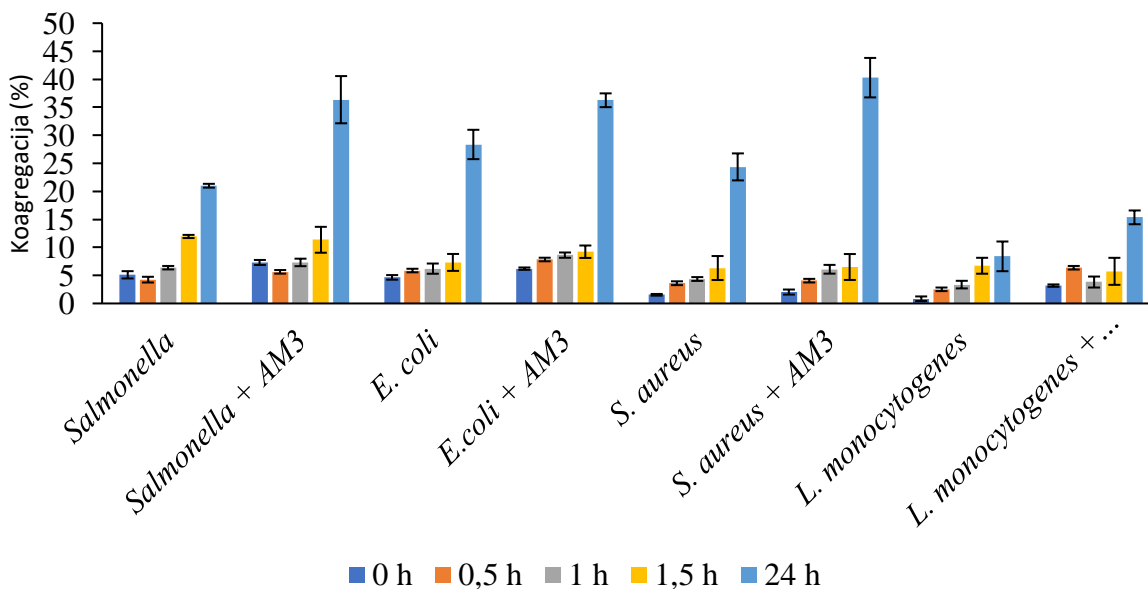


**Slika 3.** Sposobnost autoagregacije izolata AM1, AM2, AM3 i AM4 u vremenskim intervalima kroz 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Obzirom na dobivene rezultate provedenih eksperimenata, za iduću fazu istraživanja odabrani su izolati AM1 i AM3 jer su pokazali naviši probiotički potencijal.



**Slika 4.** Sposobnost koagregacije izolata AM1 u vremenskim intervalima kroz 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$



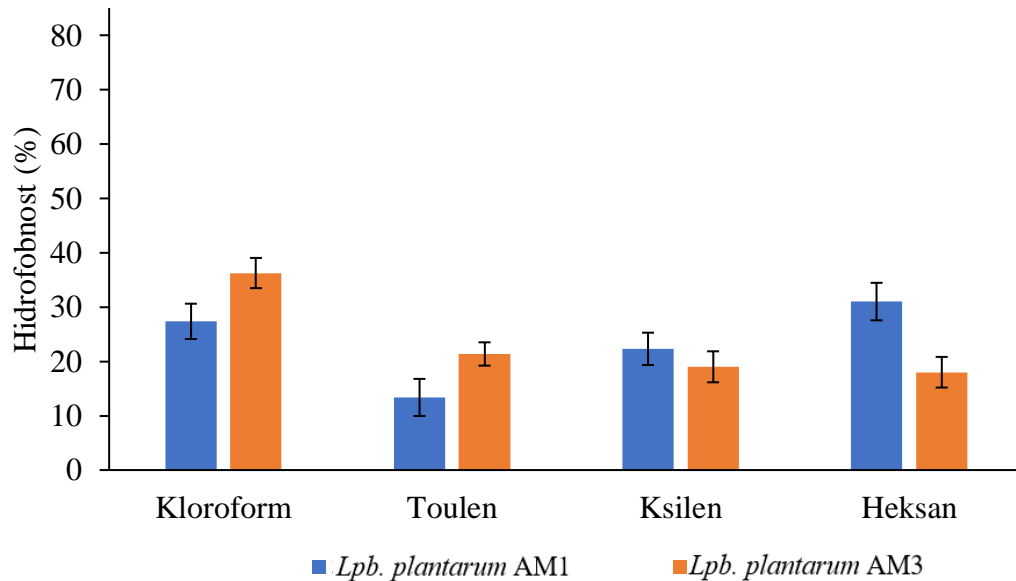
**Slika 5.** Sposobnost koagregacije izolata AM3 u vremenskim intervalima kroz 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Vrijednosti autoagregacije (prikazane kao postotak autoagregiranih stanica) izolata AM1, AM2,

AM3 i AM4 rastu s vremenom kao što se može vidjeti iz slike 3. Već nakon 1 h inkubacije izolati AM1 i AM3 se počinju isticati među ispitivanim sojevima te im sposobnosti autoagregacije nakon 24 sata inkubacije prelaze vrijednost od 60 %. Dobiveni rezultati odgovaraju onima koje su u svom istraživanju prilikom ispitivanja tri soja *Lpb. plantarum* dobile Janković i sur. (2012). Ipak, njima je nakon 24 h inkubacije vrijednost autoagregacije iznosila oko čak 80 %.

Vrijednosti koagregacije izolata AM1 i AM3 s ispitivanim patogenima su izražene kao postotci koagregiranih stanica u odnosu na početnu vrijednost (slike 4 i 5). Sposobnosti koagregacije su rasle s vremenom za oba soja te dostizale najviše vrijednosti nakon 24 h sata inkubacije. Izolat AM3 je pokazao višu vrijednost koagregacije s bakterijama roda *Salmonella*, *E. coli* i *S. aureus* u odnosu na *Lpb. plantarum* AM1 koji se pokazao boljim samo u slučaju *L. monocytogenes*. Neočekivano je da je *Lpb. plantarum* AM1 smanjio postotak koagregacije kada je dodan suspenziji *E. coli* (slika 4). Rezultati koagregacije su u skladu s drugim istraživanjima poput (Janković i sur., 2012) gdje su vrijednosti koagregacije bakterija mliječne kiseline s patogenima *E. coli*, *L. monocytogenes* i *S. Typhimurium* bile u intervalu 24 – 41,5 %.

Mogućnost formiranja biofilma na epitelnom tkivu domaćina te mogućnost autoagregacije i koagregacije ovise o hidrofobnosti stanične površine bakterijskih stanica. Dakle, što je veća hidrofobnost stanične membrane probiotičkog soja, to su jača navedena probiotička svojstva (Krasowska i Sigler, 2014). U ovom istraživanju određena je hidrofobnost izolata AM1 i AM3 na temelju određivanja adhezije bakterijskih stanica na odabrane ugljikovodike (kloroform, toluen, ksilen i heksan) (slika 6).



**Slika 6.** Hidrofobnost stanične površine izolata AM1 i AM3 na odabrane ugljikovodike izražena kao postotak  $\pm$  SD, uz statističku značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Iz slike 6 vidi se kako izolat AM1 pokazuje najveću adheziju na heksan (32 %), a najmanju na toulen (15 %) dok AM3 pokazuje najveću adheziju na kloroform (36 %) te na toulen, ksilen i heksan oko 20 %. U istraživanju Rokana i sur. (2018) dobiveni rezultati adhezije ispitivanog *Lpb. plantarum* na kloroform su 73 %, na toulen 38 % te na ksilen i heksan tek oko 15 %. Sudeći po tome hidrofobnost ispitivanih sojeva mogla biti i veća no okarakterizirana je kao zadovoljavajuća. Na temelju prikazanih rezultata može se uočiti da je hidrofobnost stanične površine specifično svojstvo pojedinog soja bakterija mliječne kiseline.

Prilikom detaljne probiotičke karakterizacije potrebno je ispitati i sposobnost formiranja biofilmova probiotičkih kandidata. U ovom istraživanju ispitana je *in vitro* sposobnost formiranja biofilmova izolata AM1 i AM3. Pritom je klasifikacijski podjeljena na slabu, umjerenu ili jaku prema protokolu objavljenom u (Borges i sur., 2012). Rezultati formiranih biofilmova nakon 24h i 48h za ispitane izolate prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Spособnost formiranja biofilmova bakterijskih izolata AM1 i AM3 izražena kao srednja vrijednost OD pri 595 nm  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

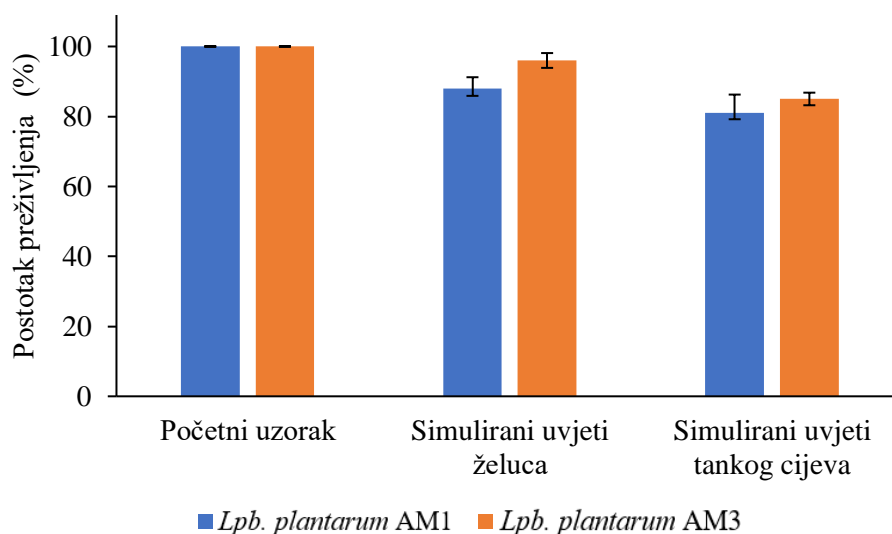
		24 h		48 h	
		OD pri 595 nm	Klasifikacija	OD pri 595 nm	Klasifikacija
Referentne vrijednosti	ODK	0,166 $\pm$ 0,03	/	0,095 $\pm$ 0,04	/
	2 $\times$ ODK	0,332 $\pm$ 0,02		0,19 $\pm$ 0,03	
	4 $\times$ ODK	0,664 $\pm$ 0,04		0,38 $\pm$ 0,03	
Ispitivani soj	AM1	0,673 $\pm$ 0,04	Jaka formacija	0,299 $\pm$ 0,03	Umjerena formacija
	AM3	0,731 $\pm$ 0,2	Jaka formacija	0,461 $\pm$ 0,1	Jaka formacija

OD-optička gustoća; ODK-optička gustoća kontrole

Iz rezultata prikazanih u tablici 3, dobivenih na temelju mjerenja optičke gustoće, uočava se da su nakon 24 h inkubacije oba izolata imala jaku sposobnost formiranja biofilmova. U radu (Sušac, 2020) je također zaključeno da su svih 6 istraživanih sojeva *Lpb. plantarum* imali jaku sposobnost formiranja biofilmova. Zanimljivo je da s vremenom inkubacije ona opada, što vrijedi u oba slučaja. Sudeći po zaključcima istraživanja Pannella i sur. (2020) s vremenom inkubacije biofilmovi *Lpb. plantarum* bi trebali jačati, a ne padati. Međutim, dok je sposobnost formacije biofilmova za AM3 nakon 48 h inkubacije ostala jaka, za AM1 je pala na umjerenu. Zanimljivo bi bilo istražiti razinu biofilmova nakon 72 i 96 h jer ukoliko AM1 ostane na umjerenj razini snage formacije biofilma, soj se može smatrati efikasnim, ali ne i ukoliko se nastavi smanjivati. Biofilmovi su zajednice mikroorganizama pričvršćenih na tkivo ili inertnu površinu na način da su okruženi samosintetiziranom matricom izvanstaničnih polimernih tvari. Navedenu formaciju mikrobi usvajaju kako bi proširili metaboličku suradnju i stekli zaštitu od neprijateljskih uvjeta okoline, kao što su imunološki odgovori, tretmani antimikrobnim sredstvima i kompeticija s patogenima (Carvalho i sur., 2021). Dakle, sposobnost formiranja biofilma omogućava soju bolje preživljavanje u GI traktu, ali i obranu domaćina od infekcije patogenom, kao što je *E. coli* u urinarnom traktu (Carvalho i sur., 2021). Na temelju rezultata i navedenih literaturnih saznanja,

možemo uočiti da izolat AM3 ima bolju sposobnost formiranja biofilmova u odnosu na AM1 time i viši probiotički potencijal jer pokazuje bolju sposobnost za stvaranje biofilmova u gastrointestinalnom sustavu domaćina.

Jedan od najvažnijih uvjeta za ispoljavanje funkcionalnog djelovanja probiotika je mogućnost preživljavanja do i na ciljnom mjestu u organizmu domaćina. Naime, specifični uvjeti u želucu i tankom crijevu nisu pogodni za većinu mikroorganizama (Bezkorovainy, 2001). Stoga je u ovome istraživanju ispitana sposobnost preživljavanja izolata AM1 i AM3 u simuliranim uvjetima želuca i tankog crijeva. Rezultati su prikazani na slici 7.



**Slika 7.** Preživljavanje izolata AM1 i AM3 u simuliranim uvjetima želuca i tankog crijeva izražena kao postotak preživljavanja  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Iz dobivenih rezultata vidi se da su oba izolata pokazala visoku sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima želuca i tankog crijeva. Može se zamijetiti da izolat AM1 bolje podnosi simulirane uvjete od AM3, iako je za oba soja u oba ispitivana uvjeta postotak preživljenja viši od 80 % (slika 7). Rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja, poput (Dolenec, 2023) gdje je sposobnost preživljavanja jednog soja *Lpb. plantarum* iznosila više od 70 %, a drugog više od 90 %.



Izolati AM1 i AM3 podvrgnuti su fenotipskoj identifikaciji pomoću API 50 CHL metode, čiji su rezultati prikazani u tablici 4.

Mogućnost probiotičkih bakterija da fermentiraju šećere može biti korisna i štetna. Pokazala se korisnom u proizvodnji hrane namjenjene ljudima oboljelim od šećerne bolesti (Feng i sur., 2018). No primjerice kada je riječ o oralnom zdravlju, tada predstavlja problem (Hedberg i sur., 2008). Pomoću API 50 CHL metode, određeno je mogu li ispitivani izolati AM1 i AM3 fermentirati u tablici 4 navedene šećere.

**Tablica 4.** API fermentacijski profil bakterijskih izolata AM1 i AM3 dobiveni API 50 CHL testom

Ugljikohidrati	AM1	AM3
Kontrola	+	+
Glicerol	-	-
Eritriol	-	-
D-arabinoza	-	-
L-arabinoza	+	+
Riboza	+	+
D-ksiloza	-	-
L-ksiloza	-	-
Adonitol	-	-
β-metil-ksilozid	-	-
Galaktoza	+	+
D-glukoza	+	+
D-fruktoza	+	+
D-manoza	+	+
L-sorboza	-	-
Ramnoza	+/-	+/-
Dulcitol	-	-
Inozitol	-	-
Manitol	+	+
Sorbitol	+	+

**Tablica 4.** API fermentacijski profil bakterijskih izolata AM1 i AM3 dobiveni API 50 CHL testom (nastavak)

$\alpha$ -metil-D-manozid	+	+
$\alpha$ -metil-D-glukozid	+	+
N-acetil glukozamin	+	+
Amigdalinalin	+	+
Arbutin	+	+
Eskulin	+	+
Salicin	+	+
Celobioza	+	+
Maltoza	+	+
Laktoza	+	+
Melibioza	+	+
Saharoza	+	+
Trehaloza	+	+
Inulin	-	-
Melezitoza	+	+
D-rafinoza	+	+
Amidon	-	-
Glikogen	-	-
Ksilitol	-	-
$\beta$ -gentobioza	+	+
D-turanoza	+	+
D-liksoza	-	-
D-tagatoza	-	-
D-fukoza	-	-
L-fukoza	-	-
D-arabitol	-	-
L-arabitol	-	-
Glukonat	+/-	+
2-keto-glukonat	-	-
5-keto-glukonat	-	-
<b>Rezultat identifikacije i postotak podudarnosti</b>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ()	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ()

Provedbom API CHL testa, korištenog za identifikaciju bakterija roda *Lactiplantibacillus*, dobiveni su profili fermentacije bakterijskih izolata AM1 i AM3 te prikazani u tablici 4. Dobiveni

izolati identificirani su sa visokim postotkom preklapanja (99,5 % – 99,6 %) kao *Lactiplantibacillus plantarum*.

Dodatno, kao što se vidi iz tablice 4, ispitivani sojevi pokazali su gotovo iste sposobnosti fermentacije navedenih šećera. Jedina razlika koja se uočava jest ta da *Lpb. plantarum* AM1 ne može toliko efikasno preraditi 2-keto-glukonat kao *Lpb. plantarum* AM3. Rezultati su slični onima objavljenim u Dujmović (2022) ispitivajući istom metodom *Lpb. plantarum* S, međutim razlikuju se po sposobnosti fermentacije ramnoze,  $\alpha$ -metil-D-glukozida, 2-keto-glukonata, trehaloze, inulina, melezitaze, D-rafinoze, ksilitola, D-turanoze, L-arbitola i glukonata. Oba soja mogu razgraditi laktozu, što ih čini perspektivnima u dizajniranju lakše probavljivih mliječnih proizvoda za osobe s intolerancijom na laktozu (Oak i Jha, 2019). Također, uočava se da su sposobni razgraditi više od polovice ispitivanih šećera, što im omogućava bolju sposobnost iskorištavanja supstrata iz okoline, a time preživljavanje i rast.

Ispitivanje antibiotske rezistencije je važan korak u procjeni sigurnosti potencijalnih probiotičkih bakterija jer se radi o sve češćem globalnom zdravstvenom problemu. Naime, bakterije imaju sposobnost neselektivno horizontalno prenijeti gene za otpornost na antibiotike patogenim bakterijama (Gueimonde i sur., 2013). Kako bi se potvrdila sigurnost ispitivanih sojeva *Lpb. plantarum* AM1 i *Lpb. plantarum* AM3, u ovom istraživanju je ispitivana osjetljivost na odabrane antibiotike putem disk difuzijske metode. Na temelju promjera nastalih zona inhibicije, sojevi su klasificirani na osjetljive, umjereno osjetljive ili rezistentne. Lista odabranih antibiotika i dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5.

**Tablica 5.** Rezultati ispitivanja osjetljivosti sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* AM1 i *Lactiplantibacillus plantarum* AM3 na odabrane antibiotike disk difuzijskom metodom

<i>Antibiotički disk</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> AM1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> AM3
<i>Kloramfenikol</i>	S	S
<i>Klindamicin</i>	S	S
<i>Tetraciklin</i>	S	S
<i>Kanamycin</i>	R	R
<i>Streptomycin</i>	R	R
<i>Eritromicin</i>	S	S
<i>Gentamicin</i>	R	R
<i>Ampicilin</i>	S	S
<i>Vankomicin</i>	R	R

S-osjetljiv; I-umjereno osjetljiv; R-rezistentan

Iz tablice 5 iščitava se da su oba soja jednako osjetljiva na iste antibiotike, odnosno rezistentna prema istima [aminoglikozidima (kanamicin, streptomycin, gentamicin) i vankomicinu]. Unutar roda *Lactobacillus* široko je rasprostranjena rezistencija na vankomicin, međutim ona se karakterizira kao intrinzična, kromosomski kodirana i nije inducibilna ili prenosiva (Anisimova i Yarullina, 2019). Za rezistenciju na aminoglikozide u svom radu (Gueimonde i sur., 2013) navode kako je posljedica kromosomskih mutacija, a ne stjecanja specifičnih gena za rezistenciju na antibiotike te stoga ne predstavljaju potencijalni rizik prenosivosti.

Bitan sigurnosni kriterij pri odabiru probiotičkih bakterija je također taj da ne posjeduju hemolitičku aktivnost. Riječ je o sposobnost liziranja eritrocita pri čemu dolazi do oslobađanja

njihovog sadržaja u krvotok što može imati štetne posljedice na ljudsko zdravlje (Dutra i sur., 2014). Kako bi se izbjegala uporaba bakterija koje posjeduju navedeno negativno svojstvo, ispitana je hemolitička aktivnost testiranih sojeva *Lpb. plantarum* AM1 i *Lpb. plantarum* AM3. Rezultati su prikazani u tablici 6.

**Tablica 6.** Rezultati određivanja hemolitičke aktivnosti sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* AM1 i *Lactiplantibacillus plantarum* AM3

Ispitivani soj	Izgled nastale zone na krvnom agaru
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> AM1	Nema zone
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> AM3	Nema zone

Budući da oko naci jepljenih sojeva na Columbia krvnom agru nije došlo do pojave vidljivih zona, zaključeno je da se radi o  $\gamma$ -hemolizi. To znači da ispitivani sojevi nemaju hemolitičku aktivnost te ih možemo smatrati sigurnima za ljudsku upotrebu (tablica 6). I u drugim radovima, kao što je (Palaniyandi i sur., 2017), pokazalo se da sojevi *Lactiplantibacillus plantarum* ne pokazuju hemolitičku aktivnost.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Uspješno je provedena izolacija 20 izolata bakterija mliječne kiseline iz uzorka kozjeg mlijeka i provedena je probiotička karakterizacija dobivenih izolata bakterija mliječne kiseline.
2. Ispitivanjem niza probiotičkih kriterija, identificirani sojevi *Lactiplantibacillus plantarum* AM1 i *Lactiplantibacillus plantarum* AM3 pokazali su najviši probiotički potencijal.
3. Izolirani sojevi *Lactiplantibacillus plantarum* AM1 i AM3 pokazali su dobru antioksidaciju aktivnost (sposobnost uklanjanja >40 % slobodnih DPPH radikala), dok je antimikrobna aktivnost prema najčešćim patogenima za soj *Lpb. plantarum* AM1 bila u rasponu od 65 do 95 %, a za *Lpb. plantarum* AM3 u rasponu od 85 do 95 %. Rezultati za oba soja smatraju se iznimno visokima.
4. Soj *Lpb. plantarum* AM1 pokazao je visoke vrijednosti autoagregacije (>60 % nakon 24 h) i umjerene koagregacije s patogenima (najviše u slučaju *L. monocytogenes*: >35 % nakon 24 h) dok je prilikom ispitivanja hidrofobnosti stanične površine najveća vrijednost postignuta s heksanom (>30 %). Soj *Lpb. plantarum* AM3 pokazao je visoke vrijednosti autoagregacije (>65 % nakon 24 h) i zadovoljavajuće koagregacije s patogenima (najviše u slučaju *S. aureus*: >40 % nakon 24 h) dok je prilikom ispitivanja hidrofobnosti stanične površine najveća vrijednost postignuta s kloroformom (>35 %).
5. Oba soja su pokazala visok stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava s malim razlikama (>85 % *Lpb. plantarum* AM1 i >80 % *Lpb. plantarum* AM3), dok je soj *Lpb. plantarum* AM3 pokazao visok stupanj formacije biofilmova nakon 24 i 48 h, a *Lpb. plantarum* AM1 visok (24 h), odnosno umjeren (48 h) stupanj.
6. Oba odabrana soja zadovoljila su sigurnosne kriterije procjenjene na temelju ispitivanja osjetljivosti na antibiotike i određivanja hemolitičke aktivnosti.

## 6. LITERATURA

- Abid Y, Azabou S (2022) Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. U: Oliveira JM, Radhouani H, Reis RL (ured.) Polysaccharides of Microbial Origin, 1. izd., Springer Cham, Berlin, str. 415–437.
- Aguirre M, Collins MD (1993) Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol* **75**, 95–107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02753.x>
- Ahmed ASI, El Moghazy GM, Elsayed TR, Goda HAL, Khalafalla GM (2021) Molecular identification and in vitro evaluation of probiotic functional properties of some Egyptian lactic acid bacteria and yeasts. *J Genet Eng Biotechnol* **19**, 1–16. <https://doi.org/10.1186/S43141-021-00212-4/TABLES/10>
- Ahmad MS, Zargar MY, Mir SA, Bhat NA, Baba ZA, Kant RH, i sur. (2018) Morphological and biochemical studies for the identification of *Lactobacillus plantarum* sp. nov., and *Lactobacillus fermentum* sp. nov., from municipal waste. *J pharmacogn phytochem* **7**(5): 1421-1424. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.13721.06240>
- Alvarez Chavez B, Raghavan V, Tartakovsky B (2022) A comparative analysis of biopolymer production by microbial and bioelectrochemical technologies. *RSC Adv* **12**, 16105–16118. <https://doi.org/10.1039/D1RA08796G>
- Anisimova EA, Yarullina DR (2019) Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* Strains. *Curr Microbiol* **76**, 1407–1416. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01769-7>
- Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, i sur. (2016) Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Front Microbiol* **7**, 464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00464>
- Averianova LA, Balabanova LA, Son OM, Podvolotskaya AB, Tekutyeva LA (2020) Production of Vitamin B2 (Riboflavin) by Microorganisms: An Overview. *Front Bioeng Biotechnol* **8**, 570828. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.570828>
- Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R, i sur. (2020) Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *J Dairy Sci* **1**(3), 202-232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>
- Bagnall P, Rizzolo D (2017) Bacterial vaginosis. *JAAPA* **30**, 15–21. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000526770.60197.fa>
- Batista VL, da Silva TF, de Jesus LCL, Tapia-Costa AP, Drumond MM, Azevedo V, i sur. (2021) Lactic Acid Bacteria as Delivery Vehicle for Therapeutics Applications. *Methods Mol Biol* **2183**, 447-459. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0795-4\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0795-4_24)
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A (2012) Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* **61**, 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>

- Bezkorovainy A (2001) Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* **73**, 399s–405s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.399s>
- Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, i sur. (2020) Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Front Microbiol* **11**, 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- Bintsis T (2018) Lactic acid bacteria: their applications in foods. *JBMOA* **6**, 89–94. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>
- Borges S, Silva J, Teixeira P (2012) Survival and biofilm formation by Group B *Streptococci* in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **101**, 677–682. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9666-y>
- Callon C, Duthoit F, Delbès C, Ferrand M, Le Frileux Y, De Crémoux R, i sur. (2007) Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Syst Appl Microbiol* **30**, 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.05.004>
- Cani PD, Delzenne NM (2009) Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 737–743. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.016>
- Carvalho FM, Teixeira-Santos R, Mergulhão FJM, Gomes LC (2021) Effect of *Lactobacillus plantarum* biofilms on the adhesion of *Escherichia coli* to urinary tract devices. *Antibiotics* **10**, 966. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080966>
- Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B (2021) Eating Fermented: Health Benefits of LAB-Fermented Foods. *Foods* **10**, 2639. <https://doi.org/10.3390/foods10112639>
- Chapman CMC, Gibson GR, Rowland I (2011) Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr* **50**, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0166-z>
- Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S (2014) Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* **13**, S9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
- De Jesus LCL, Alvarenga Lima F, Dias Coelho-Rocha N, Fernando da Silva T, Paz J, Azevedo V, i sur. (2020) Recombinant Probiotics and Microbiota Modulation as a Good Therapy for Diseases Related to the GIT. U: Salanță LC (ured.) *The Health Benefits of Foods - Current Knowledge and Further Development*, 1. Izd., IntechOpen, Rijeka, str. 1-32.
- Condoleo R, Palumbo R, Mezher Z, Bucchini L, Taylor RA (2022) Microbial risk assessment of *Escherichia coli* shiga-toxin producers (STEC) in raw sheep’s milk cheeses in Italy. *Food Control* **137**, 108951. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108951>
- Daba GM, Elnahas MO, Elkhateeb WA (2021) Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *Int J Biol Macromol* **173**, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.110>



- de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv* **36**, 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>
- Dempsey E, Corr SC (2022) *Lactobacillus spp.* for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Front Immunol* **13**, 840245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>
- Dolenec F (2023) Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti probiotičkih bakterija iz jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) u kombinaciji s ekstraktom maginje (*Arbutus unedo* L.), (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Dujmović H (2022) Funkcionalne značajke *Lactiplantibacillus plantarum* S3 iz sirišta janjadi-potencijal primjene u mljekarstvu (diplomski rad), Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, De Oliveira RB, Golenbock DT, i sur. (2014) Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E4110–E4118. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1405023111>
- EFSA (2007) Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>, Pristupljeno 2. rujna 2023.
- Fang H, Kang J, Zhang D (2017) Microbial production of vitamin B12: A review and future perspectives. *Microb Cell Fact* **16**, 15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0631-y>
- FAO/WHO (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. FAO-Food and Agriculture Organization, WHO-World Health Organisation, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>. Pristupljeno, 1. rujna. 2023
- Faraki A, Rahmani F (2020) The antioxidant activity of Lactic acid bacteria and probiotics: a review. *J food safe hyg* **6**, 168-182. <https://doi.org/10.18502/jfsh.v6i4.7563>
- Feng L, Xie Y, Peng C, Liu Y, Wang H (2018) A Novel Antidiabetic Food Produced via Solid-State Fermentation of Tartary Buckwheat using *L. plantarum* TK9 and *L. paracasei* TK1501. *Food Technol Biotechnol* **56**, 373–380. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5540>
- Feng T, Wang J (2020) Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes* **12**, 1801944. doi: 10.1080/19490976.2020.1801944.
- Fijan S (2016) Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. U: Rao AV, Rao L (ured.) Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health, 1. izd., IntechOpen, Rijeka.
- Frece, J. (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 (doktorska disertacija), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

- Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Beganović J, Leboš A, Šušković J (2009) Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *J Dairy Res* **76**(1), 98–104. <https://doi.org/10.1017/s0022029908003737>
- Frece J, Markov K, Čvek D, Kovačević D, Krcivoj T (2010) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz “slavonskog kulena” kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *MESO: The first Croatian meat journal* **12**(4), 210–216.
- George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal* **26**, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
- Ghosh N, Chatterjee S, Sil PC (2022) Evolution of antioxidants over times (including current global market and trend). U: Nabavi SM and Silva AS (ured.) *Antioxidants Effects in Health*, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 3–32.
- Gonzales-Barron U, Gonçalves-Tenório A, Rodrigues V, Cadavez V (2017) Foodborne pathogens in raw milk and cheese of sheep and goat origin: a meta-analysis approach. *Curr Opin Food Sci* **18**, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.002>
- Gonzalez-Ochoa G, Flores-Mendoza LK, Icedo-Garcia R, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra P (2017) Modulation of rotavirus severe gastroenteritis by the combination of probiotics and prebiotics. *Arch Microbiol* **199**, 953-961. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1400-3>
- Górska A, Przystupski D, Niemczura MJ, Kulbacka J (2019) Probiotic Bacteria: A Promising Tool in Cancer Prevention and Therapy. *Curr Microbiol* **76**, 939–949. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01679-8>
- Gueimonde M, Sánchez B, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A (2013) Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol* **4**, 202. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>
- Haenlein GFW (2004) Goat milk in human nutrition. U: Haenlein GFW, Sherman DM (ured.) *Small Ruminant Research*, 1. izd., Elsevier, Amsterdam, str. 155–163.
- Halder D, Mandal M, Chatterjee SS, Pal NK, Mandal S (2017) Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicines*. **5**(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5020031>
- Han S, Lu Y, Xie J, Fei Y, Zheng G, Wang Z, i sur. (2021) Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, 609722. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609722>
- Haraguchi Y, Goto M, Kuda T, Fukunaga M, Shikano A, Takahashi H, i sur. (2019) Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* Tennozu-SU2 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BF1 on *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* during and post fermentation of soymilk. *LWT* **102**, 379–384. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.042>
- Hedberg M, Hasslöf P, Sjöström I, Twetman S, Stecksén-Blicks C (2008) Sugar fermentation in probiotic bacteria – an *in vitro* study. *Oral Microbiol Immunol* **23**, 482–485. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00457.x>

- Hernández-González JC, Martínez-Tapia A, Lazcano-Hernández G, García-Pérez BE, Castrejón-Jiménez NS (2021) Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals* **11**, 979. <https://doi.org/10.3390/ani11040979>
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B i sur., (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **11**, 506-14. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Ibrahim SA, Ayivi RD, Zimmerman T, Siddiqui SA, Altemimi AB, Fidan H, i sur. (2021) Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: Food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods* **10**, 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- Issa AT, Tahergorabi R (2019) Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract: Microbial Composition of Milk. Microbial Composition of Milk. U: Watson RR, R. Preedy V (ured.) Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases: Foods, Nutrients, and Dietary Supplements, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 265–275.
- Janković T, Frece J, Abram M, Gobin I (2012) Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *IJSER* **6**, 19-24. <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:doc-BO173ZDI>
- Jurášková D, Ribeiro SC, Silva CCG (2022) Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods* **11**, 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>
- Kim J, Kim YM, Lebaka VR, Wee YJ (2022) Lactic Acid for Green Chemical Industry: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology, Recovery, and Applications. *Fermentation* **8**, 609. <https://doi.org/10.3390/fermentation8110609>
- Kobyliak N, Conte C, Cammarota G, Haley AP, Styriak I, Gaspar L, i sur. (2016) Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutr Metab (Lond)* **13**, 14. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0067-0>
- Kompan D, Komprej A (2012) The Effect of Fatty Acids in Goat Milk on Health. U: Chaiyabutr N (ured.) Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health, 1. izd., IntechOpen, Rijeka.
- Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**, 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- Kosgey JC, Jia L, Fang Y, Yang J, Gao L, Wang J, i sur. (2019) Probiotics as antifungal agents: Experimental confirmation and future prospects. *J Microbiol Methods* **162**, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.001>
- Kostelac D, Gerić M, Gajski G, Markov K, Domijan AM, Čanak I i sur. (2021) Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties

- and anti-inflammatory potential. *Int Dairy J* **112**, 104828. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104828>
- Krasowska A, Sigler K (2014) How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 112. <https://doi.org/10.3389%2Ffcimb.2014.00112>
- Krausova G, Hryslova I, Hynstova I (2019) *In vitro* evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. *Fermentation* **5**, 100. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040100>
- Lad SS, Aparnathi KD, Mehta B, Velpula S (2017) Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* **6**, 1781–1792. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.194>
- Lev-Sagie A, Goldman-Wohl D, Cohen Y, Dori-Bachash M, Leshem A, Mor U, et al. (2019) Vaginal microbiome transplantation in women with intractable bacterial vaginosis. *Nat Med* **25**, 1500–1504. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0600-6>
- Lidbeck A, Nord CE (2015) *Lactobacilli* and the Normal Human Anaerobic Microflora. *Clin Infect Dis* **16**, S181-7. [https://doi.org/10.1093/clinids/16.supplement\\_4.s181](https://doi.org/10.1093/clinids/16.supplement_4.s181)
- Li X, Ringø E, Hoseinifar SH, Lauzon HL, Birkbeck H, Yang D (2019) The adherence and colonization of microorganisms in fish gastrointestinal tract. *Rev Aquac* **11**, 603–618. <https://doi.org/10.1111/raq.12248>
- Li A, Zheng J, Han X, Yang S, Cheng S, Zhao J, et al. (2023) Advances in Low-Lactose/Lactose-Free Dairy Products and Their Production. *Foods* **12**, 2553. <https://doi.org/10.3390/foods12132553>
- Lohani M, Bhandari D (2021) The Importance of Goats in the World. *PAWJ* **6**, 8-21. <https://tupubs.tuskegee.edu/pawj/vol6/iss2/4>
- Lübeck M, Lübeck PS (2019) Application of lactic acid bacteria in green biorefineries. *FEMS Microbiol Lett* **366**, fnz024. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz024>
- Markowiak P, Śliżewska K (2017) Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* **9**, 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Remes-Troche JM, Coss Adame E, Ángel Valdovinos Díaz M, Gómez Escudero O, Eugenia Icaza Chávez M, Antonio Chávez-Barrera J, et al. (2020) *Lactobacillus acidophilus* LB: a useful pharmabiotic for the treatment of digestive disorders. *Therap Adv Gastroenterol* **13**, 1756284820971201. <https://doi.org/10.1177/1756284820971201>
- Mayer EA, Tillisch K, Gupta A (2015) Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* **125**, 926–938. <https://doi.org/10.1172/jci76304>
- Mazzoli R, Bosco F, Mizrahi I, Bayer EA, Pessione E (2014) Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol Adv* **32**, 1216–1236. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.005>

- Milardović A (2021) Antioksidativni potencijal probiotičke bakterije *L. plantarum* S1 (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Miller BA, Lu CD (2019) Current status of global dairy goat production: An overview. *Asian-Australas J Anim Sci* **32**, 1219–1232. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0253>
- Mishra V, Shah C, Mokashe N, Chavan R, Yadav H, Prajapati J (2015) Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *J Agric Food Chem* **63**, 3615–3626. <https://doi.org/10.1021/jf506326t>
- Mokoena MP, Omatola CA, Olaniran AO (2021) Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules* **26**, 7055. <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>
- Mollica MP, Trinchese G, Cimmino F, Penna E, Cavaliere G, Tudisco R, i sur. (2021) Milk fatty acid profiles in different animal species: Focus on the potential effect of selected pufas on metabolism and brain functions. *Nutrients* **13**, 1111. <https://doi.org/10.3390/nu13041111>
- Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM (2010) Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications, 2. izd., Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Mrša M (2021) Primjena bakteriocina bakterija mliječne kiseline u liječenju humanih urinarnih infekcija (diplomski rad), Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Nomura K, Yonezawa T, Mano S, Kawakami S, Shedlock AM, Hasegawa M, i sur. (2013) Domestication Process of the Goat Revealed by an Analysis of the Nearly Complete Mitochondrial Protein-Encoding Genes. *PLoS One* **8**, e67775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067775>
- Oak SJ, Jha R (2019) The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 1675–1683. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425977>
- Palaniyandi SA, Damodharan K, Suh JW, Yang SH (2017) *In Vitro* Characterization of *Lactobacillus plantarum* Strains with Inhibitory Activity on Enteropathogens for Use as Potential Animal Probiotics. *Indian J Microbiol* **57**, 201–210. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0646-4>
- Pan M, Kumaree KK, Shah NP (2017) Physiological Changes of Surface Membrane in *Lactobacillus* with Prebiotics. *J Food Sci* **82**, 744–750. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13608>
- Pandey A, Srivastava S, Rai P, Duke M (2019) Cheese whey to biohydrogen and useful organic acids: A non-pathogenic microbial treatment by *L. acidophilus*. *Sci Rep* **9**, 8320. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42752-3>
- Pannella G, Lombardi SJ, Coppola F, Vergalito F, Iorizzo M, Succi M, i sur. (2020) Effect of biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* on the malolactic fermentation in model wine. *Foods* **9**, 797. <https://doi.org/10.3390/foods9060797>
- Park YW (2007) Impact of goat milk and milk products on human nutrition. *CAB Rev Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour* **2**. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20072081>

- Parker CT, Tindall BJ, Garrity GM (2019) International code of nomenclature of Prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **69**, S1. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>
- Patra F, Patel A, Shah N (2017) Microbial Production of Low-Calorie Sugars. U: Holban AM, Grumezescu AM (ured.) *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 259–290.
- Perez RH, Zendo T, Sonomoto K (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microb Cell Fact* **13**, S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>
- Plavec TV, Berlec A (2019) Engineering of lactic acid bacteria for delivery of therapeutic proteins and peptides. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 2053–2066. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09628-y>
- Plavec TV, Berlec A (2020) Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms* **8**, 297. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297>
- Polanowska K (2023) Lactic acid bacteria in biorefineries. U: Montet D, Ray RC, De Carvalho Azevedo VA, Paramithiotis S (ured.) *Lactic Acid Bacteria as Cell Factories*, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 49–76.
- Poljak M (2016) Izazovi u razvoju formulacija i tehnologija izrade farmaceutskih oblika probiotika (Završni specijalistički rad), Farmaceutsko-biokemijskifakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Punia Bangar S, Suri S, Trif M, Ozogul F (2022) Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Biosci* **46**, 101615. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101615>
- Quigley L, O’Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, i sur. (2013) The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Rabetafika HN, Razafindralambo A, Ebenso B, Razafindralambo HL (2023) Probiotics as Antibiotic Alternatives for Human and Animal Applications. *Encyclopedia* **3**, 561–581. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia3020040>
- Rahmatalla SA, Arends D, Brockmann GA (2022) Review: Genetic and protein variants of milk caseins in goats. *Front Genet* **13**, 995349. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.995349>
- Raman J, Kim J-S, Choi KR, Eun H, Yang D, Ko Y-J, i sur. (2022) Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Sustainable Agriculture: Advantages and Limitations. *Int J Mol Sci* **23**, 7784. <https://doi.org/10.3390/ijms23147784>
- Rawoof Abdur SA, Senthil Kumar P, Vo DVN, Devaraj K, Mani Y, Devaraj T, i sur. (2021). Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: A review. *Environ Chem Lett* **19**, 539–556. [10.1007/s10311-020-01083-w](https://doi.org/10.1007/s10311-020-01083-w)

- Ringø E, Hoseinifar SH, Ghosh K, Doan H Van, Beck BR, Song SK (2018) Lactic acid bacteria in finfish- An update. *Front Microbiol* **9**, 1818. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2018.01818>
- Rizzo AE, Gordon JC, Berard AR, Burgener AD, Avril S (2021) The female reproductive tract microbiome—implications for gynecologic cancers and personalized medicine. *J Pers Med* **11**, 546. <https://doi.org/10.3390/jpm11060546>
- Rokana N, Singh BP, Thakur N, Sharma C, Gulhane RD, Panwar H (2018) Screening of cell surface properties of potential probiotic *Lactobacilli* isolated from human milk. *J Dairy Res* **85**, 347–354. <https://doi.org/10.1017/S0022029918000432>
- Rubak YT, Nuraida L, Iswantini D, Prangdimurti E (2022) Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides in Goat Milk Fermented by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Food and Breast Milk. *Food Sci Anim Resour* **42**, 46-60. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e55>
- Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspenger G i sur. (2010) Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* **1**, 164–185. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>
- Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R (2018) Probiotics for human use. *Nutr Bull* **43**, 212–225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>
- Sharifi-Rad M, Anil Kumar N V., Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, i sur. (2020) Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol* **11**, 694. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- Sharoba AM, Soliman AHS, Bahlol H (2015) Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. *MEJAS* **5**, 10-18. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:198937937>
- Shigemori S, Shimosato T (2017) Applications of Genetically Modified Immunobiotics with High Immunoregulatory Capacity for Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* **8**, 22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00022>
- Silva DR, Sardi J de CO, Pitangui N de S, Roque SM, Silva ACB da, Rosalen PL (2020) Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *J Funct Foods* **73**, 104080. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104080>
- Singh P, Kumar S (2019) Chapter 2 - Microbial Enzyme in Food Biotechnology. U: Kuddus M (ured.) *Enzymes in Food Biotechnology*, 1. izd., Academic Press, Cambridge, str. 19-28.
- Singh TP, Natraj BH (2021) Next-generation probiotics: a promising approach towards designing personalized medicine. *Crit Rev Microbiol* **47**, 479–498. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2021.1902940>
- Ślizewska K, Chlebicz-Wójcik A (2020) Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology (Basel)* **9**, 1–13. <https://doi.org/10.3390/biology9120423>

- Śliżewska K, Markowiak-Kopeć P, Śliżewska W (2021) The role of probiotics in cancer prevention. *Cancers (Basel)* **13**, 1–22. <https://doi.org/10.3390%2Fcancers13010020>
- Slover CM, Danziger L (2008) *Lactobacillus*: a Review. *Clin Microbiol Newsl* **30**, 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006>
- Smid EJ, Kleerebezem M (2014) Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annu Rev Food Sci Technol* **5**, 313-26. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092339>
- Son S, Lewis BA (2002) Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. *J Agric Food Chem* **50**, 468-472. <https://doi.org/10.1021/jf010830b>
- Sonu KS, Basavaprabhu HNC (2020) Compositional and therapeutic signatures of goat milk: A review. *Int J Chem Stud* **8**, 1013–1019. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2p.8902>
- Stavropoulou E, Bezirtzoglou E (2020) Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Front Immunol* **11**, 2192. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02192>
- Stergiadis S, Nørskov NP, Purup S, Givens I, Lee MRF (2019) Comparative nutrient profiling of retail goat and cow milk. *Nutrients* **11**, 2282. <https://doi.org/10.3390/nu11102282>
- Sušac M (2020) Utjecaj odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline na dentalne patogene (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Szatraj K, Szczepankowska AK, Chmielewska-Jeznach M (2017) Lactic acid bacteria - promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *J Appl Microbiol* **123**, 325–339. <https://doi.org/10.1111/jam.13446>
- Šušković J, Brkić B, Matošić S (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**, 57-73. <https://hrcak.srce.hr/94894>
- Šušković J, Kos B, Beganović J, Pavunc AL, Habjanič K, Matosic S (2010) Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol* **48**, 296–307. <https://orcid.org/0000-0003-1711-316X>
- Tarola AM, Preti R, Girelli AM, Campana P (2019) Recent Advances in the Valorization of Goat Milk: Nutritional Properties and Production Sustainability. *Int J Food Eng* **13**, 183-188. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3299563>
- Thierry A, Pogačić T, Weber M, Lortal S (2015) Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods. U: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM (ured.) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, Second Edition, 2. izd., str.314-340.
- Torino MI, Font de Valdez G, Mozzi F (2015) Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Front Microbiol* **6**, 834. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>
- Upadhyaya BP, DeVeaux LC, Christopher LP (2014) Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends Biotechnol* **32**, 637-44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.005>



- Verruck S, Dantas A, Prudencio ES (2019) Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *J Funct Foods* **52**, 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.017>
- Vinderola G, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A (2019) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 5. izd., CRC Press, Boca Raton.
- Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, i sur. (2017) Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* **9**, 521. <https://doi.org/10.3390%2Fnu9050521>
- Yan F, Polk DB (2010) Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases. *Curr Opin Gastroenterol* **26**, 95–101. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328335239a>
- Zhang Z, Lv J, Pan L, Zhang Y (2018) Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 8135–8143. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9217-9>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja ANA MILARDOVIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Milardović Ana

Vlastoručni potpis