

# Mliječni proizvodi kao izvor probiotičkih kultura

---

Živković, Matteo

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:489588>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2020

Mattea Živković

1154/ BPI

**MLIJEČNI PROIZVODI KAO  
IZVOR PROBIOTIČKIH  
KULTURA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Jadranke Frece, red. prof. te uz pomoć Ive Čanak, mag. ing.

## **ZAHVALA**

Ponajprije se zahvaljujem prof. dr. sc. Jadranki Frece što mi je pod njenim mentorstvom omogućila izradu diplomskog rada. Zahvaljujem se Ivi Čanak, mag. ing., na strpljenju, pomoći i savjetima danim prilikom pisanja rada. Posebnu zahvalu upućujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška tijekom studiranja.

## 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: Biotehnologija

### MLIJEČNI PROIZVODI KAO IZVOR PROBIOTIČKIH KULTURA

*Mattea Živković, 1154/ BPI*

**Sažetak:** *Mliječni proizvodi se osim po hranjivosti i blagotvornom učinku na zdravlje potrošača, izdvajaju kao dobar izvor bakterija mliječne kiseline (BMK) s mogućom primjenom u proizvodnji novih starter kultura i probiotičkih pripravaka. Poznato je da BMK posjeduju dugu tradiciju primjene u fermentacijskim procesima kojim se dobivaju namirnice blagog okusa, ugodne arome, visoke nutritivne vrijednosti i funkcionalnih svojstava. Korištenjem BMK iz spomenutih sirovina, osigurava se njihova bolja prilagodba tehnološkom procesu i veća učinkovitost proizvodnje fermentiranih mliječnih proizvoda. Kako bi njihova primjena uopće bila moguća, potrebno je zadovoljiti stroge selekcijske kriterije koji osiguravaju izbor soja s dobrim tehnološkim i funkcionalnim karakteristikama te sigurnog za upotrebu.*

**Ključne riječi:** *mliječni proizvodi, bakterije mliječne kiseline, starter kulture, probiotici*

**Rad sadrži:** 78 stranica, 6 slika, 7 tablica, 202 literaturna navoda

**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:** *Iva Čanak, mag. ing.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof. dr. sc. *Ksenija Markov*
2. Prof. dr. sc. *Jadranka Frece*
3. Doc. dr. sc. *Irena Barukčić*
4. Prof. dr. sc. *Jasna Mrvčić (zamjena)*

**Datum obrane:** 13. srpnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### DIARY PRODUCTS AS SOURCE OF PROBIOTIC CULTURES

*Mattea Živković, 1154/ BPI*

**Abstract:** *In addition to their nutritional value and beneficial effect on consumer health, dairy products stand out as an adequate source of lactic acid bacteria (LAB) with possible application in the production of starter cultures and probiotics. It is known that LAB have a long tradition of application in fermentation processes where they produce food with a mild taste, pleasant aroma, high nutritional value and functional properties. By using LAB from the mentioned raw materials, their better adaptation to the technological process and greater efficiency of production of fermented dairy products is ensured. In order for their application to be possible at all, it is necessary to meet strict selection criteria that ensure the selection of strains with good technological and functional properties and safe to use.*

**Keywords:** *diary products, lactic acid bacteria, starter cultures, probiotics*

**Thesis contains:** 78 pages, 6 figures, 7 tables, 202 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Technical support and assistance:** *Iva Čanak, M. Sc.*

#### **Title Reviewers:**

1. PhD. *Ksenija Markov*, Full professor
2. PhD. *Jadranka Frece*, Full professor
3. PhD. *Irena Barukčić*, Assistant professor
4. PhD. *Jasna Mrvčić*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 13 July 2020.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
<b>2.1. MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI</b> .....	3
2.1.1. Kemijski sastav mlijeka.....	4
2.1.2. Fizikalna svojstva mlijeka .....	8
2.1.3. Osnovni tehnološki postupci proizvodnje mliječnih proizvoda.....	8
2.1.4. Vrste mliječnih proizvoda .....	14
<b>2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE (BMK)</b> .....	18
2.2.1. Podjela BMK.....	19
2.2.2. BMK izolirane iz mlijeka i mliječnih proizvoda .....	22
<b>2.3. BMK KAO STARTER KULTURE</b> .....	30
2.3.1. Starter kulture .....	30
2.3.2. Izvor autohtonih starter kultura .....	33
2.3.3. Funkcionalne starter kulture .....	34
2.3.4. Uloga i primjena funkcionalnih starter kultura.....	36
<b>2.4. BMK KAO PROBIOTICI</b> .....	40
2.4.1. Kriteriji odabira probiotičkih sojeva.....	41
2.4.2. Mikroorganizmi kao probiotički sojevi .....	43
2.4.3. Mehanizmi djelovanja probiotika .....	44
2.4.4. Mikroorganizmi kao potencijalni probiotici .....	46
2.4.5. BMK kao potencijalni probiotici podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda.....	54
2.4.6. Primjena probiotika kao lijekova.....	57
<b>3. ZAKLJUČAK</b> .....	59
<b>4. LITERATURA</b> .....	60



# 1. UVOD

Fermentirani mliječni proizvodi se prema povijesnim zapisima, već tisućama godina nalaze u prehrani brojnih civilizacija. Spontane fermentacije mlijeka, u prošlosti uzrokovane slučajnim kontaminacijama, omogućile su dulji opstanak sirovog mlijeka i njegovu konzumaciju u novom, nutritivno bogatom obliku. Fermentirana mlijeka su zbog svoje ugodne arome i blago kiselog okusa postala popularna namirnica širom svijeta, na tržištu dostupna u brojnim varijantama koje nude visoku hranjivost i funkcionalna svojstva. U 19. stoljeću javljaju se prvi navodi koji potvrđuju da konzumacija fermentiranih mlijeka, može povoljno utjecati na zdravlje ljudskog tijela, a koje prema znanstveniku Theodoru Escherichu, prvenstveno ovisi o održivosti prirodne ravnoteže intestinalne mikrobiote. Na temelju dosadašnjeg znanja podržava se hipoteza prema kojoj ljudska prehrana osim nutritivne, mora osiguravati fiziološku funkciju, unaprjeđivati ljudsko zdravlje i prevenirati nastanak i razvoj bolesti te je u skladu s tim, u mliječnoj industriji najprije prihvaćen probiotički i prebiotički koncept (Samaržija, 2015a). Navedeni koncept podrazumijeva ponovnu uspostavu narušene ravnoteže crijevne mikrobiote i njeno poticanje prema stvaranju metabolita korisnih za zdravlje domaćina, što se postiže oralnim uzimanjem živih i korisnih mikroorganizama (probiotika), odnosno neprobavljivih sastojaka hrane koji stimuliraju rast i aktivnost autohtonih i alohtonih probiotika u probavnom traktu domaćina (Šušković i sur., 2009). Dodatkom probiotičkih sojeva poput bakterija *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* prilikom proizvodnje fermentiranih mlijeka, nastaju proizvodi s hranjivim i funkcionalnim utjecajem na ljudsko tijelo, a koji se ubrajaju u funkcionalne mliječne proizvode. Uključivanjem takve hrane u redovitu prehranu u tijelo se unose dostatne količine sastojaka koje u službi promotora zdravlja djeluju na barem jednu njegovu ciljanu funkciju (Samaržija, 2015a). Kako bi se proizvodili fermentirani proizvodi i funkcionalna hrana u industrijskom mjerilu, izbjegavaju se spontane fermentacije primjenom definiranih starter kultura koje osiguravaju standardizirani proces proizvodnje, željenu higijensku i organoleptičku kvalitetu te produljeni rok trajanja dobivene namirnice (Markov i Frece, 2016). U tu se svrhu najčešće primjenjuju bakterije mliječne kiseline (BMK) zbog proizvodnje mliječne kiseline kao glavnog proizvoda metabolizma, kao i nusprodukata koji doprinose teksturi, sensorici i mikrobiološkoj ispravnosti namirnice (Leroy i De Vuyst, 2004). Osim toga, zbog duge tradicije primjene u kontroliranim fermentacijama, ovakve starter kulture su prema FDA (Food and Drug Administration) dobile GRAS (Generally Regarded As Safe) status (Šušković i sur., 2009). Posebnu pozornost pri tom privlače BMK izolirane iz autohtone

mikrobiote tradicionalno fermentiranih proizvoda koje pronalaze potencijalnu primjenu kao autohtone starter kulture. Primjenom takvih kultura, moguće je standardiziranim postupcima proizvesti namirnicu kontrolirane kvalitete, što se ne postiže tradicionalnim spontanim fermentacijama, a istovremeno se zadržavaju sve karakteristike tradicionalnog proizvoda koje se inače gube primjenom komercijalnih startera (González i sur., 2007; Frece i sur., 2014; Palavecino Prpich i sur., 2015). Ukoliko se pažljivom selekcijom u sastav starter kulture implementira soj s poželjnim inherentnim svojstvom, moguće je dobiti funkcionalnu starter kulturu čijom bi se primjenom mogla izbjeći upotreba nepoželjnih prehrambenih aditiva ili bi se proizvela hrana sa spomenutim blagotvornim učinkom na ljudsko zdravlje (Samaržija, 2015a). Na temelju svega navedenog, izazov i limitirajući faktor moderne mliječne industrije predstavlja odabir starter kulture s poželjnim karakteristikama, a uspješnost njene proizvodnje ponajprije ovisi o pronalasku i skladištenju jasno definiranih bakterijskih sojeva koji se mogu primjenjivati u tu svrhu (Aziz i sur., 2009). Prema navodu nekoliko radova, mikroorganizmi izolirani iz autohtone mikroflore smatraju se najpogodnijima za uspostavu novih starter kultura obzirom na njihovu prilagođenost ishodišnoj sirovini i uvjetima njene obrade, te mogućnosti dominacije unutar mikrobiote konačnog produkta, proizvodnjom specifičnih metaboličkih spojeva (Frece i sur., 2005a; 2005b; Babić i sur., 2011). Obzirom na činjenicu da sirova i fermentirana mlijeka predstavljaju prirodan izvor BMK (Aziz i sur., 2009; Wang i sur., 2016), od kojih bakterije rodova *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* i *Enterococcus* pokazuju i probiotičke karakteristike (poboljšavaju ravnotežu intestinalne mikrobiote čovjeka, pokazuju negativan učinak na patogene mikroorganizme, preveniraju i liječe intestinalne bolesti) (Gionchetti i sur., 2000), pretpostavlja se da su ona dobar odabir za uspostavu novih probiotičkih sojeva i starter kultura s ciljanom primjenom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MLIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI

Mlijeko se prema definiciji CAC (The Codex Alimentarius Commission) opisuje kao prirodni sekret mliječne žlijezde jedne ili više muznih životinja u koje nije ništa dodano ili iz njega oduzeto, a namijenjeno je za upotrebu u tekućem obliku ili za daljnju obradu (CAC, 1999). Obzirom na visoku podložnost kvarljivosti, mlijeko se tradicionalno prerađuje u široki raspon mliječnih proizvoda pri čemu mliječna industrija u većini svjetskih zemalja predstavlja najvažniji prehrambeni sektor. Mlijeko se osim za proizvodnju mliječnih proizvoda može koristiti i kao izvor sastojaka s daljnjom primjenom, poput laktoze, mliječne masti, mliječnih proteina (kazein) i proteina sirutke (Motarjemi i sur., 2014).

U ukupnoj svjetskoj proizvodnji mlijeka na godišnjoj razini, najdominantnija vrsta muznih životinja su krave s otprilike 85 % proizvedenog mlijeka, zatim ih slijede bivolice s 11 % te ovce i koze s po 2 % proizvedenog mlijeka. Osim navedenog, mlijeko deve, jaka, soba, kobile i magarice vrlo je bitno za mliječnu industriju pojedinih regija svijeta, iako je njihov udio u ukupnoj proizvodnji na svjetskoj razini vrlo mali (Fox, 2003).

Kvaliteta sirovog mlijeka koje se koristi u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda određena je kemijskom, fizikalnom i higijenskom kvalitetom. Kemijska i fizikalna kvaliteta mlijeka odnose se na sadržaj i kakvoću njegovih sastojaka te na njihovu međusobnu ravnotežu unutar koloidnog sustava, koja ponajprije ovisi o pH i puferskom kapacitetu mlijeka. Spomenute kvalitete mlijeka određene su genetikom, vrstom i pasminom muzne životinje te načinom njena uzgoja. Higijenska kvaliteta mlijeka mijenja se u pozitivnom ili u negativnom smislu te prilikom njegove obrade određuje kemijska, fizikalna i tehnološka svojstva mlijeka (Samaržija, 2015b). Poželjna higijenska svojstva mlijeka i njegova zdravstvena ispravnost nužna su zbog velike važnosti mliječne industrije za prehrambeni sektor, kao i zbog zdravlja potrošača, a održavanje istih predstavlja izazov mliječne industrije na dnevnoj razini. Glavni razlog je činjenica da je sirovo mlijeko bogato hranjivim tvarima te kao takvo predstavlja idealno okruženje za razvoj različitih mikroorganizama (Motarjemi i sur., 2014). Prilikom odabira sirovog mlijeka, ono mora biti visokokvalitetno i poželjnih tehnoloških svojstava kako bi se iz njega dobio proizvod željenih organoleptičkih, kemijskih i mikrobioloških karakteristika (Samaržija, 2015b). Osim toga, prema uputama zakonodavstva, mlijeko do trenutka zaprimanja ne smije biti izlagano temperaturama višim od 40 °C jer se u suprotnom ne

može deklarirati kao sirovo, odnosno sviježe mlijeko namijenjeno za daljnju obradu (Pravilnik o mlijeku i mliječnim proizvodima, NN 133/2007).

### 2.1.1. Kemijski sastav mlijeka

Kemijski sastav mlijeka najčešće se opisuje preko njegovih komercijalno važnih sastojaka, mliječne masti, proteina, laktoze i pepela ili se izražava preko udjela suhe tvari bez masti (Sbm) i udjela ukupne suhe tvari (ST). Suha tvar bez masti koja se opisuje i kao suha tvar plazme, sastoji se od proteina, laktoze i pepela u mlijeku, dok suha tvar osim suhe tvari plazme, sadrži i mliječnu mast. Na kemijski sastav mlijeka pored vrste muzne životinje (Tablica 1) najviše utječu redoslijed i period laktacije, interval između mužnji, količina mlijeka, način hranjenja, temperaturni uvjeti okoline, godišnje doba i zdravlje životinje (Chandan, 2006).

Voda u mlijeku se definira kao fiziološka tekućina u kojoj je otopljena ili suspendirana cjelokupna suha tvar mlijeka, a koja u kravljem mlijeku različitih pasmina varira između 85.4 i 87.7 %. Voda vezana na sastojke mlijeka poput proteina, laktoze i soli čini 2% u ukupnoj količini vode mlijeka. Mliječna mast se smatra najvažnijom komponentom mlijeka jer predstavlja izvor energije te doprinosi fizikalnim i organoleptičkim svojstvima mlijeka i njegovih proizvoda. Osim hranidbene vrijednosti, izvor je vitamina topivih u mastima (A, D, E, K) te esencijalnih masnih kiselina (omega-3 i omega-6). Udio mliječne masti u mlijeku svake mliječne pasmine ovisi o karakteristikama životinje, periodu i redoslijedu laktacije, ishrani, okolišnim uvjetima i načinu mužnje. Mliječna mast se u mlijeku nalazi u obliku masnih globula i disperzirana je u emulziji mliječne plazme (tekući dio mlijeka bez mliječne masti, obrano mlijeko). Prosječna veličina masnih globula kravljeg mlijeka iznosi 4.5  $\mu\text{m}$ , ovčjeg 5  $\mu\text{m}$ , kozjeg do 3  $\mu\text{m}$  te je u njima sadržano 99 % svih lipida prisutnih u mlijeku (Samaržija, 2015b). Od ukupnih lipida, 98 % čine triacilgliceroli (TAG), dok ostatak otpada na diacilglicerole, monoacilglicerole, slobodne masne kiseline, fosfolipide, kolesterol i polarne lipide. TAG se proizvode u mliječnoj žlijezdi i izlučuju u mlijeko pri fiziološkoj temperaturi (36 - 39 °C) pri čemu se nalaze u tekućem obliku. Do procesa kristalizacije TAG-a unutar masne globule dolazi snižavanjem temperature mlijeka te je sam proces vrlo bitan u proizvodnji fermentiranih proizvoda jer osigurava fizikalnu stabilnost mliječne masti te utječe na reološka svojstva i organoleptiku mliječnih proizvoda. Položaj masnih kiselina u sastavu TAG-a nije slučajna što bi značilo da se na položaju sn-1 i sn-2 uglavnom nalaze miristinska (C14:0), palmitinska

(C16:0), stearinska (C18:0) ili oleinska kiselina (C18:1), a na položaju sn-3 u molekuli nalazi se maslačna (C4:0), kapronska (C6:0) ili oleinska kiselina (C18:1) (Chandan, 2006). Masna globula u mlijeku je obavijena tankom biološkom membranom veličine 5 – 10 nm i čini 2 – 6 % masne globule. U sastavu membrane masne globule (MMG) nalaze se bioaktivne molekule (polarni lipidi, proteini, glikoproteini, kolesterol i enzimi) koje čine jedinstveni biofiziološki koloidni sustav. Od ukupnih bioaktivnih molekula, polarni lipidi i proteini zajedno čine više od 90 % MMG. MMG u sirovom mlijeku sprječava izlazak tekućih masnih kiselina iz globule te oksidativnu razgradnju masti koja bi se dogodila djelovanjem lipaza mlijeka (Argov i sur., 2008; Affolter i sur., 2010).

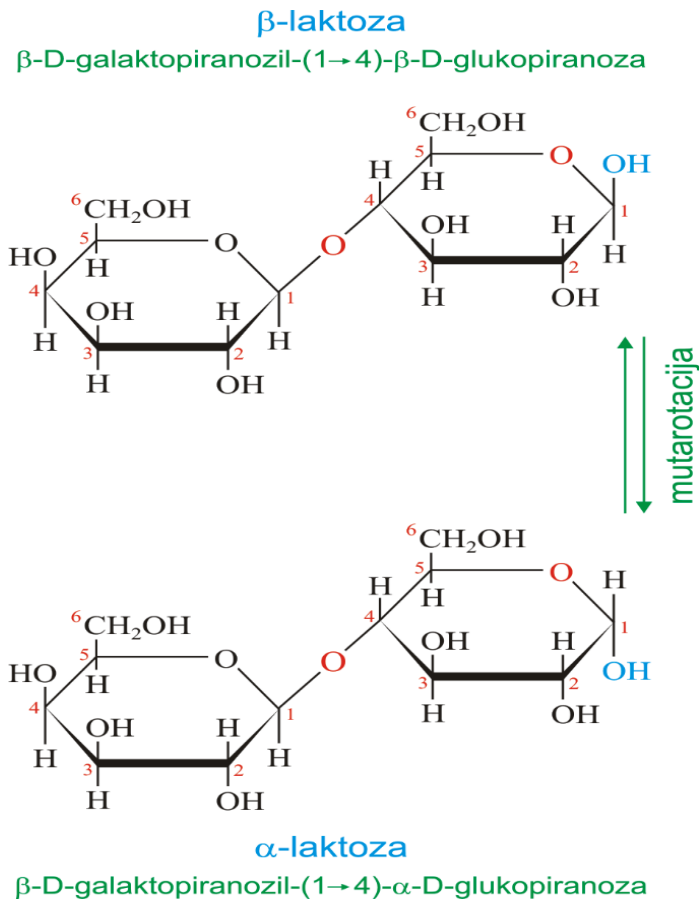
**Tablica 1:** Prosječni kemijski sastav mlijeka između odabranih vrsta sisavaca (Fox, 2003)

VRSTA	ST [%]	Mliječna mast [%]	Protein [%]	Laktoza [%]	Pepeo [%]
Čovjek	12.2	3.8	1	7.0	0.2
Krava	12.7	3.7	3.4	4.8	0.7
Bik	16.8	7.4	3.8	4.8	0.8
Koza	12.3	4.5	2.9	4.1	0.8
Ovca	19.3	7.4	4.5	4.8	1.0

U ukupnom se sastavu mlijeka nalazi 3.3 % proteina koji se dijele u dvije skupine: kazeini koji čine približno 80 % proteina, a koji se acidifikacijom mlijeka (pH 4.6/ 20 °C) talože iz otopine te proteini sirutke koji u uvjetima acidifikacije ostaju otopljeni. Kao glavni protein mlijeka se navodi kazein s udjelom većim od 80 %. 95 % nativnog kazeina nalazi se u formi kazeinskih micela, heterogenih koloidnih čestica u čijem se sastavu osim proteina (93%) nalaze kalcij, fosfat, magnezij i citrat. Zajednički naziv takve heterogene čestice je koloidni kalcijev fosfat (KCP). Unutar kazeinske micelle nalazi se četiri različite vrste kazeina (kazeinske frakcije):  $\alpha$ 1-kazein ( $\alpha$ 1-CN),  $\alpha$ 2-kazein ( $\alpha$ 2-CN),  $\beta$ -kazein ( $\beta$ -CN) i  $\kappa$ -kazein ( $\kappa$ -CN). Po kemijskom su sastavu fosfoproteini čija je fosfatna skupina esterificirana na serinskom ostatku proteinskog lanca. Vežanjem fosfatne skupine za kalcijev kation dolazi do stabilizacije micelle. Drugoj skupini proteina pripadaju proteini sirutke  $\alpha$ -laktalbumini,  $\beta$ -laktoglobulini, serum albumini, imunoglobulini, proteoza - peptoni,  $\beta$ -mikroglobulin, laktoferin i transferin (oba proteina u svojoj strukturi sadrže željezo), feritin i kalmodulin (protein koji se vezuje za kalcij) te skupina acilglikoproteina. Od ukupnih proteina sirutke u mlijeku je najzastupljeniji topivi protein  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -Lg) s udjelom od otprilike 50 %, zatim slijedi  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -La) s približno

20 % udjela te proteoza-peptoni s 2 - 6 %, imunoglobulini s 1.9 – 3.3 % i serum albumini s 0.7 – 1.3 % (Mehta, 2015)

Glavni disaharid mlijeka je laktoza sastavljena od D-glukoze i D-galaktoze ( $\beta$ -galaktozil-1,4-glukoza). Laktoza je u mlijeku prisutna u dva, međusobno uravnotežena izomerna oblika,  $\alpha$ -laktoze i  $\beta$ -laktoze. Razlika dvaju izomera je u položaju  $H^+$  i  $OH^-$  skupine na prvom C-atomu glukozidnog dijela laktoze čija konfiguracija nije stabilna pa dolazi do mutorotacije iz jednog oblika laktoze u drugi (Slika 1). Mutorotacija, kao i omjer između dva izomerna oblika laktoze, ovisi o temperaturi, pH-vrijednosti, prisutnosti drugih ugljikohidrata i prisutnim solima. Mutorotacija laktoze odvija se kao spora reakcija pri nižim temperaturama, dok porastom temperature za 10 °C raste 2.8 puta. Ukoliko se temperatura poveća na 75 °C, nastupa intenzivna i brza reakcija mutarotacije. Laktoza u odnosu na druge sastojke mlijeka ima najveći utjecaj (približno 50 %) na održavanje osmotskog tlaka u vimenu, određivanje vrijednosti točke ledišta i točke ključanja mlijeka. Prilikom mikrobne fermentacije mlijeka i proizvodnje mliječnih proizvoda dolazi do hidrolize laktoze pri čemu 23 - 30 % laktoze prelazi u mliječnu kiselinu (50 - 95 %) zbog čega se laktoza smatra vrlo bitnom stavkom za mliječnu industriju. U kravljem mlijeku prosječan udjel je laktoze 4.7 %, u ovčjem 4.9 %, a u kozjem 4.1 % (Mehta, 2015; Samaržija, 2015b).



**Slika 1:** Mutarotacija laktoze iz mlijeka (Generalić, 2013.)

U mineralni sastav mlijeka ubrajaju se soli klorida, fosfata, citrata, sulfata te bikarbonata natrija, kalija, kalcija i magnezija. Kloridi, fosfati, natrij - bikarbonati i kalij - bikarbonati su u mlijeku kao topljive soli, prisutne gotovo potpuno u ionskom obliku dok su soli kalcija i fosfata, znatno manje topljive (pH ~ 6,6). Glavni monovalentni ioni mlijeka su natrij, kalij i kloridni ion koji s laktozom reguliraju ukupnu ionsku stabilnost mlijeka što ima biološku važnost izjednačavanja osmotskog tlaka između krvi i intracelularne tekućine u vimenu. Velik broj mineralnih tvari, poput cinka, željeza i mangana je u mlijeku prisutan u tragovima. Kako kod pojedinih muznih životinja varira sadržaj makroelemenata i mikroelemenata, tako postoje i razlike po pitanju vitaminskog sastava mlijeka (Mehta, 2015). Ovčje mlijeko sadrži značajno višu koncentraciju vitamina A (0.08 mg 100 g<sup>-1</sup>) u odnosu na kravlje mlijeko (0.04 mg 100 g<sup>-1</sup>). Koncentracija vitamina B skupine u kozjem i kravljem mlijeku rezultat je sinteze u buragu i u velikoj mjeri ovisi o ishrani životinje. Ako se uspoređuje s kravljim mlijekom (0.35 mg 100 g<sup>-1</sup>; 5.30 mg 100 g<sup>-1</sup>), kozje mlijeko sadrži značajno nižu koncentraciju vitamina B12 (kobalamina) (0.06 mg 100 g<sup>-1</sup>) i B9 (folne kiseline) (1.00 mg 100 g<sup>-1</sup>), dok su obje vrste mlijeka siromašne vitaminima B6 (piridoksin) (0.04 mg 100g<sup>-1</sup>; 0.05 mg 100 g<sup>-1</sup>), C (1.00 mg 100 g<sup>-1</sup>; 1.3 mg 100 g<sup>-1</sup>) i D (0.08

mg 100 g<sup>-1</sup>; 0.06 mg 100 g<sup>-1</sup>) u odnosu na ovčje mlijeko (0.08 mg 100 g<sup>-1</sup>; 5.00 mg 100 g<sup>-1</sup>; 0.18 mg 100 g<sup>-1</sup>) (Samaržija, 2015b).

### 2.1.2. Fizikalna svojstva mlijeka

U fizikalnom smislu, mlijeko je neprozirna, bijela, heterogena tekućina čiji se sastojci u formi emulzije (lipidi u obliku masnih globula), koloidne suspenzije (kazeinske micelle), koloidne otopine (proteini sirutke) i prave otopine (laktoza, vitamini, kiseline, enzimi i neke anorganske soli) povezuju u multidisperzivan sustav. Na kiselost mlijeka utječu kazeini, kisel fosfati, citrat i plinovi u mlijeku te njihov zajednički utjecaj doprinosi prividnoj ili prirodnoj kiselosti svježe pomuzenog mlijeka (pH 6.6 – 6.8). Kao posljedica mikrobne razgradnje laktoze u mlijeku nastaje mliječna kiselina koja povećava kiselost mlijeka (stečena kiselost mlijeka) pa njegova stvarna kiselost nije jednaka prirodnoj kiselosti. Na puferski kapacitet mlijeka najveći utjecaj imaju topljivi fosfati (40 %), koloidni kalcijev fosfat (20 %), citrati, bikarbonati, kazein (35 %) i proteini sirutke (5 %). Puferski kapacitet se izražava brojem molova baze ili kiseline koji je potreban da se pH vrijednost mlijeka promijeni za jednu jedinicu. Puferski kapacitet mlijeka je oko dvaput veći prema kiselinama (2.4 - 2.6 mL kiseline 100 mL<sup>-1</sup> mlijeka) u odnosu na baze (1.2 – 1.4 mL baze 100 mL<sup>-1</sup> mlijeka) i ovisan je o vrsti muzne životinje. Prema podacima za proizvodnju jogurta, snižavanje pH mlijeka na 4.6 postići će se za otprilike 2 sata i 45 minuta za kozje mlijeko, za otprilike 3 sata i 15 minuta za kravlje mlijeko i za otprilike 5 sati i 30 minuta za ovčje mlijeko. Takve razlike posljedica su sastava mlijeka koje kod koze ima značajno nižu koncentraciju kazeina kao i činjenica da je β-kazein (glavni kazein oblikovanja gel - strukture) slabo fosforiliran te se zbog toga kiselost takvog mlijeka puno brže snižava. S druge strane, acidifikacija ovčjeg mlijeka u usporedbi s kozjim i kravljim najsporija je zbog visokog udjela kazeina i otopljenog CO<sub>2</sub> (Chandan, 2006).

### 2.1.3. Osnovni tehnološki postupci proizvodnje mliječnih proizvoda

Prije početka tehnološkog postupka proizvodnje mliječnih proizvoda, ključan je izbor sirovog mlijeka, određivanje udjela suhe tvari bez masti (Sbm) i mliječne masti sirovog mlijeka te priprema istog za proizvodnju. Sirovine koje se koriste u proizvodnji mliječnih proizvoda su sirovo mlijeko, obrano mlijeko, vrhnje, kondenzirano mlijeko i obrano mlijeko u prahu te je za



svaku ključno da je izvrsne mikrobiološke kvalitete. Mikrobiološka kvaliteta ovisit će o broju ukupnih bakterija (UBB), koliformnih bakterija (KB), kvasaca i plijesni. Naime, iako se mlijeko termički obrađuje što za posljedicu ima smanjenje početnog broja svih termički nerezistentnih mikroorganizama, prisutnost određenih sojeva može utjecati na karakteristike konačnih proizvoda. Ukoliko se u sirovom ohlađenom mlijeku odredi broj bakterija veći od 100 000 CFU mL<sup>-1</sup>, pretpostavka je da se većina odnosi na nepoželjne psihrofilne bakterije koje razlažući proteine već u sirovom mlijeku, usporavaju fermentaciju i dovode do slabe konzistencije i neželjenog okusa fermentiranog proizvoda (Samaržija, 2015b).

Osnovni tehnološki postupci u proizvodnji svih mliječnih proizvoda su predtretman mlijeka koji uključuje pripremu mlijeka, homogenizaciju i toplinsku obradu, nakon čega slijedi fermentacija, hlađenje i pakiranje proizvoda. Postupak pripreme sirovog mlijeka za prerađivanje fermentirani proizvod podrazumijeva obogaćivanje Sbm i standardizaciju mliječne masti, odnosno dodatak ostalih dopuštenih sastojaka poput stabilizatora, umjetnih aroma, boja, zaslađivača, vitamina, minerala i konzervansa. Povećanje udjela Sbm u mlijeku se koristi kako bi se povećala čvrstoća, viskoznost gel – strukture fermentiranog mlijeka i udio proteina u gotovom proizvodu. Nakon postupka obogaćivanja, suha tvar mlijeka (ST) se kreće između 9 % za obrano i 20 % za koncentrirane varijante fermentiranih proizvoda. Obogaćeno mlijeko sadrži u prosjeku 4 – 5 % proteina. Mlijeko se standardizira na željenu koncentraciju mliječne masti koja se kreće od 0.1 do 2 % za proizvode iz obranog ili djelomično obranog mlijeka od 3.2 do 5 % za punomasne proizvode. Nakon postupka obogaćivanja mlijeka i njegove standardizacije, za proizvodnju većine fermentiranih mlijeka, pripremljeno mlijeko sadrži značajno manji udjel masti (30 - 40 %) te veći udjel laktoze (6 - 7 %) i proteina (4 - 5 %) (Robinson, 2002)

U industriji mliječnih proizvoda se za postupke pripreme mlijeka najčešće koriste membranske tehnologije ili se u mlijeko dodaju tekući, odnosno osušeni mliječni aditivi. Od membranskih separacijskih tehnika primjenjuju se reverzna osmoza (RO) (dehidracija sirutke), ultrafiltracija (UF) (koncentriranje proteina u mlijeku i sirutki; standardizacija proteina u mlijeku u proizvodnji jogurta i sira), nanofiltracija (NF) (djelomična desalinizacija sirutke) i mikrofiltracija (MF) (redukcija bakterija u obranom mlijeku, sirutki i salamuri; uklanjanje masti iz sirutke namijenjene za pripremu koncentrata proteina sirutke (KPS); odvajanje proteina mlijeka). Dodaci koji se koriste za pripremu mlijeka dijele se na kazeinske dodatke (obrano mlijeko u prahu (OMP), koncentrat proteina mlijeka (KPM), Na - kazeinat, Ca - kazeinat) i na pripravke sirutke (izolati proteina sirutke (IPS), koncentrat proteina sirutke (KPS), hidrolizati

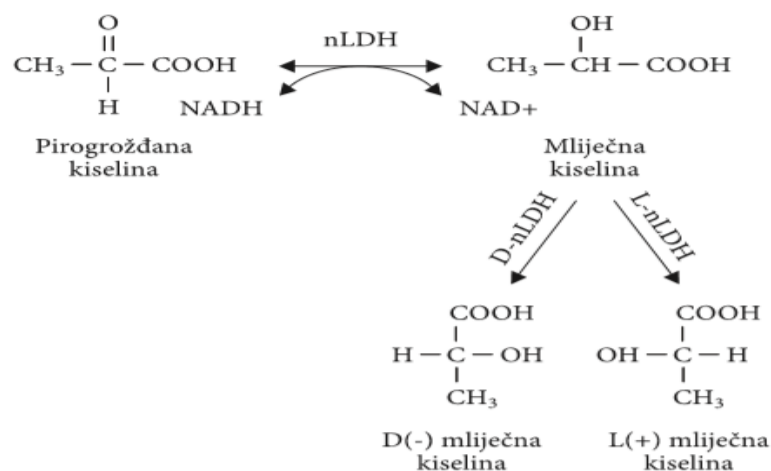
proteina sirutke (HPS) mikroproteini sirutke (MPS)). Ostali dodaci za pripremu mlijeka dijele se na aditive (prirodni šećeri, umjetna sladila, boje, emulgatori, stabilizatori i određene vrste ugušćivača), aditivima slične tvari (prirodne i umjetne arome) i ostale neškodljive tvari (kazein, inulin i vitamini). U sirovo je mlijeko moguće dodati i stabilizatore (prirodni polisaharidi poput pektina, želatine, karagenana, ksantan guma i modificiranog škroba) čija je uloga poboljšavanje kinetičke stabilnosti proizvoda što direktno utječe na reološka svojstva teksture, omogućuju maskiranje kiselosti proizvoda te poboljšavaju učinak prethodno spomenutih dodataka. Još jedan sastojak za pripremu mlijeka su i prebiotici koji doprinose održavanju mikrobiote potrošača, poboljšavaju teksturu proizvoda, potiču rast i preživljavanje probiotičkih sojeva u fermentiranom mlijeku, posebice roda *Bifidobacterium*, te imaju ulogu zamjene mliječne masti u niskokaloričnim proizvodima. Primijenjeni prebiotici su najčešće: laktuloza, inulini, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, soja-oligosaharidi, laktosukroza, izomaltoligosaharidi, glukooligosaharidi, ksilooligosaharidi. U fazu pripreme mlijeka spadaju i postupci klarifikacije i deaeracije mlijeka ukoliko su nužni. Klarifikacija se koristi za uklanjanje neželjenih čestica i bakterija iz sirovog mlijeka, a deaeracija za uklanjanje kisika. Naime, nakon hladne pohrane sirovog mlijeka koja uključuje zasićenje mlijeka kisikom, potrebno je taj kisik ukloniti kako bi se mogla provesti fermentacija mlijeka. Kisik u mlijeku odgađa proces acidifikacije i produžuje lag - fazu bakterija mliječne kiseline (BMK) jer radni mikroorganizam prije početka fermentacije mora utrošiti metaboličku energiju i vrijeme da bi uklonio neželjeni kisik. Početak acidifikacije može se pomaknuti za 90 min, odnosno, ako se primjenjuju termofilne BMK, za 45 – 180 min. Deaeracija se provodi u vakuumu uz tlak niži od 1 MPa na temperaturi 70 - 75 °C (Nilsson i Tamime, 2006; Samaržija 2015b).

Nakon postupka pripreme mlijeka potrebno je provesti njegovu homogenizaciju kako bi došlo do smanjenja veličine masnih globula na promjer manji od 1 do 2 µm. Smanjenjem veličine masnih globula, sprječava se njihovo ponovno povezivanje što omogućuje da se one ravnomjerno rasporede u mlijeku u fazi njegove fermentacije i tvorbu gel – strukture fermentiranog mlijeka. Homogenizacijom se omogućuje i potpuna otopljenost dodanih sastojaka za obogaćivanje mlijeka i njegovu stabilizaciju. Nadalje, homogenizacijom se proteini mlijeka vezuju na površinu masne globule što pogoduje stvaranju bolje konzistencije i viskoznosti proizvoda te se osigurava veća stabilnost njegove gel - strukture. Homogenizacijom mlijeka dolazi do oštećenja MMG i oslobađanje lipaza koje dovode do lipolitičkih promjena u mlijeku. Kako bi se navedeno spriječilo, nužno je mlijeko nakon homogenizacije pasterizirati /sterilizirati u što kraćem vremenskom periodu (Dewettinck i sur., 2008).

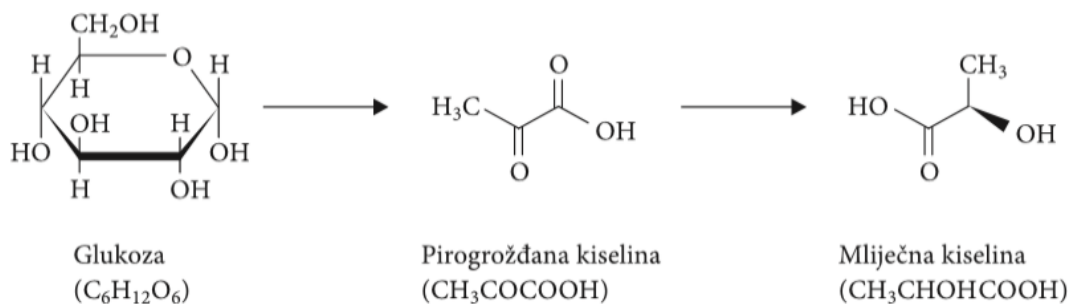
Sterilizacija ili toplinska obrada mlijeka primjenjuje se za postizanje zdravstveno-mikrobiološke kvalitete i poboljšavanje tehnoloških svojstva mlijeka. Sustavi koji se primjenjuju za pasterizaciju sirovog mlijeka su: HTSH sustav (High Temperature/ Short Holding) koji uključuje prolazak mlijeka kroz izmjenjivač topline (sekcije pasterizatora) s cijevima dovoljnog kapaciteta da mlijeko zadrži na željenoj temperaturi (90 - 95 °C) najmanje 10 - 5 min; LTH sustav (Low Temperature Holding) koji uključuje zagrijavanje i zadržavanje mlijeka u procesnom spremniku na temperaturi 80 - 85 °C/ 30 - 20 min; UHT toplinska obrada (Ultra High Temperature) sterilizacije mlijeka na temperaturi 135 - 140 °C/ 2 - 20 s. Odabir sustava ovisit će o udjelu ST u mlijeku što znači da će se mlijeko s udjelom ST od 9.5 do 12 % obraditi principom HTSH sustava, a mlijeko s udjelom ST većim od 14 % obraditi po principu LTH sustava. Toplinska obrada pored navedenog doprinosi poboljšanju kvalitete sirovog mlijeka i uspješnosti njegove pretvorbe u konačni proizvod željenih karakteristika. Konkretno, sterilizacijom se smanjuje koncentracija otopljenog kisika, dušika i CO<sub>2</sub> što pogoduje rastu radne kulture i probiotičkih sojeva; povećava se udjel slobodnih aminokiselina djelomičnom razgradnjom proteina sirutke koje poboljšavaju aktivnost kulture; snižava se oksido - redukcijski potencijal što pogoduje kinetici rasta bakterija; inaktivacijom prirodnih i bakterijskih enzima potiče se rast radne kulture; redukcijom mikrobne populacije sirovog mlijeka smanjuje se mogućnost kompeticije između prirodno prisutnih bakterija i radne kulture za isti supstrat; povećava se viskozitet mlijeka promjenama u strukturi nativnih kazeina i proteina sirutke; snižavanjem pH vrijednosti ubrzava se formiranje gel - strukture proizvoda; povećanjem koncentracije organskih kiselina, formiraju se laktoni, ketoni i drugi hlapljivi spojevi što doprinosi organoleptici fermentiranog mlijeka; redistribucija kalcija, fosfora i magnezija unutar njihova koloidnog i topljivog oblika omogućuje formiranje novih proteinskih kompleksa (García - Risco i sur., 2002; Jacob i sur., 2010; Nobel i sur., 2010).

Nakon provedenog predtretmana, mlijeko se podvrgava procesu fermentacije (inkubacije) koja podrazumijeva niz biokemijskih i fizikalno – kemijskih reakcija koje rezultiraju oblikovanjem gel – strukture konačnog proizvoda sa željenim svojstvima mirisa, okusa i teksture karakterističnih za pojedinu vrstu fermentiranog mlijeka. U tu se svrhu koriste posebno dizajnirani fermentacijski spremnici ili inkubatori u kojima se fermentacija provodi na različite načine. Fermentacija se može provoditi u prodajnoj ambalaži za čvrsta fermentirana mlijeka; u fermentacijskim spremnicima za tekuća i pitka fermentirana mlijeka; polukontinuiranim postupkom za čvrsta, tekuća i pitka fermentirana mlijeka; i kontinuiranim postupkom za uglavnom tekuća i pitka fermentirana mlijeka (Samaržija, 2015b). Fermentacija mlijeka

započinje inokulacijom pasteriziranog i prethodno ohlađenog mlijeka na radnu temperaturu inokuluma (20 – 46 °C). Nakon inokulacije, fermentacija se provodi u dvije faze: predfermentacija i glavna fermentacija. U fazi predfermentacije mlijeko se zakiseljava do pH vrijednosti od 5.2 do 5.0 pri čemu ne dolazi do značajnih promjena u strukturi mlijeka. Progresivnim snižavanjem pH vrijednost u fazi glavne fermentacije, počinje se formirati gel – struktura mlijeka čije oblikovanje završava u izoelektričnoj točki kazeina od 4.6. U ovoj fazi gel – struktura postiže svoju najveću čvrstoću i utječe na viskoznost proizvoda. Ovisno o vrsti fermentiranog mlijeka, fermentacija traje od 2.5 do 25 h dok su uobičajene temperature inkubacije za sva fermentirana mlijeka između 20 i 30 °C ukoliko se koristi mezofilna kultura, odnosno između 37 i 46 °C, ako se koristi termofilna kultura. Mliječna fermentacija koju provodi radna kultura podrazumijeva niz povezanih biokemijskih reakcija gdje se mliječna kiselina proizvodi iz šećera laktoze. Laktoza se djelovanjem enzima laktaze razgrađuje na glukozu i galaktozu. Nastala galaktoza se u odvojenom biokemijskom putu prevodi u glukozu, supstrat fermentacije. Intermedijarna komponenta u mliječnoj fermentaciji je pirogroždana kiselina ili piruvat koji nastaje metabolizmom laktoze složenim enzimskim reakcijama. Iz piruvata djelovanjem enzima NAD<sup>+</sup> (nikotinamid adenin dinukleotid) ovisne laktat dehidrogenaze nastaje laktat. Istovremeno stvaranje L (+) izomera ili D (-) izomera mliječne kiseline je ovisno o prisutnosti specifičnih enzima laktat dehidrogenaza. Osim mliječne kiseline, iz laktoze nastaju i nusproizvodi koji služe kao izvor energije jednim mikroorganizmima ili postaju letalni za druge mikrobne vrste koje sudjeluju u fermentaciji (Bourdichon i sur., 2012). Na Slikama 2 i 3 je prikazan metabolički put razgradnje glukoze u mliječno – kiseloj fermentaciji.



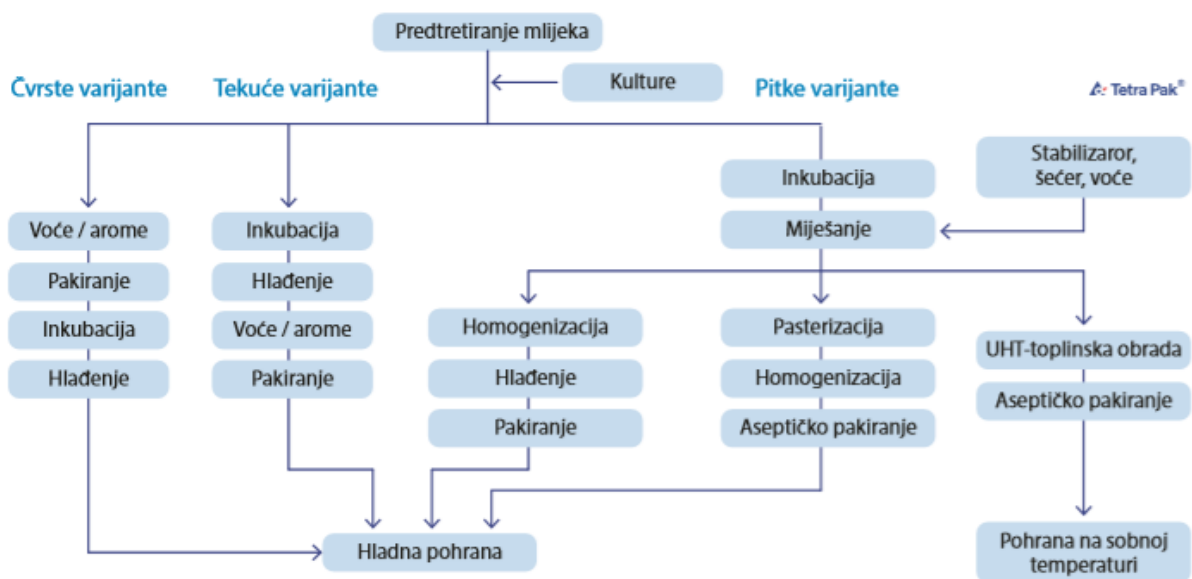
**Slika 2:** Shematski prikaz razgradnje glukoze u mliječnu kiselinu (Samaržija, 2015b)



**Slika 3:** Shematski prikaz nastajanja mliječne kiseline iz pirogroždane kiseline djelovanjem bakterijskog enzima  $\text{NAD}^+$  ovisne laktat-dehidrogenaze (nLDH) (Samaržija, 2015b).

U proizvodnji fermentiranih mlijeka postoje dva tipa hlađenja: hlađenje u svrhu prekida fermentacijskog postupka i završno hlađenje. Prvom vrstom hlađenja kontrolira se koncentracija proizvedene mliječne kiseline u fermentiranom proizvodu i očuvanje njegove gel – strukture. Početak hlađenja jogurta nastupa kad se koncentracija proizvedene mliječne kiseline povisi na 0.7 do 1.0 g 100 g<sup>-1</sup> te mora započeti i završiti u pH intervalu od 4.7 do 4.5. Osim početkom i završetkom, ova je vrsta hlađenja određena i brzinom. Ukoliko je hlađenje presporo za određenu vrstu fermentacijskog mlijeka doći će do prekomjerne acidifikacije proizvoda i diskoloracije voća kod voćnih fermentacijskih mlijeka. Prebrzo hlađenje, s druge strane može dovesti do jačih kontrakcija gel – strukture i izdvajanja sirutke. Hlađenje se može provoditi postupkom brzog hlađenja u jednoj fazi ili postupnim hlađenjem u dvije faze. Brzim hlađenjem u jednoj fazi temperatura fermentacije (20 - 45 °C) direktno se snizi na temperaturu nižu od 10 °C koja značajno usporava metaboličku aktivnost radne kulture. Takvo se hlađenje primjenjuje za čvrste tipove fermentacijskih mlijeka. Hlađenjem u dvije faze koje se primjenjuje za hlađenje tekućih, pitkih i voćnih ili aromatiziranih varijanti fermentiranih mlijeka, proizvod se uz miješanje postupno hladi na 20 °C nakon čega se u proizvod dodaje voće i puni se u prodajnu ambalažu. Proizvod se u ambalaži hladi na temperaturu nižu od 10 °C u periodu od 10 do 12 h. Kod proizvoda u koje se ne dodaje voće, hlađenje se provodi u periodu od 5 do 6 h na temperaturi od 7 do 10 °C u prodajnoj ambalaži. Nakon opisanog postupka, sva se fermentirana mlijeka hlade na jednak način u postupku završnog hlađenja. Proizvod se hladi na temperaturu od 2 do 4 °C i pohranjuje u mljekari tijekom distribucije, odnosno u prodajnim prostorima u hladnjacima (Samaržija, 2015b).

Kako bi se očuvala kvaliteta fermentiranog mlijeka, ambalaža mora zadovoljiti nekoliko uvjeta: otpornost na okolišne i mehaničke utjecaje; pogodnost za serijsko punjenje u punionicama; nepropusnost za svjetlo, miris i slično; ne smije sadržavati toksične elemente; inertnost i ekološka prihvatljivost. Mliječni se proizvodi najčešće pakiraju u ambalažu od polipropilena (PP), polistirena (PS), polietilen - tereftalata (PET), polietilena (LDPE), polivinil klorida (PVC) te novijih materijala poput poliviniliden klorida (PVDC), etilen - vinil alkohola (EVOH) i poliacetala (Samaržija, 2015b). Na Slici 4 je prikazan hodogram tehnoloških postupaka pripreme različitih varijanti fermentiranih mliječnih proizvoda.



**Slika 4:** Prikaz osnovnih tehnoloških operacija kod proizvodnje čvrstih, tekućih i pitkih vrsta fermentiranih mliječnih proizvoda s dodatkom i bez dodatka voća ili aroma. (Bylund, 2003).

#### 2.1.4. Vrste mliječnih proizvoda

Mliječni se proizvodi smatraju ključnima kao izvor energije i esencijalnih sastojaka u ljudskoj prehrani te se njihova konzumacija povezuje sa zdravljem kostiju i prevencijom srčanih bolesti (Bradley i O'Sullivan, 2018). Fermentirana mlijeka se prema zapisima iz prošlosti proizvode veće tisućama godina. Pretpostavlja se da su nekad bila proizvod slučajnih kontaminacija mlijeka mikroorganizama te je s vremenom otkriveno da se primjenom određene mikrobne kulture uz kontrolirane uvjete može proizvesti širok spektar različitih mliječnih proizvoda. U

posljednjih dvadesetak godina, pored osnovnih nutritivnih sastojaka koji su prirodno prisutni, fermentirana mlijeka nude i funkcionalna svojstva nastala njihovim obogaćivanjem različitim dodacima poput  $\omega$ -3 masnih kiselina i prebiotika (Samaržija, 2015c). U Tablici 2 nalazi se pregled fermentiranih mlijeka uz pridružene primarne tehnologije njihove proizvodnje. Fermentirana mlijeka se definicijom opisuju kao proizvodi dobiveni djelovanjem mikroorganizama iz punomasnog, potpuno ili djelomično obranog mlijeka, koncentriranog mlijeka ili mlijeka supstituiranog iz djelomično ili potpuno obranog mlijeka u prahu te iz nehomogeniziranog ili homogeniziranog mlijeka koje je pasterezirano ili sterilizirano. Definicija prema znanstveniku Franku V. Kosikowskom je 1984. dopunjena zahtjevom koji navodi nužnost održivosti živih mikroorganizama u fermentiranom mlijeku do datuma uporabljivosti te do danas nije mijenjana (Samaržija, 2015c). Jedna od podjela fermentiranih mlijeka prema standardu CODEX STAN 243-2003 dijeli proizvode obzirom na mikrobnu kulturu koja se koristi za fermentaciju (I), teksturu (II), okus (III) te na fermentirane napitke (IV). Prema prvoj kategoriji (I) fermentiranih mlijeka, mikrobna kultura definira jogurt, jogurtu srodne vrste, acidofil, kefir i kumis (Tablica 3). U drugu kategoriju (II) spadaju koncentrirana fermentirana mlijeka s udjelom proteina minimalno 5.6 % što se postiže prije ili nakon fermentacije mlijeka. Tu spadaju fermentirana mlijeka labneha, ymera i ylettea. Trećoj skupini (III) pripadaju mješovita fermentirana mlijeka koja ne smiju sadržavati više od 50 % nemliječnih komponenti koje doprinose specifičnom okusu/ aromi (prirodna i umjetna sladila, voće i povrće, sokove, voćne piree, voćne kaše, itd). Četvrta skupina (IV) se odnosi na mješovita fermentirana mlijeka koja moraju sadržavati barem 40 % fermentiranog napitka koji se miješa sa pitkom vodom uz neobavezni dodatak sirutke, drugih nemliječnih dodataka i aroma (Nilsson i sur., 2006; Samaržija, 2015c).

**Tablica 2:** Raznolikost mliječnih proizvoda (Fox, 2003)

Proces proizvodnje	Mliječni proizvod	Daljnji produkti
Centrifugalna separacija	Vrhnje	Maslac, bezvodna mliječna mast, ghee maslac, kremasti sirevi
	Obrano mlijeko	Obrano mlijeko u prahu, kazein, sir, koncentrat mliječnih proteina
Koncentriranje termalnom evaporacijom ili UF		Koncentrirano zaslađeno mlijeko
Koncentriranje i sušenje		Punomasno mlijeko u prahu, formule za dojenčad, dijetetski proizvodi
Enzimsko koagulacija	Sir	Prerađeni sir i proizvodi bazirani na siru
	Sirište	Sirutka, sirutka u prahu, demineralizirana sirutka u prahu, koncentrirani proteini sirutke, izolati proteina sirutke, pojedinačni proteini sirutke, hidrolizati proteina sirutke, nutraceutici
		Laktoza i derivati laktoze
Kisela koagulacija	Sir	Svježi sir i proizvodi bazirani na siru
	Kiseli kazein/ kazeinati	Ciljana primjena kao dodaci vrhnja za kavu, omekšivače mesa, nutritivna primjena
	Sirutka	Sirutka, sirutka u prahu, demineralizirana sirutka u prahu, koncentrirani proteini sirutke, izolati proteina sirutke, pojedinačni proteini sirutke, hidrolizati proteina sirutke, nutraceutici
Fermentacija		Jogurt, mlaćenica, acidofilno mlijeko, biojogurt
Zamrzavanje	Sladoled	Različite vrste i formulacije



**Tablica 3:** Prikaz fermentiranih mlijeka obzirom na specifičnu mikrobnu kulturu koja je korištena za fermentaciju (CODEX STAN 243 – 2003.)

Fermentirano mlijeko	Mikrobna kultura
Jogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> i <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Jogurtu srodne vrste	<i>Streptococcus thermophilus</i> i druge <i>Lactobacillus</i> vrste
Acidofil	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Kefir	pripremljen od kefirnih zrna: <i>Lactobacillus kefir</i> i vrsta rodova <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> i <i>Acetobacter</i> koji rastu u jakom simbiotskom odnosu, laktoza fermentativni kvasci ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> ) i nefermentativni kvasci ( <i>Saccharomyces uniporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> i <i>Saccharomyces exiguus</i> )
Kumis	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> i laktoza fermentativni kvasci <i>Kluyveromyces marxianus</i>

## 2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE (BMK)

Mljekarska mikroba kultura predstavlja medij koji sadrži neškodljive mikroorganizme iz skupine bakterija, kvasaca i plijesni koji služe za proizvodnju određene vrste fermentiranog mliječnog proizvoda, točno određenih organoleptičkih i strukturnih svojstava. U kontroliranim uvjetima provedbe fermentacije, mikroorganizmi svojim metabolizmom osiguravaju karakterističnu kiselost, aromu, okus i teksturu gotovog proizvoda (Robinson i sur., 2002). Kulture koje se najčešće koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda su BMK *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp. i bakterijski sojevi *Bifidobacterium* spp. Osim navedenog, u proizvodnji fermentiranih mlijeka s probiotičkim učinkom mogu se koristiti i sojevi vrsta *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus*. Kulture BMK i bifidobakterija koje se koriste u proizvodnji mliječnih proizvoda odabiru se prema nekoliko osnovnih kriterija: brzini, omjeru rasta i razmnožavanja u mlijeku, sposobnosti stvaranja mliječne kiseline i nusproizvoda, sposobnosti poboljšanja viskoznosti proizvoda, sposobnosti rasta i razmnožavanja u kokulturi, otpornosti na bakteriofage, sposobnosti preživljavanja tijekom pripreme kultura, konzerviranja, pohrane i distribucije proizvoda. Za proizvodnju mliječnih proizvoda mogu se koristiti tradicionalne kulture (sadrže nedefinirane bakterijske vrste) i starter kulture (definirane i selekcionirane bakterijske vrste) (Samaržija, 2015d).

Bakterije mliječne kiseline su mikroorganizmi sa širokom primjenom u području proizvodnje fermentiranih namirnica, probiotičkih pripravaka te u području biokonzerviranja (Markov i Frece, 2016). BMK se danas koriste kao starter kulture u svrhu provedbi kontroliranih fermentacija koje za posljedicu imaju nutritivno obogaćene prehrambene proizvode željene teksture i arome (Upadrasta i sur., 2001). U opsežnoj definiciji opisuju se kao Gram - pozitivne, katalaza - negativne i nesporogene bakterije koje nemaju sposobnost sinteze hemoproteina zbog čega preživljavaju samo u anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima na različitim supstratima. Naime, neka mikroaerofilne vrste BMK, unatoč nedostatku hemoproteina, zbog većih količina intracelularnog magnezija, cinka i selena koji vežu na sebe kisik radikale, uspješno toleriraju prisutnost manje koncentracije kisika u svojoj okolini. U ovom slučaju magnezij, cink i selenij preuzimaju ulogu peroksidaza i katalaza. Obzirom na krajnji produkt anaerobnog metabolizma, BMK se dijele na homofermentativne, proizvodeći isključivo mliječnu kiselinu, heterofermentativne proizvodeći mliječnu kiselinu, acetat, etanol i ugljični dioksid te fakultativno heterofermentativne što ovisi o prisutnosti supstrata u podlozi. Posljednji navod se

objašnjava činjenicom da će bakterija koja raste na podlozi s pentozama kao izvorom ugljika, aktivirati enzim fosfoketolazu i preusmjeriti svoj metabolizam u heterofermentativan, odnosno ukoliko su u podlozi prisutne heksoze metabolizam će biti homofermentativan (Samaržija, 2015d). BMK se morfološki dijele na koke, kokobacile ili bacile. Pretežito se razmnožavaju binarnom diobom te se njihov rast, razvoj i dioba odvija u generacijskom vremenu od 30 do 90 min (Hammes i Vogel, 1995). BMK se obzirom na optimalnu temperaturu rasta dijele na mezofilne sojeve koje rastu pri temperaturnim rasponima od 25 °C do 30 °C, odnosno na termofilne sojeve koje rastu pri rasponu od 40 °C do 44 °C (Samaržija, 2015d). Ukoliko se BMK primjenjuju kao starter kulture, moraju posjedovati GRAS status, što nalaže FDA američka uprava za hranu i lijekove (Šušković i sur., 2009).

Kako bi se bakterije proučile na osnovu filogenetske povezanosti, provode se istraživanja na ribosomskim ribonukleinskim kiselinama (rRNK) koje su prisutne u svim mikroorganizmima. Na temelju usporedbe sekvenci 16S rRNK molekula, s genima na konzervativnim i varijabilnim regijama prisutnim u svim mikroorganizmima, dokazano je da sve Gram - pozitivne bakterije imaju filogenetsku povezanost i svrstavaju se u jedanaest filogenetskih skupina. Nadalje, proučavanjem sekvenci 16S i 23S rRNK utvrđeno je da Gram - pozitivne bakterije tvore dvije linije potomstva od kojih BMK pripadaju onoj čije bakterije imaju DNK sa manje od 50 % G + C (gvanin + citozin) parova, granu *Clostridium*. Druga grana, *Actinomyces* obuhvaća bakterije sa više od 50 % G + C (gvanin + citozin) parova u DNK molekuli (Leboš Pavunc, 2012).

### 2.2.1. Podjela BMK

BMK podijeljene su u dvije velike skupine, prvu koja sadrži porodice *Enterococcaceae* i *Streptococcaceae* te drugu skupinu koja sadrži porodice *Lactobacillaceae* i *Leuconostocaceae*. Rodovi bakterija mliječne kiseline su: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconoctoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* i *Bifidobacterium*.

- Rod *Lactobacillus*

Bakterije roda *Lactobacillus* spadaju u koljeno *Firmicutes*, red *Lactobacillales* i porodicu *Lactobacillaceae*. Bakterije ovog roda su Gram - pozitivne, nesporogene, katalaza - negativne te dolaze u obliku kuglica i štapića. Bakterije su kiselo – tolerantne te nastanjuju respiratorni i probavni sustav životinja i čovjeka. Od ukupno opisanih 150 različitih vrsta, bakterije se međusobno razlikuju obzirom na tip metabolizma, konfiguraciji proizvedene mliječne kiseline

i optimalne uvjete rasta. Prvoj skupini bakterija iz roda *Lactobacillus* pripadaju obligatno homofermentativni sojevi, drugoj fakultativno heterofermentativni sojevi, a trećoj skupini obligatni heterofermentativni sojevi koji fosfoketolaznim i pentoza - fosfatnim putem proizvode mliječnu kiselinu, acetat, etanol i ugljični dioksid (Canchaya i sur., 2006).

- Rod *Streptococcus*

Prema taksonomiji, rod *Streptococcus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Streptococcaceae*. Komercijalno najvažnija vrsta bakterije ove skupine je *S. thermophilus* koja se primjenjuje za proizvodnju jogurta i nekih vrsta sireva, samostalno ili uz bakterije *Lactobacillus* spp. *S. thermophilus* karakterizira bolja rezistentnost na temperaturu i veća sposobnost rasta i razmnožavanja pri temperaturi od 52 °C u odnosu na druge streptokoke i laktokoke te za razliku od njih, fermentira limitirani broj ugljikohidrata i ima slabu proteolitičku aktivnost (Hols i sur., 2005).

- Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* se taksonomski svrstava u koljeno *Firmicutes*, red *Lactobacillales* i porodicu *Leuconostocaceae*. 15 do sada opisanih vrsta definiraju se kao Gram – pozitivne, mezofilne (25 °C), heterofermentativne bakterije koje su nepokretne, fakultativno anaerobne i vankomicin – rezistentne. Oblik bakterija ovog roda uvjetovan je medijem na kojem rastu pri čemu bakterije mogu biti štapićaste ili tvore nakupine te u obliku kuglica ili tvore lance. Neke vrste leukonostoka imaju sposobnost tvorbe egzopolisaharida (EPS). Kako bi mogle rasti, bakterijama iz ovog roda potrebno je osigurati kompleksnu hranjivu podlogu koja sadrži vitamine B skupine, magnezij i mangan kao najvažnije minerale te širok spektar različitih aminokiselina (aspartanska, glutaminska, vanilin, cistein, itd.). U mljekarskoj industriji, bakterije roda *Leuconostoc* imaju veliku važnost zbog sposobnosti metabolizma citrata te se najčešće koriste vrsta *L. lactis* i dvije podvrste *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* i *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Osobito je važan leukonostok *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* koji proizvodeći diacetil metabolizmom citrata, doprinosi specifičnoj aromi fermentiranog mlijeka. Obje podvrste leukonostoka mogu se koristiti kao dopunska kultura u proizvodnji jogurta ukoliko potrošači favoriziraju okus po diacetilu (Hemme i sur., 2004).

- Rod *Enterococcus*

Prema taksonomiji, enterokoki pripadaju koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Enterococcaceae*. Rod *Enterococcus* kojem pripada 40 do sada opisanih vrsta, spada u Gram -

pozitivne bakterije s niskim mol postotnim udjelom G + C u DNK molekuli, a filogenetski su najbližiji rodovima *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* i *Aerococcus*. Nadalje, opisani su kao fakultativno anaerobni i katalaza - negativni organizmi, iznimno su toplinski – tolerantni (preživljavaju zagrijavanje medija na oko 60 °C/ 30 min), otporni na isušivanje i dezinfekcijska sredstva. Rastu na temperaturama između 10 i 45 °C i u mediju pH-vrijednosti između 4.0 i 9.6. Odlikuje ih otpornost na relativno visoke koncentracije soli (6.5 %) te hidroliziraju eskulin (kumarinski glukozid) u prisutnosti 40 % žučnih soli. Osim navedenog, enterokoke karakterizira proteolitička aktivnost koja je veća u odnosu na druge BMK, imaju sposobnost razgradnje mliječne masti esterazama te citratnim metabolizmom proizvode aromatske spojeve poput diacetila, acetoina i acetaldehida. Morfološki se enterokoki razlikuju kao diplokoki koji dolaze u parovima ili kratkim lancima. Za mljekarsku industriju su važni određeni sojevi vrsta *E. faecium* i *E. faecalis* koji se koriste kao dodatak kulturi u proizvodnji sireva te kao komercijalni probiotički pripravci u prevenciji i liječenju probavnih tegoba ljudi (Samaržija, 2015d).

- Rod *Lactococcus*

Taksonomski, rod *Lactococcus* pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici s *Streptococcaceae* (Samaržija, 2015d). Laktokoki pripadaju skupini Gram – pozitivnih, kuglastih bakterija koje su nepokretne i koje homofermentativnim metabolizmom iz glukoze proizvode isključivo L (+) mliječnu kiselinu. Laktokoki preživljavaju na različitim staništima poput površine biljaka i životinjske kože te se mogu izolirati iz sirovog mlijeka u koje su dospjeli kontaminacijom iz okoliša ili opreme tijekom mužnje (Casalta i Montel, 2008). Rod *Lactococcus* čine sedam opisanih vrsta bakterija *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. fujiensis* i *L. chungangensis* od kojih je za mljekarstvo i industriju najbitnija vrsta *Lactococcus lactis* (Kelly i sur., 2010).

- Rod *Pediococcus*

Rod *Pediococcus* taksonomski pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici s *Lactobacillaceae* (Samaržija, 2015d). Pediokoki su Gram – pozitivne, nepokretne, oksidaza i katalaza negativne kuglaste bakterije koje po vrsti metabolizma spadaju u fakultativne homofermentativne BMK. Neke vrste ovog roda podnose ekstremne okolišne uvjete poput visokih temperatura, ekstremnih pH vrijednosti i visokih koncentracija NaCl. Pediokoki su do sada izolirani iz biljaka, različitih vrsta fermentiranih namirnica te se pojavljuju kao kontaminanti u proizvodnji piva (Aspri, 2017).

- Rod *Bifidobacterium*

Taksonomski, rod *Bifidobacterium* pripada koljenu *Actinobacteria*, redu *Bifidobacteriales* i porodici *Bifidobacteriaceae*. Do sada je opisano više od 40 različitih vrsta bifidobakterija humanog (10 vrsta) i životinjskog podrijetla (17 vrsta), onih izoliranih iz otpadnih voda (2 vrste) i fermentiranog mlijeka (1 vrsta) (Masco i sur., 2004). Bifidobakterije pripadaju Gram – pozitivnim, striktno anaerobnim, nepokretnim, nesporogenim, katalaza – negativnim bakterijama s visokim udjelom G + C (42 – 67 %) regija u DNK (Martinez i sur., 2013). Osim navedenog, tipično stanište bakterija ovog roda je gastrointestinalni trakt (GIT) i feces čovjeka i životinja (Lee i O'Sullivan, 2010.)

### 2.2.2 BMK izolirane iz mlijeka i mliječnih proizvoda

U sirovom se mlijeku različitih muznih životinja može pronaći široki spektar mikroorganizama koji uključuju kvasce, plijesni i bakterije, od kojih se BMK, smatraju dominantnom mikroflorom mlijeka jer jedine mogu iskoristavati laktozu u procesu fermentacije (Ogier i sur., 2002). Obzirom da posjeduju iznimni biotehnološki potencijal i mogućnost provedbe učinkovitih biotransformacija važnih za mljekarsku industriju, BMK izolirane iz sirovog mlijeka predmet su brojnih istraživanja (Leisner i sur., 1999). Spomenuti mikroorganizmi se u mliječnoj industriji najčešće koriste kao definirane i specifične kulture za provedbu kontroliranih fermentacija i dobivanja ujednačenog proizvoda. Mliječna industrija neprestano zahtjeva otkrivanje novih, stabilnih sojeva, njihovu karakterizaciju i skladištenje kako bi se tim sojevima obogatile postojeće mliječne kulture i dobili poboljšani/ novi fermentirani mliječni proizvodi. Obzirom da su BMK koje se koriste u tu svrhu prisutne u mlijeku različitih muznih životinja, ono postaje prirodni okoliš za pronalazak novih sojeva i obogaćivanje zbirki (Aziz i sur., 2009). Nadalje, osim u mlijeku muznih životinja, različite vrste mikroorganizama, posebice BMK, mogu se pronaći i u mliječnim proizvodima dobivenim tradicionalnom proizvodnjom (Wang i sur., 2016). Istraženo je da u mnogim dijelovima svijeta, poput Turske, Afrike, Italije, Mongolije, Irana i Maroka, tradicionalni fermentirani mliječni proizvodi predstavljaju stanište brojnim i raznolikim mikrobnim vrstama (Mathara i sur. 2004; Gurses i Erdogan, 2006; Azadnia i Khan Nazer, 2009; Ouadghiri i sur., 2009; Takeda i sur., 2013; Losio i sur., 2014). U regijama na zapadu Unutrašnje Mongolije, lokalno stanovništvo je očuvalo načine tradicionalne proizvodnje mliječnih proizvoda, bez dodatka starter kultura, iz kravljeg,

kozjeg, konjskog i devinog mlijeka te na taj način omogućilo očuvanje BMK kao autohtone mikroflore u takvim proizvodima (Rhee i sur., 2011).

U istraživanju Aziz i sur. (2009) određena je prisutnosti BMK izoliranih iz tri različita uzorka mlijeka, sirovog kravljeg, bivoljeg i ovčjeg. Postotak mliječnih izolata BMK bio je najveći u kravljem mlijeku (75 %), potom u bivoljem (68 %) te 55 % u ovčjem mlijeku. Otkriveno je da bivolje mlijeko sadrži pet vrsta BMK *Lactobacillus acidophilus* (25 %), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (21 %), *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (21 %), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (19 %), i *S. thermophilus* (14 %). Iz uzorka kravljeg mlijeka su izolirane i identificirane četiri vrste *S. thermophilus* (34 %), *L. lactis* ssp. *lactis* (28 %), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (28 %) i *L. lactis* ssp. *cremoris* (10 %). Iz ovčjeg mlijeka su izolirani *L. lactis* ssp. *lactis* (36 %), *L. lactis* ssp. *cremoris* (32 %), *L. acidophilus* (22 %) i *Leuconostoc* spp. (10 %). *L. lactis* ssp. *lactis* i *L. lactis* ssp. *cremoris* su izolati uobičajeni za sva tri vrsta mlijeka dok je *Leuconostoc* spp. specifičan za ovčje mlijeko. Prema navedenom se zaključuje da kravlje mlijeko pretežito sadrži jogurtne starter kulture, ovčje mlijeko starter kulture za proizvodnju sira, a bivolje za proizvodnju maslaca (Aziz i sur., 2009). Nadalje, tijekom godina provođenja različitih studija, utvrđeno je da u ovčjem mlijeku prevladavaju rodovi BMK *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc* (Chanos i Williams, 2011; Iranmanesh i Ezzathpanah, 2015), a prema novom istraživanju Diasa i sur. (2019) iz ovčjeg mlijeka podrijetlom iz Brazila su uspješno izolirani sojevi *Lactococcus lactis* MRS1, *L. lactis* MRS2, *L. lactis* MRS5, *L. lactis* MRS6 i *E. faecalis* M173. Nakon provedenih testova utvrđeno je da sojevi pronalaze potencijalnu primjenu kao dodaci ovčjim mliječnim proizvodima u obliku starter kultura ili pomoćnih kultura u proizvodnji sira.

Prema novijem istraživanju da Silva i sur. (2019) utvrđeno je da BMK izolirane iz sirovog mlijeka muzne životinje, mogu posjedovati i probiotički potencijal za kojeg je poznato da se manifestira kroz poboljšanje ravnoteže prirodne mikrobiote u GIT-u domaćina (Hill i sur., 2014). Cilj spomenutog istraživanja bio je odrediti sigurnost i probiotički potencijal BMK izoliranih iz uzorka kozjeg mlijeka iz Brazila. Izolirani sojevi BMK bili su sigurni obzirom na ispitivane parametre (prisutnost čimbenika virulencije) te su posjedovali karakteristike poželjne za probiotičke sojeve. Među njima su se isticali *L. plantarum* (DF60Mi) i *L. lactis* (DF04Mi) koji najbolje preživljavaju u simuliranim uvjetima GIT-a, posjeduju antimikrobnu aktivnost prema bakteriji *Listeria monocytogenes*, te je kod soja DF60Mi dokazana mogućnost proizvodnje EPS-a, što je jedna od karakteristika probiotičkog soja. Nadalje, izolati *L. lactis*

subsp. *lactis* LS2 i *L. lactis* subsp. *lactis* DF4Mi pokazali su antimikrobnu aktivnost prema *Streptococcus mutans* ATCC 25175 koji predstavlja najčešćeg uzročnika karijesa kod ljudi.

U posljednjih nekoliko godina znanost se sve više zanima za magareće mlijeko koje obiluje na nutrijentima i funkcionalnim sastojcima te se obzirom na sličnost s humanim mlijekom može koristiti kao zamjenska hrana dojenčadi s alergijama i intolerancijom na hranu (Mansueto i sur., 2013). Iako magareće mlijeko ne sadrži veliki broj bakterija u odnosu na druge muzne životinje, do sada je iz njega uspješno izolirano 191 soj BMK (Danków et al., 2011). Među njima se ističu *L. mesenteroides* (45 %), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (19 %), *Lactococcus garviae* (7 %), *L. lactis* ssp. *lactis* (8 %), *Streptococcus parauberis* (16 %) i *E. faecium* (6 %) (An i sur., 2004). Kako bi se bolje istražila mikrobiota magarećeg mlijeka, Soto del Rio i sur. (2016) su u svojem istraživanju korištenjem RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction) metode u kombinaciji s 16S rDNK sekvencioniranjem ispitivali mikrobnu raznolikost magarećeg mlijeka s nekoliko farmi u sjeverozapadnoj Italiji. Najčešći sojevi BMK pronađeni u mlijeku su *Lactobacillus paracasei* (34 %), *L. lactis* (29.9 %) i *Carnobacterium maltaromaticum* (9.7 %). BMK koje su izolirane u manjem broju pripadaju rodovima *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Streptococcus*. Osim BMK, iz uzoraka mlijeka izoliran je kvasac *Kluyveromyces marxianus*. *L. paracasei* obično se nalazi u siru gdje uglavnom sudjeluje u procesu zrenja zbog svojih proteolitičkih i lipolitičkih aktivnosti. Soj *L. paracasei* je već ranije uspješno izoliran iz magarećeg mlijeka te je podvrgnut testiranju na prisutne bakteriocine (ribosomski sintetizirane antimikrobne peptide koji pokazuju letalno djelovanje prema sojevima bakterija različitim od soja producenta) kako bi se ubuduće mogao komercijalno koristiti u prehrambenoj industriji. Djelovanju bakteriocina su potom izloženi klinički patogeni te je utvrđeno da prema sojevima *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, i *Pseudomonas aeruginosa*, bakteriocini pokazuju maksimalnu inhibicijsku aktivnost (Ashokkumar i sur., 2011). Različiti sojevi, koji pripadaju rodu *Lactobacillus*, mogu se koristiti kao probiotici u proizvodnji fermentiranih napitaka iz magarećeg mlijeka, što je i istraženo na sojevima *L. rhamnosus* i *L. casei* izoliranim iz sira (Chiavari i sur., 2005). Osim toga, sojevi *L. acidophilus* i *L. casei*, koji nisu izolirani iz magarećeg mlijeka, a pokazuju fementativnu i antioksidativnu aktivnost, mogu se primijeniti kao dodaci jogurtu od magarećeg mlijeka koji se takav deklarira kao nova hrana (Perna i sur., 2015). Nadalje, u spomenutom istraživanju Soto del Rio i sur. (2016), druga najbrojnija skupina BMK je *L. lactis* koja do sada nije ni jednom izolirana iz magarećeg mlijeka, a redovito se pronalazi u mlijeku ostali muznih životinja poput krave, ovce, koze, bika te u humanom mlijeku



(Quigley i sur., 2013). Bakterija *C. maltaromaticum*, treća vrsta BMK po zastupljenosti u magarećem mlijeku u ovom istraživanju, do sada je najčešće izolirana iz mekih sireva. Riječ je o sporoacidificirajućoj BMK koja se koristi za biokonzerviranje mesnih i ribljih proizvoda (Afzal i sur., 2010).

Nadalje, u istraživanju Murua i sur. (2013) iz mlijeka magarice su izolirane BMK te podvrgnute fiziološkim, biokemijskim i molekularnim metodama kako bi se pronašli sojevi s potencijalnim povoljnim karakteristikama. Izolat s najvećim potencijalom za proizvodnju bakteriocina je bio *L. plantarum* LP08AD. Bakteriocin LP08AD pokazao se učinkovitim protiv viabilnih i rastućih stanica patogena *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium* i *Lactobacillus curvatus*. Osim ispitivanja prisutnosti antimikrobnih supstanci, soj je podvrgnut testu autoagregacije koja se smatra pozitivnim svojstvom probiotičkih sojeva u borbi protiv patogena. Autoagregacija *L. plantarum* LP08AD iznosila je 36 do 65 %, a sposobnost agregacije sa stanicama patogena 33 – 55 % (*L. monocytogenes* 603), 38 – 65 % (*L. monocytogenes* 703) i 45 – 96 % (*E. faecium* ET05). Nadalje, soj *L. plantarum* LP08AD je pokazao dobar rast u MRS hranjivoj podlozi pri pH vrijednostima 5.0, 6.0, 7.0 i 9.0. te prisutnosti žučnih soli koncentracije manje od 0.8 %. Obzirom da soj također nije pokazao rezistentnost prema ispitivanim antibioticima, temeljem navedenih rezultata, zaključeno je da se potencijalno može primjenjivati u dizajnu funkcionalne hrane, kao probiotik, te u primjeni metoda biokonzerviranja.

U istraživanju An i sur. (2004) uspoređena je mikrobiota sirovog kobiljeg mlijeka i chigeea (fermentirani proizvod dobiven od nepasteriziranog kobiljeg mlijeka, tradicionalnim postupkom, karakterističnog za područja u Unutrašnjoj Mongoliji). Uspješno je izolirano 117 sojeva iz chigeea i 191 soj iz kobiljeg mlijeka te ih se klasificiralo u 6, odnosno 10 grupa na temelju proteinskog profila dobivenog SDS - poliakrilamidnom gel elektroforezom. Reprezentativni izolati iz svih grupa su identificirani primjenom 16S rDNK sekvencioniranja. Chigeee sadrži sojeve *L. plantarum* (48 %), *Lactobacillus pentosus* (33 %) i *L. lactis* ssp. *cremoris* (19 %) dok su izolati iz kobiljeg mlijeka pretežito kuglaste bakterija vrsta *L. mesenteroides* (45 %), *L. pseudomesenteroides* (19 %), *L. garvieae* (7 %), *L. lactis* ssp. *lactis* (8 %), *S. parauberis* (16 %) i *E. faecium* (6 %). U istraživanju je dokazano da se mikroflora u chigeeu razlikuje u odnosu na mikrofloru sirovog kobiljeg mlijeka. Nadalje, novije istraživanje Mulyawati i sur. (2019) imalo je cilj odrediti raznolikost BMK prisutnih u uzorcima fermentiranog kobiljeg mlijeka iz triju regija u Indoneziji - Dompu, Bima i Sumbawa primjenom PCR – RFLP (Restriction Fagment Length Polymorphism) analize. Ukupno 41

izolat bakterija svrstan je unutar 10 klastera od kojih su 3 klastera određena kao BMK roda *Lactobacillus*: vrsta *L. plantarum* i dva soja vrste *L. rhamnosus*. Istraživanje je pokazalo kako se izolati BMK međusobno razlikuju ovisno o regiji iz koje su uzorci fermentiranih proizvoda uzeti, uslijed različitog nutritivnog sastava uzoraka, a osobito sadržaja laktoze (Abdel - Salam i sur., 2010). Osim toga, uvjeti skladištenja i pakiranja uzoraka mlijeka također mogu doprinijeti različitom broju prisutnih BMK. Primijećeno je da se jedino u uzorcima iz regija Bima i Dompu mogu pronaći izolati BMK, pri čemu je uzorak mlijeka iz regije Dompu bio bogatiji izolatima vrste *L. rhamnosus*.

Osim spomenutog kobiljeg i mlijeka magarice, mlijeko ostalih neuobičajenih muznih životinja također može poslužiti kao izvor BMK s različitim biotehnoškim potencijalom. U istraživanju Amara i sur. (2019) novoizolirani sojevi roda *Lactobacillus* iz fermentiranog mlijeka alžirske deve i kobile podvrgnuti su *in vitro* ispitivanju kako bi se ustanovio njihov probiotički i lipolitički potencijal. Lipolitički potencijal može se iskoristiti u svrhu smanjenja razine kolesterola u krvi konzumenta i prevencije bolesti krvožilnog sustava. Naime, neke su studije pokazale da fermentirano devino i kobilje mlijeko ima nizak sadržaj kolesterola (Pieszka i sur., 2016) koji je posljedica sastava mlijeka i njegove bakterijske mikroflore (Kamal i Salama, 2009). Obzirom da je ta mikroflora sastavljena pretežito od BMK koje imaju sposobnost redukcije lipida u krvi (Mansoub, 2010), ovo je istraživanje usmjereno prema identifikaciji takvih sojeva koji se mogu upotrijebiti kao probiotici ukoliko zadovolje potrebne uvjete. Do sada su već uspješno izolirani potencijalni probiotički sojevi iz devinog (Abdel Gader i Alhaider, 2016) i kobiljeg mlijeka (Jastrzębska i sur., 2017) koji mogu konkurirati komercijalnim probioticima te u odnosu na njih biti učinkovitiji i povoljniji. U radu Amara i sur. (2019), od ukupno 88 izolata iz različitih fermentiranih proizvoda spomenutih vrsta mlijeka, tri soja (NSC10, NSC5C i JUMIII4) vrste *L. plantarum* su pokazala najbolji probiotički i lipolitički kapacitet u *in vitro* uvjetima. Soj NSC5c izoliran iz devinog mlijeka pokazao je najbolje preživljavanje u simuliranim uvjetima GIT-a, u inhibiciji patogenih mikroorganizama te je bio uspješan u razlaganju prirodnih i sintetičkih lipida. Soj je uspješno reducirao *in vitro* kolesterol za 54 % i trigliceride za 80 %. Karakteristike ovog soja se dalje moraju istraživati u *in vivo* uvjetima, u životinjskim modelima ili kliničkim studijama, kako bi se bolje ispitaio njihov mehanizam redukcije lipida i omogućila njihova primjena kao probiotika.

Osim u navedenom istraživanju, sirovo devino mlijeko i njegovi fermentirani proizvodi su i ranije bili predmetom nekoliko znanstvenih radova, posebice jer predstavljaju izvor potencijalnih probiotičkih sojeva. Među najčešće pronađenim sojevima BMK se ističu rodovi

*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus* (Abushelaibi i sur., 2017). Maurad i Meriem (2008.) su iz tradicionalnog devinog maslaca izolirali dva soja bakterije *L. plantarum* (SH12 i SH24) koji se koriste kao starteri za fermentaciju devinog mlijeka i koji kao takvi pokazuju nekoliko poželjnih karakteristika: brzu acidifikaciju proizvoda, proteolitičku aktivnost, antibakterijsku aktivnost i visoki stupanj preživljavanja nakon procesa zamrzavanja i sušenja. Nadalje, u studiji Khedid i sur. (2009) otkriveno je da sirovo marokansko devino mlijeko obiluje sojevima BMK poput *L. lactis* subsp. *lactis* (17.5 %), *Lactobacillus helveticus* (10 %), *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (9.20 %), *L. casei* subsp. *casei* (5.80 %) i *L. plantarum* (5 %). U nešto novijem istraživanju (Hamed i Elattar, 2013), iz sirovog mlijeka egipatskih deva uspješno su izolirani sojevi BMK vrsta *E. faecium* (7 izolata), *Enterococcus durans* (1 izolat), *Aerococcus viridians* (1 izolat), *L. lactis* (1 izolat) i *L. plantarum* (1 izolat) koji su pokazali antimikrobnu aktivnost prema patogenima *S. typhi* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922 i *Vibrio fluvialis*; rezistenciju prema kiselom sadržaju želuca (pH 3) i toleranciju prema 0.3 % žučnim solima. Ni jedan soj nije bio hemolitički aktivan. Benmechernene i sur. (2013) izolirali dva su soja *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (B7 and Z8) iz alžirskog devinog mlijeka koji su pokazivali probiotički potencijal u *in vitro* uvjetima. Dobro su preživljavali pri niskom pH (2 - 3, 4) u prisutnosti 0.5, 1.0, 2.0 % otopine žučnih soli te pri pH 3 u prisutnosti 3 mg/ mL pepsina. Oba su soja pokazivala antimikrobnu aktivnost prema patogenim mikroorganizmima *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* i *Staphylococcus aureus*. U radu Abbas i Mahasneh (2014), identificira su 34 izolata iz svježeg i fermentiranog devinog mlijeka iz Jordana: *L. paracasei* ssp *paracasei* (41 %), *L. plantarum* (23 %), *L. rhamnosus* (18 %), *Lactobacillus fermentum* (12 %) i *Lactobacillus brevis* (6 %), a svi su sojevi pokazivali probiotičke karakteristike u *in vitro* uvjetima.

Nadovezujući se na spomenuto da su tradicionalni mliječni fermentirani proizvodi izvor autohtonih mikrobnih kultura, u radu Azat i sur. (2016), BMK izoliranim iz tradicionalnog fermentiranog Xinjiang sira, istraživao se probiotički potencijal i moguća primjena kao starter kultura. Šest sojeva BMK izoliranih iz tradicionalnog sira uključivalo je *L. rhamnosus* (1 soj), *L. helveticus* (1 soj) i *Enterococcus hirae* (4 soja) od kojih su svi pokazivali toleranciju na kiseli sadržaj GIT-a i žučne soli. Među njima se po poželjnoj antimikrobnoj, autoagregacijskoj i hidrofobnoj aktivnosti isticao soj *L. rhamnosus* R4. Antimikrobna aktivnost ispitivala se na kontrolnim sojevima patogena *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* *L. monocytogenes* i *E. faecalis*. Autoagregacijska sposobnost soja upućuje na mogućnost njegove adhezije za epitelne stanice i površinsku sluz u GIT-u što je odlika probiotičkog soja (Dunne i sur., 2001). Nadalje,

hidrofobnost, kao značajka površine bakterijske stanice, upućuje na njenu sposobnost da se veže na stanice domaćina pri čemu je u kompetitivnoj prednosti pred autohtonom mikrobiotom, a što joj omogućuje opstanak u humanom GIT-u (Schillinger i sur., 2005). Soj je također bio u mogućnosti razgraditi kolesterol i trigliceride s uspješnošću od 50.97 %, odnosno 28.92 %. Kako bi se istražio utjecaj odabranog soja *L. rhamnosus* R4 na zdravlje domaćina, kao *in vivo* model je korišten crv *Caenorhabditis elegans*. Modelni organizam hranjen s BMK pokazao je značajne razlike u odnosu na onaj hranjen s *E. coli* OP50 kao negativnom kontrolom. Životni vijek crva hranjenog s *L. rhamnosus* R4 produžen je za 36.1 %. Istraživanje je dokazalo funkcionalne karakteristike probiotičkih sojeva izoliranih iz Xinjiang sira i njihovu potencijalnu primjenu kao starter kultura u mliječnoj industriji.

Zanirati i sur. (2015) istraživali su mikrobiotu tradicionalnog brazilskog kefir koji bi se mogla koristiti kao starter kultura za proizvodnju standardiziranog komercijalnog kefir. Kefir potječe s Kavkaza, a tradicionalno se dobiva iz kefirnih zrnaca (mikrobna populacija bakterija i kvasaca povezana u polisaharidni matriks) mješovitom fermentacijom pri čemu kao jedan od produkata nastaje etanol (Lopitz - Otsoa i sur., 2006). Ovaj se fermentirani proizvod može nazvati funkcionalnom hranom zbog poznatog pozitivnog učinka na zdravlje čovjeka (Guzel - Seydim i sur., 2011). Tradicionalni brazilski kefir se proizvodi inkubiranjem kefirnih zrnaca u mlijeku ili otopini smeđeg šećera što doprinosi raznolikosti mikrobiološkog sastava spomenutog proizvoda. Općenito, kefirna zrnca sadrže rodove bakterija *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Acetobacter* te kvasce roda *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulospira*, *Kazachstania*, *Lachancea* i *Yarrowia* (Gulitz i sur., 2011). Obzirom na navedene činjenice, Zanirati i sur. (2015) su izolirali BMK iz osam uzoraka tradicionalno proizvedenog kefir s različitih lokacija u Brazilu kako bi izdvojili bakterije roda *Lactobacillus* s poželjnim *in vitro* probiotičkim karakteristikama. U uzorcima kefir pronađena su 108 izolata podijeljenih u 11 vrsta temeljem sekvencioniranja 16S rRNK, koji pripadaju rodovima *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Oenococcus*. Vrste *L. mesenteroides*, *Lactobacillus kefir* i *Lactobacillus kefirianofaciens* izolirane su iz kefir pripremljenog u kravljem mlijeku dok su vrste *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus parafarraginis*, *Lactobacillus diolivorans* i *Oenococcus oeni* izolirane iz kefir pripremljenog u otopini smeđeg šećera. 52 izolata roda *Lactobacillus* podvrgnuta su testovima preživljavanja u želučanom soku i otopini žučnih soli, antagonizma prema patogenima, antimikrobne otpornosti i mogućnosti hidrofobnog vezanja na površine u GIT-u prilikom čega su se sojevi *L. kefirianofaciens* 8U, *L. diolivorans* 1Z i *L. casei*

17U pokazali najuspješnijima. Navedeni sojevi imaju probiotički potencijal i mogućnost primjene kao starter kultura u industrijsko proizvodnji kefira u Brazilu.

Osim u sirovom kravljem mlijeku (Aziz i sur., 2009), različite vrste BMK mogu se pronaći i u tradicionalnim fermentiranim mliječnim proizvodima proizvedenim iz kravljeg mlijeka. U istraživanju Wanga i sur. (2016), primjenom klasičnih metoda i 16S rRNK analize gena otkriveni su sojevi BMK prisutni u tradicionalnim proizvodima kravljeg mlijeka, huruudu i urumu, koji potječu iz regija Unutarnje Mongolije. Iz 66 proizvoda uzorkovanih iz 13 različitih mjesta, izolirana su 202 soja BMK podijeljenih u rodove *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Najdominantnije vrste u mikrobioti fermentiranih proizvoda bile su *L. lactis* subsp. *lactis* (32.18 %), *L. plantarum* (12.38 %) i *L. mesenteroides* (11.39 %). Na osnovu rezultata kvantitativne PCR metode utvrđeno je da se brojnost istih vrsta BMK međusobno razlikuje između uzoraka mliječnih proizvoda. To je objašnjeno činjenicom da se mikrobiota fermentiranih proizvoda razlikuje zbog jedinstvenih načina njihove proizvodnje u pojedinom domaćinstvu te zbog razlika u sastavu prirodno prisutnih startera u mlijeku. Kako je navedeno u zaključku istraživanja, dobiveni rezultati mogu doprinijeti razumijevanju raznolikosti BMK u tradicionalnim mliječnim proizvodima te poslužiti kao izvor informacija za buduća istraživanja usmjerena prema području probiotika i starter kultura.

## 2.3. BMK KAO STARTER KULTURE

BMK se danas najčešće koriste kao starter kulture za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda, mesa, povrća i žitarica u industrijskom mjerilu, u kontroliranim i standardiziranim postupcima. Osim kontroliranih fermentacija uobičajenih za prehrambenu industriju, veliki broj prehrambenih proizvoda se dobiva spontanom fermentacijom pomoću autohtonih BMK, koje su dio mikroflore sirovine i koje konačnom proizvodu daju specifične karakteristike (Wouters i sur., 2002; Topisirović i sur., 2006, Frece i sur., 2014). Obzirom da je sastav autohtone mikroflore raznolik, a rast uvjetovan okolišnim uvjetima, dobiveni fermentirani proizvodi nemaju standardiziranu kvalitetu koja bi se dobila primjenom komercijalnih starter kultura. S druge strane, primjenom komercijalnih starter kultura, dobivaju se proizvodi ujednačene kvalitete i senzorskih karakteristika, no dolazi do gubitka onih poželjnih svojstava koji bi se dobili tradicionalnom proizvodnjom (Babić i sur., 2011; Frece i sur., 2014; Palavecino Prpich i sur., 2015). Moguće rješenje bi bila izolacija BMK iz autohtone mikroflore prirodno fermentiranih proizvoda, koja bi se koristila kao autohtona starter kultura u kontroliranim fermentacijama te jamčila željenu kvalitetu fermentiranog proizvoda uz očuvanje karakteristika svojstvenih za tradicionalnu proizvodnju (González i sur., 2007). Takvi prirodni izolati BMK iz spontano fermentiranih proizvoda, nakon fenotipske i genotipske karakterizacije, mogu poslužiti kao specifične starter kulture i izvori potencijalnih antimikrobnih metabolita (Topisirović i sur., 2006).

### 2.3.1. Starter kulture

Starter kulture se definiraju kao mikrobiološki pripravci koji sadrže barem jednu vrstu mikroorganizama, a koje dodatkom u sirovinu, ubrzavaju i upravljaju procesom fermentacije s ciljem proizvodnje fermentirane hrane (Franciosa i sur., 2018). Skupina bakterija koje se najčešće primjenjuje u takvim procesima su BMK sa svojom dugom tradicijom u proizvodnji fermentirane hrane. BMK zakiseljavaju sirovinu u procesu fermentacije proizvodnjom mliječne kiseline, a svojim nusproizvodima metabolizma poput octene kiseline, etanola, komponenata arome (slobodne aminokiseline, masne kiseline i peptidi), bakteriocina, EPS-a te proizvodnjom važnih enzima, produljuju rok trajanja proizvedene namirnice, čine ju mikrobiološki sigurnom, upotpunjuju njenu teksturu i doprinose njenom željenom senzornom profilu (Leroy i Vuyst, 2004). Obzirom da se upotrebom starter kultura, osigurava higijenska sigurnost konačnog



proizvoda, proces sazrijevanja postaje standardiziran, kvaliteta proizvoda poboljšana, a njegov rok trajanja produljen (Frece i Markov, 2017), BMK se nameću kao logičan odabir za starter kulture u specifičnim proizvodnim procesima. Sojevi sa željenim metaboličkim i fiziološkim karakteristikama, a koji bi se primjenjivali kao starteri, mogu biti izolirani iz prirodnog staništa ili uspješno fermentiranih proizvoda (Leroy i Vuyst, 2004). Osim BMK, kao starter kulture se mogu koristiti kvasci i plijesni što ovisi o vrsti proizvodnje i fermentiranom proizvodu. Prilikom selekcije sojeva za starter kulturu, treba odabrati one sojeve koji ne sadrže nepoželjne karakteristike poput proizvodnje ugljičnog dioksida, biogenih amina, mikotoksina, itd. (Frece i sur., 2010a; Markov i sur., 2013). Jedna od najvažnijih karakteristika starter kultura je mogućnost kolonizacije okoline i natjecanje s autohtonom mikrobiotom sirovine, dominacija u mikrobnoj populaciji te proizvodnja mikrobnih metabolita koji će spriječiti rast i opstanak autohtone mikrobiote u uvjetima fermentacije (Frece i sur., 2014; Palavecino Prpich i sur., 2015). Nadalje, vrlo bitna uloga starter kultura je inaktivacija patogena i mikroorganizama kvarenja uslijed proizvodnje kiselina i bakteriocina. Na taj način proizvedena fermentirana hrana ostaje zdravstveno ispravna i sigurna (Frece i Markov, 2017). U Tablici 4 prikazani su osnovni kriteriji koje odabrani soj treba zadovoljiti kako bi postao starter kulturom.

Kako je već ranije spomenuto, najveći potencijal kao starter kulture imaju oni mikroorganizmi izolirani i selekcionirani iz autohtone mikrobiote (autohtone starter kulture) jer su, zbog prirodne dominacije u tradicionalnom fermentacijskom procesu, već prilagođeni na mikrouvjete u proizvodu, tehnološkom procesu i tehnološkim parametrima svojstvenima za proizvodnju specifičnog proizvoda. Nadalje, takvi mikroorganizmi imaju veći metabolički kapacitet koji doprinosi kvaliteti i sigurnosti proizvoda te specifičnim senzorskim karakteristikama (boji, teksturi, mirisu i okusu) (Frece i Markov, 2017). Glavne prednosti primjene autohtone starter kulture prikazani su u Tablici 5.

**Tablica 4:** Opći kriteriji za izbor starter kulture (Šušković i sur., 2001; Frece i sur., 2010b)

Kriteriji odabira	
Sigurnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Starter mikroorganizam ne smije imati patogeno i toksično djelovanje</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Priprava starter kultura mora biti provedena pod strogo kontroliranim aseptičnim uvjetima</li> </ul>
Tehnološke karakteristike	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Starter mikroorganizam mora dominirati pred autohtonom mikrobiotom</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Starter mikroorganizam provodi specifičnu metaboličku aktivnost</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tijekom tehnološkog postupka proizvodnje starter kultura ne smije doći do kontaminacije</li> </ul>
Ekonomičnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uzgoj starter kultura mora biti lako izvediv s ekonomske točke gledišta</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Čuvanje starter kultura može biti provedeno metodama smrzavanja ili liofilizacije s minimalnim gubitkom metaboličke aktivnosti kulture</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Važna svojstva starter kultura moraju biti stabilna pod definiranim uvjetima čuvanja kroz nekoliko mjeseci</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rukovanje starter kulturama mora biti olakšano koliko god je moguće</li> </ul>



**Tablica 5:** Prednosti primjene autohtonih starter kultura (Frece i sur., 2011)

Prednosti primjene autohtonih starter kultura
1. Produljenje roka trajanja proizvoda proizvodnjom antimikrobnih metabolita (mliječne kiseline, octene kiseline, diacetila, vodikovog peroksida, bakteriocina) što omogućuje biokonzerviranje i redukciju u primjeni aditiva
2. Formiranje željene arome, boje i teksture proizvoda
3. Skraćivanje vremena zrenja
4. Uz upotrebu funkcionalne starter kulture doprinose kvaliteti proizvoda što daje funkcionalnu hranu
5. Dominantna je i prilagođena rastu na proizvodnoj sirovini obzirom da je iz nje izolirana
6. Omogućuje dobivanje tradicionalnog proizvoda karakteristične arome i poboljšanih karakteristika

### 2.3.2. Izvor autohtonih starter kultura

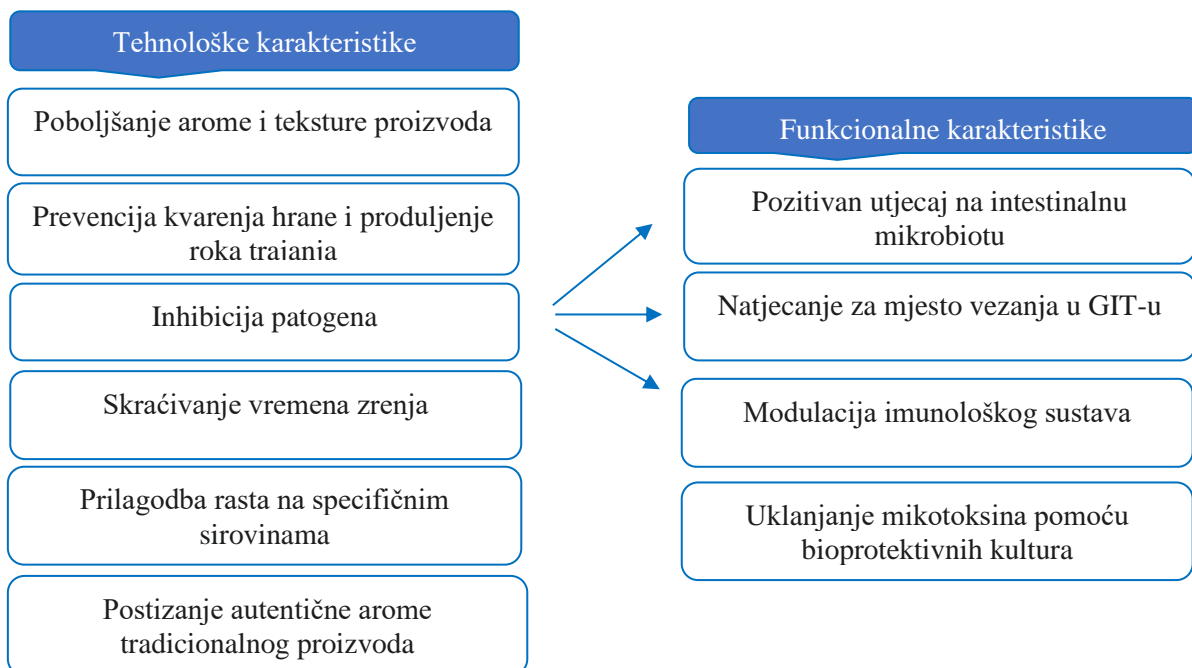
Ako se orijentiramo na mliječnu industriju, brojna tradicionalna fermentirana mlijeka postaju izvor autohtone mikroflore koja se može upotrijebiti kao starter kultura za komercijalnu proizvodnju istih bez gubitaka željenih karakteristika proizvoda. Brojni radovi spomenuti u prethodnom poglavlju poput onog Dias i sur. (2019), Azat i sur. (2016) te Zanirata i sur. (2014), bavili su se identifikacijom BMK iz fermentiranih mliječnih proizvoda s potencijalnom primjenom u području razvoja starter kultura. Tradicionalno proizvedeni svježi sir je visokovrijedan izvor BMK koje predstavljaju lokalnu i geografski specifičnu mikrobiotu, a koja doprinosi karakterističnom okusu i teksturi sira pojedine regije. Ukoliko se takva kultura izolira iz autohtonog sira proizvedenog u skladu s lokalnom tradicijom, bez dodanih starter kultura, dobiva se osnova za selekciju novih sojeva za razvoj autohtone starter kulture (Piraino i sur., 2008). U istraživanju Leboš Pavunc i sur. (2012), od 15 sojeva BMK izoliranih iz tri vrste autohtonog svježeg sira iz Prigorja u Hrvatskoj, dva soja s visokim stupnjem acidifikacije i proteolitičke aktivnosti su identificirana kao *L. fermentum* A8 i *E. faecium* A7. Nakon primjene sojeva za proizvodnju svježeg sira, dokazano je da sir proizveden pomoću kombinacije izoliranih sojeva i komercijalnih starter kultura, ima senzorske karakteristike slične siru proizvedenom tradicionalnom spontanom fermentacijom. Nakon desetodnevnog skladištenja, senzorske su karakteristike sira ostale nepromijenjene čime je dokazano da autohtoni sojevi

imaju veliki potencijal za poboljšanje okusa industrijski proizvedenog sira u kontroliranim uvjetima.

### 2.3.3. Funkcionalne starter kulture

Veliki izazov prehrambene industrije je pronaći način kako osigurati da hrana bude svježija, sigurna, ukusna, niskog udjela šećera, masti i soli bez dodataka aditiva, koji s jedne strane štite hranu od kvarenja i poboljšavaju joj organoleptička svojstva, a s druge strane su neprihvaćeni jer ih se smatra opasnima i neprirodnima. Nadalje, kako bi se zadovoljilo zahtjevno tržište koje sve više pažnje posvećuje odnosu između prehrane i zdravlja, danas je dostupna takozvana funkcionalna hrana, koja svojim karakteristikama dovodi do poboljšanja zdravlja potrošača (Nutrition Business Journal, 2002). U području proizvodnje fermentirane hrane, navedeno je moguće postići upotrebom starter kultura čija se svojstva mogu unaprijediti razumijevanjem genetike i metabolizma industrijskih mikroorganizama u sastavu kultura, te primjenom metoda molekularne biologije kojima bi se omogućila ekspresija poželjnih i supresija nepoželjnih karakteristika startera (Leroy i Vuyst, 2004). Funkcionalne starter kulture se definiraju kao starteri koji posjeduju barem jedno funkcionalno svojstvo koje poboljšava kvalitetu fermentirane namirnice, a putem kojeg se direktno pozitivno utječe na zdravlje i fiziologiju korisnika takvog proizvoda (Leroy i Vuyst., 2004; Frece i sur., 2011). Inherentno funkcionalno svojstvo kulture može pridonijeti sigurnosti hrane ili povoljno utjecati na jednu ili više senzorskih, tehnoloških, hranjivih i zdravstvenih osobina fermentirane namirnice. Ako se pažljivom selekcijom, u formi starter kulture ili kokulture, implementira soj s poželjnim svojstvima, na kraju fermentacijskog procesa može se dobiti namirnica specifičnih karakteristika kojoj su u potpunosti očuvane prirodne i zdravstvene vrijednosti. Inherentna funkcionalna svojstva BMK prvenstveno se odnose na proizvodnju antimikrobnih supstanci, polimera šećera, zaslađivača, aromatskih spojeva i visokovrijednih enzima te nutraceutika i promotora zdravlja. Funkcionalna starter kultura u užem smislu odnosi se na onu kulturu koja može zamijeniti primjenu neželjenih kemijskih dodatka hrani proizvodnjom prirodnih spojeva, a da se istovremeno očuva atraktivnost proizvoda za potrošača. S druge strane, funkcionalna starter kultura u širem smislu sadrži probiotičke BMK za koje je poznato da djeluju pozitivno na intestinalnu mikrobiotu potrošača, a time i na njegovo zdravlje (Florou - Paneri i sur., 2013).

Kod izbora sojeva u sastavu funkcionalnih starter kultura, odabiru se BMK koje proizvode antimikrobne supstance poput organskih kiselina (mliječna, octena, mravlja, maslačna, kapronska), ugljičnog dioksida, vodikovog peroksida, diacetila, etanola, bakteriocina, reuterina i reutericiklina (Samaržija, 2015e). Osim navedenog, za mikroorganizme u sastavu funkcionalnih starter kultura poželjno je da doprinose razvoju boje proizvoda, skraćuju vrijeme zrenja te imaju probiotički učinak (Leroy i Vuyst, 2004). Konkretno, u proizvodnji mliječnih proizvoda zanimljive su i funkcionalne kulture sastavljene od bakterijskih sojeva koje antimikrobne supstance proizvode i nakon završene fermentacije, čime se kontrolira rast specifičnih patogena poput *Listeria* spp. ili enteroinvazivnih sojeva *E. coli*. Pored toga što proizvode antimikrobne spojeve nakon fermentacije, takvi su sojevi pokazali i dobro preživljavanje u uvjetima GIT-a (Shah, 2007). Autohtona funkcionalna starter kultura u odnosu na komercijalnu starter kulturu, pruža dodatnu funkcionalnost (blagotvorni učinak na probavnu mikrobiotu, imunomodulacijski učinak, itd.) fermentiranom proizvodu te omogućuje poboljšani i optimiziran način proizvodnje ukusnije, sigurnije i zdravije hrane koja sadrži osobine tradicionalnog proizvoda. Kao što je i ranije spomenuto, tradicionalno fermentirana hrana različitog podrijetla može poslužiti kao izvor novih sojeva za uspostavu autohtonih funkcionalnih starter kultura (Frece i Markov, 2017). Na Slici 5 je prikazano na koji način autohtona funkcionalna starter kultura utječe na proizvodnju funkcionalne fermentirane hrane te na koji način tehnološke karakteristike utječu na funkcionalne karakteristike hrane.



**Slika 5:** Uloga autohtone funkcionalne starter kulture u poboljšanju tehnoloških i funkcionalnih karakteristika fermentirane hrane (Frece i sur., 2011)

#### 2.3.4. Uloga i primjena funkcionalnih starter kultura

Na prvom mjestu, funkcionalne starter kulture omogućuju konzerviranje i sigurnost hrane. Kemijski aditivi poput nitrita, sulfita, propionske kiseline, sorbinske kiseline i benzojeve kiseline mogu biti zamijenjeni s antimikrobnim proizvodima metabolizma BMK koje se primjenjuju u formi startera. Od spomenutih antimikrobnih metabolita BMK, octena kiselina osim što doprinosi aromi fermentiranog proizvoda, sprječava razvoj plijesni (Leroy i Vuyst, 2004). Bakteriocini su ribosomski - sintetizirani peptidi koji pokazuju aktivnost protiv vlastitih producenata ili bakterija pronađenih u sličnim okolišnim uvjetima (Drider i sur., 2006). *In situ* proizvodnja bakteriocina može rezultirati povećanjem kompetencijske moći producenta bakteriocina u hranjivom matriksu što dovodi do prevencije kvarenja proizvedene namirnice djelovanjem patogena *Clostridium botulinum*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*. Sojevi BMK, producenti bakteriocina, se mogu koristiti kao alternativa kalijevom nitratu koji prevenira kasno kvarenje sira uzrokovano bakterijama roda *Clostridium*. Reuterin ( $\beta$  - hidroksipropionaldehid), kojeg proizvodi *Lactobacillus reuteri*, pokazuje aktivnost prema širokom spektru bakterija, plijesni i kvasaca, ali se ne može nakupljati u većoj koncentraciji ukoliko su u okolini mikroorganizma prisutni šećeri. Reutericin je antibiotik kojeg također proizvodi ista vrsta bakterije, a za kojeg se vjeruje da je odgovoran za stabilnost kiselog tijesta. Nadalje, fenillaktične i 4 – hidroksifenillaktične kiseline koju proizvode *L. plantarum* sojevi, dokazano dovode do prevencije razvoja gljivica u kiselom tijestu. Soj *L. plantarum* MiLAB 393, osim fenillaktične kiseline, proizvodi i ciklične dipeptide koji također imaju antifungalno djelovanje. Kaproična kiselina se također pokazala djelotvornom protiv plijesni, a proizvodi ju BMK *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 (Leroy i Vuyst, 2004).

Kako bi se dobila željena tekstura i okus jogurta, u mlijeko se prije proizvodnje često dodaje obrano mlijeko u prahu ili sirutka. Iako kupci ovakav način proizvodnje ne smatraju neprirodnim, dodatak navedenih sastojaka povećava troškove proizvodnje fermentiranog mlijeka. Umjesto toga, česta praksa je bila dodatak ksantana, želatine ili mikrobnih polisaharida koji bi povećavali viskoznost i čvrstoću jogurta, doprinosili njegovoj teksturi i okusu, posebice kod proizvodnje varijanta jogurta sa smanjenim udjelom masnoće (Harvey i McNeil, 1998). Obzirom da su ksantan i želatina često bili kemijski modificirani, postali su neprihvaćeni kao aditivi u mliječnim proizvodima te su u nekoliko europskih zemalja i zakonski zabranjeni. U svrhu toga, istražena je moguća primjena *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* te *S. thermophilus*, kao egzopolisaharid – producirajućih sojeva direktno prilikom fermentacije namirnice. Takvi

se starteri primjenjuju u mliječnoj industriji te u industriji pekarskih proizvoda, a sojevi s navedenom primjenom mogu se izolirati iz različitih vrsta fermentiranih mliječnih proizvoda, povrća i žitarica. Drugi primjer BMK koje doprinose teksturi namirnice su amilaza – producirajući sojevi koji proizvode termostabilnu amilazu, a koja prilikom fermentacije žitarica, osobito u tehnologiji kiselog tijesta, sprječava pojavu ustajalog kruha (Leroy i Vuyst, 2004).

BMK tijekom proizvodnje fermentirane hrane doprinose njenoj aromi i okusu koja potječe od proizvedene mliječne kiseline i aromatskih spojeva nastalih biokonverzijom iz aminokiselina. U proizvodnji sira, u fazi njegova zrenja, ključnu ulogu imaju peptidaze (*L. lactis* subsp. *cremoris*) koje poboljšavaju njegovu senzorsku kvalitetu. Prilikom mliječne fermentacije nastali piruvat može biti prekursor za brojne metabolite poput acetata, etanola, diacetila i acetaldehida, a koji daju specifičan okus raznim fermentiranim proizvodima kao što su kefir, kiselo tijesto, maslac, mlaćenica i jogurt (Kleerebezem i sur., 2000; Guldfeldt i sur., 2001; van Kranenburg i sur., 2002). Optimizacijom fermentacije te metaboličkim inženjerstvom radne kulture, omogućena je prekomjerna produkciju željenih metabolita u svrhu proizvodnje namirnice definirane senzorske kvalitete (Leroy i Vuyst, 2004). Primjeri takve manipulacije povećana su proizvodnja diacetila pomoću soja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* u mlaćenici, preusmjeravanjem katabolizma piruvata (Kleerebezem i sur., 2000) te veća produkcija acetaldehida uz pomoć soja *S. thermophilus* u fermentiranom mlijeku (Chaves i sur., 2002).

Obzirom na visoke sanitarne zahtjeve, pojava bakteriofaga je nepoželjna prilikom proizvodnje fermentiranih mlijeka što se može izbjeći korištenjem prikladnog medija, rotacijom starter kulture i upotrebom sojeva rezistentnih na djelovanje faga. Rezistencija na bakteriofage može biti posljedica prirodnog mehanizma (upotreba restriktivnih i modificirajućih enzima) ili prevencije intracelularnog razvoja faga putem njegove adsorpcije i abortivne infekcije (Leroy i Vuyst, 2004). U mljekarskoj industriji izvori infekcije bakteriofazima su sirovo mlijeko, toplinski obrađeno mlijeko, svi dodaci fermentiranog mlijeka, kultura za fermentaciju, zrak i sve dodirne površine u pogonu. Kultura sama po sebi može biti izvor bakteriofaga ukoliko je u njen kromosom ugrađen njegov nasljedni materijal koji se onda neprestano replicira zajedno s bakterijskim kromosomom. Nadalje, stalno precjepljivanje kulture u mlijeko može dovesti do zamjene ugrađenog faga s novim virulentnim mutantom. Isto tako, na tržištu nije dostupna ni jedna kultura za koju se može sa sigurnošću reći da je fag – rezistentna jer se takva prvotna otpornost može izgubiti dugotrajnom upotrebom kulture. Prilikom replikacije, stanice kćeri

često gube poželjne tehnološke karakteristike koje imaju stanice majke te u ovom slučaju postaju podložne infekciji fagom. U posljednjih nekoliko godina pokazalo se da fag – infekcije zahvaćaju i veliki broj probiotičkih sojeva vrsta *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* i *L. plantarum*. Selekcija kultura rezistentnih na fag – infekciju se pokazala relativno učinkovitom za mješovite kulture u kojim postoje minimalno dva bakterijska soja koja provode fermentaciju te ukoliko dođe do infekcije jednog, drugi bakterijski soj može nastaviti fermentirati sirovinu iako takva fermentirana namirnica neće imati kvalitetu istovjetnu onoj da do infekcije nije došlo (Garneau i Moineau, 2011).

U mljekarskoj industriji, kod proizvodnje jogurta, nakon završene fermentacije, kiselost proizvoda se kreće između pH 4.2 i 4.5. Naknadno zakiseljavanje prilikom skladištenja proizvoda je nepoželjno jer ono dovodi do razvoja kiselog i gorkog okusa. Takva je pojava zabilježena upotrebom soja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Kako bi se soj i dalje mogao koristiti kao starter kultura, bilo je potrebno stvoriti mutanta koji može rasti jedino u zajednici s bakterijom *S. thermophilus* pri čemu ona preuzima ulogu fermentacije laktoze u mliječnu kiselinu, a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* osigurava poželjne karakteristike konačnog proizvoda (Samaržija, 2015e).

Kako bi započeo proces sazrijevanja sira, potrebno je odabrati adekvatne sojeve BMK kao starter kulture koje će imati sposobnost proizvodnje ključnih aromatskih spojeva, a koji nastaju djelovanjem endogenih enzima mlijeka te proteolitičkom i lipolitičkom aktivnošću odabranih sojeva. Obzirom da sazrijevanje zahtjeva puno vremena, proces se može ubrzati dodatkom egzogenih enzima (proizvodnja enzimski modificiranog sira) koji autoliziraju odabrane BMK te dolazi do otpuštanja intracelularnih peptidaza koje skraćuju vrijeme zrenja. Osim toga, bakteriocini također mogu uzrokovati bakteriolizu, indukcijom autolizina, čime se degradira stanična stijenka i otpušta sadržaja stanice u matriks (Leroy i Vuyst, 2004).

Nutraceutici su hranjivi sastojci koji putem specifične fiziološke aktivnosti doprinose zdravlju potrošača te su poželjan sastojak funkcionalne hrane. Nutraceutici su proizvodi metabolizma bakterija za koje je poželjno da se nalaze u sastavu funkcionalnih starter kultura. Pažljivom selekcijom sojeva i optimizacijom procesa proizvodnje, moguće je modificirati metabolizam BMK da proizvode povećanu količinu nutraceutika u fermentiranoj namirnici (Leroy i Vuyst, 2004). Primjer BMK koje se koriste kao starteri u mliječnoj industriji, su one koje proizvode velike koncentracije niskokaloričnih poliola (nutraceutik), zamjenu za šećer u fermentiranom mlijeku (Wisselink i sur., 2002). Nadalje, BMK koje proizvode oligosaharide točno određene strukture i duljine lanca, mogu se primjenjivati kao funkcionalni starteri jer takvim sastojcima

čine namirnicu niskokaloričnom, bogatom vlaknima i doprinose njenom probiotičkom učinku. Također, jogurtne kulture poput *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. thermophilus* imaju sposobnost proizvodnje folne kiseline koja se smatra nutraceutikom (Leroy i Vuyst, 2004).

Kao funkcionalne starter kulture su također poželjne one BMK koje svojom aktivnošću mogu uklanjati toksične i antinutritivne sastojke iz fermentiranog mlijeka, poput laktoze i galaktoze, a koje mogu uzrokovati intoleranciju kod potrošača i neželjenu akumulaciju (Wouters i sur., 2002). Također postoje sojevi BMK koji uklanjaju oligosaharide iz soje, poput rafinoze, koja može dovesti do problema s probavom; proteinaza iz žitarica koje sprječavaju normalnu probavu; fitinske kiseline i tanina iz žitarica i mahunarki kako bi se povećala dostupnost minerala u namirnici; prirodnih toksina poput endogenih glukozyda iz manioke te biogenih amina iz tradicionalne fermentirane hrane (Leroy i Vuyst, 2004).



## 2.4. BMK KAO PROBIOTICI

U svijetu u kojem je hrana pretežito procesirana, velika se pozornost usmjerava na njen sastav i sigurnost. Od hrane se očekuje da bude nutritivno bogata, ali i učinkovita za zdravlje i prevenciju bolesti. Kvaliteta hrane je izrazito bitna kako bi se spriječila pojava trovanja, pretilosti, alergija, kardiovaskularnih bolesti i raka koji se smatra kugom 21. stoljeća (Markowiak i Slizewska, 2017). U skladu s navedenim, ne samo da raste potreba za primjenom starter kultura koje će osigurati ispravnost namirnice i njenu ujednačenu kvalitetu, već je potrebno primjenjivati funkcionalne startere koji će proizvodnjom funkcionalne hrane prevenirati štetne posljedice neadekvatne prehrane i unaprjeđivati zdravlje potrošača. Skupina funkcionalnih startera od interesa su spomenute probiotičke kulture koje se koriste u hrani i mliječnim proizvodima više od stotinu godina. Nedavno je porastao interes prema probioticima u svrhu prevencije, ublažavanja i liječenja suvremenih bolesti poput nekrozivnog kolitisa dojenčadi do hipertenzije u odraslih osoba (Bernardo i sur., 2013; Khalesi i sur., 2014).

Definicija probiotika se mijenjala kroz nekoliko desetljeća te je konačno uspostavljena 2001. godine od strane FAO (Food and Agriculture Organization)/ WHO (World Health Organization). Prema toj definiciji, probiotici su živi organizmi koji primijenjeni u adekvatnoj količini, doprinose zdravlju domaćina (FAO/ WHO, 2001). Prema ovoj definiciji, karakteristika probiotika smatra se specifičnošću pojedinog soja, stoga se njegove osobine moraju jasno i nedvosmisleno definirati te se ne smiju ekstrapolirati na druge sojeve, pripadnike iste vrste ili roda. Nužno je znanstveno dokazati učinak pružanja dobrobiti probiotika na zdravlje domaćina, ali taj učinak ne smije biti povezan s ni jednim specifičnim mehanizmom djelovanja (Markowiak i Slizewska, 2017). Probiotički koncept odnosi se na hranu i farmaceutske pripravke koji se primjenjuju u svrhu promocije zdravlja različitih organskih sustava u domaćinu poput GIT-a, respiratornog sustava, kože, krvi i spolnih organa. Kad se govori o primijeni probiotika, ona se ne odnosi samo na oralnu primjenu već uključuje druge načine unosa probiotika i njegovu površinsku aplikaciju. Osim toga, mikroorganizam koji se primjenjuje kao probiotik mora biti isključivo viabilan i ne smiju se u koncept ubrajati mrtve stanice i njihovi dijelovi (Hill i sur., 2014).



#### 2.4.1. Kriteriji odabira probiotičkih sojeva

Prema preporuci WHO, FAO i EFA (European Food Safety Authority), prilikom postupka selekcije soja kao probiotika, moraju biti zadovoljeni kriteriji sigurnosti, funkcionalnosti i tehnološke uporabljivosti soja (Tablica 6). Sigurnost soja određena je njegovim podrijetlom, nepovezanošću s patogenim kulturama i antibiotskom rezistencijom. Funkcionalne karakteristike odnose se na preživljavanje soja u GIT-u te njegov imunomodulacijski učinak na domaćina. Nadalje, probiotički sojevi moraju preživjeti uvijete koji vladaju prilikom proizvodnog procesa u kojem se primjenjuju te moraju ostati stabilni prilikom skladištenja i transporta (Lee i sur., 2009). Probiotički soj mora imati definiran i dokazan povoljan učinak na zdravlje domaćina koji mora biti u skladu s osobinama soja predstavljenog tržištu. Također, radovi i studije koje dokumentiraju karakteristike jednog probiotičkog soja, ne smiju biti korištene za predstavljanje drugog probiotičkog soja. Isto tako, studije koje dokumentiraju učinak definirane količine jednog probiotičkog soja, nisu dokaz sličnih karakteristika istog soja primijenjenog u drugačijoj dozi. Nadalje, treba voditi brigu o karakteristikama nosača ili matriksa probiotičkog soja koji može utjecati na njegove osobine i viabilnost stanica (Sanders i sur., 2007, 2014)

**Tablica 6:** Seleksijski kriteriji odabira probiotičkog soja (FAO, 2002; EFSA, 2005)

KRITERIJ ODABIRA	TRAŽENA SVOJSTVA
Sigurnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humano ili životinjsko podrijetlo</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Izolacija iz GIT zdravih pojedinaca</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Povijest sigurne primjene</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Precizna dijagnostička identifikacija (fenotipska i genotipska istraživanja)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odsutnost podataka koji povezuju soj s infektivnim bolestima</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odsutnost sposobnosti razgradnje žučnih soli</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odsutnost štetnih učinaka</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odsutnost gena za rezistenciju na antibiotike lokalizirane u nestabilnim elementima</li> </ul>
Funkcionalnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respektabilna kompeticija s autohtonom mikrobiotom u crijevnom ekosustavu</li> </ul>

Funkcionalnost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sposobnost preživljavanja, održavanja metaboličke aktivnosti i rasta na ciljanom mjestu</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Otpornost na enzime i žučne soli</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Otpornost na kiselost želuca</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kompeticija u odnosu na mikrobne vrste koje inhibiraju crijevni ekosustav</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antagonizam prema patogenima (<i>H. pylori</i>, <i>Salmonella</i> sp., <i>L. monocytogenes</i>, <i>Clostridium difficile</i>)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Otpornost prema bakteriocinima i kiselinama intestinalne mikrobiote</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sposobnost kolonizacije na ciljanim mjestima u domaćinu i odgovarajuća stopa preživljavanja u GIT-u</li> </ul>
Tehnološka učinkovitost	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lagana proizvodnja velike količine biomase i visoka produktivnost kulture</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viabilnost i stabilnost poželjnih karakteristika probiotičkih sojeva tijekom procesa unaprjeđivanja, pripreme i distribucije probiotičkih proizvoda</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Visoka stopa preživljavanja prilikom skladištenja gotovog proizvoda u anaerobnim i mikroaerofilnim uvjetima</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Garancija željenih senzorskih karakteristika gotovog proizvoda (probiotik za prehrambenu industriju)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genetička stabilnost</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rezistentnost na bakteriofage</li> </ul>

## 2.4.2. Mikroorganizmi kao probiotički sojevi

Probiotički pripravci mogu sadržavati jedan ili više selekcioniranih mikrobnih sojeva, a oni za humanu upotrebu najčešće su BMK koje pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, i *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* (Simon, 2005). Ukoliko se primjenjuju za humanu i animalnu upotrebu, probiotici trebaju posjedovati GRAS status reguliran od strane FDA u SAD-u, odnosno status QPS (Qualified Presumption of Safety), u Europi reguliran putem EFSA (Gaggia i sur., 2010). U Tablici 7 su prikazani najčešći sojevi bakterija korišteni kao dodaci prehrani ili farmaceutski pripravci za humanu upotrebu.

**Tablica 7:** Humani probiotički mikroorganizmi (EFSA, 2017)

Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Ostale BMK	Ostali mikroorganizmi
<i>L. acidophilus</i> (a)			
<i>L. amylovorus</i> (b)	<i>B. adolescentis</i> (a)		
<i>L. casei</i> (a), (b)	<i>B. animalis</i> (a)	<i>Enterococcus faecium</i> (a)	<i>Bacillus clausii</i> (a)
<i>L. gasseri</i> (a)	<i>B. bifidum</i> (a)	<i>Lactococcus lactis</i> (b)	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. helveticus</i> (a)	<i>B. breve</i> (b)	<i>Streptococcus thermophilus</i> (a)	<i>Nissle 1917</i> (a)
<i>L. johnsonii</i> (b)	<i>B. infantis</i> (a)		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. plantarum</i> (b)	<i>B. longum</i> (a)		<i>(boulardi)</i> (a)
<i>L. reuteri</i> (a)			
<i>L. rhamnosus</i> (a),(b)			
<i>L. pentosus</i> (b)			

(a) Primjena kao farmaceutki proizvodi; (b) Primjena kao dodaci prehrani

### 2.4.3. Mehanizmi djelovanja probiotika

Probiotici posjeduju brojne funkcije kojima blagotvorno djeluju na ljudski organizam, među kojima je najvažnija održavanje i razvoj autohtone mikrobiote domaćina na način koji osigurava optimalnu ravnotežu između patogena i bakterija potrebnih za normalno funkcioniranje organizma (Oelschlaeger, 2010). Mikroorganizmi koji ispunjavaju potrebne kriterije za biokonzerviranje namirnica i primjenu u sklopu funkcionalne hrane, putem takve hrane obnavljaju crijevnu mikrobiotu narušenu terapijom antibioticima (Johnston i sur., 2006). Nadalje, još jedna aktivnost probiotika odnosi se na suzbijanje patogena koji su u tijelo uneseni putem okoliša i kontaminiranom hranom, a među kojima se ističu *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* te rodovi *Shigella*, *Staphylococcus* i *Yersinia* (Markowiak i Slizewska, 2017). Osim toga, u nekoliko je radova potvrđen pozitivan učinak probiotika na probavu, liječenje alergija na hranu (Heczko i sur., 2005; Thomas i Greer, 2010), liječenje kandidijaze (Kumar i sur., 2013) i dentalnog karijesa (Nase i sur., 2001). BMK vrste *L. plantarum*, *L. reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis*, i *Bifidobacterium pseudocatenulatum* proizvođači su vitamina B skupine što se smatra pozitivnim funkcionalnim svojstvom te je dokazano da oni povećavaju učinkovitost imunološkog sustava i pospješuju apsorpciju vitamina i minerala iz hrane (Nova i sur., 2007). Neki probiotički sojevi mogu proizvoditi visokovrijedne enzime poput esteraza, lipaza te koenzime A, Q, NAD i NADP, dok je za neke sojeve dokazano da njihovi metaboliti imaju antibiotsko, antikancerogeno i imunosupresivno djelovanje (Schellenberg i sur., 2006).

Pozitivne karakteristike koje potencijalni probiotički soj treba zadovoljiti, određeni na osnovu molekularnih i genetičkih studija, uključuju četiri mehanizma: antagonizam proizvodnjom antimikrobnih supstancija, kompeticija s patogenima za hranjive sastojke i mjesto vezanja na epitelno tkivo, imunomodulacijski učinak u domaćinu te inhibicija proizvodnje bakterijskih toksina (Markowiak i Slizewska, 2017). Prva dva mehanizma važna su za profilaksu (zaštita od opasnosti) i liječenje infekcija te održavanje mikrobiote domaćina. U skladu s tim, da bi obranili epitel od kolonizacije patogenima, većina probiotičkih sojeva ima sposobnost povezivanja u agregate i stvaranja zaštitne barijere prema neželjenim mikroorganizmima (Schachtsiek i sur., 2004). Bakterije iz roda *Lactobacillus* se protiv djelovanja patogena brane proizvodnjom različitih tipova bakteriocina i antibiotika (Oelschlaeger, 2010) dok one roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* proizvode derivate žučnih kiselina s jakim antibakterijskim djelovanjem (Begley i sur. 2006). Nadalje, ključna aktivnost probiotičkih mikroorganizama je adhezija za

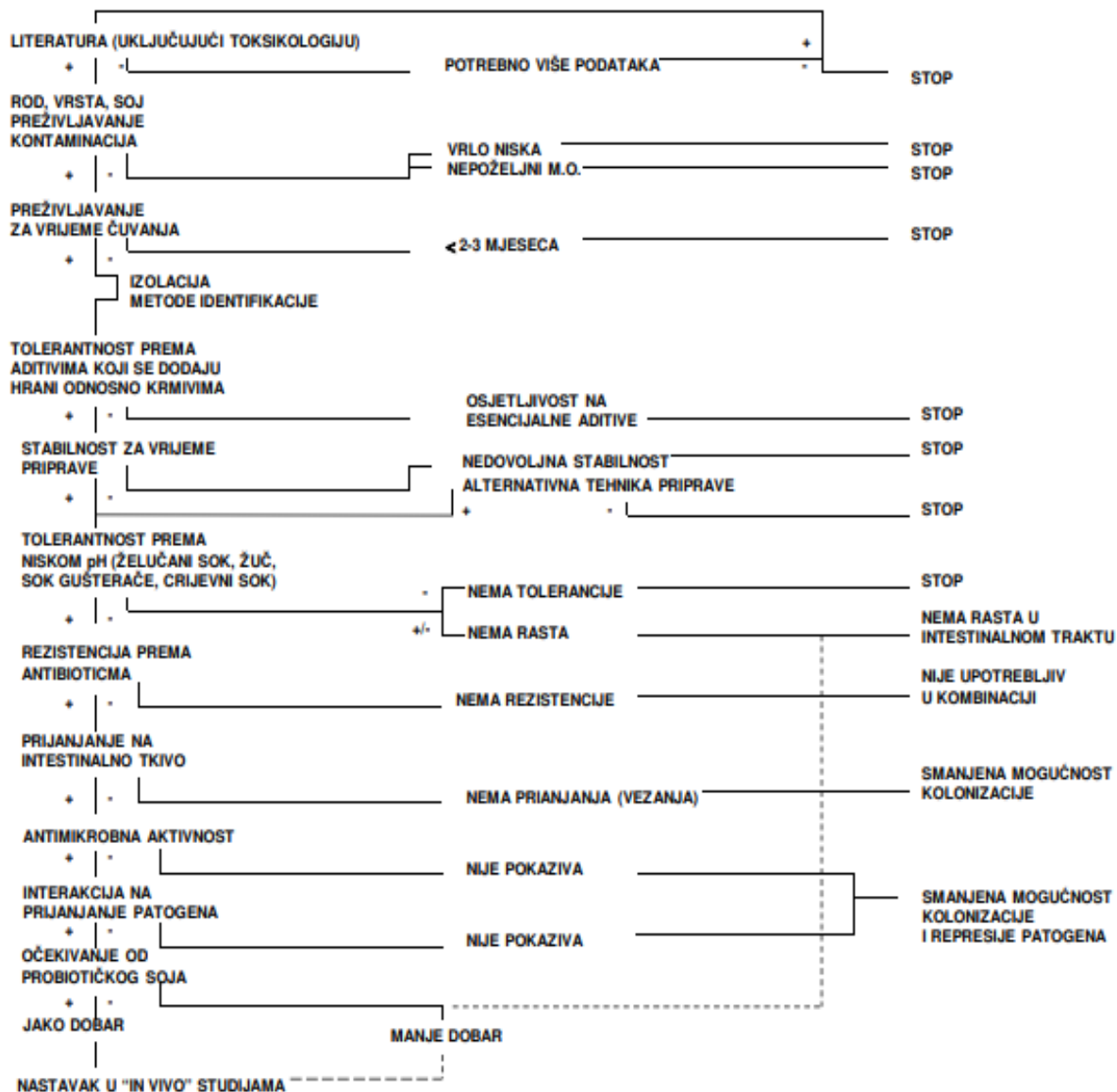
crijevni epitel, koja za posljedicu ima blokiranje patogena u kolonizaciji njihova mjesta djelovanja i imunomodulacijski učinak na organizam domaćina. Naime, ukoliko se preko epitelnih stanica koje su kolonizirali probiotici, otpuste određene komponente, one mogu direktno ili indirektno aktivirati stanice imunološkog sustava. Tako aktivirane stanice mogu pomoći u prevenciji i liječenju zaraznih bolesti i kroničnih upalnih procesa u GIT-u (Oelschlaeger, 2010). Imunomodulacijski učinak mikrobiote GIT-a te probiotičkih bakterija bazira se na tri fenomena: indukciji i održavanju stanja imunološke tolerancije na antigene iz okoliša, indukciji i upravljanju imunološkim reakcijama protiv patogena bakterijskog ili viralnog podrijetla te inhibiciji autoagresivnih i alergijskih reakcija (Borchers i sur., 2009). Probiotici putem vlastitih metabolita djeluju na urođeni i stečeni imunološki sustav. Za imunološki odgovor najbitnije stanice domaćina su epitelne i imunološke stanice crijeva. Nakon adhezije na epitelne stanice, stanična stijenka probiotičkih bakterija stimulira aktivnost makrofaga koji su sposobni, proizvodnjom slobodnih radikala kisika i lizosomskih enzima, uništiti nepoželjne mikrobe u mikrookolini. Nadalje, probiotici su sposobni, putem imunokompetentnih stanica GIT-a, potaknuti proizvodnju obrambenih citokina, stimulirati imunitet povećanom proizvodnjom imunoglobulina i gama - interferona te poboljšati aktivnost makrofaga i limfocita (Gill i sur., 2002; Oelschlaeger, 2010). Četvrti mehanizam se odnosi na obranu domaćina od bakterijskih toksina čija se proizvodnja inhibira ili se uklanjaju iz tijela domaćina ako su već proizvedeni. Kod odabira probiotičkih sojeva, poželjni su oni koji imaju sposobnost detoksifikacije (vezanje toksina za staničnu stijenku probiotika i smanjenje apsorpcije toksina u crijevima) ili inhibicije stvaranja toksina usporavanjem metaboličkih reakcija njihova stvaranja, a što je povezano sa stimulacijom puteva proizvodnje nativnih enzima, vitamina i antimikrobnih tvari (Markowiak i Slizewska, 2017).

Ukoliko njena aktivnost nije narušena, a zdravstveno stanje organizma je povoljno, autohtona mikrobiota GIT-a domaćina obavlja sve aktivnosti koje omogućavaju njegovo normalno funkcioniranje. Ona ima značajnu ulogu u metaboličkim procesima poput regulacije kolesterola, krvnog tlaka i metabolizma glukoze; uključena je u rad imunološkog sustava te doprinosi održavanju i razvoju svih organa i sustava (Khalesi i sur., 2014; Ruan i sur., 2015; Upadrasta, i Madempudi, 2016). Kako bi se prevenirali ili umanjili simptomi povezani s metaboličkim sustavom, a koji direktno utječu na pojavu kardiovaskularnih bolesti i kroničnih bolesti drugih organskih sustava, onda je nužno primijeniti terapiju probioticima putem koje se nutritivnim programiranjem manipulira i balansira kompozicija autohtone mikrobiote. Daljnje studije rade na tome da istraže mogućnost ciljanje i učinkovite upotrebe probiotika koji će

liječiti metaboličke poremećaje i unaprijediti opće zdravlje pacijenata (Upadrasta i Madempudi, 2016). Obzirom da je mala vjerojatnost da svaki soj okarakteriziran kao probiotik ima podjednako učinkovita sva četiri spomenuta mehanizma djelovanja, budućnost bioterapeutskih proizvoda temelji se na primjeni pripravaka koji sadrže različite kombinacije probiotičkih sojeva (Lima - Filho i sur., 2000).

#### 2.4.4. Mikroorganizmi kao potencijalni probiotici

Obzirom da postoji veliki medicinski i industrijski interes za pronalazak novih probiotičkih sojeva s pozitivnim utjecajem na zdravlje (Khan, 2014), potrebno je provesti istraživanja o sigurnosti upotrebe takvih sojeva, kao i o njihovim specifičnim osobinama zbog kojih ih se može nazvati funkcionalnima. Odabir probiotičkih sojeva temelji se na nizu *in vitro* istraživanja kako bi se odredila njihova željena svojstva koja bi soj manifestirao u *in vivo* uvjetima (Šušković i sur., 2009). Na Slici 6 je prikazan hodogram izbora sojeva BMK kao potencijalnih probiotika. Među prvim *in vitro* ispitivanjima je određivanje antimikrobnih karakteristika potencijalnog probiotika nakon čega slijede testovi na virulentnost i patogenost, rezistenciju na antibiotike, proizvodnju ekstracelularnih proteina (hemolizin i želatinaza), te ispitivanje prisutnosti površinskih proteina i agregacijskih supstanci (Vijava i sur., 2015; Padmavathi i sur., 2018). Nadalje, ispituje se sposobnost proizvodnje EPS-a koji omogućuju povezivanje bakterija u agregate, prepoznavanje i vezanje na crijevni epitel te samim time i njegovu kolonizaciju poželjnim probioticima (Saadat i sur., 2019). Osim toga, kako bi preživio u uvjetima GIT-a domaćina, uspješno kolonizirao njegov epitel i u takvim uvjetima ispoljio svoje funkcionalne karakteristike, potrebno je provesti istraživanje preživljavanja soja pri niskim vrijednostima pH u želucu i u prisutnosti žučnih soli. Ostali testovi odnose se na mogućnost potencijalnog soja pri snižavanju kolesterola u krvi domaćina, hidrolize žučnih soli, hemolitičkoj aktivnosti i preživljavanje fermentacijskih procesa (Vijaya i sur. 2015).



Slika 6: *In vitro* selekcija probiotičkih sojeva (Šušković, 1996)

## Sigurnosni aspekti

Prilikom odabira BMK kao potencijalnih probiotika, na prvom mjestu je potrebno da budu zadovoljeni sigurnosni kriteriji. Ispitivanjem osjetljivosti sojeva BMK na antibiotike dokazuje se da ne posjeduju gene za antibiotsku rezistenciju koje bi mogli prenijeti u genom patogenih bakterija prisutnih u njihovoj mikrookolini (de Almeida Júnior i sur. 2015). Osjetljivost sojeva BMK na antibiotike može se odrediti disk difuzijskom metodom prilagođenoj prema García-Hernándezu i sur. (2016). Osjetljivost se ispituje na komercijalne antibiotike: ampicilin (10 µg), kloramfenikol (30 µg), klindamicin (2 µg), gentamicin (10 µg) i tetraciklin (30 µg), odabrane prema preporukama Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA 2012). Kulture se inkubiraju na MRS agaru koji sadrži antibiotik, na optimalnoj temperaturi tijekom 18 do 24 h. Ukoliko se pojavi zona inhibicije, soj je osjetljiv, odnosno ako dođe do odsutnosti zone, soj je otporan na antibiotik. BMK sa zonom inhibicije  $\geq 15$  mm za gentamicin,  $\geq 18$  mm za kloramfenikol,  $\geq 19$  mm za tetraciklin te  $\geq 14$  mm za klindamicin i ampicilin smatraju se osjetljivima, a ako je zona inhibicije  $\geq 22$  mm za ispitivane antibiotike, onda su sojevi vrlo osjetljivi. Promjeri zone inhibicije interpretirani su prema smjernicama EUCAST-a (Europski odbor za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove) (2014).

Nadalje, određivanje hemolitičke aktivnosti smatra se jednim od preduvjeta za deklaraciju sojeva kao probiotika za kojeg se potvrđuje da je siguran za domaćina (FAO/ WHO, 2002). Bakterijski soj kojem se dokaže da ne provodi hidrolizu eritrocita domaćina te time i odsustvo virulencije, smatra se prikladnim za provedbu dodatnih istraživanja kao potencijalnog probiotika (Maragkoudakis i sur., 2009). Hemolitička aktivnost može se provesti primjenom BHI (Brain Heart Infusion) agara s 5 % defibrinirane ovčje krvi. Ispitivani sojevi se naciepljuju na navedene BHI ploče i inkubiraju na optimalnoj temperaturi. Nakon 48 do 72 h hemolitička aktivnost se detektira djelomičnom hidrolizom eritrocita i stvaranja zelene boje ( $\alpha$ -hemoliza) ili potpunom hidrolizom eritrocita čime se stvara čista zona oko kolonije bakterija ( $\beta$ -hemoliza), odnosno ne dolazi do reakcije.  $\beta$ -hemoliza se potvrđuje primjenom *S. aureus* ATCC23235 kao pozitivne kontrole (Eaton and Gasson, 2001).

Obzirom da patogeni mikroorganizmi najčešće ispoljavaju svoju virulentnost putem ekstracelularnih faktora, u svrhu određivanja potencijalne patogenosti provode se testovi za dokazivanje čestih virulentnih izvanstaničnih enzima poput elastaze, fibrinolizina,



hijaluronidaze, koagulaze, želatinaze i DNAze (Giwa, 2017). Najčešće se provode istraživanja na prisutnu želatinaznu i koagulaznu aktivnost koja se mora pokazati negativnom ukoliko se ispitivani soj primjenjuje kao probiotik (da Silva i sur., 2019). Ispitivanje želatinazne aktivnosti provodi se tako da se izolati BMK nanose pomoću mikrobiološke ušice u epruvete s hranjivom podlogom (5 g L<sup>-1</sup> peptona, 3 g L<sup>-1</sup> mesnog ekstrakta i 120 g L<sup>-1</sup> želatine) i inkubiraju na optimalnoj temperaturi tijekom 7 do 14 dana. Kako bi se odredila proizvodnja želatinaze, kultura se svakodnevno hladi na 4 °C 1 h te ukoliko podloga iz krutog prelazi u tekuće stanje (likvefakcija podloge koja se zadržava nakon hlađenja) dokazana je hidroliza želatine (dela Cruz i Torres 2012). Koagulaza test se provodi dodatkom 0.3 mL aerobno inkubiranih sojeva u MRS (Man, Rogosa i Sharpe) hranjivoj podlozi na 18 do 24 h pri optimalnoj temperaturi koji se sterilno naciepljuju u epruvete s 0.3 mL rekonstruirane zečje plazme. Sadržaj se inkubira na optimalnoj temperaturi tijekom 6 h (De Almeida Júnior i sur. 2015).

### **Funkcionalni aspekti**

Sljedeći kriterij koje probiotički soj mora zadovoljiti odnosi se na njegovu funkcionalnost u što se, između ostalog, ubraja i proizvodnja EPS. EPS su mikrobni ekscelularni sekundarni metaboliti koji se proizvode unutar stanica te iz nje izlučuju u obliku kapsule ili EPS biofilma (Donot i sur., 2012). Oni se sastoje od ponavljajućih jedinica monosaharida pričvršćenih za lipidni nosač te mogu biti povezani sa organskim ili anorganskim spojevima, lipidima, proteinima i metalnim ionima (Mishra i Jha, 2013). Uloge EPS su mnogobrojne. Omogućuje bakterijama producentima formiranje biofilma i prihvaćanje za površinu, njihovu prilagodbu na različite kemijske i fizikalne uvjete okoliša te posjeduje zaštitnu ulogu zbog velikog sadržaja vezane vode (Vu i sur., 2009; Donot i sur., 2012). Kao što je i spomenuto ranije, EPS predstavlja važnu karakteristiku probiotičkog soja jer mu olakšava kolonizaciju GIT-a domaćina. Ispitivanje proizvodnje EPS može se provesti prema Angmo i sur. (2016) uz sljedeće modifikacije: 1 % kulture BMK inkubira se u hranjivom MRS-u 24 h pri optimalnoj temperaturi te se potom dodaje u rekonstruirani medij (5 g obranog mlijeka u prahu, 1 g glukoze ili s 1 g saharoze). Prema izvornom postupku Angmo i sur. (2016), prekončna kultura nanosi se pomoću ušice na površinu podloge koja sadrži rutenijsko crveno mlijeko (Ruthenium Red Milk, RRM) sljedećeg sastava: 10 % w v<sup>-1</sup> obranog mlijeka u prahu, 1 % w v<sup>-1</sup> saharoze, 0.08 g L<sup>-1</sup> rutenija i 1.5 % w v<sup>-1</sup> agara). Cjelokupna smjesa se inkubira od 18 do 24 h na optimalnoj

temperaturi uz rotaciju pri 150 okr min<sup>-1</sup>. Nakon inkubacije, kulturu je potrebno centrifugirati pri 8000 x *g* tijekom 20 min na 4 °C uz prikupljanje supernatanta. U supernatant se potom u tri navrata dodaje 70 % - tni etanol uz inkubaciju pri 4 °C tijekom 15 h kako bi došlo do izdvajanja EPS. Izdvojeni EPS se prikuplja centrifugiranjem sadržaja pri 4000 x *g* tijekom 20 min i sušenjem na 50 °C.

Nadalje, zajednička karakteristika BMK roda *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, i *Streptococcus* je prisustvo proteolitičkih enzima koji predstavljaju važnu ulogu u opskrbi bakterija hranjivim tvarima (Juillard i sur., 2016). Većina BMK ne djeluje proteolitički osim u situacijama kad u okolišu nedostaju određeni nutrijenti i kada je njihova moć za sintezu aminokiselina vrlo niska (Tavares i sur. 2009). Nadalje, proteolitička je aktivnost poželjna u mliječnoj industriji jer omogućuje umnažanje BMK u mlijeku i proizvodnju sastojaka koji mliječnim proizvodima daju željeni okus (de Almeida Júnior i sur., 2015). S druge strane, takva aktivnost nije poželjna kod proizvodnje određenih vrsta sireva, poput mozzarelle, jer utječu na njihov sastav proteina i kapacitet otapanja sira (da Silva i sur., 2019). Stoga je bitno odrediti proteolitičku aktivnost BMK koji će se primjenjivati kao probiotici u starter kulturama te odrediti u kojim su proizvodnim procesima poželjni ili nepoželjni. Proteolitička aktivnost sojeva BMK ispituje se naciepljivanjem u hranjivu podlogu koja sadrži 1 % obranog mlijeka dodanog u standardiziranu PCA (Plate Count Agar) hranjivu podlogu (0.5 % peptona, 0.25 % kvašćevog ekstrakta, 0.1 % glukoze, 1.5 % agara) (Beerens et al. 1990). Podloga se inkubira na 7 °C tijekom 10 dana te na optimalnoj temperaturi u narednih 48 h. Pojava prozirnih zona indicira proteolitičku aktivnost.

Mogućnost autoagregacije BMK od iznimne je važnosti i povezuje se s adhezijskim kapacitetom sojeva kao mogućih probiotika. Naime, autoagregacija stanica probiotika povećava njihovu mogućnost vezanja za crijevni epitel te posljedično tomu omogućuje integraciju probiotika u autohtonu mikrobiotu GIT-a. Na taj se način štiti GIT domaćina putem imunomodulacijske aktivnosti i natjecanjem s patogenima za supstrat i mjesto vezanja (Xu i sur., 2010). Postupak ispitivanja autoagregacije provodi se tako da se svježe uzgojena kultura volumena 20 mL centrifugira pri 6000 x *g* tijekom 10 min pri sobnoj temperaturi (25 °C) nakon čega se talog stanica ispiru dva puta s fosfatnim puferom (PBS) pH 7.4. Sadržaj se potom ponovno resuspendira u istom puferu, a dobivenoj suspenziji se odredi apsorbancija na 600 nm u nultom satu i nakon 2 sata inkubacije pri optimalnoj temperaturi (Xu i sur., 2009). Postotak autoagregacije se računa prema izrazu:

$$\left(1 - \frac{A1}{A0}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

$A1$  = apsorbancija nakon 2 h inkubacije

$A0$  = apsorbancija u nultom satu

Antimikrobna aktivnost poželjna je karakteristika budućeg probiotika jer se manifestira kao natjecanje za supstrat s drugim mikroorganizmima te putem proizvodnje antimikrobnih metabolita poput bakteriocina, organskih kiselina i vodikovog peroksida (Collins i sur., 2010). Jedne od važnijih antimikrobnih supstanci su bakteriocini koji mogu djelovati kao kolonizirajući peptidi omogućujući dominaciju njihova producenta unutar populacije različitih vrsta bakterija, poput članova mikrobiote i neželjenih patogena GIT-a (Riley i sur., 2002). Osim toga, bakteriocini su poželjni u fermentiranoj hrani jer preuzimaju ulogu aditiva za koje je rečeno da su neprihvaćeni od strane potrošača (Ghanbari i Jami, 2013). Za određivanje antimikrobne aktivnosti ispitivanih sojeva može se primijeniti turbidimetrijska metoda na najčešće vrste patogena poput *E. coli*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* i *L. monocytogenes*. U jažice mikrotitarske pločice dodaje se 240  $\mu$ L supernatanta određenog bakterijskog izolata (prethodno uzgojena kultura se dva puta centrifugira u PBS puferu (6000 x *g* / 20 min) i 10  $\mu$ L test patogena prethodno uzgojenog u hranjivom bujonu (37 °C tijekom noći). Supernatant BMK se prethodno podesi na pH 6.5 sa sterilnim 1M NaOH kako bi se isključio inhibitorni učinak mliječne kiseline. Antimikrobno djelovanje supernatanta bakterijskih izolata na test patogene, tijekom 72 h uzgoja (2, 4, 6, 24, 48 i 72 h) pri optimalnoj temperaturi, određuje se spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepjen hranjivi bujon s test mikroorganizmom bez dodanog supernatanta bakterijskog izolata) i uzoraka s dodanim supernatantom bakterijskog izolata je mjera inhibicije rasta test mikroorganizma. Slijepo probe su uzorci pripremljeni bez dodatka mikroorganizama (Babić i sur., 2011). Stupanj inhibicije određuje se prema izrazu (Leboš i sur., 2008):

$$(\%) = (1 - A1) \cdot A0 \cdot 100 \quad (2)$$

$A1$  = apsorbancija uzorka

$A0$  = apsorbancija kontrole

Kako bi se potencijalni probiotički sojevi mogli primjenjivati u prehrambenoj industriji, za njih je bitno da mogu preživjeti ulazak u GIT gdje se izlažu intestinalnoj kiselini i žučnim solima. Osim toga, vrlo je bitno da sojevi prežive u adekvatnom broju kako bi mogli provesti navedene aktivnosti u novim okolišnim uvjetima (Chalas i sur., 2016). Prema navodu Shehat i sur. (2016), preživljavanje probiotika u kiselim uvjetima nije važno samo za podnošenje želučane kiseline, već i za primjenu kao dodataka fermentiranim namirnicama s niskom pH vrijednosti. Nadalje, prema istom navodu, tolerancija prema žučnim solima preduvjet je za kolonizaciju i metabolički doprinos probiotika u održavanju crijevne mikrobiote. Postupak preživljavanja u simuliranom soku želuca može se provesti na sljedeći način. Simulirani sok želuca pripremi se dodatkom pepsina ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) i podešavanjem pH pomoću 1M klorovodične kiseline. Mogu se pripremiti otopine različite pH vrijednosti u preporučenom rasponu od 1.5 do 3.0. U 3 mL pripremljenog simuliranog soka želuca dodaje se 1.5 mL suspenzije stanica BMK koja se inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, u alikvotu otopine se određuje broj živih BMK indirektnom metodom i izražava se kao CFU vrijednost prema jednadžbi (3). Ostatak suspenzije BMK u soku želuca se sačuva i koristi u daljnjem postupku. Nakon toga, u 3 mL prethodno pripremljene otopine koja simulira tanko crijevo (pankreatin ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) i žučne soli ( $1.5$  i  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  guste žuči) u 0.5 % otopini NaCl) podešene pH vrijednosti na 8, dodaje se 1.5 mL sačuvane suspenzije stanica BMK i inkubira se 3.5 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, određuje se broj živih BMK indirektnom metodom, i izražava se kao CFU vrijednost prema jednadžbi (3). Indirektna metoda određivanja broja živih stanica se provodi na sljedeći način. Pripremi se serija decimalnih razrjeđenja suspenzije u omjeru 1:10, a po 100  $\mu\text{L}$  suspenzije naciepljuje se na MRS agar u pločama. Nakon inkubacije naciepljenih podloga (24 h) se pomoću brojača kolonija određuje broj poraslih kolonija BMK, te izračunava CFU (Colony Forming Units) vrijednost prema jednadžbi (3) (Hajsig i Delaš, 2016).

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrijebljenog uzorka}} \cdot \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad (3)$$

### **Tehnološke karakteristike**

Jedan od uvjeta potencijalnog probiotičkog soja s aspekta tehnološke učinkovitosti je rezistentnost na bakteriofage. Osim u prirodnim ekosustavima, ovi bakterijski virusi su prisutni i u tehnološkim postrojenjima gdje inficiraju starter kulture BMK te time usporavaju i/ ili

zaustavljaju fermentacijske procese. Infekcija starter kulture bakteriofagom nastupa u različitim stupnjevima fermentacijskog procesa i rezultira blagom povećanju pH vrijednosti proizvoda ili gubitkom čitavih šarži. Prisutnosti bakteriofaga se najčešće uočava povećanjem pH vrijednosti proizvoda, mjerenjem visoke koncentracija laktoze te nedovoljne količine proizvedene mliječne kiseline. U mliječnoj industriji, infekcija bakteriofagom se najčešće događa putem površina u postrojenju i sirovog mlijeka te je dokazano da većina faga može preživjeti uvjete pasterizacije (Abedon, 2008). U autohtonoj mikrobioti sirovog i fermentiranog mlijeka, zbog rasta i metaboličke aktivnosti u prisutnosti bakteriofaga, razvili su se rezistentni i tolerantni sojevi BMK koji se koriste za uspostavu novih ili oplemenjivanje postojećih zbirki starter kultura (Carminati i sur., 2010). Prirodni mehanizmi obrane bakterija od virusa su inhibicija adsorpcije faga, sprječavanje injekcije virusne DNK, restrikcijski/ modifikacijski mehanizmi te CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated) sustav. Nadalje, kako bi se prevenirala infekcija bakteriofagom u proizvodnji mliječnih proizvoda, primjenjuje se dodatak otopine natrijeva tripolifosfata (0.3 – 0.5 %), koja u sirovom mlijeku inhibira litički ciklus bakteriofaga (Suárez i sur., 2007). Kako bi se odredila prisutnost bakteriofaga u industrijskim procesima, pored mikrobioloških metoda (metoda detekcije plaka, mjerenje kiselosti uzorka), razvijaju se nove sofisticirane metode u koje se ubrajaju PCR – metoda i protočna citometrija (Garneau i Moineau, 2011). PCR – metodom se uspješno i brzo detektiraju bakteriofagi koji inficiraju BMK roda *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Streptococcus*. Metoda se može primjenjivati direktno u uzorku mlijeka ili sirutke pri čemu je najniži prag detekcije virusa  $10^3$  PFU mL<sup>-1</sup>. Obzirom da primjena klasične PCR metode može potrajati nekoliko sati, često se kao zamjena koristi qPCR (quantitative PCR) metoda kojom se brzo i s visokom osjetljivošću može zapaziti kontaminacija uzorka fagom, specifičnog za vrstu *Streptococcus thermophilus* te bakterije roda *Lactobacillus* (del Rio i sur., 2008; Zago i sur., 2008).

Povoljan učinak probiotičkog soja na zdravlje domaćina u direktnoj je ovisnosti s dostatnom količinom i viabilnošću stanica soja (WHO, 2006). Trenutno se istražuje upotreba prebiotika, koji dodani stanicama, omogućuju veću otpornost probiotičkog soja prema kiselom sadržaju i enzimima GIT-a domaćina te povećavaju njegovu stabilnost prilikom proizvodnje, skladištenja i primjene funkcionalne namirnice (Heidebach i sur., 2012). Za očuvanje karakteristika probiotičkog soja prilikom njegove pohrane, najčešće se primjenjuje metoda liofilizacije. Liofilizacija je proces sušenja uzorka u zamrznutom obliku pri čemu se voda iz uzorka uklanja sublimacijom, čime se usporavaju metabolički procesi u stanicama uz očuvanje strukture i

staničnih funkcija (Jadhav i Moon, 2015). Odabir zaštitnog materijala (prebiotika) koji se primjenjuje u liofilizacijskom procesu, kao i uvjeti liofilizacije, moraju biti prilagođeni specifičnom soju (De Vos i sur., 2010). U tu se svrhu najčešće upotrebljavaju inulin, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, obrano mlijeko i saharoza (Shekh i sur., 2020). Proces liofilizacije može se provesti na sljedeći način. Uzorak prekonoćne kulture BMK (24 h / optimalna temperatura/ statičan uzgoj) uzgojen u MRS bujonu se centrifugira ( $5000 \times g$ , 20 min, 4 °C) kako bi se izdvojili peleti stanica (1 g). Stanice se potom 3 puta ispiru u destiliranoj vodi za potpuno uklanjanje hranjive podloge. Stanice se zatim pomiješaju s 1 g prebiotika (saharozu) te se u smjesu dodaje 0.5 g obranog mlijeka. Kontrolna smjesa se sastoji od stanica bez dodataka prebiotika i obranog mlijeka. Po 300  $\mu$ L obje smjese se odvojeno prenose u kriobočicu, zamrzavaju na -20 °C tijekom 18 h te liofiliziraju primjenom Micromodulyo 0230 liofilizatora (-50 °C, 8 h). Liofilizirana kultura stanica se pohranjuje na 8 – 10 °C tijekom 6 mjeseci uz evaluaciju viabilnosti stanica (Shekh i sur., 2020). Broj kolonija se odredi prema jednadžbi (3), a zadovoljavajućom vijabilnošću stanica se smatraju vrijednosti od 20 do 350 log CFU mL<sup>-1</sup>. Postotak viabilnosti stanica se odredi prema jednadžbi:

$$(\%) = \left( \frac{N}{N_0} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

$N$  = broj kolonija nakon liofilizacija

$N_0$  = broj kolonija prije liofilizacije

#### 2.4.5. BMK kao potencijalni probiotici podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda

Kako je već ranije spomenuto, BMK mogu biti izolirane iz mlijeka i mliječnih proizvoda te kao starter kulture biti korištene u svrhu proizvodnje fermentiranih mlijeka. Među njima su najpoželjnije autohtone funkcionalne starter kulture koje će omogućiti industrijsku proizvodnju ujednačenog proizvoda, senzorskih osobina karakterističnih za tradicionalnu proizvodnju, a koje posjeduju barem jedno svojstvo s blagotvornim učinkom na zdravlje potrošača (González i sur., 2007). BMK koje imaju ulogu promotora zdravlja, poznate kao probiotički sojevi, mogu također biti klasificirane kao funkcionalne starter kulture ili kokulture u fermentativnim procesima (Leroy i Vuyst, 2004). U prethodno navedenim istraživanjima, sirova mlijeka i njihovi proizvodi različitih muznih životinja poslužili su kao izvor BMK s probiotičkim potencijalom utvrđenim kroz nekoliko standardiziranih testova. U radu Murua i sur. (2013)

uspješno je izoliran soj BMK iz magarećeg mlijeka, *L. plantarum* LP08AD, producenta plantaricina W koji je pokazao nekoliko poželjnih svojstava potrebnih za preživljavanje i aktivnost u GIT-u domaćina. Nadalje, istraživanje Azat i sur. (2016) pokazalo je kako tradicionalno fermentirani sir može poslužiti kao izvor sojeva BMK, od kojih se *L. rhamnosus* R4 pokazao najpoželjnijim za primjenu kao probiotik i starter kultura. Na osnovu svoje antimikrobne, autogregacijske i hidrofobne karakteristike, soj može uspješno kolonizirati GIT domaćina i poslužiti kao prva linija obrane organizma od patogena. U istraživanju Amara i sur. (2019) izolirani su sojevi BMK vrste *L. plantarum* s probiotičkim i lipolitičkim potencijalom koji dobro preživljavaju u simuliranim uvjetima GIT-a, inhibiraju patogene te razgrađuju prirodne i sintetičke lipide. Iste godine, da Silva i sur. (2019) su izolirali iz kozjeg mlijeka sojeve BMK, *L. plantarum* (DF60Mi) i *L. lactis* (DF04Mi) koji pokazuju preživljavanje u simuliranim uvjetima GIT-a, posjeduju antimikrobnu aktivnost protiv patogena hrane, te je kod soja DF60Mi dokazana mogućnost proizvodnje EPS-a.

U radu Aspri i sur. (2016), istraživale su se tehnološke karakteristike, sigurnost i probiotički potencijal izoliranih enterokoka iz devet uzorka sirovog magarećeg mlijeka prikupljenih u periodu od sedam mjeseci s farmi na Cipru. Ispitivane su tehnološke karakteristike poput acidifikacijske aktivnosti, proteolitičke i lipolitičke aktivnosti, proizvodnje EPS i diacetila te autolitička aktivnost. Acidifikacija mlijeka pri njegovoj fermentaciji je ključna, jer sprječava rast nepoželjnih mikroorganizama u mlijeku, patogena i bakterija kvarenja, te doprinosi njegovoj aromi. Također je pokazatelj dobre metaboličke aktivnosti radne kulture koja prevodi laktozu u mliječnu kiselinu. Poželjna mezofilna radna kultura ima sposobnost sniziti pH vrijednost mlijeka s inicijalnih 6.6 na 5.3 u periodu od 6 h. Obzirom na dobivene rezultate, izolirani enterokoki (ukupno 189 izolata) se mogu svrstati u tri kategorije: izolati s velikom acidifikacijskom aktivnosti koji snižavaju pH na više od 2.0 jedinice (6 % izolata); izolati sa srednjom acidifikacijskom aktivnosti koji snižavaju pH za 1.5 do 2.0 jedinice (56 % izolata); izolati sa slabom acidifikacijskom aktivnosti koji snižavaju pH za manje od 1.5 jedinica (44 % izolata). Nadalje, ispitivanje proteolitičke aktivnosti je bitno kod determinacije soja kao startera ili probiotika jer pokazuje njihovu sposobnost za iskorištavanje kazeina iz mlijeka kao izvora aminokiselina i dušika te kod odabira procesa u kojem će se taj soj koristiti (Aspri i sur., 2016). Isto tako, tijekom procesa fermentacije, proteolitička aktivnost može nekim sojevima omogućiti proizvodnju peptida s bioaktivnim karakteristikama poput antimikrobne i antihipertenzivne (Korhonen, 2009). Od ukupno 72 izolata, 56 ih je pokazalo pozitivan rezultat na proteolitičku aktivnost. Lipolitička aktivnost se ispituje kao jedna od karakteristika startera zahvaljujući kojoj

razgrađuju trigliceride iz mlijeka na masne kiseline koje predstavljaju prekursor tvari arome (metilketona, sekundarnih alkohola, estera i laktona) (Giraffa, 2003). Izolati enterokoka su općenito pokazali slabu lipolitičku aktivnost koja je u radu objašnjena činjenicom da je za razliku od mlijeka drugih muznih životinja, magareće mlijeko siromašno na mastima (Malissiova i sur., 2016). Ovakav rezultat pokazuje da se izolati neće primjenjivati u procesima zrenja tvrdih talijanskih sireva, za što je potrebna kultura s izraženom lipolitičkom aktivnosti, već će se primjenjivati u procesima fermentacije mlijeka gdje je izražena lipoliza svakako nepoželjna. Isto tako, niska lipolitička aktivnost je za većinu fermentiranih mlijeka dostatna jer se njome uspješno proizvodi dovoljna količina tvari arome i okusa (Aspri i sur., 2016). Nadovezujući se na već spomenutu ulogu EPS-a, također se navodi da proizvodnja ovih oligosaharida povoljno utječe na reološka svojstva fermentiranog mlijeka, doprinosi okusu fermentiranih proizvoda smanjenog udjela masnoće (magareće mlijeko) te zamjenjuje neželjene hidrokoloidne aditive koji se koriste za postizanje očekivane teksture proizvoda (Patel i Prajapat, 2013). Ukupno 36 % izolata enterokoka proizvodi EPS (Aspri i sur., 2016). Proizvodnja diacetila poželjna je karakteristika starter kultura u proizvodnji fermentiranih mlijeka jer ona doprinosi maslačnoj aromi i okusu namirnice (Rincon – Delgado i sur., 2012). Od ukupno 72 ispitana izolata, 54 je pokazalo diacetilnu aktivnost. Nadalje, zahvaljujući autolitičkoj aktivnosti, potencijalne starter kulture otpuštaju intracelularne metabolite i enzime u mikrookolinu čime direkto utječu na senzoričku proizvodnju. U spomenutom je istraživanju, 10 sojeva enterokoka pokazalo visoku autolitičku aktivnost. Kako bi se utvrdila sigurnost primjene izolata enterokoka, ispitivana je njihova antibiotska rezistencija, proizvodnja biogenih amina te virulentna aktivnost. Studija je pokazala da je samo 4 % izolata rezistentno na vankomicin, dok ni jedan soj nije bio rezistentan na ampicilin i kloramfenikol. S druge strane, nepoželjnim se pokazala rezistencija 54 % izolata na penicilin, 50 % na eritromicin te je 100 % izolata pokazalo potpunu rezistenciju na gentamicin i streptomycin. Nadalje, biogeni amini su nepoželjni u fermentiranoj hrani jer uzrokuju probleme sa zdravljem. Tiramin, kojeg je prema istraživanju proizvelo 75 % izolata tijekom 7 dana inkubacije, uzrokuje glavobolje i hipertenziju u kombinaciji s terapijom antidepresivima, a može biti prisutan u zrelom siru. Prema Aspri i sur. (2016), 100 – 800 mg kg<sup>-1</sup> ovog spoja se pokazalo toksičnima za zdravlje čovjeka. Posljednje istraživanje se odnosilo na ispitivanje preživljavanja potencijalnih probiotika u simuliranim uvjetima GIT-a. Izolati su pokazali visoku toleranciju prema žučnim solima (MRS podloga s dodanih 30 g L<sup>-1</sup> žučnih soli) te niskom pH (2.0 i 3.0) te su tri izolata pokazala sposobnost proizvodnje bakteriocina djelotvornih protiv patogena *L. monocytogenes* i *S. aureus*.



Ovim je radom dokazana važnost istraživanja potencijalnih probiotika te koliko ona moraju biti iscrpna da bi soj zadovoljio potrebne kriterije. Iako su se neki sojevi pokazali u potpunosti rezistentni na neke komercijalne antibiotike te su na njihovim plazmidima pronađeni geni za virulenciju, među izolatima enterokoka postoje oni sojevi s potencijalnom primjenom kao starteri i probiotici (Aspri i sur., 2016). Tome u prilog idu zadovoljavajući testovi preživljavanja simuliranih uvjeta u GIT-u te proizvodnja bakteriocina. Sukladno tome, odabrani se sojevi mogu konkretno koristiti u procesima proizvodnje mliječnih proizvoda te u svrhu biokonzerviranja namirnica (Aspri i sur., 2016).

#### 2.4.6. Primjena probiotika kao lijekova

Probiotici se prema načinu primjene dijela na bioterapeutike i funkcionalne dodatke hrani. Bioterapeutici se definiraju kao probiotički pripravci koji se koriste za prevenciju i liječenje bolesti te kao takvi pripadaju u kategoriju živih lijekova. Probiotici kao funkcionalni dodaci hrani se opisuju kao pripravci koji promoviraju zdravlje putem održavanja ravnoteže crijevne mikrobiote (Šušković, 2009). Ako se proučava utjecaj probiotika na čovjeka, pokazalo se da probiotici mogu biti uspješni u terapijama protiv ulcerativnog kolitisa, Kronove bolesti i nespecifičnih upala ileuma (Bengmark, 2007). Nadalje, brojne su studije procijenile uspješnu upotrebu probiotika u liječenju intolerancije na laktozu, sindroma iritabilnog crijeva, prevencije karcinoma debelog crijeva i čira (Levri i sur., 2005; Montalno i sur., 2006; Geier i sur., 2006; Lesbros - Pantoflickova i sur., 2007). Uzimajući u obzir sposobnost probiotika da inhibiraju neke bakterijske enzime, kod životinja je dokazano da probiotici mogu reducirati rizik spomenutog raka debelog crijeva, dok su kliničke studije potrebne kako bi se dokazao jednaki učinak na čovjeku (Guarner i sur., 2011). S druge strane, studijama je dokazana uspješna primjena probiotika u liječenju urogenitalnih tegoba poput prevencije i liječenja infekcije mokraćnog trakta i bakterijskog vaginitisa (Falagas i sur., 2006). Također se ispituje mogućnost primjene na trudnicama s ciljem prevencije razvoja atopijskog dermatitisa novorođenčadi (Kukkonen i sur., 2007). Nadalje, postoje dokazi koji povezuju konzumaciju mliječnih proizvoda s probiotičkim kulturama, s redukcijom kolesterola u krvi, što pomaže u prevenciji razvoja pretilosti, dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i moždanog udara (Simons i sur., 2006). Studija Hatakka i sur. (2001) pokazala je da redovita primjena probiotičkog soja *L. rhamnosus* GG može dovesti do redukcije infekcija respiratornog trakta. Ostale su studije pokazale da prehrana koja ne sadrži fermentirane namirnice može dovesti do slabljenja urođenog

imunološkog odgovora, značajnog smanjenja broja laktobacila u stolici kao i količine kratkolančanih masnih kiselina. Osim toga, takva je prehrana uzrokovala smanjenje fagocitne aktivnosti leukocita u periodu od dva tjedna što može dovesti do smanjene sposobnosti organizma u obrani protiv infekcija (Olivares i sur., 2006). U sklopu istog istraživanja, trideset slučajno odabranih ispitanika podvrgnuto je prehrani koja je uključivala fermentirane proizvode s probioticima *Lactobacillus gasseri* CECT5714 i *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 te nije uočen negativni učinak sojeva na ispitanike. Štoviše, primijećen je pozitivan učinak na proizvodnju kratkolančanih masnih kiselina, vlažnost, frekvenciju i volumen stolice te subjektivno poboljšanje funkcije crijeva. Nadalje, Alvaro i sur. (2007) su dokazali da ispitanici koji konzumiraju jogurt, imaju smanjeni sadržaj bakterija *Enterobacteriaceae* i povećanu galaktozidaznu aktivnost u GIT-u.

### 3. ZAKLJUČAK

Fermentacijski proces može biti proučavan kao biološki proces očuvanja ishodišne sirovine, a hrana proizvedena na ovaj način, zbog prisutnih mikrobnih metabolita (organskih kiselina, bakteriocina i etanola) se puno rjeđe kvari. Osim toga, fermentacijom dolazi do promjene senzorskih karakteristika, teksture i reologije namirnice te se postiže nutritivni sastav različit u odnosu na početnu sirovinu (Marco i sur., 2017). Budući da BMK predstavljaju dominantnu mikrofloru mlijeka, brzo zakiseljavaju sirovinu te proizvodima i nusproizvodima metabolizma osiguravaju željenu kvalitetu i higijenski standard namirnice, očekivano se primjenjuju kao starter kulture za pojedine fermentacijske procese. BMK izolirane iz tradicionalnih mliječnih proizvoda odličan su odabir za uspostavu autohtonih starter kultura kojima se takvi proizvodi dobivaju u strogim kontroliranim uvjetima uz željenu kvalitetu, higijenski standard i očuvane tradicionalne karakteristike. Uzimajući u obzir da su takvi izolati već prilagođeni sirovini i tehnološkim parametrima, njihova primjena u formi startera olakšava proces proizvodnje te ga čini ekonomski isplativijim. Nadalje, obzirom da izolati BMK iz mliječnih proizvoda često posjeduju barem jedno inherentno funkcionalno svojstvo, ono se može iskoristiti za proizvodnju hrane bez štetnih prehrambenih aditiva, odnosno funkcionalne hrane koja je u službi promotora zdravlja. Također, ako se BMK izoliranim iz sirovog i fermentiranog mlijeka dokaže probiotički učinak, mogu se primijeniti kao funkcionalni starteri za proizvodnju fermentiranih namirnica čijom se konzumacijom preveniraju i liječe bolesti probavnog i imunološkog sustava, direktnim utjecajem na autohtonu mikrobiotu GIT-a domaćina. Na temelju svega spomenutog, može se zaključiti da sojevi BMK izolirani iz mliječnih proizvoda posjeduju veliki potencijal za izbor starter kultura i probiotičkih pripravaka te dokazan povoljan učinak na zdravlje.

## 4. LITERATURA

Abbas, M. M., Mahasneh, A. M. (2014) Isolation of *Lactobacillus* strains with probiotic potential from camel milk. *Afr. J. Microbiol. Res*, **8(15)**, 1645 – 1655.

Abdel Gader, A. M., Alhaider, A. A. (2016) The unique medicinal properties of camel products: A review of the scientific evidence. *Journal of Taibah University Medical Sciences* **11(2)**, 98 – 103.

Abdel - Salam, A. M., Al-Dekheil, A., Babkr, A., Farahna, M., Mousa, H. M. (2010) High fiber probiotic fermented mare's milk reduces the toxic effects of mercury in rats *North Am. J. Med. Sci.* **2(12)** 569 – 575.

Abedon, T. S. (2008) Bacteriophage ecology: Population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. *Cambridge University Press*, 302 – 332.

Abushelaibi, A., Al - Mahadin, S., El - Tarabily, K., Shah, N. P., Ayyash, M. (2017) Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Sci. Technol.*, **79**, 316 – 325.

Affolter, M., Grass, L., Vanrobaeys, F., Casado, B., Kussmann, M. (2010) Qualitative and quantitative profiling of the bovine milk fat globule membrane proteome. *J. Proteomics*, **73**, 1079 – 1088.

Afzal, M. I., Jacquet, T., Delaunay, S., Borges, F., Millière, J. B., Revol - Junelles, A. M., Cailliez - Grimal, C. (2010) *Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiol.* **27**, 573 – 579.

Alvaro, E., Andrieux, C., Rochet, V., Rigottier - Gois, L., Leprcq, P., Sutren, M., Galan, P., Duval, Y., Juste, C., Dore, J. (2007) Composition and metabolism of the intestinal microbiota in consumers and non-consumers of yogurt. *Br. J. Nutr.* **97**, 126 – 133.

Amara, S., Zadi - Karam, H., Karam, N. E. (2019) Selection of *Lactobacillus* strains newly isolated from Algerian camel and mare fermented milk for their in vitro probiotic and lipolytic potentials. *Afr. J. Biotechnol.* **18(30)**, 882 – 894.

Angmo, K., Kumari, A., Bhalla, T. C. (2016) Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT Food Sci. Technol.* **66**, 428 – 435.

- An, Y., Adachi, Y., Ogawa, Y. (2004) Classification of lactic acid bacteria isolated from chigee and mare milk collected in Inner Mongolia. *Animal Sci. J.* **75**(3), 245 – 252.
- Argov, N., Lemay, D. G., German, J. B. (2008) Milk fat globule structure and function: nano science comes to milk production. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, 617 – 623.
- Ashokkumar S., Sree Krishna, R., Pavithra, V., Hemalatha, V., Priya, I. (2011) Production and antibacterial activity of bacteriocin by *Lactobacillus paracasei* isolated from donkey milk. *Int. J. Current Sci.* **1**, 109 – 115.
- Aspri, M. (2017) *Donkey milk microbiota: isolation and characterization for potential applications*. Doktorska disertacija. Cipar: Faculty of Geotechnical Sciences and Environmental Management.
- Aspri, M., Bozoudi, D., Tsaltas, D., Hill, C., Papademas, P. (2016) Raw donkey milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. *Food Control*, **73**, 81 – 90.
- Azadnia, P., Khan Nazer, A. (2009) Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. *Iranian J. Vet. Res.* **10**, 235 – 240.
- Azat, R., Liu, Y., Li, W., Kayir, A., Lin, D. B., Zhou, W. W., Zheng, X. D. (2016) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **17**(8), 597 – 609.
- Aziz, T., Khan, H., Bakhtair, S. M., Naurin, M. (2009) Incidence and relative abundance of lactic acid bacteria in raw milk of buffalo, cow and sheep. *J. Anim. Plant Sci.* **19**(4), 168 – 173.
- Babić, I., Markov, K., Kovačević, D., Trontel, A., Slavica, A., Đugum J., Čvek, D., Svetec I. K., Posavec S., Frece J. (2011) Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from a Croatian brand product Slavonski kulen. *Meat Sci.* **88**, 517 – 524.
- Begley, M., Hill, C., Gahan, C. G. M. (2006) Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1729 – 1738.
- Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo - Mata, P., Barros - Velázquez, J. (2013) Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *BioMed Res. Int.* **2013**, 1 – 14.

- Bernardo, W. M., Aires, F. T., Carneiro, R. M., de Sá, F. P., Rullo, V. E. V., Burns, D. A. (2013) Effectiveness of probiotics in the prophylaxis of necrotizing enterocolitis in preterm neonates: a systematic review and meta - analysis. *J. Pediatr. (Versão em Português)*, **89(1)**, 18 – 24.
- Beerens, H., Luquet, F. M., Oria Almudí, R. M. (1990) Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos.
- Bengmark, S. (2007) Bioecological control of inflammatory bowel disease. *Clin. Nutr.* **26**, 169 – 181.
- Bradley, B. R., O’Sullivan T. (2018) Dairy products MDPI, Basel.
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L. Gershwin, M. E. (2009) Probiotics and immunity. *J.Gastroenterol.* **44**, 26 – 46.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Yasuyuki, S., Schure, E. T., van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E .B. (2012) Food fermentations: microorganisms with technology beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* **154**, 87 – 97.
- Bylund, G. (2003) Dairy processing handbook, Tetra Pak, Processing Systems AB, Lund, Sweden, dopunjeno izdanje.
- CAC (1999) General Standard for the Use of Dairy Terms (CODEX STAN 206–1999). Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Rim, FAO.
- Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J. (2010) Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. U: *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, (Mozzi, F., Raya, R., Vignolo, G., ured.), Iowa, USA, Wiley-Blackwell, str. 177 – 192.
- Casalta, E., Montel, M. C. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126(3)**, 271-273.c
- Chalas, R., Janczarek, M., Bachanek, T., Mazur, E., Cieszko – Buk, M., Szymanska, J. (2016) Characteristics of oral probiotics—a review. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* **29(1)**, 8 – 10.

- Canchaya, C., Claesson, M. J., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D., O'Toole, P. W. (2006) Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology*, **152**(11), 3185 – 3196.
- Chandan, R. C. (2006) Milk composition, physical and processing characteristics. U: *Manufacturing Yoghurt and Fermented Milks*, (Chandan, R.C., White, C. H., Kilara, A., Hui, Y. H., ured.), Blackwell Publishing, UK, str. 17 – 39.
- Chanos, P., Williams, D. R. (2011) Anti *Listeria* bacteriocin-producing bacteria from raw ewe's milk in northern Greece. *J. App. Microbiol.* **110**, 757 – 768.
- Chaves, A. C. S. D., Fernandez, M., Lerayer, A. L. S., Mierau, I., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. (2002) Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Env. Microbiol.* **68**(11), 5656 – 5662.
- Chen, J. D., Lai, S. Y., Huang, S. L. (1995) Cloning of the hemolysin gene from *Edwardseilla tarda*. *J. Fish. Soc. Taiwan*, **22**, 267 – 277.
- Chiavari, C., Coloretti, F., Nanni, M., Sorrentino, E., Grazia, L. (2005) Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. *Le Lait*, **85**, 481– 490.
- Codex Alimentarius (2003): Codex standard for fermented milks (CODEX STAN 243-2003), prihvéen 2003, revidiran 2008, 2010, 1 – 11.
- Collins, B., Cotter, P. D., Hill, C., Paul Ross, R. (2010) Applications of Lactic Acid Bacteria - Produced Bacteriocins. U: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (Mozzi, F., Raya, R., Vignolo, G.M., ured.), Blackwell Publishing, New Jersey, str. 89 – 109.
- Da Silva, L. A., Neto, J. H. P. L., Cardarelli, H. R. (2019) Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria. *Annals of Microbiology*, **69**(13), 1497 – 1505.
- Danków, R., Pikul, J., Osten-Sacken, N. (2011) Effect of lactation on some milk physicochemical traits of Polish cold blood breed mares. IDF International Symposium on Sheep, Goat and Other Non-Cow Milk, 16. – 18. svibnja, Atena, Grčka, sekcija 4, poster 5.
- De Almeida Júnior, W. L. G., da Silva Ferrari, Í., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa, M. M., Dias, F. S. (2015) Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, **53**, 96 – 103.

- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* **20(4)**, 292 – 302.
- Del Rio, B., Martín, M. C., Martínez, N., Magadán, A. H., Alvarez, M. A. (2008) Multiplex fast real-time PCR for quantitative detection and identification of *cos*- and *pac*-type *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* **74**, 4779 – 4781.
- Dela Cruz, T. E. E., Torres, J. M. O. (2012) Gelatin hydrolysis test protocol.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., van Camp, J. (2008) Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* **18**, 436 – 457.
- Dias, M. R. S., Fusieger, A., de Souza Motta, A. (2019) Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from sheep milk for potential use as non-starter cultures. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, **74(1)**, 197 – 208.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr-Galindo, S. (2012) Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* **87(2)**, 951 - 962.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L., Prevost, H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **70**, 564 – 582.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., Collins, J. K. (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **73(2)**, 386 – 392.
- FAO/ WHO (2001) Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations*, London, Ontario, Canada.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 30. travnja – 1. svibnja, London, Kanada.



- Franciosa, I., Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Cocolin, L. (2018) Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *Int. J. Food Microbiol.* **279**, 26 – 32.
- Eaton, T. J., Gasson, M. J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus virulence* determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67(4)**, 1628 - 1635.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* **10(6)**, 2740.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2017) Scientific Opinion on the update of the list of QPS - recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017 update). *EFSA J.*, **15**, 1 – 177.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* **226**, 1 – 12.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2014) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1.
- Falagas, M. E., Betsi, G. I., Tokas, T., Athanasiou, S. (2006) Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women: A review of the evidence from microbiological and clinical studies. *Drugs*, **66**, 1253 – 1261.
- Florou - Paneri, P., Christaki, E., Bonos, E. (2013) Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. doi:10.5772/47766.
- Fox, P. F. (2003) Milk proteins: general and historical aspects. U: *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins*, 3. izdanje (Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., ured.) Springer, Boston, str. 458 – 466.
- Frece, J., Kos, B., Beganović, J., Vuković, S., Šušković, J. (2005a) In vivo testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World J. Microb. Biot.* **21(8-9)**, 1401.

- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušković, J. (2005b) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. App. Microbiol.* **98(2)**, 285 – 292.
- Frece, J., Kovačević, D., Kazazić, S., Mrvčić, J., Vahčić, N., Ježek, D., Hruškar, M., Babić, I., Markov, K. (2014) Comparison of sensory properties, shelf-life and microbiological safety of industrial sausages produced with autochthonous and commercial starter cultures. *Food Technol. Biotechnol.* **52(3)**, 307 – 316.
- Frece, J., Markov, K. (2017) Authtonous Starter Cultures. U: *Fermented Meat Product. Health Aspects* (Zdolec, N., ured.), CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida.
- Frece, J., Markov, K., Čvek, D., Kovačević, D., Đuraković, L., Delaš, F. (2011) Autochthonous functional starter cultures and mycotoxins in " Slavonski kulen". Međunarodni znanstvenostručni skup XIII. Ružičkini dani " Danas znanost-sutra industrija", Vukovar, Hrvatska, 16. - 17. rujna, 263 – 273.
- Frece, J., Markov, K., Kovačević, D. (2010a) Determination of indigenous microbial populations, mycotoxins and characterization of potential starter cultures in Slavonian kulen. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*, **12(2)**, 92 – 99.
- Frece, J., Markov, K., Čvek, D., Kovačević, D., Krcivoj, T. (2010b) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz "slavonskog kulena" kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*, **12(4)**, 210 – 216.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B. (2010) Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, 15 – 28.
- García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicoli, J. R., Moreira-Silva, J., Halaihel, N. (2016) Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Res. Vet. Sci.* **108**, 125 – 132.
- García-Risco, M. R., Ramos, M., López-Fandiño, R. (2002) Modifications in milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. *Int. Dairy J.* **12**, 679 – 688.
- Garneau, J. E., Moineau, S. (2011) Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microb. Cell Fact.* **10**, 1 – 10.

Geier, M. S., Butler, R. N., Howarth, G. S. (2006) Probiotics, prebiotics and synbiotics: A role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1265 – 1269.

Generalić, E. (2013): "Permeabilnost" Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar. 18 Mar. 2013. KTF-Split. <[http:// glossary.periodni.com](http://glossary.periodni.com)>.

Ghanbari, M., Jami, M. (2013) Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: A Promising Approach to Seafood Biopreservation. U: *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (Kongo, J.M., ured.), IntechOpen, Beč, str. 381 – 404.

Gill, H. S.; Cross, M. L. (2002) Probiotics and immune function. U: *Nutrition and Immune Function*, (Calder, P. C., Field, C. J., Gill, H. S., ured.), CABI Publishing, Wallingford, UK, str. 251 – 272.

Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *Int.J. Food Microbiol.*, **88(2-3)**, 215 – 222.

Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Campieri, A. (2000) Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15(5)**, 489 – 493.

Giwa, H. J. (2017) Virulence Characteristics and Public Health Significance of Bacteria Isolated from University of Ibadan Libraries. *J. Adv. Microbiol.* 1 – 10.

González, L., Sandoval, H., Sacristán N., Castro, J. M., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E. (2007) Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, **18**, 716 – 722.

Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Lemair, T. (2011) Probiotics and Prebiotics. *Global Guidelines World Gastroenterology Organisation*, **46**, 468 – 481.

Guldfeldt, L. U., Sørensen, K. I., Strøman, P., Behrndt, H., Williams, D., Johansen, E. (2001) Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on Cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* **11**, 373 – 382.

Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2011) The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food Microbiol.* **151(3)**, 284 – 288.

Gurses, M., Erdogan, A. (2006) Identification of lactic acid bacteria isolated from Tulum cheese during ripening period. *Int. J. Food Prop.* **9**, 551 – 557.

- Guzel - Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K., Seydim, A. C. (2011) Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51(3)**, 261 – 268.
- Hajsig, D., Delaš, F. (2016) Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije, Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, str. 54 – 55.
- Hamed, E., Elattar, A. (2013) Identification and Some Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated From Egyptian Camels Milk. *Life Sci. J.* **10(1)**, 1952 – 1961.
- Hammes W. P., Vogel R. F. (1995) The genus *Lactobacillus*. U: *The genera of lactic acid bacteria*, (Wood B. J. B., Holzapfel W. H. ured.), 2. izdanje, Blackie academic & professional, str. 19 – 49.
- Harvey, L. M., McNeil, B. (1998) Thickeners of microbial origin. U: *Microbiology of fermented foods* (Wood, B. J. B., ured), London, Blackie Academic & Professional, str. 148 – 171.
- Hatakka, K., Savilahti, E., Pönkä, A., Meurman, J. H., Poussa, T., Näse, L., Saxelin, M., Ko, R. (2001) Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: Double blind, randomised trial. *Br. Med. J.* **322**, 1327.
- Heczko, P. B., Strus, M., Jawień, M., Szymański, H. (2005) Medyczne zastosowanie probiotyków. *Wiad. Lek.* **58**, 640 – 646.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2012) Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **52(4)**, 291 – 311.
- Hemme, D., Foucaud - Scheunemann, C. (2004) *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* **14**, 467 – 494.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Berni Canani, R., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., Sanders, M. E. (2014) 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(8)**, 506 – 514.
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ehrlich, S D., Guedon, E., Monnet, W., Renault, P., Kleerebezem, M. (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 435 – 463.

- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H. (2015) Characterization and Kinetics of Growth of Bacteriocin like Substance Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewe Milk and Traditional Sour Buttermilk in Iran. *J. Food Process. Techno.* **6(12)**, 1 – 9.
- Jacob, M., Nobel, S., Jaros, D., Rohm, H. (2010) Physical properties of acid milk gels: acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids* **15**, 1 – 7.
- Jadhav, T. R., Moon, R. S. (2015) Review on lyophilization technique. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **4(5)**, 1906 – 1928.
- Jastrzębska, E., Wadas, E., Daszkiewicz, T., Pietrzak-Fiećko, R. (2017) Nutritional value and health-promoting properties of mare's milk– a review. *Czech J. Anim. Sci.* **62(12)**, 511 – 518.
- Johnston , B. C., Supina, A. L., Vohra, S. (2006) Probiotics for pediatric antibiotic -associated diarrhea: Ameta - analysis of randomized placebo-controlled trials. *Can. Med. Assoc. J.* **175**, 377 – 383.
- Juillard, V., Lopez - Kleine, L., Monnet, V. (2016) Proteolytic systems of lactic acid bacteria (LAB). *Institut National de la Recherche Agronomique*, **1(7)**.
- Kamal, A. M., Salama, O. A. (2009) Lipid fractions and fatty acid composition of colostrums, transitional and mature she-camel milk during the first month of lactation *Asian. J. Clin. Nutr.* **1**, 23 – 30.
- Kelly, W. J., Ward, L. J. H., Leahy, S. C. (2010) Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biol. Evol.* **2**, 729 - 744.
- Khan, S. U. (2014) Probiotics in dairy foods: A review. *Nutr. Food Sci.* **44(1)**, 71 – 88.
- Khalesi, S., Sun, J., Buys, N., Jayasinghe, R. (2014) Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*, **64(4)**, 897 – 903.
- Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A., Zinedine, A. (2009) Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol. Res.* **164(1)**, 81 – 91.

- Kleerebezem, M., Hols, P., Hugenholtz, J. (2000) Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 840 – 848.
- Korhonen, H. (2009) Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods*, **1(2)**, 177 – 187.
- Kukkonen, K., Savilahti, E., Haahtela, T., Juntunen - Backman, K., Korpela, R., Poussa, T., Tuure, T., Kuitunen, M. (2007) Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double - blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 192 – 198.
- Kumar, S., Bansal, A., Chakrabarti, A., Singhi, S. (2013) Evaluation of efficacy of probiotics in prevention of *Candida* colonization in a PICU—A randomized controlled trial. *Crit. Care Med.* **41**, 565 – 572.
- Leboš Pavunc A. (2012) Fenotipska i genotipska karakterizacija sojeva bakterija mliječne kiseline u svrhu proizvodnje probiotika i funkcionalnih starter kultura. Doktorska disertacija. Zagreb: Prehrambeno-biotehnoški fakultet.
- Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Kos, B., Uroić, K., Blažić, M., Šušković, J. (2012) Characterization and Application of Autochthonous Starter Cultures for Fresh Cheese Production. *Food Technol. Biotechnol.* **50 (2)**, 141 – 151.
- Leboš, A., Habjanič, K., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., & Šušković, J. (2008) The use of *Lactobacillus plantarum* L4 for the production of probiotic drink with cabbage juice. Proceedings of the Joint Central European Congress: 4th Central European Congress on Food and 6th Croatian Congress of food technologists, biotechnologist, and nutritionists (CEFood2008), 15. – 17. ožujka, Cavtat, Hrvatska, 269 – 276.
- Lee, H. J., O'Sullivan, D. J. (2010) Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74(3)**, 378 – 416.
- Lee, Y. K. (2009) Selection and maintenance of probiotic microorganisms. U: *Handbook of probiotics and prebiotics* (Lee, Y. K., Salminen, S., ured.). 2. izdanje, Wiley-VCH, Weinheim (Njemačka), str. 177 – 187.

- Leisner, J. J., Pot, B., Cristensen, H., Rasul, G., Olsen, O. J., Wee, B. W., Mohammad, K., Ghazali, H. M. (1999) Identification of lactic acid bacteria from Chilli Bo, a Malaysian food ingredient. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(2)**, 599 – 605.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Tech.* **15(2)**, 67 – 78.
- Lesbros - Pantoflickova, D., Corthesy - Theulaz, I.; Blum, A. L. (2007) *Helicobacter pylori* and probiotics. *J. Nutr.* **137**, 812 – 818.
- Levri, K. M., Ketvertis, K., Deramo, M., Merenstein, J. H., D'Amico, F. (2005) Do probiotics reduce adult lactose intolerance? *J. Family Pract.* **54**, 613 – 620.
- Lima - Filho, J. V. M., Vieira, E. C., Nicoli, J. R. (2000) *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium*. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 365 – 370.
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., Garaizar, J. (2006) Kefir: una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras con propiedades saludables. *Revista Iberoamericana de Micología*, **23(2)**, 67 – 74.
- Losio, M. N., Bozzo, G., Galuppini, E., Martella, V., Bertasi, B., Pavoni, E., Finazzi, G. (2014) Silter cheese, a traditional Italian dairy product: A source of feasible probiotic strains. *Int. J. Food Prop.* **18**, 492 – 498.
- Malissiova, E., Arsenos, G., Papademas, P., Fletouris, D., Manouras, A., Aspri, M., Nikolopoulou, A., Giannopoulou, A, Arvanitoyannis, I. S. (2015) Assessment of donkey milk chemical, microbiological and sensory attributes in Greece and Cyprus. *Int. J. Dairy Tech.* **69(1)**, 143 – 146.
- Mansoub, N. H. (2010) Effect of Probiotic Bacteria Utilization on Serum Cholesterol and Triglycerides Contents and Performance of Broiler Chickens. *Global Vet.* **5(3)**, 184 – 186.
- Mansueto, P., Iacono, G., Taormina, G., Seidita, A., D'Alcamo, A., Adragna, F., Randazzo, G., Carta, M., Rini, G., Carroccio, A. (2013) Ass's milk in allergy to cow's milk protein: a review. *Acta Med Mediterr.* **29**, 153.

- Maragkoudakis, P. A., Mountzouris, K. C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M. D., Tsakalidou, E. (2009) Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol.* **30(3)**, 219 – 226.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Ganzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., Hutkins, R. (2017) Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, **44**, 94 – 102.
- Marcó, M. B., Moineau, S., Quiberoni, A. (2012) Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, **2(3)**, 149 – 158.
- Markov, K., Frece, J. (2016) Sigurnost hrane: mikrobiološki/infektološki aspekti. U: *Prehrana u općoj i kliničkoj pedijatriji* (Kolaček, S., Hojsak, I., Niseteo, T., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 113 – 121.
- Markov, K., Pleadin, J., Bevardi, M., Vahčić, N., Sokolić-Mihalak, D., Frece, J. (2013) Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. *Food Control*, **34(2)**, 312 – 317.
- Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017) Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, **9(9)**, 1021.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D., de Souza Oliveira, R. P. (2013) Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol. Adv.* **31(4)**, 482 – 488.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G., Swings, J. (2004) Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1137 – 1143.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Holzapfel, W. H. (2004) Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: The Maasai traditional fermented milk in Kenya. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 269 – 278.
- Maurad, K., Meriem, K. H. (2008) Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. *Grasas y aceites*, **59(3)**, 218 – 224.



- Mehta, B. M. (2015) Chemical Composition of Milk and Milk Products. U: *Handbook of food chemistry*, (Cheung, P. C. K., Mehta, B. M., ured.), Springer, Berlin, str. 511 – 554.
- Mishra, A., Jha, B. (2013) Microbial Exopolysacchrides. U: *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology* (Rosenberg, E., de Long, E. F., Thompson, F., Lory, S., Stackebrandt, E., ured.), 4. izdanje, Springer, Berlin, str. 179 – 192.
- Montalto, M., Curigliano, V., Santoro, L., Vastola, M., Cammarota, G., Manna, R., Gasbarrini, A., Gasbarrini, G. (2006) Management and treatment of lactose malabsorption. *World J. Gastroenterol.* **12**, 187.
- Motarjemi, Y., Moy, G. G., Jooste, P. J., Anelich, L. E. (2014) Milk and Dairy Products. U: *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry* (Motarjemi, Y., Lelieveld, H., ured.) Academic Press, Cambridge (Massachusetts), str. 83 – 117.
- Mulyawati, A. I., Jatmiko, Y. D., Mustafa, I., Ardyati, T. (2019) Diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented mare's milk products based on PCR-RFLP analysis. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* **230(1)**, 1 – 9.
- Murua, A., Todorov, S. D., Vieira, A. D. S., Martinez, R. C. R., Cencič, A., Franco, B. D. G. M. (2013) Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *L. actobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. *J. Appl. Microbiol.* **114(6)**, 1793 – 1809.
- Nase, L., Hatakka, K., Savilahti, E. (2001) Effect of long-term consumption of *Lactobacillus* GG in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res.* **35**, 412 – 420.
- Nilsson, L. - E., Lyck, S., Tamime, A. Y. (2006) Production of drinking products. U: *Fermented Milks*, (Tamime, A. Y., ured.), Bleckwell Publishing, UK, str. 95 – 127.
- Nobel, J. M., Jaros, D., Rohm, H. (2010) Physical properties of acid milk gels: acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids* **15**, 1 – 7.
- Nova, E., Warnberg, J., Gomez-Martinez, S., Diaz, L. E., Romeo, J., Marcos, A. (2007) Immunodulatory effects of probiotics in different stages of life. *Br. J. Nutr.* **98**, 90 – 95.
- Nutrition Business Journal. (2002) *Functional foods report*. Penton Media.
- Oelschlaeger, T. A. (2010) Mechanisms of probiotic actions—A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57 – 62.

- Ogier J. C., Son, O., Gruss, A., Tailliez. P. Delacroix-Buchet A. (2002) Identification of bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Environ. Microbiol.* **68(8)**, 691 – 701.
- Olivares, M., Diaz-Ropero, M., Gomez, N., Sierra, S., Lara - Villoslada, F., Martin, R., Miguel Rodriguez, J., Xaus, J. (2006) Dietary deprivation of fermented foods causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of this deprivation. *J. Dairy Res.* **73**, 492 – 498.
- Ouadghiri, M., Vancanneyt, M., Vandamme, P., Naser, S., Gevers, D., Lefebvre, K., Swings, J., Amar, M. (2009) Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk 'lben'. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 486 – 495.
- Palavecino Prpich, N. Z., Castro, M. P., Cayré, M. E., Garro, O. A., Vignolo, G. M. (2015) Indigenous starter cultures to improve quality of artisanal dry fermented sausages from Chaco (Argentina). *Int. J. Food Sci.* **2015**, 1 – 9.
- Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjana, N. R., Pavitra, P. V. (2018) Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *JGEB*, **16(2)**, 357 – 362.
- Patel, A., Prajapati, J. B. (2013) Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Adv. Dairy Res.* **1(2)**, 1 – 7.
- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., Gambacorta, E. (2015) Donkey milk for manufacture of novel functional fermented beverages. *J Food Sci.* **80**, 1352 – 1359.
- Pieszka, M., Luszczynski, J., Zamachowska, M., Augustyn, R., Dlugosz, B., Hedrzak, M. (2016) Is mare milk an appropriate food for people? – A review. *Ann. Anim. Sci.* **16(1)**, 33 – 51.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., McSweeney, P. L. H., Parente, E. (2008) Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. *Int. Dairy J.* **18**, 81 – 92.
- Pravilnik o mlijeku i mliječnim proizvodima (2007) Narodne novine, br. 133/2007.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Cotter, P. D. (2013) The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, **37(5)**, 664 – 698.

- Rhee, S. J., Lee, J. - E., Lee, C. - H. (2011) Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microb. Cell Fact.* **10**, 5.
- Riley, M. A., Wertz, J. E. (2002) Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, **84**, 357 – 364.
- Rincon - Delgadillo, M. I., Lopez - Hernandez, A., Wijaya, I., Rankin, S. A. (2012) Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *J. Dairy Sci.* **95(3)**, 1128 – 1139.
- Robinson, R. K., Tamime, A. Y., Wszolek, M. (2002) Microbiology of fermented milks. U: *Dairy Microbiology Handbook. The microbiology of milks and milks products*, (Robinson, R. K., ured.), John Wiley and Sons, Inc., New York, str. 367 – 430.
- Ruan, Y., Sun, J., He, J., Chen, F., Chen, R., Chen, H. (2015) Effect of probiotics on glycemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PloS one*, **10(7)**, 1 – 15.
- Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y., Gargari, B. P. (2019) A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohy. Polym.* **217**, 79 – 89.
- Shah, N. P. (2007) Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* **17**, 1262 – 1277.
- Shehata, M. G., El Sohaimy, S. A., El - Sahn, M. A., Youssef, M. M. (2016) Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Ann. Agri. Sci.* **61(1)**, 65 – 75.
- Sanders, M. E., Gibson, G., Harsharnjit, S.G. Guarner, F. (2007) Probiotics: Their Potential to Impact Human Health *Council for Agricultural Science and Technology Issue Paper*, **36**, 1 – 20.
- Sanders, M. E., Lenoir - Wijnkoop, I., Salminen, S., Merenstein, D. J. Gibson, G. R., Petschow, B.W., Nieuwdorp, M., Tancredi, D. J., Cifelli, C. J., Jacques, P., Pot, B. (2014) Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1309(1)**, 19 – 29.
- Schachtsiek, M., Hammes, W. P., Hertel, C. (2004) Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein CPF mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7078 – 7085.

- Schellenberg, J., Smoragiewicz, W., Karska-Wysocki, B. (2006) A rapid method combining immunofluorescence and flow cytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acid bacteria (LAB) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in mixed culture. *J. Microbiol. Methods*, **65**(1), 1 – 9.
- Schillinger, U., Guigas, C., Heinrich Holzapfel, W. (2005) In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int. Dairy J.* **15**(12), 1289 – 1297.
- Shekh, S. L., Boricha, A. A., Chavda, J. G., Vyas, B. R. M. (2020) Probiotic potential of lyophilized *Lactobacillus plantarum* GP. *Ann. Microbiol.* **70**(1), 1 – 12.
- Simons, L. A., Amansec, S. G., Conway, P. (2006) Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **16**, 531 – 535.
- Samaržija, D. (2015a) Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka. U: *Fermentirana mlijeka* (Samaržija, D., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 297 – 328.
- Samaržija, D. (2015b) Tehnologija proizvodnje fermentiranih mlijeka U: *Fermentirana mlijeka* (Samaržija, D., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 121 – 206.
- Samaržija, D. (2015c) Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani U: *Fermentirana mlijeka* (Samaržija, D., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 1 – 26.
- Samaržija, D. (2015d) Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija U: *Fermentirana mlijeka* (Samaržija, D., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 27 – 84.
- Samaržija, D. (2015e) Mikrobne kulture U: *Fermentirana mlijeka* (Samaržija, D., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 85 – 120.
- Simon, O. (2005) Micro-organisms as feed additives—Probiotics. *Adv. Pork Prod.* **16**, 161 – 167.
- Soto del Rio, M. de los D., Andrighetto, C., Dalmaso, A., Lombardi, A., Civera, T., Bottero, M. T. (2016) Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from donkey milk. *J. Dairy Res.* **83**(03), 383 – 386.

Suárez, V. B., Capra, M. L., Rivera, M., Reinheimer, J. A. (2007) Inactivation of calcium-dependent lactic acid bacteria phages by phosphates. *J. Food Prot.* **70(6)**, 1518 – 1522.

Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Doktorska dizertacija, Zagreb : Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc A. (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Cro. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **4(3-4)**, 77 – 84.

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

Takeda, S., Fujimoto, R., Takenoyama, S., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Tsend-Ayush, C., Dashnyam, B., Muguruma, M., Kawahara, S. (2013) Application of probiotics from Mongolian dairy products to fermented dairy products and its effects on human defecation. *Food Sci. Technol. Res.* **19**, 245 – 253.

Tavares, V. B., Pinto, J. C., Evangelista, A. R., Figueiredo, H. C. P., Ávila, C. L. D. S. (2009) Effects of different compaction degrees, inclusion of absorbent additive and wilting on the chemical composition of Tanzania grass silages. *Rev. Bras. Zootec.* **38(1)**, 40 – 49.

Thomas, D. W., Greer, F. (2010) Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics*, **126**, 1217 – 1231.

Topisirović, L., Kojić, M., Fira, D., Golić, N., Strahinić, I., Lozo, J. (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **112(3)**, 230 – 235.

Upadrasta, A., Madempudi, R. S. (2016) Probiotics and blood pressure: Current insights. *Integr. Blood Press. Control*, **9**, 33 – 42.

Upadrasta, A., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Paul Ross, R. (2001) Improving the Stress Tolerance of Probiotic Cultures: Recent Trends and Future Directions. U: *Stress responses of lactic acid bacteria* (Tsakalidou E., Papadimitriou, K., ured.), Springer, Boston, str. 395 – 438.

Van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A., Ayad, E. H. E., Smit, G., Siezen, R. J. (2002) Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.* **12**, 111 – 121.

- Vijaya, K. B. V., Vijayendra, S. V. N., Reddy, O. V. S. (2015) Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *J. Food Sci. Technol.* **52(10)**, 6112 – 6124.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., Ivanova, E. P. (2009) Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* **14**, 2535 – 2554.
- Wang, D., Liu, W., Ren, Y., De, L., Zhang, D., Yang, Y., Bao, Q., Zhang, H., Menghe, B. (2016) Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional dairy products in Baotou and Bayannur of Midwestern Inner Mongolia and q-PCR analysis of predominant species. *Korean J. Food Sci. An.* **36(4)**, 499 – 507.
- Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Eggink, G., Hugenholtz, J., Grobber, G. J. (2002) Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *Int. Dairy J.* **12**, 151 – 161.
- World Health Organization (2006) Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.
- Wouters, J. T. M., Ayad, E. H. E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* **12**, 91 – 109.
- Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H.Y., Ahn, J. (2009) Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **49(4)**, 434 – 442.
- Xu, Z., Li, L., Shirliff, M. E., Peters, B. M., Peng, Y., Alam, M. J., Shi, L. (2010) First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **68(3)**, 315 – 317.
- Zago, M., Rossetti, L., Reinheimer, J., Carminati, D., Giraffa, G. (2008) Detection and identification of *Lactobacillus helveticus* bacteriophages by PCR. *J Dairy Res.* **75**, 196 – 201.
- Zanirati, D. F., Abatemarco Jr, M., de Cicco Sandes, S. H., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., Neumann, E. (2015) Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, **32**, 70 – 76.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ovo je potvrda da je intelektualni sadržaj diplomskog rada proizvod mojeg samostalnog i izvornog promišljanja te da su svi izvori korišteni za izradu diplomskog rada propisno priznati.

A handwritten signature in blue ink, reading "Mattea Zirkovid", is written over a horizontal line.

Ime studenta