

Proizvodnja fermentiranih probiotičkih napitaka s bioaktivnim peptidima primjenom soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51

Vuletić-Antić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:816283>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2023.

Lucija Vuletić-Antić

PROIZVODNJA FERMENTIRANIH
PROBIOTIČKIH NAPITAKA S
BIOAKTIVNIM PEPTIDIMA
PRIMJENOM SOJA *Lactococcus lactis*
ZGBP5-51

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos, uz pomoć dr. sc. Katarine Butorac te u tvrtki Probiotik d.o.o. pod voditeljstvom Katarine Tonković, mag. ing. spec.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) pod voditeljstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos.

Prvenstveno želim zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Blaženki Kos, na ukazanom povjerenju i mogućnosti za izradu ovog rada.

Puno zahvaljujem i Katarini Tonković, mag. ing. spec., iz tvrtke Probiotik d.o.o. na suradnji i stručnim savjetima.

Veliko hvala dr. sc. Katarini Butorac na pomoći, strpljenju i susretljivosti prilikom izrade rada. Svojim kolegama, prijateljima, obitelji i Tinu zahvaljujem na podršci i bodrenju tijekom svih godina studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

PROIZVODNJA FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA S BIOAKTIVNIM PEPTIDIMA PRIMJENOM SOJA *Lactococcus lactis* ZGBP5-51

Lucija Vuletić-Antić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058214802

Sažetak:

Cilj ovog diplomskog rada bio je proizvesti funkcionalne fermentirane probiotičke napitke s bioaktivnim peptidima primjenom autohtonog potencijalnog probiotičkog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51, izoliranog, identificiranog i okarakteriziranog kao producenta proteolitičkih enzima. Proizvedena su tri fermentirana mliječna napitka od kojih je jedan sadržavao samo komercijalnu mezofilnu starter kulturu, drugi je sadržavao komercijalnu starter kulturu i soj *L. lactis* ZGBP5-51 u jednakim omjerima, a treći isključivo soj *L. lactis* ZGBP5-51. Optimizacijom uvjeta proizvodnje probiotičkih napitaka odabrana je mezofilna temperatura (28 °C) za provođenje fermentacije. Tijekom skladištenja u trajanju od 21 dan određen je broj živih bakterijskih stanica, pH vrijednost, stupanj kiselosti, odnosno volumni udio proizvedene mliječne kiseline, kao i mikrobiološka ispravnost. Najbolji rezultati postignuti su s napitkom proizvedenim primjenom komercijalne starter kulture i soja *L. lactis* ZGBP5-51 jer je izmjeren najveći broj živih bakterijskih stanica i najviša pH vrijednost tijekom skladištenja. Utvrđeno je preživljavanje soja *L. lactis* ZGBP5-51 tijekom procesa liofilizacije veće od 6 log CFU mL⁻¹ što zadovoljava tehnološki kriterij izbora probiotičkih sojeva. Senzorskom analizom proizvedenih napitaka najveći prosječni broj bodova ostvario je napitak proizveden primjenom komercijalne starter kulture.

Ključne riječi: *probiotički napitci, bioaktivni peptidi, Lactococcus lactis*

Rad sadrži: 43 stranice, 10 slika, 13 tablica, 30 literaturnih 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. Blaženka Kos

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac; Katarina Tonković, mag. ing. spec.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Blaženka Kos (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Markov (član)
4. prof. dr. sc. Rajka Božanić (zamjenski član)

Datum obrane: 12. listopada 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

PRODUCTION OF FERMENTED PROBIOTIC DRINKS WITH BIOACTIVE PEPTIDES USING
STRAIN *LACTOCOCCUS LACTIS* ZGBP5-51

Lucija Vuletić-Antić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058214802

Abstract:

The aim of this thesis was to produce functional fermented probiotic drinks with bioactive peptides using the autochthonous potential probiotic strain *Lactococcus lactis* ZGBP5-51, isolated, identified and characterized as a producer of proteolytic enzymes. Three fermented dairy beverages were produced, one containing only the commercial mesophilic starter culture, the second containing the commercial starter culture and the *L. lactis* ZGBP5-51 strain in equal proportions, and the third exclusively the *L. lactis* ZGBP5-51 strain. By optimizing the conditions for the production of probiotic drinks, a mesophilic temperature (28 °C) was chosen for fermentation. During storage for 21 days, the number of viable bacterial cells, pH value, degree of acidity, i.e. the percentage of lactic acid produced, as well as microbiological safety were determined. The best results were achieved with the beverage produced using the commercial starter culture and strain *L. lactis* ZGBP5-51, as the highest number of viable bacterial cells and the highest pH value were measured during storage. The survival of the strain *L. lactis* ZGBP5-51 during the lyophilization process was determined to be higher than 6 log CFU mL⁻¹, which is in accordance with the technological criteria for the selection of probiotic strains. Sensory analysis of the produced beverages showed the highest average number of points by the beverage produced using a commercial starter culture.

Keywords: *probiotic drinks, bioactive peptides, Lactococcus lactis*

Thesis contains: 43 pages, 10 figures, 13 tables, 30 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Blaženka Kos, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD; Katarina Tonković, mag. ing. spec.

Reviewers:

1. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (president)
2. Blaženka Kos, PhD, Full professor (mentor)
3. Ksenija Markov, PhD, Full professor (member)
4. Rajka Božanić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: October 12th, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PROBIOTIČKI SOJEVI	3
2.1.1. Probiotičke formulacije	6
2.2. PROBIOTIČKO DJELOVANJE	7
2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	11
2.3.1. <i>Lactococcus lactis</i>	12
2.4. PROTEOLITIČKI SUSTAV BMK	13
2.4.1. Bioaktivni peptidi.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	17
3.1.2. Hranjive podloge.....	17
3.1.3. Kemikalije	18
3.1.4. Aparatura i pribor	18
3.1.5. Sirovina	19
3.2. METODE	19
3.2.1. Čuvanje i održavanje mikroorganizma	19
3.2.2. Odabir temperature za provođenje fermentacije	19
3.2.3. Postupak proizvodnje i skladištenja fermentiranih probiotičkih napitaka... 19	
3.2.4. Ispitivanje preživljavanja soja tijekom procesa liofilizacije proizvedenih fermentiranih probiotičkih napitaka	20
3.2.5. Određivanje broja živih stanica indirektnom metodom	21
3.2.6. Određivanje pH vrijednosti.....	22
3.2.7. Određivanje stupnja kiselosti, odnosno volumnog udjela proizvedene mliječne kiseline.....	22
3.2.8. Određivanje mikrobiološke čistoće	22
3.2.9. Senzorska ocjena fermentiranih probiotičkih napitaka	23
3.2.10. Statistička obrada podataka	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA	26
4.2. PROIZVODNJA I SKLADIŠTENJE FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA	28
4.3. PREŽIVLJAVANJE SOJA <i>L. lactis</i> ZGBP5-51 TIJEKOM PROCESA LIOFILIZACIJE PROIZVEDENIH FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA	32

4.4. OCJENJIVANJE SENZORSKIH SVOJSTAVA FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA.....	35
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada se unose u organizam u potrebnim količinama, imaju sposobnost poboljšanja zdravlja domaćina. Probiotički se sojevi biraju na temelju svojih bioloških i tehničkih karakteristika, pa se tako selekcija probiotika temelji na njihovoj sigurnosti, otpornosti na antibiotike, vijabilnosti i stabilnosti u gastrointestinalnom (GI) traktu, imunomodulacijskoj sposobnosti te genetskoj i fiziološkoj stabilnosti (Khaled, 2021).

Ukupan broj mikroorganizama koji čine crijevnu mikrofloru odraslog čovjeka je oko $3,9 \cdot 10^{13}$, što je nešto više od ukupnog broja ljudskih stanica. Crijevna mikroflora je u interakciji s cijelim ljudskim tijelom, pomaže u probavi i apsorpiranju hranjivih tvari iz hrane, metaboliziranju suvišnih tvari proizvedenih u crijevima i proizvodnji funkcionalnih tvari potrebnih za život, kao što su aminokiseline, vitamini i kratkolančane masne kiseline. Ako je crijevna mikroflora poremećena, to može utjecati na zdravlje čovjeka i uzrokovati bolesti kao što su pretilost, dijabetes, sindrom iritabilnog crijeva i rak debelog crijeva te je stoga važno održavati njenu ravnotežu (You i sur., 2022). Probiotici održavaju normalnu crijevnu mikrobiotu i štite od gastrointestinalnih patogena, smanjuju razinu kolesterola u krvi, reguliraju krvni tlak i smanjuju oksidativni stres. Mogu se primjerice koristiti za liječenje bolesti urogenitalnog trakta i dišnog sustava te gastrointestinalnih bolesti. Mnoge vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Lactococcus* i *Propionibacterium* koriste se kao probiotici zbog njihovih korisnih učinaka na zdravlje (Yadav i sur., 2020).

Mnogi probiotici pripadaju skupini bakterija mliječne kiseline (BMK) koji se smatraju najviše proučavanim mikroorganizmima. BMK se klasificiraju prema njihovim morfološkim, metaboličkim i fiziološkim karakteristikama na rodove *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus* (Saravanan i sur., 2023). Od njih, posebnu ulogu u mliječnoj industriji zauzima *Lactococcus lactis*, a u sintetskoj se biologiji može koristiti za proizvodnju rekombinantnih proteina, metaboličko inženjerstvo i razvoj probiotika i cjepiva (Norcross i sur., 2019).

U okruženjima bogatim hranjivim tvarima, BMK se natječu s drugim mikroorganizmima brzim rastom i nakupljanjem mliječne kiseline dobivene fermentacijom ugljikohidrata, a za rast moraju provoditi hidrolizu proteina. Proteolitički sustav BMK sastoji se od izvanstaničnih proteinaza, raznih transportera koji omogućuju unos peptida i aminokiselina u stanicu te niza unutarstaničnih peptidaza koje provode hidrolizu peptida u aminokiseline (Hansen i Marcatili,

2020). BMK također izlučuju proteine i peptide u ekstracelularni okoliš kako bi se natjecale s drugim bakterijama. Ti antimikrobni peptidi, toksini, enzimi, bakteriocini i proteini mogu imati razne korisne učinke na zdravlje, među kojima je i antitumorsko djelovanje (Rodrigues i sur., 2019). Bioaktivni peptidi su specifični proteinski fragmenti koji se sastoje od 2 do 20 aminokiselina koji se oslobađaju hidrolizom pomoću proteolitičkih enzima tijekom fermentacije ili probave te nakon oslobađanja pokazuju blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje (Romero-Luna i sur., 2022).

Cilj ovog diplomskog rada bio je primjenom autohtonog, potencijalnog probiotičkog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51, izoliranog, identificiranog i okarakteriziranog kao dobrog producenta proteolitičkih enzima, proizvesti fermentacijom mlijeka probiotičke napitke s bioaktivnim peptidima. Provedena je optimizacija procesa proizvodnje napitaka, pri čemu su praćeni ukupan broj živih stanica, pH vrijednost, stupanj kiselosti i mikrobiološka ispravnost tijekom skladištenja proizvedenih napitaka. Nakon proizvodnje napitaka ocijenjena su njihova senzorska svojstva te je ispitano preživljavanje soja ZGBP5-51 tijekom procesa liofilizacije provedenog u svrhu dobivanja praškastog probiotičkog pripravka koji sadrži bioaktivne peptide.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROBIOTIČKI SOJEVI

Pojam probiotici odnosi se na žive mikroorganizme koji, kada se u organizam unose u adekvatnim količinama, poboljšavaju zdravlje domaćina i igraju ulogu u prevenciji bolesti. Neki od blagotvornih učinaka probiotika uključuju ponovno uspostavljanje crijevne mikrobiote, antimikrobnu aktivnost zbog stvaranja organskih kiselina, vodikovog peroksida i bakteriocina, modificiranje pH vrijednosti u crijevima, natjecanje s patogenima za nutrijente i za mjesta vezanja u domaćinu te smanjenje aktivnosti njihovih toksina, ali i proizvodnju molekula koje su sposobne omesti komunikaciju među stanicama (engl. *Quorum Sensing*, QS) i stvaranje biofilma, onemogućavanje prodiranja u mukozni sloj te poticanje proizvodnje imunoglobulina A koji štiti sluznicu crijeva (Tavares i sur., 2020).

Probiotici se klasificiraju prema rodu, vrsti i soju. Prema rodu, probiotici koji se uobičajeno koriste, dijele se na *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. i *Saccharomyces* spp. *Lactobacillus* spp. su gram-pozitivne, štapičaste bakterije koje se izoliraju iz fermentirane hrane te proizvode mliječnu kiselinu i arome u fermentiranim proizvodima. Također, pokazuju terapijske učinke, kao što su povećanje bioraspoloživosti minerala, poticanje sinteze čimbenika rasta i smanjenje propusnosti crijeva. Postoje 253 vrste iz roda *Lactobacillus* od kojih su najpoznatije *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* i *Lactobacillus delbrueckii*. *Bifidobacterium* spp. mogu proizvoditi različite vitamine, poput vitamina B6, K, tiamina i riboflavina. Posjeduju i značajnu antifungalnu aktivnost te otpornost na antibiotike, a pokazuju i izvrsnu sposobnost proizvodnje mliječne kiseline. Iz roda *Bifidobacterium* spp. komercijalno se koriste vrste *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* i *Bifidobacterium infantis*. Vrste iz roda *Saccharomyces* spp. također imaju povoljna probiotička svojstva, no u usporedbi s *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. još nisu toliko u upotrebi. Imaju sposobnost borbe protiv patogena i upalnih bolesti crijeva zbog svojih imunomodulacijskih aktivnosti poput inhibicije rasta i pričvršćivanja patogena za epitelne stanice crijeva, kao i smanjenje proizvodnje toksina. Najčešće se koriste *Saccharomyces boulardii* i *Saccharomyces cerevisiae* (Gao i sur., 2021).

Rast i razmnožavanje probiotika može se poboljšati prebioticima. Prebiotici su tvari, uglavnom polisaharidi, koji se zbog nedostatka enzima koji bi ih hidrolizirali ne probavljaju u tankom crijevu pa dopijevaju u debelo crijevo gdje ih crijevna mikroflora fermentira do određenih sekundarnih metabolita koji selektivno stimuliraju rast određenog broja bakterija prisutnih u crijevima, mijenjajući tako njihovu aktivnost te blagotvorno djelujući na fiziološke procese u domaćinu kao što su poboljšanje imuniteta i otpornosti na patogene, modifikacija metabolizma, povećanje apsorpcije minerala te snižavanje razine lipida u tijelu. Prebiotici su uglavnom oligosaharidi; ksilooligosaharidi, galaktooligosaharidi, laktuloza, inulin i fruktooligosaharidi, ali mogu biti i polisaharidi, polifenoli i polipeptidni polimeri, a izoliraju se iz raznih izvora, primjerice iz algi, voća i sjemenki (You i sur., 2022).

Izvor iz kojeg je probiotički soj izoliran vrlo je važan za njegovo djelovanje. Probiotičke sojeve se može podijeliti i na autohtone sojeve, koji su prirodno prisutni u domaćinu, i na alohtone sojeve, koji nisu prirodno prisutni u domaćinu. Pokazalo se kako neki alohtoni sojevi, koji su *in vitro* pokazali izvrsna svojstva, u kliničkim ispitivanjima ne uspijevaju kolonizirati u GI traktu zbog razlike između njihovih izvora izolacije i mjesta na kojem trebaju djelovati. Ekološka povijest probiotičkog soja, iako često zanemarena, igra značajnu ulogu u preživljavanju tog soja na potrebnom mjestu djelovanja u domaćinu. Prema tome, izvor izolacije probiotičkog soja trebao bi biti u korelaciji s mjestom djelovanja za koji bi bio namijenjen. Na primjer, ako je određeni soj namijenjen za ublažavanje disbioze crijeva, izvor izolacije trebao bi biti ljudski GI trakt, a slično tome, ako je potrebno liječiti bakterijsku vaginozu ili parodontitis, tada bi se odgovarajući probiotici trebali formulirati pomoću vaginalnih odnosno oralnih izolata. Doprinos shvaćanju značaja ekološke povijesti probiotika dalo je istraživanje koje je izvijestilo o sposobnosti kolonizacije GI trakta za sojeve *Limosilactobacillus mucosae* FSL-04 i *Limosilactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475, koji su autohtoni u ljudskom GI traktu, u usporedbi sa sojem *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 koji je alohton soj u ljudskom GI traktu, te je zaključeno kako autohtoni sojevi učinkovitije koloniziraju ljudski GI trakt nego alohtoni sojevi. Također, potencijal probiotičkih sojeva za kolonizaciju ljudskog GI trakta ovisi o samoj mikrobioti domaćina, tako da su neka istraživanja pokazala da čak i autohtoni sojevi jedne osobe ne mogu kolonizirati GI trakt druge osobe zbog razlika u mikrobioti svakog pojedinca (Idrees i sur., 2022). U tablici 1 navedene su neke od čestih probiotičkih bakterijskih vrsta roda *Lactobacillus*, a nazivi su u skladu s novom nomenklaturom po kojoj je rod *Lactobacillus* podijeljen u čak 25 rodova (Zheng i sur., 2020).

Tablica 1. Neki od često korištenih autohtonih i alohtonih sojeva za ljudski GI trakt
(prilagođeno prema Idrees i sur., 2022)

Autohtoni sojevi	Alohtoni sojevi
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Ligilactobacillus ruminis</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>

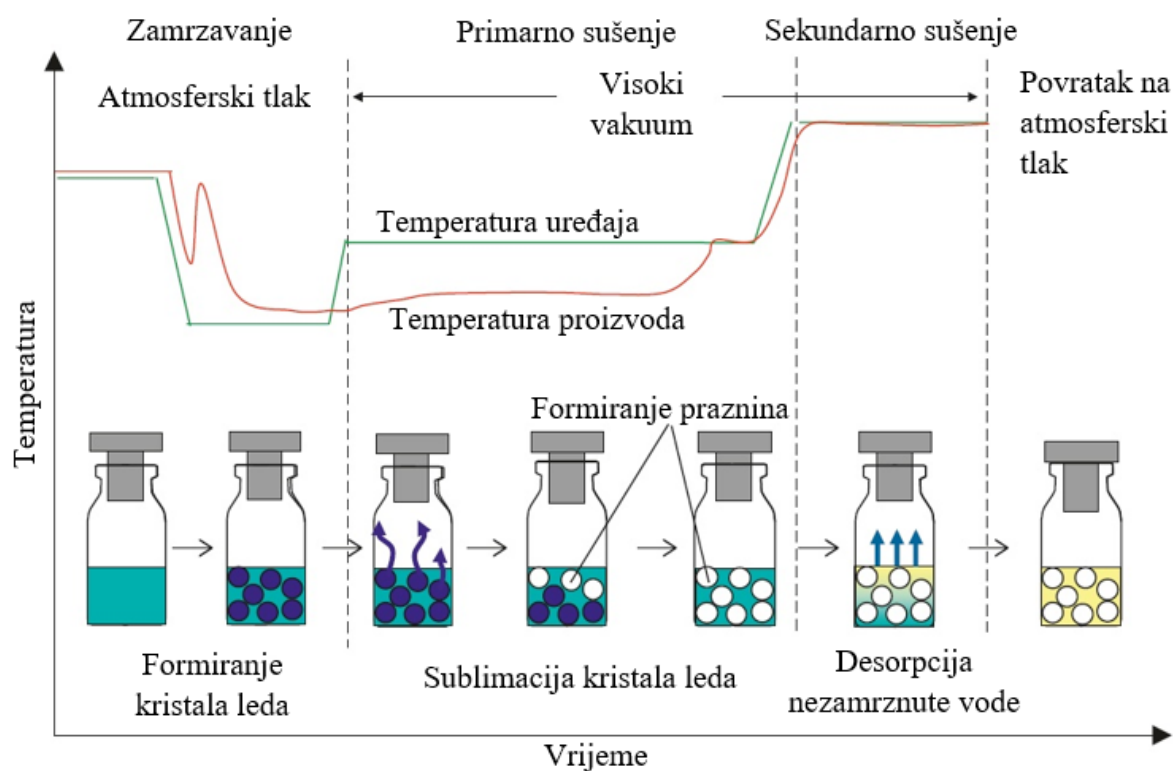
Budući da su probiotici živi mikroorganizmi, lako se destabiliziraju tijekom pripreme, skladištenja i primjene *in vivo*. Nakon oralne primjene, probiotici se izlažu teškim uvjetima u GI traktu koji im značajno smanjuju vijabilnost. Niska pH vrijednost u želucu smanjuje citoplazmatsku pH vrijednost u bakterijskim stanicama i aktivnost glikolitičkih enzima. Žučne kiseline i drugi probavni enzimi uključujući lipaze, proteaze i amilaze u tankom crijevu narušavaju integritet stanične membrane i oštećuju DNA probiotika. Različiti fizikalno-kemijski i okolišni čimbenici koji destabiliziraju probiotike tijekom proizvodnje i skladištenja uključuju toplinu, koncentraciju kisika, mehaničke sile, osmotski šok i promjene u pH vrijednostima. Proces sušenja, primjerice, može dovesti do osmotskog šoka zbog povećanja unutarstanične osmolarnosti što može uzrokovati fiziološke promjene na vanjskoj staničnoj membrani. Prilikom smrzavanja dolazi do stvaranja kristala leda u mediju ili unutar samih stanica što može oštetiti staničnu membranu. Također, mehaničke sile tijekom proizvodnje probiotika mogu oštetiti staničnu stijenu i druge bioaktivne komponente. Reaktivni kisikovi radikali, nastali djelomičnom redukcijom kisika u vodi, mogu oštetiti proteine, lipide i DNA

probiotika te nakupljanje takvih toksičnih metabolita na kraju dovodi do stanične smrti. Stoga je potrebno osmisлити stabilne formulacije probiotika za prevladavanje različitih farmaceutskih i bioloških barijera, koje će maksimalno povećavati terapijsku učinkovitost i kliničku primjenjivost (Baral i sur., 2021).

2.1.1. Probiotičke formulacije

Postoje razne strategije kako se probiotici mogu zaštititi unutar različitih formulacija koje mogu zaštititi probiotičke bakterije od teških uvjeta u GI traktu jer unatoč dosadašnjem napretku i otkrivanju sve više inovativnih formulacija, poželjna vijabilnost i stabilnost probiotika ostaje izazov (Gao i sur., 2021).

Većina komercijalno dostupnih probiotika formulirana je u obliku praha ili granula. Za pripremu praškastih formulacija najčešće se koristi metoda liofilizacije za sušenje sastojaka osjetljivih na toplinu i održavanje dovoljne količine vijabilnih probiotika. Postupak liofilizacije grafički je prikazan na slici 1. Također se može koristiti sušenje raspršivanjem koje nije vremenski zahtjevno ni skupo, no probiotičke su bakterije izložene toplini i dehidraciji. Granule su, pak, pogodne za doziranje velike količine probiotika te je s njima lakše rukovati u odnosu na praškaste oblike, a mogu se obložiti različitim polimerima kako bi im se povećala stabilnost ili kako bi se bolje kontrolirala brzina otpuštanja probiotika. Oralne formulacije probiotika trenutno prevladavaju na tržištu zahvaljujući svojim prednostima, uključujući jednostavnost, niski rizik od infekcije i ekonomsku isplativost, no ipak još uvijek postoji značajni pad vijabilnosti probiotika. Na drugim se alternativnim načinima primjene koji zaobilaze GI trakt poput nazalne, transdermalne, vaginalne i rektalne primjene, također, aktivno radi u svrhu optimiranja terapijske učinkovitosti probiotika. Međutim, svaki način primjene ima svoja ograničenja, pa je tako na primjer, učinkovitost probiotika nakon vaginalne primjene pod utjecajem cervikalne sluzi i varijacija u debljini vaginalne sluznice te svojstava vaginalne tekućine. Isto tako, na nazalnu isporuku probiotika utječu različiti čimbenici poput brzog mukocilijarnog čišćenja, kratkog vremena zadržavanja i male površine te enzimske razgradnje, a osim toga, kolonizaciju probiotičkih sojeva na respiratorni epitel može omesti prisutnost nazalne mikrobne zajednice (Baral i sur., 2021).



Slika 1. Shematska ilustracija procesa liofilizacije (*prilagođeno prema Kawasaki i sur., 2019*)

Probiotički proizvodi pripremljeni u prahu, kapsulama ili tabletama obično se uzimaju s vodom, a kako bi se poboljšale nutritivne vrijednosti probiotičkih proizvoda, mogu se proizvesti i zdravi napitci koji sadrže prebiotike kao što su proteinski hidrolizati i mikroalge koji bi mogli zamijeniti vodu. Očekuju se i novi probiotički proizvodi s manje šećera i s izvrsnom stabilnošću koji se mogu koristiti kao dodaci hrani, čime se može zamijeniti tradicionalna fermentirana hrana (Gao i sur., 2021).

2.2. PROBIOTIČKO DJELOVANJE

Kako bi se neki mikroorganizam mogao koristiti kao probiotik, on prvenstveno mora imati blagotvoran učinak na domaćina, te također, mora biti nepatogen, netoksičan i sposoban preživjeti ili se metabolizirati u crijevnom okolišu, odupirući se organskim kiselinama, žučnim solima i niskim pH vrijednostima, a trebao bi i zadržati svoja svojstva u uvjetima skladištenja (Yadav i sur., 2020). Probiotičke bakterije održavaju integritet epitelnih stanica crijeva tako što

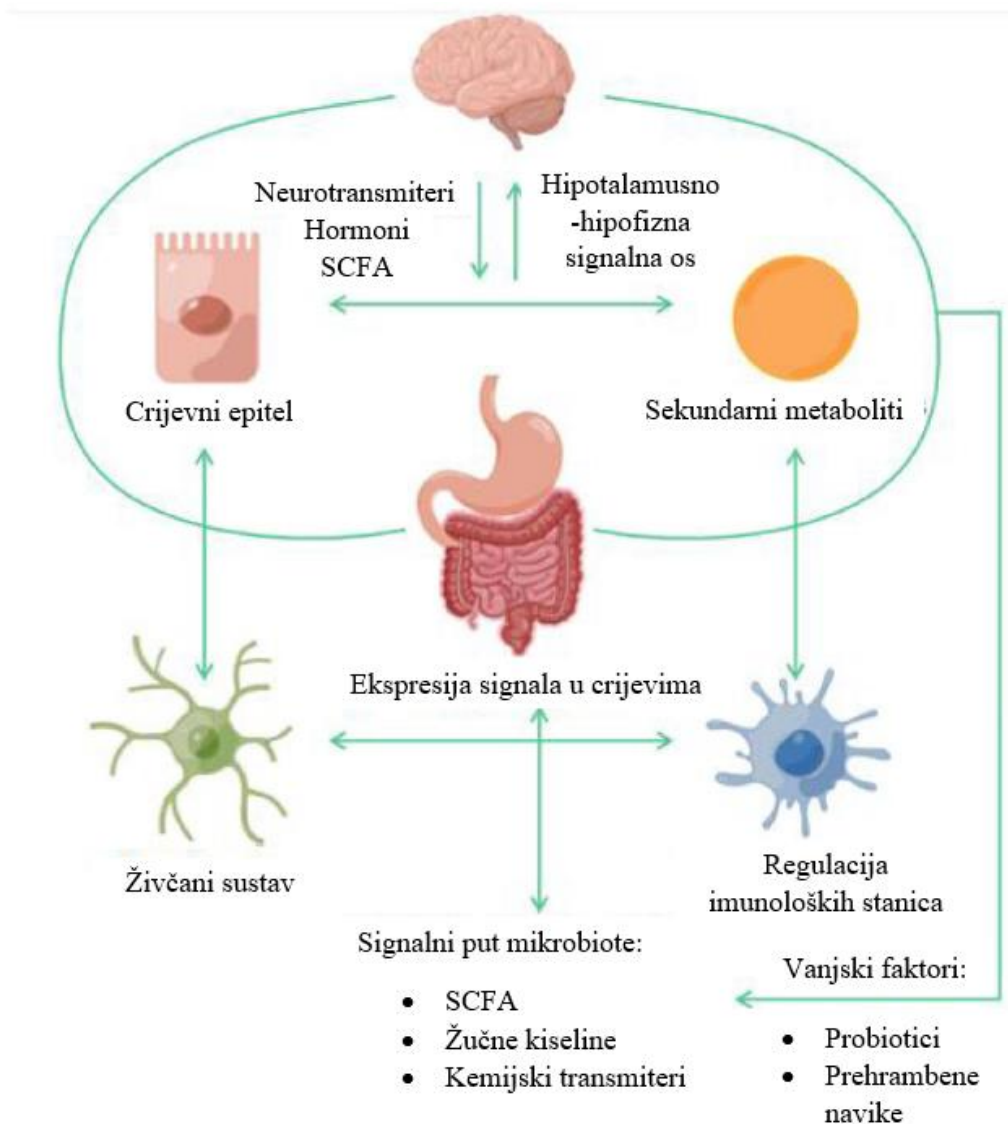
potiču proizvodnju mucina koji štiti protiv antigena i stranih molekula te djeluje kao lubrikant u crijevima. Imaju i imunomodulacijska svojstva, poput stimulacije urođenog i stečenog imuniteta (Tavares i sur., 2020).

Postoje brojna istraživanja koja prate utjecaj crijevne mikrobiote na plućne poremećaje kao što su primjerice astma, kronična opstruktivna plućna bolest, kronični bronhitis, rak pluća, upala pluća i virusne infekcije pluća. Također je poznato da virusne infekcije u respiratornom traktu izazivaju poremećaje u crijevnoj mikrobioti, a nedavno je potvrđeno da infekcija COVID-19 utječe na ravnotežu mikrobiote u crijevima na temelju opažanja smanjenog broja *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp. kod pacijenata zaraženih s COVID-19. Probiotici se povezuju i s borbom protiv citokinske oluje koja se javlja kod nekih pacijenata kao rezultat infekcije s COVID-19, a može oštetiti između ostalog pluća, gastrointestinalni trakt, mozak, kardiovaskularni sustav, jetru i bubrege (Khaled, 2021).

Probiotici imaju utjecaj i kod pretilosti. Pretilost je česta metabolička bolest koja može nastati zbog stila života, prehrane i genetskih čimbenika, ali i poremećaja u crijevnoj mikroflori. Genetskim sekvencioniranjem uzoraka stolice pretilih pacijenata utvrđeno je da oni imaju značajno manje vrsta iz roda *Bacterioides*, u odnosu na vrste iz roda *Firmicutes* u usporedbi sa zdravim pojedincima. Crijevni je mikrobiom također usko povezan s nekim kožnim bolestima, kao što su akne, psorijaza i atopijski dermatitis. Atopijski dermatitis je česta kronična upalna bolest kože koja se uglavnom liječi korištenjem protuupalnih tvari poput kortikosteroida. Probiotici stoga igraju ulogu u prevenciji i liječenju atopijskog dermatitisa jačanjem imuniteta. Akne karakteriziraju upala i seboreja uzrokovana promjenama u hormonima te smanjenim imunitetom. Istraživanja su pokazala kako se unošenjem probiotičkih pripravaka sa sojevima *Lactobacillus bulgaricus* i *Lactobacillus acidophilus* stanje pacijenata s aknama značajno poboljšalo. Psorijaza je također upalna bolest kože koja se povezuje s disbalansom crijevne mikrobiote. Jedno je istraživanje pokazalo kako je mikrobiota crijeva kod pacijenata sa psorijazom ozbiljno narušena, tako što je povećan broj sojeva iz rodova *Firmicutes* i *Actinobacteria*, a smanjen broj sojeva iz rodova *Proteobacteria* i *Bacterioides* (Wang i sur., 2021).

Važnost veze između crijeva i mozga u održavanju homeostaze u tijelu odavno je poznata, a dosadašnji rezultati istraživanja upućuju na to da crijevna mikrobiota i mozak međusobno komuniciraju različitim putevima koji uključuju mikrobne metabolite kao što su kratkolančane masne kiseline (engl. *Short Chain Fatty Acids*, SCFA). SCFA uglavnom proizvode anaerobne bakterije fermentacijom neprobavljenih i neapsorbiranih ugljikohidrata u debelom crijevu, a

one snižavaju pH vrijednost u crijevima što sprječava razmnožavanje štetnih bakterija, a potiče rast probiotičkih bakterija. U crijevima se proizvode i mnogi hormoni i neurotransmiteri poput dopamina i serotonina, tako da crijevna mikrobiota utječe i na emocije, regulaciju raspoloženja i pamćenje. Na slici 2 shematski je prikazana veza između mozga i crijevne mikrobiote. Također, jedno je istraživanje ukazalo na vezu između autizma i neravnoteže crijevne mikrobiote. Kod djece s autizmom pronađene su abnormalne razine SCFA, lipopolisaharida i indola što je vjerojatno uzrokovalo propusnost crijevne barijere. Moguća patogenezna Alzheimerove bolesti slična je autizmu, gdje povećana propusnost crijevne barijere i aktivacija imunoloških stanica oštećuje funkciju krvno-moždane barijere što rezultira gubitkom neurona, nastajanjem upale i oštećenjem živaca u mozgu čime započinje sama bolest. Stoga se probiotici mogu koristiti kao prevencija i liječenje kod autizma i Alzheimerove bolesti (You i sur., 2022). Također postoje i psihobiotici, a to su određeni sojevi probiotičkih bakterija koji se mogu koristiti za poboljšanje psihičkog zdravlja pacijenata. Najčešće su za tu svrhu korišteni sojevi iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, koji služe u regulaciji raspoloženja i ponašanja pojedinca jer mogu lučiti glavni inhibitorni neurotransmiter gama-aminomaslačnu kiselinu (GABA) koji je važan za regulaciju psiholoških i fizioloških procesa u mozgu. Uzimanje psihobiotika rezultira značajnim smanjenjem simptoma depresije i anksioznosti (Yadav i sur., 2020).



Slika 2. Shematski prikaz veze između crijevne mikrobiote i mozga te pripadajućeg signalnog puta (*prilagođeno prema You i sur., 2022*)

Pretvorba sojeva komezalne mikrobiote u probiotike koji se koriste s ciljanim djelovanjem uključuje nekoliko koraka. Prvo se uzorci prikupljeni od zdravih pojedinaca izoliraju pomoću specifičnog medija za rast te se zatim ti izolati podvrgavaju fenotipskoj karakterizaciji i odabiru se kandidati taksonomski identificirani na razini roda, vrste i soja kojima se onda pomoću *in vitro* i *ex vivo* pristupa ocjenjuju sigurnost i funkcionalnost. Nakon toga se pomoću analiza genomike, transkriptomike, proteomike i metabolomike identificiraju metaboliti koje proizvode, a koji potencijalno mogu modificirati metaboličke puteve u domaćinu ili njegovoj mikrobioti. Nakon *in silico* analize slijede *in vivo* istraživanja gdje se koriste razni životinjski modeli za validaciju pretpostavljenih probiotičkih učinaka. Naposljetku, uspjeh u kliničkim

ispitivanjima rezultira razvojem ciljanih probiotika za ljudsku upotrebu (Idrees i sur., 2022). Napredak u tehnologiji uređivanja gena, posebno tehnologija CRISPR-Cas9, pruža nove mogućnosti za uređivanje gena probiotika. Genetički konstruirani probiotici su se posljednjih godina brzo razvili, a istraživači su proveli razne biomedicinske studije o probioticima namijenjenima za dijagnozu i liječenje bolesti pa je tako primjerice razvijen genetski modificirani soj *Lactococcus lactis* AG019 koji može isporučiti proinzulin i interleukin 10 u gastrointestinalnu sluznicu, smanjiti ili ukloniti oštećenje β -stanica gušterače te potencijalno stabilizirati ili poboljšati proizvodnju endogenog inzulina (Ma i sur., 2022).

Treba uzeti u obzir da su i mnoge vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* i *Bifidobacterium* izolirane iz patoloških stanja, kao što su bakterijski endokarditis, sistemske infekcije i meningitis. Translokacija bakterija iz crijeva u krvotok događa se zbog imunosupresije i smanjenja crijevne barijere, a može dovesti do bakterijemije, sepse i zatajenja organa. Većina sojeva BMK uključena u takvim kliničkim slučajevima je *E. faecium* i *E. faecalis*, s nekoliko studija koje uključuju i *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei* i *L. plantarum*. U zdravih osoba je utvrđeno da se translokacija bakterija događa često, bez štetnih posljedica, u postotku od 5 do 10 %. Istraživanja koja su uključivala zdrave pojedince nisu prijavila teške bolesti poput sepse uzrokovane translokacijom probiotika. Objašnjenje ovog fenomena nije u potpunosti razumljivo, ali pretpostavlja se da je to zbog osjetljivosti probiotika na djelovanje makrofaga izvan crijeva (Tavares i sur., 2020).

2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

BMK čine heterolognu grupu nesporelirajućih, gram-pozitivnih, mikroaerofilnih, nepokretnih i katalaza-negativnih mikroorganizama. Glavna im je karakteristika sposobnost proizvodnje mliječne kiseline u fermentaciji ugljikohidrata. Ove bakterije se klasificiraju kao homofermentativne i heterofermentativne prema konačnom produktu fermentacije. Mliječna kiselina je glavni produkt fermentacije glukoze u homofermentativnoj skupini, dok se u heterofermentativnoj skupini uz mliječnu kiselinu proizvodi i ugljikov dioksid, octena kiselina i etanol. BMK uključuju razne vrste iz roda *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Sporolactobacillus* i *Weissella*. Većina ovih bakterija ima GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) status (Tavares i sur., 2020). Tijekom fermentacije, BMK provode tri glavne skupine biokemijskih reakcija pretvorbe sastojaka mlijeka: pretvorba

ugljikohidrata u mliječnu kiselinu ili druge metabolite (glikoliza), hidroliza kazeina na peptide i slobodne aminokiseline (proteoliza) te razgradnja mliječne masti na slobodne masne kiseline (lipoliza). Ove reakcije zaslužne su za proizvodnju raznih poželjnih spojeva koji daju okus fermentiranim mliječnim proizvodima. Jedan od takvih spojeva je diacetil te je dokazano kako se karakteristična aroma fermentiranih mliječnih proizvoda može osjetiti onda kada koncentracija diacetila dosegne 1 mg kg^{-1} . Također, slobodne aminokiseline dobivene proteolizom mogu se pretvoriti u različite spojeve uključujući amonijak, aldehide, fenole, indole i alkohole, koji mogu pridonijeti okusu mliječnih proizvoda (Chen i sur., 2017).

2.3.1. *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis igra važnu ulogu u industriji gdje se primjenjuje u proizvodnji niza fermentiranih proizvoda te je zbog svoje važnosti bio predmet istraživanja više od jednog stoljeća. U početku opisan kao *Bacterium lactis*, prvo je reklasificiran kao *Streptococcus lactis*, a kasnije kao *Lactococcus lactis*. Mnoge od primjena *L. lactis* u fermentaciji hrane nalaze se u mljekarskom sektoru, a primarna uloga *L. lactis* je zakiseljavanje koje ovisi o učinkovitoj pretvorbi laktoze u mliječnu kiselinu što doprinosi produljenju roka trajanja fermentiranih mliječnih proizvoda sprječavanjem razvoja patogenih mikroorganizama i organizama koji uzrokuju kvarenje u teksturi ili karakteristikama okusa. Svojstva teksture ne ovise samo o promjenama u fizikalno-kemijskim svojstvima mliječnih proteina izazvanim zakiseljavanjem, nego su također pod utjecajem proizvodnje izvanstaničnih polisaharida. Važnost stvaranja okusa pomoću *L. lactis* posebno je istaknuta u proizvodnji sireva koja uključuje dugo razdoblje zrenja tijekom kojeg se sastojci mlijeka pretvaraju u karakteristične spojeve okusa. Ekstracelularna proteoliza, unos peptida i aminokiselina u stanicu te intracelularna razgradnja peptida peptidazama kao i regulacija ekspresije proteina uključenih u ove procese opsežno je proučavana u *L. lactis* te su dosad opisani brojni biokemijski putevi i ključni enzimi uključeni u ovaj proces. *L. lactis* je dugo vremena služio kao modelni organizam u istraživanju BMK te je doprinio našem sadašnjem razumijevanju molekularne biologije, genetike, regulacije gena i metabolizma ove skupine bakterija (Kleerebezem i sur., 2020).

L. lactis optimalno raste pri pH vrijednosti 6,3 i na $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Također je auktotrof za aminokiseline razgranatih lanaca te je oligopeptidni ABC transporter neophodan za rast na prirodnim supstratima kao što je kazein iz mlijeka, a sastoji se od više podjedinica koje uključuju dva transmembranska proteina (OppB i OppC), dva proteina koji vežu ATP (OppD i OppF) i protein koji veže supstrat (OppA). OppA je posebno zanimljiv jer ima relativno nisku specifičnost za peptidne sekvence, što je vjerojatno zato što gotovo isključivo stvara vodikove

veze s peptidnom okosnicom, a ne i s bočnim ograncima peptida. Niži pH potiče OppA na vezanje peptida te tada afinitet OppA za peptide raste, što je ključno budući da je u fermentaciji hrane to važna prilagodba na stresna stanja (Norcross i sur., 2019).

Sojevi *L. lactis* mogu se pomoću genetičkog inženjerstva modificirati tako da postanu producenti heterolognih proteina i prijenosnici DNA cjepiva. Svojstva koja čine *L. lactis* idealnim kandidatom za proizvodnju molekula od interesa je izostanak proizvodnje lipopolisaharida i drugih toksičnih metabolita te je jedini protein koji se izlučuje u količinama koje se mogu detektirati gel elektroforezom USP45 (engl. *Unknown Secreted Protein*). Ovo je svojstvo važno jer olakšava analizu i pročišćavanje proizvedenih proteina od interesa. Osim u *L. lactis*, heterologni proteini mogu se eksprimirati i u ostalim BMK poput *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. Primjer proizvedenog rekombinantnog proteina u *L. lactis* je onkogeni virusni protein E6 iz HPV-a koji je identificiran u zaraženim stanicama, a može poslužiti i kao tumorski specifični antigen te bi se potencijalno mogao koristiti kao imunoterapijska alternativa za liječenje raka vrata maternice povezanog s HPV-om. Osim heterolognih sustava proizvodnje proteina, *L. lactis* se može koristiti i kao prijenosnik DNA cjepiva jer se tako DNA cjepivo može zaštititi od razgradnje enzimskim djelovanjem ili od nepovoljnih uvjeta u GI traktu. Međutim, mehanizmi kojima se DNA prenosi sa živih bakterijskih vektora na eukariotske stanice još nisu potpuno razjašnjeni te je još potrebno potvrditi sigurnost takvih cjepiva. Postoji rizik od širenja gena za rezistenciju na antibiotike u okoliš, budući da se prilikom genetskih modifikacija bakterija kao selektivni markeri najčešće koriste geni za rezistenciju na antibiotike, stoga bi moglo doći do horizontalnog prijenosa plazmida s tim genima na druge bakterije (Tavares i sur., 2020).

2.4. PROTEOLITIČKI SUSTAV BMK

Proteolitički sustav BMK sastoji se od proteaza, peptidaza i specifičnih transportnih proteina. Ima važnu ulogu u opskrbi stanica dušikovim spojevima budući da je količina slobodnih aminokiselina u okolišu obično nedovoljna u odnosu na potrebe bakterija. Također, proteolitički je sustav važan i u formiranju organoleptičkih svojstava fermentiranih mliječnih proizvoda. BMK razgrađuju proteine iz mlijeka tako da proteaze prvo cijepaju kazein na peptide, nakon čega se oni transportiraju u stanicu gdje ih unutarstanične peptidaze razgrađuju na aminokiseline i manje peptide. BMK mogu regulirati ekspresiju svojih gena ovisno o promjenama u dostupnosti dušika, a biosinteza specifičnih proteolitičkih enzima na staničnoj

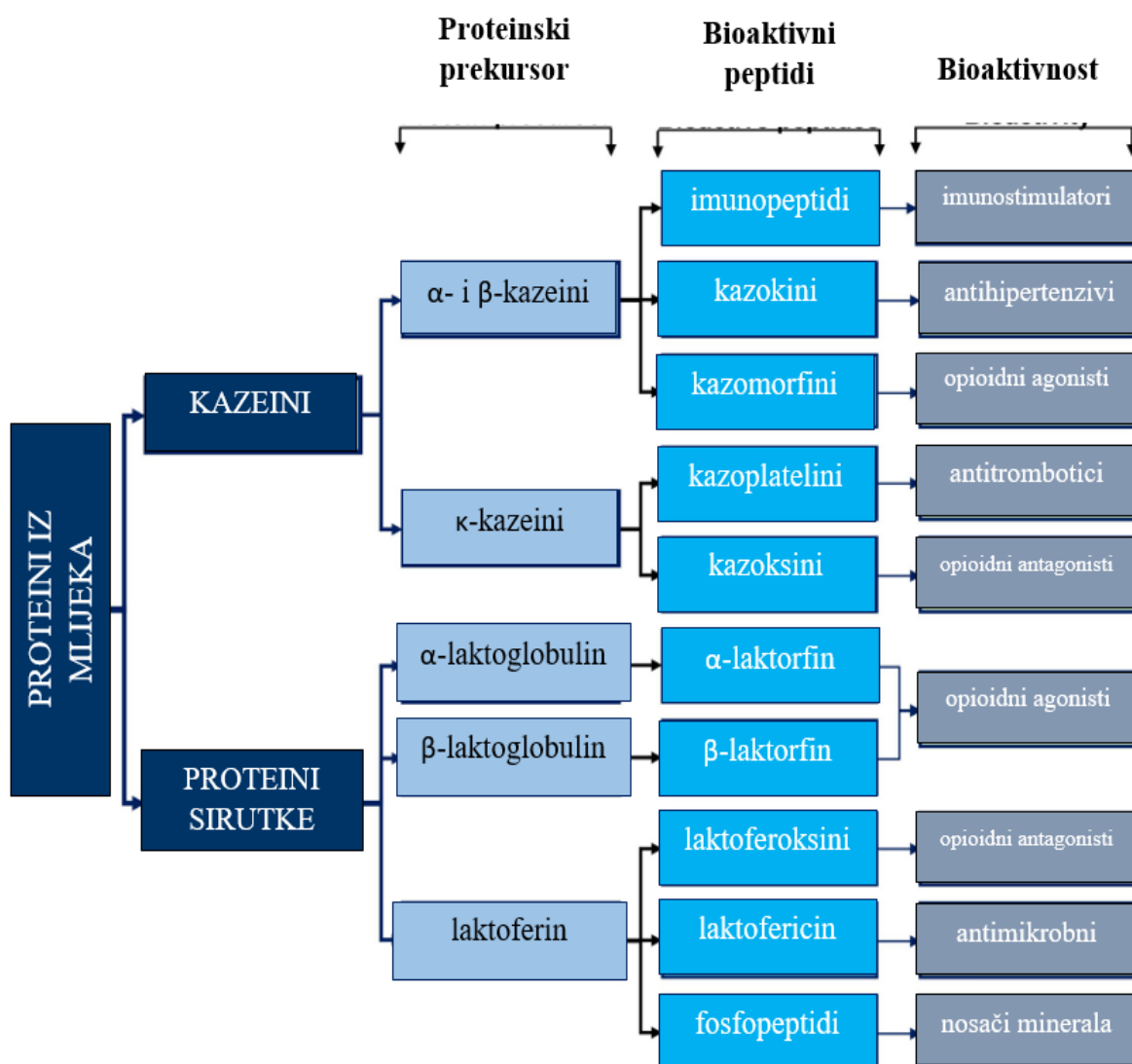
razini temelji se na mehanizmu indukcije u prisutnosti odgovarajućeg supstrata (Kieliszek i sur., 2021).

Proteaze stanične membrane (engl. *Cell-Envelope Proteinases*, CEP) igraju važnu ulogu u proteolitičkom sustavu BMK i najviše se koriste u biotehnologiji. Tijekom fermentacije mlijeka, CEP hidroliziraju kazeine do peptida i aminokiselina te se zbog tog nakupljanja hidrolizata stvaraju karakteristična senzorna i bioaktivna svojstva. Postoji 6 glavnih vrsta, a to su PrtP pronađen u *L. paracasei* i *L. lactis*, PrtB i PrtL iz *L. delbrueckii*, PrtH iz *L. helveticus*, PrtS iz *Streptococcus thermophilus* i PrtR iz *L. rhamnosus*. Prisutnost određenih kationa utječe na aktivnost CEP, pa tako Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} povećavaju njihovu aktivnost, dok ju primjerice Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} i Hg^{2+} snižavaju. CEP pokazuju izrazitu specifičnost za hidrolizu kazeina i to za 4 tipa kazeina iz mlijeka, a to su α_{s1} -, α_{s2} -, β - i κ -kazeini. CEP snižavaju i pojavu alergena iz mlijeka budući da mogu razgraditi α - i β -laktoglobulin koji su poznati alergeni iz proteina sirutke. Osim za hidrolizu kazeina, CEP se mogu koristiti i za hidrolizu proteina iz mesa i biljaka, poput soje, pa tako mogu smanjiti rizik i od alergija povezanih s proteinima iz soje. Također, CEP mogu razgraditi i toksine iz vode koji se nazivaju mikrocistini, a proizvode ih cijanobakterije. Potrebna su daljnja istraživanja za bolje razumijevanje proteina s površine bakterijskih stanica kako bi se mogli upotrebljavati u industriji (Ji i sur., 2021).

2.4.1. Bioaktivni peptidi

Kravlje mlijeko sastoji se od niza bioaktivnih molekula, a može se podijeliti na glavne proteinske frakcije koje uključuju laktoferin, kazein, imunoglobulin, beta-laktoglobulin, alfa-laktalbumin i proteine sirutke. Na slici 3 prikazane su najvažnije skupine proteina iz mlijeka i njihova biološka aktivnost (Murtaza i sur., 2022). Bioaktivni peptidi su kratke aminokiselinske sekvence unutar proteina mlijeka koje se oslobađaju u procesima fermentacije mlijeka pomoću proteolitičkih starter kultura ili pomoću enzimske hidrolize tijekom probave. Bioaktivni peptidi koji se oslobađaju proteolizom kazeina, koji je glavni njihov izvor, obično imaju od 2 do 20 aminokiselinskih ostataka. Također, utječu na kardiovaskularni, neurološki, probavni, endokrini i imunološki sustav te pokazuju antimikrobna, antitrombotska, antihipertenzivna, antiaterogena, antioksidativna i imunomodulacijska svojstva. Dodatak bioaktivnih peptida u funkcionalnu hranu može poboljšati zdravlje potrošača zbog svojih terapijskih vrijednosti tako što mogu spriječiti infekcije budući da su pokazali inhibitornu aktivnost protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih sojeva, kao što su primjerice *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*, inhibirati pojavu raka aktivacijom i stimulacijom imunološkog sustava te regulacijom oksidativnog metabolizma spriječiti

oštećenje staničnih proteina, lipida, DNA i enzima (Punia i sur., 2020). Razgradnja bioaktivnih peptida u GI traktu poboljšava njihovu biodostupnost, ali i utječe na njihovu biološku aktivnost. Različiti faktori utječu na otpornost bioaktivnih peptida na razgradnju u GI traktu, a oni uključuju njihovu hidrofobnost, kompoziciju aminokiselina i peptidnu sekvencu. Bioaktivni peptidi mogu se i zaštititi od hidrolize u GI traktu pomoću metoda inkapsulacije na bazi proteina, polisaharida ili lipida (Mirzapour-Kouhdacht i Garcia-Vaquero, 2022).



Slika 3. Shematski prikaz podjele proteina iz mlijeka i pripadajućih bioloških aktivnosti (prilagođeno prema Murtaza i sur., 2022)

U industriji, bioaktivni peptidi se proizvode pomoću mikrobne fermentacije i enzimske hidrolize, no ti načini često daju slab prinos peptida. Razvijene su razne nove tehnike

predtretmana mlijeka i mliječnih proizvoda za dobivanje veće količine bioaktivnih peptida u mliječnoj industriji, a neke od njih su ultrazvučna, mikrovalna i visokotlačna predobrada. Ultrazvučna predobrada bazira se na ultrazvučnim valovima koji razbijaju elektrostatske i hidrofobne interakcije u mliječnim proteinima. Mikrovalna predobrada je jednostavne izvedbe pa bi se stoga mogla provoditi kontinuirano. Visokotlačna predobrada oslanja se na konformacijske promjene u proteinima zbog čega oni postaju podložniji enzimskoj razgradnji. Zatim se bioaktivni peptidi razdvajaju pomoću ultrafiltracije i gel filtracije, identificiraju pomoću masene spektrometrije i pročišćavaju pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (Murtaza i sur., 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom je radu korišten autohtoni potencijalno probiotički soj *Lactococcus lactis* ZGBP5-51, producent bioaktivnih peptida, uzgojen u M17 bujonu, aerobno pri 37 °C. Soj je izoliran iz tradicionalno proizvedenog svježeg sira, identificiran, okarakteriziran kao dobar producent proteolitičkih enzima i uvršten u Zbirku mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Također je korištena komercijalna starter kultura DI-PROX M229, proizvođača BIOPROX, Francuska.

3.1.2. Hranjive podloge

U ovom su radu korištene sljedeće hranjive podloge:

a) za uzgoj i održavanje soja *L. lactis* ZGBP5-51:

- M17 agar sastava (g L⁻¹ destilirane vode) (Biolife, Italija): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5; laktoza 5; natrijev glicerofosfat 19; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1.
- M17 tekuća podloga istog sastava kao M17 agar, samo bez dodatka agara

b) za određivanje mikrobiološke ispravnosti:

- BP (engl. *Baird-Parker*) agar sastava (g L⁻¹ destilirane vode) (Biolab, Mađarska): pepton iz kazeina 10; goveđi ekstrakt 5; kvašćev ekstrakt 1; natrijev piruvat 10; litijev klorid 5; glicin 12; agar 17. pH podloge je 6,8, a sterilizacija je provedena pri 121°C tijekom 15 minuta. Nakon što je podloga ohlađena na 50°C, sterilno je dodana 5 % emulzija telurita i žumanjka.
- XLD (engl. *Xylose Lysine Deoxycholate*) agar sastava (g L⁻¹ destilirane vode) (Biovit, Italija): ksiloza 3,5; L-lizin 5; laktoza 7,5; saharoza 7,5; natrijev klorid 5; kvašćev ekstrakt 3; natrij-dezoksikolat 2,5; natrijev tiosulfat 6,8; amonij-željezo (III) citrat 0,8; fenol crveno 0,08; agar 13,5.
- Rapid *E. coli* 2 agar sastava (g L⁻¹ destilirane vode) (Biovit, Italija): mesni pepton 5; želatin pepton 5; NaCl 5; kvašćev ekstrakt 3; selektivni kromogeni supstrat 6; agar 13.

- Aloa Listeria agar sastava (g L⁻¹ destilirane vode) (Biolife, Italija): mesni pepton 18; tripton 6; kvašćev ekstrakt 10; natrijev piruvat 2; glukoza 2; magnezijev glicerofosfat 1; magnezijev sulfat 0,5; natrijev klorid 5; litijev klorid 10; natrijev hidrogenfosfat 2,5; 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukopiranozid 0,05; agar 13. pH podloge je 7,2, a sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodan Aloa selektivni dodatak i jedna vijala tekućeg dodatka.
- Chromogenic Coliform agar sastava (g L⁻¹ destilirane vode) (Biolife, Italija): pepton iz kazeina 1; kvašćev ekstrakt 2; natrijev klorid 5; natrijev dihidrogenfosfat dihidrat 2,2; dinatrijev hidrogenfosfat 2,7; natrijev piruvat 1; sorbitol 1; triptofan 1; Tergitol®7 0,15; 6-kloro-3-indoksil-β-D-galaktopiranozid 0,2; 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-glukuronid cikloheksil-amonijeva sol 0,1; izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid 0,1; agar 10,6.

3.1.3. Kemikalije

- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- fiziološka otopina, PBF, Hrvatska
- natrijeva lužina, p. a., „Kemika“, Hrvatska
- fenolftalein, „Kemika“, Hrvatska

3.1.4. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete (1000, 200 i 20 μL), „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- Erlenmeyerove tikvice, „Technische Glaswerke Ilmenau“, Njemačka
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje od 50 mL, „Falcon“, Engleska
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- nastavci za pipete, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- kivete od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka

- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za kivete, „neoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vorteks mješać V1 plus, „Biosan“, Latvija
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, Njemačka

3.1.5. Sirovina

- pasterizirano mlijeko s 3,2 % m.m. proizvođača Mini mljekara Veronika d.o.o., Hrvatska

3.2. METODE

3.2.1. Čuvanje i održavanje mikroorganizma

Soj *L. lactis* ZGBP5-51 čuvan je pri -80 °C u M17 tekućoj podlozi uz dodatak 15 % (v v⁻¹) glicerola te je prije provođenja eksperimenta inokuliran u 5 mL odgovarajuće podloge te stavljen na aerobnu inkubaciju preko noći pri 37 °C.

3.2.2. Odabir temperature za provođenje fermentacije

Nakon prekonocne aerobne inkubacije soja *L. lactis* ZGBP5-51 pri 37 °C u M17 bujonu, 9 paralela poraslih kultura prebačeno je u kivetu za centrifugiranje te je provedeno centrifugiranje pri 4200 o min⁻¹ tijekom 10 minuta, nakon čega je odliven supernatant. Talog je suspendiran u 18 mL mlijeka. 2 mL suspenzije stanica prebačeno je u 9 prethodno steriliziranih Erlenmeyerovih tikvica nakon čega je dodano 48 mL mlijeka, tako da je ukupni volumen u tikvicama iznosio 50 mL. Nakon toga su po tri tikvice spremljene u termostat na temperaturi od 28 °C, 37 °C i 42 °C. Tijekom inkubacije, u različitim vremenskim intervalima, odnosno u 0., 4., 16. i 24. satu, određivani su: ukupan broj živih stanica pomoću indirektna metode, pH vrijednost te stupanj kiselosti, odnosno volumni udio (v v⁻¹, %) proizvedene mliječne kiseline.

3.2.3. Postupak proizvodnje i skladištenja fermentiranih probiotičkih napitaka

Proizvedena su tri fermentirana probiotička napitka:

1. napitak proizveden dodatkom komercijalne starter kulture DI-PROX M229, proizvođača BIOPROX, Francuska

2. napitak proizveden dodatkom komercijalne starter kulture DI-PROX M229, proizvođača BIOPROX, Francuska i soja *L. lactis* ZGBP5-51

3. napitak proizveden dodatkom soja *L. lactis* ZGBP5-51.

Nakon preonoćne inkubacije soja *L. lactis* ZGBP5-51 pri 37 °C u M17 bujonu, porasle su kulture prebačene u kivete za centrifugiranje. U jednu je kivetu prebačeno 5 mL jedne kulture *L. lactis* ZGBP5-51 za proizvodnju napitka broj 3, a u drugu kivetu 2,5 mL druge kulture *L. lactis* ZGBP5-51 za proizvodnju napitka broj 2. Provedeno je centrifugiranje tijekom 10 minuta pri 4200 o min⁻¹. Nakon toga je supernatant odliven te je talog za proizvodnju napitka broj 3 resuspendiran u 50 mL mlijeka, dok je talog za proizvodnju napitka broj 2 resuspendiran u 25 mL mlijeka te su oba inokuluma za proizvodnju napitaka 2 i 3 ostavljena na aerobnoj inkubaciji preko noći pri 28 °C.

Idući je dan u inokulumima određen broj živih stanica indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.5. Fermentirani mliječni napitci proizvedeni su pomoću pripremljenih inokuluma i odabrane komercijalne starter kulture u tvrtki PROBIOTIK d.o.o. Svježem pasteriziranom mlijeku određena je temperatura i pH-vrijednost, a nakon toga je ono dogrijano na temperaturu fermentacije od 22 °C. Prvi napitak proizveden je samo s dodatkom komercijalne starter kulture DI-PROX M229, drugi napitak dodatkom komercijalne starter kulture DI-PROX M229 i inokuluma za proizvodnju napitka broj 2, a treći samo s dodatkom inokuluma za proizvodnju napitka broj 3. Svaki uzorak fermentiranih napitaka proizveden je u količini od 1 litre.

Fermentacija je trajala do postizanja pH vrijednosti od oko 4,60 pri 22 °C. Idući je dan probiotičkim napitcima određeni broj živih stanica indirektnom metodom, pH vrijednost, stupanj kiselosti, senzorska svojstva i mikrobiološka ispravnost te su napitci skladišteni u hladnjaku pri 4 °C. Tijekom tri tjedna skladištenja, odnosno 7., 14. i 21. dan, napitcima je određen broj živih stanica indirektnom metodom, pH vrijednost te stupanj kiselosti, odnosno volumni udio (v v⁻¹, %) proizvedene mliječne kiseline, a 21. dan određena je i mikrobiološka ispravnost.

3.2.4. Ispitivanje preživljavanja soja tijekom procesa liofilizacije proizvedenih fermentiranih probiotičkih napitaka

Prije provođenja procesa liofilizacije određen je broj živih stanica indirektnom metodom prema postupku u poglavlju 3.2.5. Po 1 mL svakog fermentiranog probiotičkog napitka prebačeno je u sterilnu penicilinku i poklopljeno steričnim gumenim čepom te zamrznuto pri -80 °C. Kada su uzorci zamrznuti, provedena je liofilizacija u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus

prikazanom na slici 4. Nakon provedene liofilizacije, ponovno je određen broj živih stanica indirektnom metodom prema postupku u poglavlju 3.2.5.



Slika 4. Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus (*vlastita fotografija*)

3.2.5. Određivanje broja živih stanica indirektnom metodom

Broj živih stanica određen je indirektnom metodom tako da je po 1 mL svakog uzroka prebačeno u sterilnu kivetu od 1,5 ili 2 mL. Zatim su priređena decimalna razrjeđenja tako je uzeto po 100 μ L uzorka i prebačeno u kivetu koja sadrži 900 μ L sterilne fiziološke otopine te je to razrjeđenje homogenizirano pomoću vorteks mješača. Postupak je ponovljen do 8. razrjeđenja. 10 μ L svakog razrjeđenja naciepljeno je na M17 agar u dvije paralele u obliku kapljica te je stavljeno na aerobnu inkubaciju tijekom 48 sati pri 37 °C, nakon čega su porasle su kolonije izbrojane te je izračunat broj živih stanica po mililitru uzorka (engl. *Colony-Forming Units/mL*, CFU/mL) prema formuli:

$$\frac{CFU}{mL} = \left(\frac{a}{b}\right) * c$$

gdje je a broj poraslih kolonija, b volumen upotrijebljenog uzorka (μL), a c recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja.

3.2.6. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost određena je pomoću pH-metra. Elektroda pH-metra uronjena je u uzorak te je očitana ustaljena pH vrijednost na zaslonu pH-metra (Kos i sur., 2003).

3.2.7. Određivanje stupnja kiselosti, odnosno volumnog udjela proizvedene mliječne kiseline

Stupanj kiselosti uzoraka u stupnjevima po Soxhlet-Henkelu ($^{\circ}\text{SH}$) određen je prema Kos i sur. (2003). 1 mL uzorka razrijeđeno je s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici te je titrirano s 0,1 M natrijevog hidroksida do pojave ružičastog obojenja uz fenolftalein kao indikator. Zatim je stupanj kiselosti, odnosno volumni udio (v v^{-1} , %) proizvedene mliječne kiseline izračunat prema formuli:

$$\begin{aligned}^{\circ}\text{SH} &= a * 20 * f_{\text{NaOH}} * 2 \\ \% \text{ mliječne kiseline} &= ^{\circ}\text{SH} * 0,0225\end{aligned}$$

gdje je a volumen utrošenog 0,1 M natrijevog hidroksida (mL), f_{NaOH} 1, a $^{\circ}\text{SH}$ približno 0,0225 g mliječne kiseline (%).

3.2.8. Određivanje mikrobiološke čistoće

Nacjeppljivanjem prethodno pripremljenih decimalnih razrjeđenja uzoraka (opisano pod 3.2.4.) na različite hranjive podloge pogodne za rast različitih vrsta kontaminanata u hrani, provjerena je mikrobiološka ispravnost uzoraka. Po 10 μL određenog razrjeđenja nacijepljeno je u dvije paralele u obliku kapljica na:

- a) BP (engl. *Baird-Parker*) agar namijenjen za izolaciju *Staphylococcus aureus*
- b) XLD (engl. *Xylose Lysine Deoxycholate*) agar namijenjen za izolaciju *Salmonella* i *Shigela* vrsta
- c) Rapid *E. coli* 2 agar namijenjen za izolaciju *Escherichia coli*
- d) Aloa Listeria agar namijenjen za izolaciju *Listeria monocytogenes*
- e) Chromogenic Coliform agar namijenjen za izolaciju *E. coli* i koliformnih bakterija

Petrijeve zdjelice s nacijepljenim razrjeđenjima su zatim stavljene na aerobnu inkubaciju pri 37 $^{\circ}\text{C}$. Nakon završetka inkubacije, provjereno je jesu li u Petrijevim zdjelicama porasle kolonije.

3.2.9. Senzorska ocjena fermentiranih probiotičkih napitaka

Senzorska svojstva koja su određivana za ocjenu probiotičkih napitaka su: izgled, boja, konzistencija, miris i okus. Uzorci napitaka iz tri pokusa ocijenjeni su od strane tri panelista na 1. dan čuvanja napitaka. U tablici 2 prikazan je primjer obrasca koji je dan panelistima za procjenjivanje svojstava napitaka. Svakom je svojstvu fermentiranih probiotičkih napitaka dodijeljena ocjena od 1 do 5 te je onda ta ocjena korigirana faktorom značajnosti (F_v). Postignuti su bodovi dobiveni množenjem dobivene ocjene i faktora značajnosti (Božanić i sur., 2010).

Tablica 2. Primjer obrasca za senzorsko ocjenjivanje fermentiranih probiotičkih napitaka
(prilagođeno prema Božanić i sur., 2010)

Svojstva	F_v	Najveći broj bodova	Postignut broj bodova	Napomena
Izgled	0,2	1		
Boja	0,2	1		
Konzistencija	0,8	4		
Miris	0,4	2		
Okus	2,4	12		
Ukupno		20		

3.2.10. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je Microsoftov program Excel. Podaci prikupljeni za vrijeme mjerenja ispitivanih uzoraka uneseni su u program, nakon čega je izračunata srednja vrijednost unesenih podataka za tri pokusa kao i standardna devijacija, koja služi kao mjera odstupanja podataka od srednje vrijednosti, prema sljedećim formulama:

$$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n}$$
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

gdje je \bar{x} srednja vrijednost uzoraka, x_i vrijednost uzorka, n veličina uzorka, a σ standardna devijacija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je proizvesti fermentirane probiotičke napitke primjenom autohtonog soja *Lactococcus lactis* ZGBP5-51 koji je producent proteolitičkih enzima i koji fermentacijom mlijeka proizvodi bioaktivne peptide što je ustanovljeno u prethodnim istraživanjima provedenim u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura (rezultati nisu objavljeni).

U svrhu optimizacije proizvodnje fermentiranih probiotičkih napitaka, određivani su ukupan broj živih stanica indirektnom metodom, pH vrijednost i stupanj kiselosti, odnosno volumni udio ($v\ v^{-1}$, %) proizvedene mliječne kiseline pri 28 °C, 37 °C i 42 °C. Rezultati su prikazani na slikama 5-7.

Rezultati mjerenja ukupnog broja živih stanica, pH vrijednosti i stupnja kiselosti, odnosno volumnog udjela ($v\ v^{-1}$, %) proizvedene mliječne kiseline tijekom skladištenja proizvedenih probiotičkih napitaka prikazani su u tablicama 5-7. Rezultati određenih parametara prije provođenja fermentacije prikazani su u tablicama 3 i 4, a u tablici 8 prikazani su rezultati određivanja mikrobiološke čistoće.

Preživljavanje soja *L. lactis* ZGBP5-51 u proizvedenim napitcima ispitano je tijekom procesa liofilizacije te su rezultati prikazani na slici 9 te u tablici 9.

Senzorske ocjene proizvedenih napitaka određivane su na 1. dan čuvanja. Senzorska svojstva koja su ocjenjivana su: izgled, boja, konzistencija, miris i okus. Rezultati su prikazani u tablicama 10-12 te na slici 10.

Sva su ispitivanja provedena u tri pokusa te su u tablicama i na slikama prikazane izračunate srednje vrijednosti i pripadajuća statistička razlika.

4.1. OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA

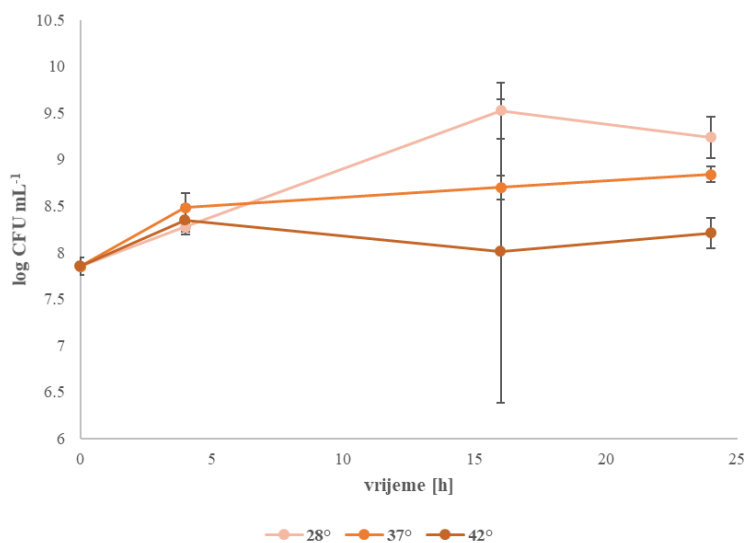
BMK su pokretači fermentacije mliječnih proizvoda te se koriste za dobivanje fermentirane funkcionalne hrane. Primarna uloga BMK u proizvodnji hrane je fermentacija izvora ugljika za zakiseljavanje sirovine pomoću proizvedene mliječne kiseline, čime se smanjuje prisutnost nepoželjnih patogena koji uzrokuju kvarenje. Time poboljšavaju sigurnost i produžuju vrijeme očuvanja konačnog proizvoda te mijenjaju senzorska svojstva proizvoda. Ovisno o proizvodnoj praksi za svaki pojedini proizvod, BMK se odabiru prema njihovoj optimalnoj temperaturi rasta te se dijele na mezofilne (s optimalnom temperaturom fermentacije oko 30 °C) ili termofilne kulture (s optimalnom temperaturom fermentacije oko 42 °C) (González-González i sur., 2022).

Prije proizvodnje funkcionalnih napitaka provedena je optimizacija fermentacije, odnosno ispitano je pri kojoj temperaturi soj *L. lactis* ZGBP5-51 najbolje provodi fermentaciju. Ispitivanje je provedeno pri tri različite temperature (28, 37 i 42 °C), tijekom kojih je određen broj živih stanica BMK indirektnom metodom, pH vrijednost i stupanj kiselosti, odnosno volumni udio ($v \cdot v^{-1}$, %) proizvedene mliječne kiseline. Ukoliko soj najbolje provodi fermentaciju pri 28 °C, tada bi za proizvodnju probiotičkog napitka bila korištena mezofilna komercijalna starter kultura te bi bio proizveden mezofilni fermentirani probiotički napitak, odnosno probiotičko kiselo mlijeko. Ukoliko soj najbolje provodi fermentaciju pri 42 °C, za proizvodnju probiotičkog napitka bila bi korištena termofilna komercijalna starter kultura te bi proizvod onda bio termofilni fermentirani probiotički napitak. Fermentacija pri 37 °C provedena je kao kontrola, budući su pri toj temperaturi prethodno bili detektirani bioaktivni peptidi u istraživanjima provedenim u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura (rezultati nisu objavljeni).

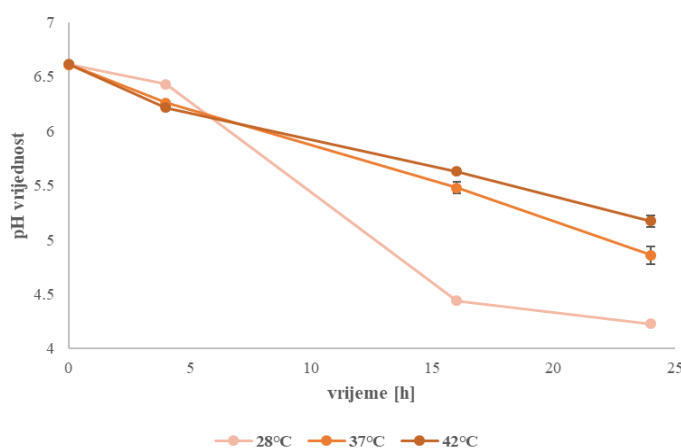
Odabir optimalne temperature za provođenje fermentacije proveden je određivanjem broja živih bakterijskih stanica indirektnom metodom, mjerenjem pH vrijednosti i stupnja kiselosti koji su prikazani na slikama 5-7. Kako je nakon 24 sata najveći broj živih bakterijskih stanica ($9,24 \pm 0,22 \log \text{CFU mL}^{-1}$), najniža pH vrijednost ($4,23 \pm 0,02$) te najviši volumni udio ($v \cdot v^{-1}$, %) proizvedene mliječne kiseline ($75,00 \pm 10,40 \%$), zabilježen pri 28 °C, za proizvodnju fermentiranih probiotičkih napitaka odabrana je temperatura 28 °C.

Najslabiji rezultati postignuti su kada je fermentacija provedena pri 42 °C s obzirom da je nakon 24 sata određen najmanji broj živih bakterijskih stanica ($8,21 \pm 0,16 \log \text{CFU mL}^{-1}$),

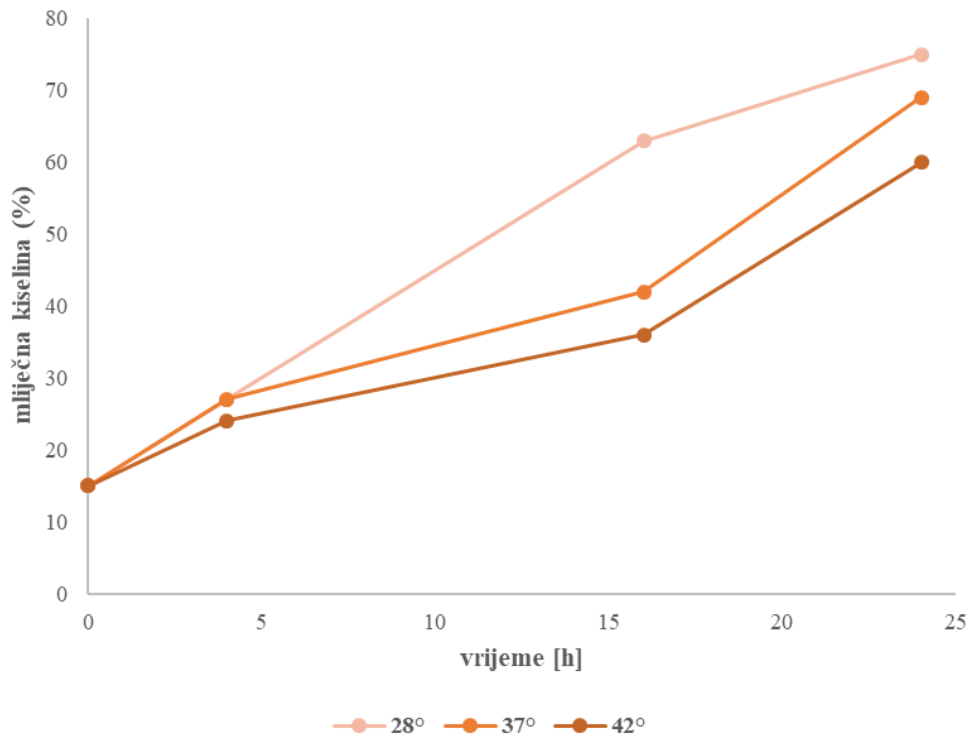
najviša pH vrijednost ($5,17 \pm 0,05$) te najniži volumni udio ($v v^{-1}$, %) proizvedene mliječne kiseline ($60,00 \pm 0,05$ %). Acevedo i sur. (2021) istraživali su fermentacijske parametre tradicionalnog kolumbijskog mliječnog proizvoda „*Suero Costeño*“ koji se proizvodi iz fermentiranog kravljeg mlijeka uz dodatak soja *Lactococcus lactis*. Fermentacija je provedena na 30 °C te je zaključeno kako se pri toj temperaturi postižu najbolje senzorska svojstva fermentiranih proizvoda.



Slika 5. Broj živih bakterijskih stanica ($\log \text{CFU mL}^{-1}$) određen tijekom fermentacije soja *L. lactis* ZGBP5-51 pri 28 °C, 37 °C i 42 °C u 0.,4.,16. i 24. satu



Slika 6. pH vrijednost izmjerena tijekom fermentacije soja *L. lactis* ZGBP5-51 pri 28 °C, 37 °C i 42 °C u 0., 4., 16. i 24. satu



Slika 7. Volumni udio ($v v^{-1}$, %) proizvedene mliječne kiseline tijekom fermentacije soja *L. lactis* ZGBP5-51 pri 28 °C, 37 °C i 42 °C u 0., 4., 16. i 24. satu

4.2. PROIZVODNJA I SKLADIŠTENJE FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA

Fermentirani mliječni proizvodi dobivaju se fermentacijom mlijeka djelovanjem odgovarajućih mikroorganizama, što rezultira smanjenjem pH vrijednosti, razvojem specifičnih organoleptičkih svojstava, produljenim rokom trajanja te utjecajem na zdravlje potrošača zbog čega se nazivaju i funkcionalnom hranom. Funkcionalna hrana sadrži određene kemijske ili mikrobne komponente koje imaju barem jednu dobrobit za zdravlje organizma te se probiotički prehrambeni proizvodi ubrajaju u značajan dio tržišta funkcionalne hrane. Probiotički mikroorganizmi se u fermentirane mliječne proizvode mogu dodati kao nefermentativni mikroorganizmi nakon provedene fermentacije ili se dodaju kao starter kulture za fermentaciju mlijeka. Kada se probiotici koriste kao starter kulture, važno je da su sigurni za primjenu, imaju sposobnost fermentacije, odnosno zakiseljavanja mlijeka i s time povezano vrijeme fermentacije, zadovoljavajuću vijabilnost stanica u proizvodu, odgovarajuću

sposobnost proizvodnje okusa i teksture proizvoda te ekonomsku isplativost. Jedan od najvažnijih kriterija je vijabilnost probiotičkih mikroorganizama do kraja roka trajanja proizvoda, budući da je utvrđeno kako su minimalne zadovoljavajuće koncentracije probiotika u mliječnim proizvodima između 10^6 i 10^8 CFU mL⁻¹. Vijabilnost probiotika također bi mogla biti pod značajnim utjecajem formulacije proizvoda i procesa tijekom proizvodnje, kao i skladištenja u hladnjaku. Vrijeme skladištenja vrlo je važno zbog pojave štetnih učinaka na probiotičke stanice. Za fermentirana mlijeka s pH vrijednosti nižom od 4,2, što je slučaj kod mnogih fermentiranih mliječnih proizvoda, postizanje roka trajanja dužeg od 21 dan s vijabilnim brojem stanica od najmanje 10^7 ili čak 10^6 CFU g⁻¹ proizvoda vrlo je teško pri uobičajenim uvjetima, iako je otpornost probiotičkih stanica na teške uvjete u okolišu specifična za svaki soj (Mohammadi i sur., 2012).

Tijekom proizvodnje funkcionalnih fermentiranih probiotičkih napitaka, ispitan je broj živih bakterijskih stanica i parametri fermentacije u inokulumu i konačnom proizvodu tijekom skladištenja. U tablici 3 prikazan je broj živih bakterijskih stanica određen indirektnom metodom u inokulumima za 2. i 3. napitak, a parametri fermentacije prikazani su u tablici 4.

Tablica 3. Broj živih bakterijskih stanica (log CFU mL⁻¹) u inokulumima za proizvodnju 2. i 3. napitka

	broj živih stanica [log CFU mL ⁻¹]
2. napitak	9,15 ± 0,20
3. napitak	9,08 ± 0,21

Tablica 4. Parametri fermentacije mlijeka za proizvodnju fermentiranih probiotičkih napitaka

pH vrijednost mlijeka	6,69 ± 0,02
trajanje fermentacije	16 sati i 42 minute ± 17 minuta

U tablicama 5-7 prikazani su rezultati određivanja broja živih bakterijskih stanica, pH vrijednosti te stupnja kiselosti, odnosno volumnog udjela (v v⁻¹, %) proizvedene mliječne kiseline, za tri proizvedena probiotička napitka. Mjerenja su provedena 1., 7., 14. i 21. dan od proizvodnje napitaka. Najveći broj živih bakterijskih stanica postignut je s 2. napitkom te je

21. dan iznosio $8,07 \pm 0,35 \log \text{CFU mL}^{-1}$. Najmanji broj živih bakterijskih stanica postignut je s 1. napitkom te je 21. dan iznosio $4,21 \pm 1,50 \log \text{CFU mL}^{-1}$. Izmjerene pH vrijednosti bile su podjednake za 1. i 3. napitak, dok su kod 2. napitka izmjerene nešto veće pH vrijednosti. pH vrijednost za 1. napitak 21. dan iznosila je $4,20 \pm 0,07$, a za 3. napitak $4,20 \pm 0,09$. pH vrijednost za 2. napitak 21. dan iznosila je $4,27 \pm 0,03$. Mjerenjem stupnja kiselosti pokazano je kako je 21. dan za 1. napitak izmjereno $72,00 \pm 9,00 \%$ nastale mliječne kiseline, što je najviše od sva tri ispitana napitka. Za 1. je napitak izmjeren i najveći volumni udio ($v \text{ v}^{-1}$, %) proizvedene mliječne kiseline 1. dan, $81,00 \pm 9,00 \%$. Najmanji volumni udio ($v \text{ v}^{-1}$, %) nastale mliječne kiseline izmjeren je 21. dan za 2. napitak te je iznosio $63,00 \pm 9,00 \%$. Mohammadi i sur. (2012) zaključuju kako su nizak pH i stupanj kiselosti najvažniji faktori koji utječu na vijabilnost probiotičkih bakterija u fermentiranim mliječnim proizvodima. Probiotičke su bakterije osjetljivije na niske pH vrijednosti, nego na stupanj kiselosti. No, istraživanja pokazuju kako stupanj kiselosti ima veći utjecaj na vijabilnost stanica tijekom skladištenja, nego tijekom samog provođenja fermentacije.

Tablica 5. Broj živih bakterijskih stanica ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), pH vrijednost te proizvedena mliječna kiselina (volumni udio $v \text{ v}^{-1}$; %) za 1. napitak tijekom skladištenja

vrijeme [dani]	broj živih stanica [$\log \text{CFU mL}^{-1}$]	pH vrijednost	volumni udio mliječne kiseline [$v \text{ v}^{-1}$; %]
1.	$7,29 \pm 1,08$	$4,38 \pm 0,06$	$81,00 \pm 9,00$
7.	$6,05 \pm 0,10$	$4,20 \pm 0,03$	$66,00 \pm 5,20$
14.	$5,59 \pm 0,80$	$4,22 \pm 0,06$	$66,00 \pm 18,73$
21.	$4,21 \pm 1,50$	$4,20 \pm 0,07$	$72,00 \pm 9,00$

Tablica 6. Broj živih bakterijskih stanica ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), pH vrijednost te proizvedena mliječna kiselina (volumni udio $v \text{ v}^{-1}$; %) za 2. napitak tijekom skladištenja

vrijeme [dani]	broj živih stanica [$\log \text{CFU mL}^{-1}$]	pH vrijednost	volumni udio mliječne kiseline [v/v ; %]
1.	$9,02 \pm 0,40$	$4,37 \pm 0,05$	$63,00 \pm 0,00$
7.	$8,88 \pm 0,44$	$4,33 \pm 0,04$	$72,00 \pm 9,00$
14.	$8,77 \pm 0,17$	$4,31 \pm 0,02$	$69,00 \pm 5,20$
21.	$8,07 \pm 0,35$	$4,27 \pm 0,03$	$63,00 \pm 9,00$

Tablica 7. Broj živih bakterijskih stanica ($\log \text{CFU mL}^{-1}$), pH vrijednost te proizvedena mliječna kiselina (volumni udio $v \text{ v}^{-1}$; %) za 3. napitak tijekom skladištenja

vrijeme [dani]	broj živih stanica [$\log \text{CFU mL}^{-1}$]	pH vrijednost	volumni udio mliječne kiseline [$v \text{ v}^{-1}$; %]
1.	$8,77 \pm 0,21$	$4,28 \pm 0,08$	$63,00 \pm 9,00$
7.	$8,83 \pm 0,31$	$4,24 \pm 0,14$	$69,00 \pm 10,39$
14.	$8,66 \pm 0,27$	$4,23 \pm 0,11$	$66,00 \pm 5,20$
21.	$7,99 \pm 0,53$	$4,20 \pm 0,09$	$69,00 \pm 5,20$

Određivanje mikrobiološke ispravnosti provedeno je 1. i 21. dan tijekom skladištenja napitaka, a rezultati su prikazani u tablici 8. Pokazano je kako su sva tri napitka mikrobiološki ispravna jer na hranjivim podlogama nisu izrasli patogeni *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* i *Shigela* vrste, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* te koliformne bakterije.

Tablica 8. Mikrobiološka ispravnost proizvedenih napitaka određena 1. i 21. dan čuvanja

vrste patogena	broj živih stanica [log CFU mL ⁻¹]	
	1. dan čuvanja	21. dan čuvanja
<i>Staphylococcus aureus</i>	n.d.	n.d.
<i>Salmonella spp.</i>	n.d.	n.d.
<i>Shigela spp.</i>	n.d.	n.d.
<i>Escherichia coli</i>	n.d.	n.d.
<i>Listeria monocytogenes</i>	n.d.	n.d.
koliformne bakterije	n.d.	n.d.

n.d. – nije dokazano

4.3. PREŽIVLJAVANJE SOJA *L. lactis* ZGBP5-51 TIJEKOM PROCESA LIOFILIZACIJE PROIZVEDENIH FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA

Liofilizacija je metoda sušenja proizvoda koja se koristi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Postupak liofilizacije sastoji se od zamrzavanja te primarnog i sekundarnog sušenja. Postupkom zamrzavanja voda se pretvara u led te dolazi do stvaranja ledenih kristala. Zatim slijedi primarno sušenje koje se naziva i sublimacijska faza sušenja. U ovoj se fazi primjenjuje vakuum, a temperatura se postupno povećava što izaziva sublimaciju leda. Kod sekundarnog sušenja temperatura se podiže zbog zaostale vode koja se nije pretvorila u led tijekom faze smrzavanja te se ta nezamrznuta voda uklanja desorpcijom. Cilj sekundarnog sušenja je smanjiti konačni sadržaj zaostale vode na prihvatljivu razinu što je neizostavan korak u liofilizaciji jer zaostala voda negativno utječe na kvalitetu proizvoda (Kawasaki i sur., 2019). Budući da može doći do oštećenja stanica nastajanjem kristala koji mogu izazvati oštećenje organela i membrana stanica, postoje različite pomoćne tvari koje se koriste za stabilizaciju stanica i proteina tijekom liofilizacije. Te se pomoćne tvari još zovu i lioprotektori, a one mogu

biti različiti šećeri, makromolekule, poliol, antioksidansi i kelirajuća sredstva (Rockinger i sur., 2021).

Ispitano je preživljavanje soja *L. lactis* ZGBP5-51 u proizvedenim funkcionalnim fermentiranim probiotičkim napitcima tijekom procesa liofilizacije provedenog u svrhu dobivanja praškastog probiotičkog pripravka koji sadrži bioaktivne peptide. Kao lioprotektor korišten je sami proizvedeni probiotički napitak, odnosno kiselo mlijeko.



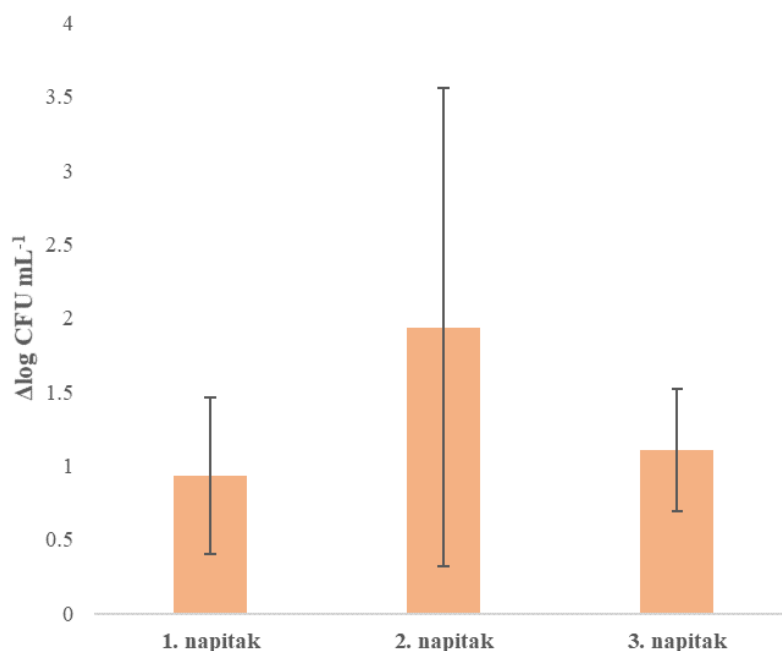
Slika 8. Uzorci soja *L. lactis* ZGBP5-51 iz tri proizvedena probiotička napitka poslije procesa liofilizacije (vlastita fotografija)

Iz rezultata (slika 9, tablica 9) je vidljivo kako soj *L. lactis* ZGBP5-51 preživljava uvjete liofilizacije u zadovoljavajućem broju. Nakon procesa liofilizacije, najmanja razlika u broju živih bakterijskih stanica prije i poslije liofilizacije postignuta je s 1. napitkom, gdje $\Delta \log \text{CFU mL}^{-1}$ iznosi $0,94 \pm 0,53$. Najveći broj živih bakterijskih stanica nakon procesa liofilizacije dobiven je s 3. napitkom, gdje $\log \text{CFU mL}^{-1}$ iznosi $6,88 \pm 0,14$. Najveća razlika u broju živih bakterijskih stanica nakon procesa liofilizacije izmjerena je kod 2. napitka, gdje $\Delta \log \text{CFU mL}^{-1}$ iznosi $1,94 \pm 1,62$. Ibrahim i sur. (2023) istraživali su stopu preživljavanja i sposobnost provođenja fermentacije za tri liofilizirane bakterijske kulture, među kojima je bila i *L. lactis*. Zaključeno je kako se *L. lactis* može koristiti kao liofilizirana funkcionalna starter kultura jer

preživljava proces liofilizacije u broju većem od 6 log CFU mL⁻¹ čime je zadovoljen tehnološki kriterij odabira probiotičkih sojeva, te je prihvatljiva za proizvodnju probiotičkih fermentiranih mliječnih napitaka i praškastih probiotičkih pripravaka koji sadrže bioaktivne peptide, te je prikladna za komercijalizaciju procesa i proizvodnju u velikim mjerilima.

Tablica 9. Broj živih bakterijskih stanica soja *L. lactis* ZGBP5-51 izražen kao log CFU mL⁻¹ u proizvedenim probiotičkim napitcima prije i poslije procesa liofilizacije

	log CFU mL ⁻¹	
	prije liofilizacije	poslije liofilizacije
1. napitak	4,21 ± 1,50	3,27 ± 0,99
2. napitak	8,07 ± 0,35	6,13 ± 1,93
3. napitak	7,99 ± 0,53	6,88 ± 0,14



Slika 9. Preživljavanje soja *L. lactis* ZGBP5-51 u proizvedenim probiotičkim napitcima tijekom procesa liofilizacije

4.4. OCJENJIVANJE SENZORSKIH SVOJSTAVA FERMENTIRANIH PROBIOTIČKIH NAPITAKA

BMK pridonose okusu, teksturi i hranjivoj vrijednosti fermentirane hrane. Tri glavna metabolička puta koja su uključena u formiranje okusa fermentirane hrane su glikoliza, lipoliza i proteoliza. Od njih je najvažniji biokemijski put proteoliza jer se proteini razgrađuju na manje peptide i slobodne aminokiseline koji se dalje mogu konvertirati u razne alkohole, aldehide, kiseline, estere te sumporne spojeve koji pridonose razvoju specifičnih aroma u fermentiranim mliječnim proizvodima (Bintsis, 2018). Senzorska analiza mlijeka i mliječnih proizvoda najstarija je metoda za određivanje njihove kvalitete. To je znanstvena disciplina koja se koristi za analizu i interpretaciju te mjerenje određenih reakcija na svojstva koja su karakteristična za određene proizvode i to pomoću ljudskih osjetila. Tri su osnovne karakteristike senzorskih svojstava proizvoda, a one su izgled, okus i miris te tekstura proizvoda. Na ocjenjivanje senzorskih svojstava utječu sami proizvodi, osoba koja ih ocjenjuje, okoliš u kojem se nalazi kao i metode ocjenjivanja. Prednosti senzorskog ocjenjivanja proizvoda su primjerice brzina i jednostavnost, mali troškovi te mogućnost brze reakcije na neispravnost proizvoda. Nedostaci ovih metoda su nedovoljno reproducibilni rezultati i činjenica da ove metode nisu objektivne, nego ovise o prethodno navedenim čimbenicima. Senzorsko ocjenjivanje proizvoda ima primjenu u industriji u razvijanju novih proizvoda, određivanju kvalitete proizvoda za vrijeme skladištenja, ispitivanju mišljenja kupaca i unapređenju kvalitete postojećih proizvoda. Za senzorsko ispitivanje namirnica najčešće se koriste metode bodovanja te se uobičajeno koriste bodovne skale s ukupno 20 bodova kojima se ocjenjuju karakteristike proizvoda (Božanić i sur., 2010).

Također, za ocjenjivanje senzorskih karakteristika koriste se i metode bodovanja s ponderiranim bodovima, koje su korištene u ovom radu. U tablicama 10-12 prikazani su postignuti bodovi za određena svojstva proizvedenih probiotičkih napitaka mjerena na 1. dan skladištenja napitaka. Najbolji su rezultati postignuti s 1. napitkom s kojim je postignut najveći prosječni broj bodova za sva svojstva, osim za boju gdje je najviše bodova, $0,96 \pm 0,04$ od maksimalnih 1, postignuto s 2. napitkom. Za svojstvo okusa, najmanji broj bodova postignut je s 3. napitkom, $6,13 \pm 0,46$ od maksimalnih 12, dok je s 1. napitkom postignuto $8,27 \pm 1,22$ boda.

Tablica 10. Ocjene pojedinih senzorskih svojstava za 1. napitak

svojstva	F_v	najveći broj bodova	1. pokus	2. pokus	3. pokus	prosjek broja ostvarenih bodova
izgled	0,2	1	0,73 ± 0,12	0,73 ± 0,12	0,67 ± 0,42	0,71 ± 0,04
boja	0,2	1	0,80 ± 0,00	0,87 ± 0,00	0,93 ± 0,00	0,87 ± 0,07
konzistencija	0,8	4	2,93 ± 1,22	2,93 ± 0,46	3,20 ± 0,00	3,02 ± 0,15
miris	0,4	2	1,87 ± 0,23	1,60 ± 0,00	1,87 ± 0,23	1,78 ± 0,15
okus	2,4	12	7,20 ± 0,00	8,00 ± 1,39	9,60 ± 2,40	8,27 ± 1,22

Tablica 11. Ocjene pojedinih senzorskih svojstava za 2. napitak

svojstva	F_v	najveći broj bodova	1. pokus	2. pokus	3. pokus	prosjek broja ostvarenih bodova
izgled	0,2	1	0,73 ± 0,12	0,67 ± 0,12	0,67 ± 0,42	0,69 ± 0,04
boja	0,2	1	1,00 ± 0,00	0,93 ± 0,00	0,93 ± 0,00	0,96 ± 0,04
konzistencija	0,8	4	2,67 ± 0,92	2,67 ± 0,46	3,20 ± 0,00	2,84 ± 0,31
miris	0,4	2	1,73 ± 0,46	1,07 ± 0,00	1,47 ± 0,61	1,42 ± 0,34
okus	2,4	12	5,60 ± 1,39	6,40 ± 1,39	8,00 ± 2,77	6,67 ± 1,22

Tablica 12. Ocjene pojedinih senzorskih svojstava za 3. napitak

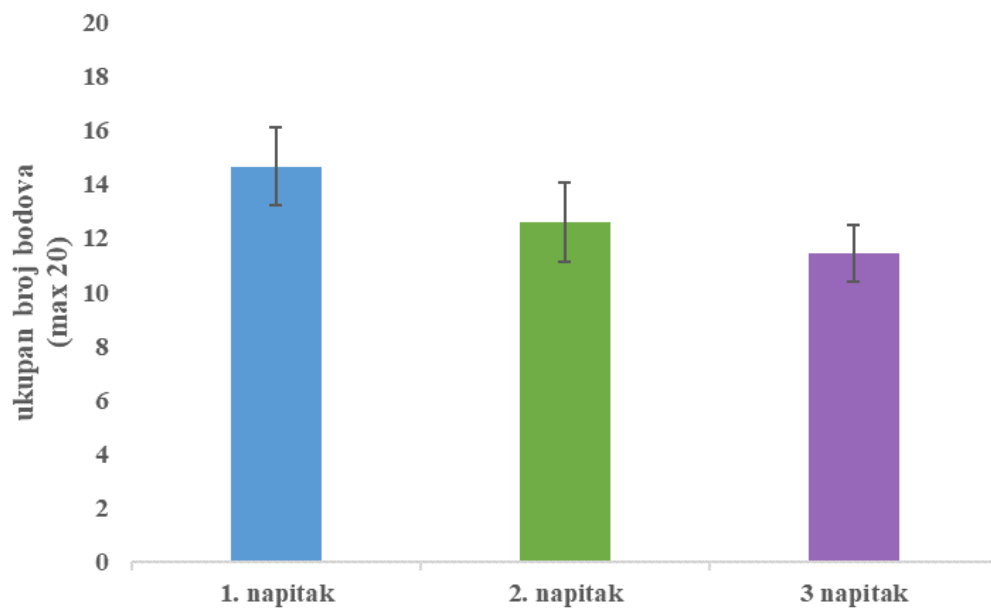
svojstva	F _v	najveći broj bodova	1. pokus	2. pokus	3. pokus	prosjek broja ostvarenih bodova
izgled	0,2	1	0,67 ± 0,12	0,67 ± 0,12	0,67 ± 0,42	0,67 ± 0,00
boja	0,2	1	1,00 ± 0,00	0,80 ± 0,00	0,93 ± 0,00	0,91 ± 0,10
konzistencija	0,8	4	2,93 ± 1,22	2,67 ± 0,46	2,40 ± 0,00	2,67 ± 0,27
miris	0,4	2	1,47 ± 0,23	0,67 ± 0,00	1,07 ± 0,23	1,07 ± 0,40
okus	2,4	12	6,40 ± 1,39	5,60 ± 1,39	6,40 ± 1,39	6,13 ± 0,46

Ostvareni bodovi se zatim zbrajaju u ukupne ocjene te na temelju njih fermentirani mliječni proizvodi mogu biti razvrstani u razrede kvalitete, što je prikazano u tablici 13.

Tablica 13. Prikaz razvrstavanja proizvoda u razrede kvalitete prema ostvarenom ukupnom broju bodova (Božanić i sur., 2010)

razred kvalitete	broj bodova
ekstra (E)	18,3 – 20,0
I	16,3 – 18,2
II	13,3 – 16,2
III	10,0 – 13,2
ostali	< 10

Na slici 10 prikazani su ostvareni prosječni ukupni brojevi bodova za proizvedene probiotičke napitke.



Slika 10. Ukupan broj ostvarenih bodova za pojedina senzorska svojstva za proizvedene napitke

Iz prikazanih je rezultata vidljivo kako je s 1. napitkom postignut najveći prosječni broj bodova, s ostvarenih $14,64 \pm 1,44$ boda, zbog čega bi se mogao svrstati pod II. razred kvalitete. S 2. i 3. napitkom postignuti su nešto niži prosječni ukupni brojevi bodova, 2. napitak s $12,58 \pm 1,46$ boda te 3. napitak s $11,44 \pm 1,03$ boda zbog čega bi bili svrstani u III. razred kvalitete.

5. ZAKLJUČCI

1. Optimirani su uvjeti proizvodnje funkcionalnog fermentiranog probiotičkog napitka primjenom autohtonog soja *L. lactis* ZGBP5-51 pri čemu je odabrana mezofilna temperatura (28 °C) za provođenje fermentacije.
2. Tijekom skladištenja u trajanju od 21 dan, najbolja fermentacijska svojstva (pH, stupanj kiselosti i udio mliječne kiseline) kao i najveći broj živih stanica u proizvedenim probiotičkim napitcima postignut je kombinacijom komercijalne starter kulture i soja *L. lactis* ZGBP5-51.
3. Utvrđeno je preživljavanje soja *L. lactis* ZGBP5-51 tijekom procesa liofilizacije veće od 6 log CFU mL⁻¹ što zadovoljava tehnološki kriterij izbora probiotičkih sojeva.
4. Senzorskom analizom proizvedenih napitaka najveći prosječni broj bodova ostvario je napitak proizveden primjenom komercijalne starter kulture. Utvrđeno je da za proizvodnju napitka s poželjnim senzorskim svojstvima nije dovoljno primijeniti samo autohtoni soj *L. lactis* ZGBP5-51.

6. LITERATURA

Acevedo D, Castillo PMM, Morales JJ (2021) Fermentation Parameters of Suero Costeño Elaborated with Lactic Acid Bacteria Strains. *Curr Res Nutr Food Sci* **9(3)**, 1058-1066. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.9.3.30>

Baral KC, Bajracharya R, Lee SH, Han HK (2021) Advancements in the Pharmaceutical Applications of Probiotics: Dosage Forms and Formulation Technology. *Int J Nanomedicine* **16**, 7535–7556. <https://doi.org/10.2147/IJN.S337427>

Bintsis T (2018) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol* **4(4)**, 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>

Božanić R, Jeličić I, Bilušić T (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda – priručnik, Plejada, Zagreb.

Chen C, Zhao S, Hao G, Yu H, Tian H, Zhao G (2017) Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *Int J Food Prop* **20(1)**, 316-330. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1295988>

Gao Y, Wang X, Xue C, Wei Z (2021) Latest developments in food-grade delivery systems for probiotics: A systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **63(20)**, 4371-4388. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2001640>

González-González F, Delgado S, Ruiz L, Margolles A, Ruas-Madiedo P (2022) Functional bacterial cultures for dairy applications: Towards improving safety, quality, nutritional and health benefit aspects. *J Appl Microbiol* **133(1)**, 212–229. <https://doi.org/10.1111/jam.15510>

Hansen EB, Marcatili P (2020) Modeled Structure of the Cell Envelope Proteinase of *Lactococcus lactis*. *Front Bioeng Biotechnol* **8**, 613986. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.613986>

Ibrahim I, Ayariga JA, Xu J, Boakai RK, Ajayi OS, Owusu-Kwarteng J (2023) A Comparative Study of Skimmed Milk and Cassava Flour on the Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures for Yogurt Fermentation. *Foods* **12(6)**, 1207. <https://doi.org/10.3390/foods12061207>

Idrees M, Imran M, Atiq N, Zahra R, Abid R, Alreshidi M, i sur. (2022) Probiotics, their action modality and the use of multi-omics in metamorphosis of commensal microbiota into target-based probiotics. *Front Nutr* **9**, 959941. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.959941>

- Ji D, Ma J, Xu M, Agyei D (2021) Cell-envelope proteinases from lactic acid bacteria: Biochemical features and biotechnological applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **20**, 369-400. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12676>
- Kawasaki H, Shimanouchi T, Kimura Y (2019) Recent development of optimization of lyophilization process. *J Chem* **2019**, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/9502856>
- Khaled JMA (2021) Probiotics, prebiotics, and COVID-19 infection: A review article. *Saudi J Biol Sci* **28(1)**, 865–869. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.025>
- Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM (2021) Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules* **26(7)**, 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>
- Kleerebezem M, Bachmann H, van Pelt-KleinJan E, Douwenga S, Smid EJ, Teusink B i sur. (2020) Lifestyle, metabolism and environmental adaptation in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Rev* **44(6)**, 804-820. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa033>
- Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**, 981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- Ma J, Lyu Y, Liu X, Jia X, Cui F, Wu X, i sur. (2022) Engineered probiotics. *Microb Cell Fact* **21(1)**, 72. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01799-0>
- Mirzapour-Kouhdasht A, Garcia-Vaquero M (2022) Cardioprotective Peptides from Milk Processing and Dairy Products: From Bioactivity to Final Products including Commercialization and Legislation. *Foods* **11(9)**, 1270. <https://doi.org/10.3390/foods11091270>
- Mohammadi R, Sohrabvandi S, Mohammad Mortazavian A (2012) The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Eng Life Sci* **12(4)**, 399-409. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100125>
- Murtaza MA, Irfan S, Hafiz I, Ranjha MMAN, Rahaman A, Murtaza MS, Ibrahim SA, Siddiqui SA (2022) Conventional and Novel Technologies in the Production of Dairy Bioactive Peptides. *Front Nutr* **9**, 780151. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.780151>

Norcross S, Sunderraj A, Tantama M (2019) pH-and temperature-dependent peptide binding to the *Lactococcus lactis* oligopeptide-binding protein A measured with a fluorescence anisotropy assay. *ACS Omega* **4(2)**, 2812-2822. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02427>

Punia H, Tokas J, Malik A, Sangwan S, Baloda S, Singh N i sur. (2020) Identification and Detection of Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: Remarks about Agro-Foods. *Molecules* **25(15)**, 3328. <https://doi.org/10.3390/molecules25153328>

Rockinger U, Funk M, Winter G (2021) Current Approaches of Preservation of Cells During (freeze-) Drying. *Journal Pharm Sci* **110(8)**, 2873–2893. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>

Rodrigues G, Silva GGO, Buccini DF, Duque HM, Dias SC, Franco OL (2019) Bacterial Proteinaceous Compounds With Multiple Activities Toward Cancers and Microbial Infection. *Front Microbiol* **10**, 1690. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01690>

Romero-Luna HE, Hernández-Mendoza A, González-Córdova AF, Peredo-Lovillo A (2022) Bioactive peptides produced by engineered probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Food Chem: X* **13**, 100196. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100196>

Saravanan P, Balachander N (2023) Anti-inflammatory and wound healing properties of lactic acid bacteria and its peptides. *Folia Microbiol* **68**, 337–353. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-01030-y>

Tavares LM, de Jesus LCL, da Silva TF, Barroso FAL, Batista VL, Coelho-Rocha ND i sur. (2020) Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model. *Frontiers Bioeng Biotechnol* **8**, 517166. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.517166>

Wang X, Zhang P, Zhang X (2021) Probiotics Regulate Gut Microbiota: An Effective Method to Improve Immunity. *Molecules* **26(19)**, 6076. <https://doi.org/10.3390/molecules26196076>

Yadav M, Mandeep, Shukla P (2020) Probiotics of Diverse Origin and Their Therapeutic Applications: A Review. *J Am Col Nutr* **39(5)**, 469–479. <https://doi.org/10.1080/07315724.2019.1691957>

You S, Ma Y, Yan B, Pei W, Wu Q, Ding C, i sur. (2022) The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. *Front Nutr* **9**, 1000517. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1000517>

Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM, Mattarelli P, i sur. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol* **70(4)**, 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Vlastoručni potpis