

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Milica M. Mirković

**PRIMENA I VIJABILNOST AUTOHTONIH SPREJ
SUŠENIH POTENCIJALNIH PROBIOTSKIH
BAKTERIJA MLEČNE KISELINE U HRANI I
GASTROINTESTINALNIM USLOVIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Milica M. Mirković

**APPLICATION AND VIABILITY OF
AUTOCHTHONOUS SPRAY DRIED POTENTIAL
PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA IN FOOD
AND GASTROINTESTINAL CONDITIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mentor:

Prof. dr Zorica Radulović, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Viktor Nedović, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr. Bojana Bogovič Matijašić, naučni savetnik
Biotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija

Prof. dr Jelena Miočinović, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Marica Rakin, vanredni profesor
Tehnološko-metalurški Fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane _____

Veliku zahvalnost dugujem mom mentoru, profesorki Zorici Radulović, na ukazanoj prilici, velikom razumevanju i strpljenju, svesrdnoj pomoći i svim savetima, kao i na uloženom trudu prilikom realizacije doktorske disertacije.

Želim da izrazim veliku zahvalnost doktoru Bojani Bogović Matijašić, na uloženom trudu i svim sugestijama prilikom izrade i pisanja doktorske disertacije, kao i na gostoprimstvu u Institutu za mleko i probiotike u Rodicama. Veliko hvala i profesoru Viktoru Nedoviću za sve sugestije tokom pisanja doktorata, ali i za pomoć prilikom sprej sušenja probiotskih bakterija, kao i profesorki Jeleni Miočinović za pomoć prilikom senzornog ocenjivanja proizvoda i korisnim savetima prilikom pisanja doktorata. Takođe, veliko hvala i profesorki Marici Rakin za sve sugestije prilikom pisanja doktorata.

Posebnu zahvalnost dugujem kompaniji “Soko Štark” a.d. Beograd i kolegincama Kati Vučković i Dariji Janežić za pomoć prilikom realizacije proizvodnje crne čokolade, kao i mlekari “Granice”, Mladenovac, naročito Draganu i Svetlani Vukadinović i sjajnim tehnolozima za svu pomoć prilikom proizvodnje sira i jogurta.

Ogromnu zahvalnost dugujem kumovima, prijateljima i kolegama koji su prihvatili da učestvuju kao volonteri u in vivo studiji i koji su bez pogovora prihvatili da konzumiraju različite proizvode.

Želim da se zahvalim i profesoru Dragojlu Obradoviću za pomoć prilikom aplikacije i realizacije FEMS Research Fellowship, zahvaljujući kojoj sam provela 3 meseca na LTH fakultetu Univerziteta u Lundu, Švedska. Takođe, veliku zahvalnost dugujem i profesorki Siv Ahrne i svim kolegama sa Odseka za tehnologiju hrane, inženjerstva i ishrane, LTH fakulteta u Lundu, na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dela doktorske disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem svim kolegama sa Katedre za tehnološku mikrobiologiju, naročito devojkama na podršci i razumevanju, kao i Dušanki Paunović na velikoj pomoći. Naravno, veliko hvala i mom deveru i kolegi Nemanji na svom trudu, radu, pomoći, priči, podršci i velikom prijateljstvu. Takođe, veliko hvala sestrinskoj katedri za Ekološku mikrobiologiju za svu pomoć i hemikalijama.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, mojoj majci i mom suprugu, na njihovoj безусловnoj ljubavi, podršci i strpljenju koju su mi pružali tokom izrade doktorske disertacije.

PRIMENA I VIJABILNOST AUTOHTONIH SPREJ SUŠENIH POTENCIJALNIH PROBIOTSKIH BAKTERIJA MLEČNE KISELINE U HRANI I GASTROINTESTINALNIM USLOVIMA

Doktorska disertacija

Milica Mirković

REZIME

Sve veća briga potrošača o zdravlju, kao i neadekvatna ishrana, doveli su do velikog interesovanja za hranu obogaćenu dodatnim funkcionalnim komponentama, pri čemu je uveden pojam funkcionalne hrane. Poseban značaj se pridaje funkcionalnoj hrani sa probiotskim bakterijama. Autohtone bakterije mlečne kiseline izolovane iz tradicionalnih sireva predstavljaju neiscrpan izvor novih sojeva, različitih metaboličkih aktivnosti, što daje mogućnost selekcije novih potencijalnih probiotskih sojeva. Pored toga, sprej sušenje probiotskih sojeva ima sve veću primenu, usled značajno bolje održivosti probiotika tokom skladištenja proizvoda, kao i tokom prolaza kroz gastrointestinalni trakt.

Cilj ove doktorske disertacije jeste izolacija i selekcija potencijalnih probiotskih bakterija, ispitivanje njihove vijabilnosti i probiotskih karakteristika nakon mikroinkapsulacije sprej sušenjem, primena u proizvodnji jogurta, sira od ultrafiltriranog (UF) mleka i crne čokolade, utvrđivanje vijabilnosti probiotika i senzornog kvaliteta navedenih proizvoda, kao i sposobnost preživljavanja potencijalnih probiotskih bakterija u gastrointestinalnim uslovima.

Iz 5 uzoraka Pirotskog kačkavalja i 2 uzorka Sjeničkog sira, izolovano je ukupno 61 izolat. Na osnovu morfoloških, fizioloških i tehnoloških karakteristika, 9 izolata je selektovano za identifikaciju i ispitivanje potencijalnih probiotskih karakteristika. Na osnovu rezultata sposobnosti preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova, rezistencije na antibiotike i antimikrobno delovanje, za dalja ispitivanja selektovane su dve potencijalne probiotske bakterije, *Lactobacillus plantarum* 564 i *Lactobacillus paracasei* Z8. Selektovani sojevi su inkapsulisani tehnikom sprej sušenja, gde je nakon mikroinkapsulacije ispitivana vijabilnost sprej sušenih potencijalnih probiotskih ćelija i

sposobnost preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova. Vijabilnost je ispitivana pomoću metode razređenja i real time PCR uz tretman propidijum monoazidom (PMA). Nakon ispitivanja karakteristika sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija, *Lb. plantarum* 564 je odabran za primenu u proizvodnji jogurta i sira od UF mleka sa dodatim probiotskim bakterijama u obliku slobodnih i sprej sušenih ćelija, kao i u proizvodnji crne čokolade u obliku sprej sušenih ćelija. Kao kontrolni probiotik korišćen je *Lb. plantarum* 299v (DSM 9843). Nakon primene probiotskih bakterija u proizvodnji navedenih proizvoda, ispitivana je njihova vijabilnost tokom proizvodnje i skladištenja, kao i uticaj na senzorni kvalitet proizvoda. Takođe, ispitivana je i sposobnost preživljavanja gastrointestinalnih uslova probiotskih bakterija u *in vivo* studiji na volonterima koji su konzumirali prah sprej sušenih probiotskih ćelija, jogurt, sir od UF mleka i crnu čokoladu sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v u odgovarajućim količinama tokom 14 dana, kao i mikroflora fecesa volontera pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probioticima. Molekularnom metodom RAPD ispitivano je prisustvo konzumiranih probiotskih bakterija u fecesu volontera.

Ispitivanjem broja preživelih ćelija potencijalnih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 nakon sprej sušenja, ustanovljeno je da su tokom ovoga procesa postignuti optimalni uslovi. Takođe, nije bilo značajnih razlika u broju sprej sušenih ćelija između metode razređenja i real time PCR uz primenu PMA.

Praćenjem vijabilnosti starter kultura i pH vrednosti jogurta i sireva od UF mleka sa slobodnim i sprej sušenim probiotskim bakterijama *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v, može se ustanoviti da nije bilo značajnih razlika u broju ćelija starter kultura između kontrolnih varijanti bez probiotika i varijanti sa probioticima. Takođe, pH vrednosti jogurta i sira od UF mleka su se kretale u odgovarajućim granicama. Tokom skladištenja jogurta, slobodne i sprej sušene probiotske ćelije bile su na nivou iznad 10^7 cfu ml^{-1} , pri čemu nije bilo statistički značajnih razlika između broja slobodnih i sprej sušenih ćelija. Isto tako, slobodne i sprej sušene probiotske ćelije bile su na nivou većem od 10^8 cfu g^{-1} tokom skladištenja sira od UF mleka. S druge strane, vijabilnost sprej sušenih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v bila je na nivou većem od 10^6 cfu g^{-1} tokom 9 meseci skladištenja crne čokolade na sobnoj temperaturi. Senzorni kvalitet jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade sa probiotskim bakterijama ostao je nepromenjen tokom skladištenja. Probiotske bakterije nisu uticale

na promene izgleda i konzistencije proizvoda, a nisu dovele ni do pojave stranih mirisa i ukusa koji bi uticali na karakterističan i prepoznatljiv ukus proizvoda. Takođe, nije bilo statistički značajnih razlika između kontrolnih varijanti proizvoda bez probiotskih bakterija i varijanti sa probiotskim bakterijama.

Nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama, analizom mikroflore fecesa volontera primećen je pad broja sulfitoredujućih klostridija, enterobakterija, kao i enterokoka nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama. Takođe, broj laktobacila se povećao nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama. Prilikom ispitivanja procentualnog udela laktobacila, sulfitoredujućih klostridija, enterokoka i enterobakterija, dobijeni rezultati ukazuju na povećanje udela laktobacila u fecesu volontera nakon konzumiranja proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v, što ujedino dovodi i do smanjenja procentualnog udela nepoželjnih mikroorganizama. Pored toga, dokazano je da potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 preživljava nepovoljne uslove gastrointestinalnog trakta. Ispitivanjem uloge prehrambenih proizvoda kao nosača probiotskih bakterija primećeno je da je crna čokolada pokazala izuzetno dobru ulogu nosača, uzimajući u obzir da su obe probiotske bakterije pronađene kod najvećeg broja volontera nakon konzumiranja crne čokolade. Takođe, sir od UF mleka je pokazao veoma dobru ulogu nosača probiotskih bakterija, dok su jogurt i prah sprej sušenih probiotskih ćelija pružili najslabiju zaštitu probiotskim bakterijama, s obzirom na to da su probiotici izolovani iz najmanjeg broja fecesa volontera nakon konzumiranja navedenih proizvoda.

Ključne reči: potencijalne probiotske bakterije, funkcionalna hrana, gastrointestinalni uslovi, sprej sušenje, jogurt, sir od ultrafiltriranog mleka, crna čokolada, *in vivo* studija

Naučna oblast: Prehrambena tehnologija

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

APPLICATION AND VIABILITY OF AUTOCHTHONOUS SPRAY DRIED POTENTIAL PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA IN FOOD AND GASTROINTESTINAL CONDITIONS

Doctoral Dissertation

Milica Mirković

ABSTRACT

Increasing consumer concerns about health, as well as inadequate nutrition, have led to great interest in foods enriched with additional functional components, referred to as functional foods. Particular importance is devoted to the functional food with probiotic bacteria. Autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional cheeses represent an endless source of new strains with various metabolic activities, which allows the selection of potential probiotic strains. In addition, spray drying of probiotic strains is frequently used due to significantly better survival during storage of product, as well as through the passage in the gastrointestinal tract.

The aim of this doctoral thesis is the isolation and selection of potential probiotic bacteria from traditional cheeses, testing their viability and probiotic characteristics after microencapsulation by spray drying, application in the production of yogurt, cheese from ultrafiltered (UF) milk and dark chocolate, the viability of probiotics and sensory quality of products, as well as establishing the ability of potential probiotic bacteria to survive gastrointestinal conditions.

From 5 samples of Pirot's kashkaval and 2 samples of Sjenica cheese, there were 61 isolates. Based on morphological, physiological and technological characteristics, 9 isolates were selected for identification and testing of potential probiotic characteristics. Based on the ability to survive simulated gastrointestinal conditions, antibiotic resistance and antimicrobial activity, two potential probiotic bacteria, *Lactobacillus plantarum* 564 and *Lactobacillus paracasei* Z8 were selected for further testing. The selected strains were microencapsulated by spray drying technique, after which the viability of potential probiotic cells and ability to survive simulated gastrointestinal conditions were examined. Viability was assessed by the plate-counting method and real

time PCR combine with propidium monoazide (PMA) - treatment. Based on the assessment of characteristics of spray dried potential probiotic bacteria, *Lb. plantarum* 564 was selected for application in the production of yoghurt and cheese made from ultrafiltered milk equivalent with the addition of probiotic bacteria in the form of free and spray dried cells, as well as in the production of dark chocolate with spray dried cells. *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) was used as a reference probiotic. The viability of probiotic bacteria during production and storage, as well as the sensory quality of the product were examined. Furthermore, the ability of probiotic bacteria to survive gastrointestinal conditions was examined *in vivo* on volunteers consuming a powder of spray dried probiotic cells, yogurt, cheese from UF milk and dark chocolate with spray-dried cells of *Lb. plantarum* 564 and *Lb. plantarum* 299v in adequate quantities during 14 days, as well as microflora of volunteer's feces before and after consumption of products with probiotic bacteria. The presence of the consumed probiotic bacteria in the feces of volunteers was investigated with RAPD molecular technique.

Based on the viability of potential probiotic bacteria *Lb. plantarum* 564 and *Lb. paracasei* Z8 after spray drying, it was found that optimal conditions were achieved during this process. There was no significant difference in the results of viability assessment by plate counting and by real time PCR with PMA. Furthermore, there were no significant difference in the number of starter cultures bacteria between control variant of yogurt and cheeses from UF milk without probiotics and variants with *Lb. plantarum* 564 and *Lb. plantarum* 299v. Also the pH value of yogurt and cheese from UF milk ranged within an appropriate range. During storage of yogurt, free and spray dried probiotic cells were found at a level above 10^7 cfu/ml⁻¹, with no statistically significant difference between the number of free and spray-dried cells. Likewise, the free and spray dried probiotic cells were at the level above 10^8 cfu/g during storage of the cheese from UF milk. On the other hand, the viability of the spray dried probiotic bacteria *Lb. plantarum* 564 and *Lb. plantarum* 299v was maintained at a level higher than 10^6 cfug⁻¹ during the 9 months of storage of dark chocolate at room temperature. Sensory quality of yoghurt, cheese from UF milk and dark chocolate with probiotic bacteria remained unchanged during storage. Probiotic bacteria did not affect the appearance and consistency of product, and neither led to non-specific odors and flavors

that would influence the characteristic and distinctive taste of the product. Also, there was no statistically significant difference between control products without probiotic bacteria and products with probiotic bacteria.

It was observed that after consumption of products with probiotic bacteria, the numbers of sulfitereducing clostridia, enterobacteria and enterococci from volunteer's feces have decreased. Also the number of lactobacilli increased after consumption of products with probiotic bacteria. Determination of percentage share of lactobacilli, sulfitereducing clostridia, enterococci and enterobacteria indicated an increase in share of lactobacilli in feces of volunteers after consumption of products with *Lb. plantarum* 564 and *Lb. plantarum* 299v, which lead to reduction of share of undesirable microorganisms. In addition, potential probiotic *Lb. plantarum* 564 survived unfavorable conditions of the gastrointestinal tract.

By examination of the role of carrier products with probiotic bacteria, it was observed that dark chocolate was a very good carrier, taking into consideration that both probiotic bacteria were found in most of the volunteers' feces after consumption of dark chocolate. Also the cheese from UF milk showed very good performance as a carrier of probiotic bacteria, while yogurt and spray dried powder provided the weakest protection to probiotic bacteria, as probiotics were isolated from the minimum number of feces of volunteers after consumption of the above mentioned products.

Keywords: potential probiotic bacteria, functional food, gastrointestinal conditions, spray drying, yogurt, cheese from ultrafiltered milk, dark chocolate, in vivo studies

Scientific field: Food technology

Specific scientific field: Industrial microbiology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. PREGLED LITERATURE	4
1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE BAKTERIJA MLEČNE KISELINE	4
1.1.1. Rod <i>Lactococcus</i>	6
1.1.2. Rod <i>Streptococcus</i>	7
1.1.3. Rod <i>Oenococcus</i>	7
1.1.4. Rod <i>Leuconostoc</i>	7
1.1.5. Rod <i>Pediococcus</i>	8
1.1.6. Rod <i>Weissella</i>	8
1.1.7. Rod <i>Lactobacillus</i>	8
1.1.7.1. Vrsta <i>Lactobacillus plantarum</i>	10
1.2. OPŠTE KARAKTERISTIKE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	11
1.3. GASTROINTESTINALNI TRAKT	11
1.3.1. Funkcija mikrobiote	11
1.3.2. Faktori koji utiču na mikrobiološki sastav gastrointestinalnog trakta ..	14
1.4. FUNKCIONALNA HRANA	16
1.5. PROBIOTSKE BAKTERIJE	17
1.5.1. Kriterijumi za selekciju probiotskih bakterija.....	20
1.5.2. Opšti probiotski kriterijumi	22
1.5.2.1. Poreklo, identifikacija, GRAS status	22
1.5.2.2. Vijabilnost probiotskih bakterija u prehrambenim proizvodima	23
1.5.2.3. Preživljavanje niskih pH vrednosti i žučnih soli	24
1.5.2.4. Osetljivost na antibiotike	25
1.5.3. Fiziološki probiotski kriterijumi	27
1.5.3.1. Sposobnost adhezije.....	27
1.5.3.2. Imunostimulacija	28
1.5.3.3. Antimikrobna aktivnost probiotskih bakterija	29
1.5.4. Tehnološki probiotski kriterijumi	30
1.5.4.1. Tehnološke karakteristike	30
1.5.4.2. Uticaj probiotskih bakterija na senzorne karakteristike proizvoda...	34
1.5.4.3. Interakcije probiotskih bakterija sa ostalim mikroorganizmima	34
1.5.4.4. Stabilnost probiotskih bakterija tokom skladištenja proizvoda	35
1.5.4.5. Uticaj kiseonika na probiotske bakterije.....	35

1.5.5.	Zdravstveni efekti probiotskih bakterija	35
1.5.6.	Autohtone potencijalne probiotske bakterije	40
1.6.	MIKROINKAPSULACIJA PROBIOTSKIH BAKTERIJA	41
1.6.1.	Tehnike mikroinkapsulacije probiotskih bakterija.....	42
1.6.2.	Tehnika mikroinkapsulacije sprej sušenjem	43
1.6.2.1.	Proces sprej sušenja	44
1.6.2.2.	Nosači za mikroinkapsulaciju probiotskih bakterija sprej sušenjem	45
1.6.2.3.	Određivanje broja vijabilnih ćelija nakon sprej sušenja	46
1.7.	PRIMENA PROBIOTSKIH BAKTERIJA U PROIZVODNJI HRANE	47
1.7.1.	Primena probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta	49
1.7.2.	Primena probiotskih bakterija u proizvodnji sira.....	51
1.7.3.	Primena probiotskih bakterija u proizvodnji čokolade	53
1.7.4.	Primena probiotskih bakterija u proizvodnji drugih prehrambenih proizvoda	56
1.8.	<i>IN VIVO</i> ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI PREŽIVLJAVANJA GASTROINTESTINALNIH USLOVA	58
2.	CILJ RADA	61
3.	MATERIJAL I METODE.....	63
3.1.	TRADICIONALNI SIREVI.....	63
3.2.	IZOLACIJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE	63
3.3.	KARAKTERIZACIJA I SELEKCIJA IZOLATA LAKTOBACILA	64
3.3.1.	Katalaza test.....	64
3.3.2.	Način fermentacije šećera	64
3.3.3.	Sposobnost rasta na različitim temperaturama	64
3.3.4.	Sposobnost rasta pri različitim koncentracijama soli	65
3.3.5.	Sposobnost rasta u različitim pH vrednostima	65
3.3.6.	Ispitivanje acidogene sposobnosti.....	65
3.3.7.	Sposobnost produkcije egzopolisaharida.....	65
3.3.8.	Sposobnost produkcije aromogenih jedinjenja	66
3.3.9.	Proteolitička aktivnost	66
3.4.	IDENTIFIKACIJA SELEKTOVANIH SOJEVA	66
3.4.1.	API sistem.....	66
3.4.2.	Izolacija totalne DNK iz selektovanih izolata	67
3.4.3.	Umnožavanje DNK fragmenata metodom PCR (Polymerase Chain Reaction).....	67

3.4.4.	Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu	69
3.5.	ODREĐIVANJE PROBIOTSKIH KARAKTERISTIKA SELEKTOVANIH SOJEVA <i>IN VITRO</i> TESTOVIMA	69
3.5.1.	Gastro uslovi	69
3.5.2.	Intestinalni uslovi.....	69
3.5.3.	Rezistencija na antibiotike	70
3.5.4.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika	70
3.5.5.	Antimikrobna svojstva	71
3.6.	MIKROINKAPSULACIJA POTENCIJALNIH PROBIOTSKIH BAKTERIJA SPREJ SUŠENJEM.....	72
3.6.1.	Ispitivanje osetljivosti potencijalnih probiotskih bakterija na povišene temperature	72
3.6.2.	Priprema inokuluma za sprej sušenje.....	73
3.6.3.	Tehnika sprej sušenja	73
3.7.	ISPITIVANJE VIJABILNOSTI POTENCIJALNIH PROBIOTSKIH BAKTERIJA NAKON SPREJ SUŠENJA.....	74
3.7.1.	Metoda razređenja.....	74
3.7.2.	Metoda real time PCR.....	74
3.7.2.1.	Tretman sa propidijum monoazidom (PMA).....	74
3.7.2.2.	Izolacija DNK sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija	75
3.7.2.3.	Real time PCR	75
3.7.3.	Određivanje probiotskih karakteristika potencijalnih probiotskih bakterija nakon sprej sušenja <i>in vitro</i> testovima.....	76
3.8.	PRIMENA PROBIOTSKIH BAKTERIJA U PROIZVODNJI JOGURTA, SIRA OD ULTRAFILTRIRANOG MLEKA I CRNE ČOKOLADE.....	76
3.8.1.	Određivanje broja ćelija potencijalnog probiotika <i>Lb. plantarum</i> 564 i komercijalnog probiotika <i>Lb. plantarum</i> 299v.....	77
3.8.2.	Primena probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta	77
3.8.3.	Primena probiotskih bakterija u proizvodnji sira od ultrafiltriranog mleka	78
3.8.4.	Primena probiotskih bakterija u proizvodnji crne čokolade	80
3.9.	ODREĐIVANJE pH VREDNOSTI JOGURTA I SIRA OD ULTRAFILTRIRANOG MLEKA SA PROBIOTSKIM BAKTERIJAMA	81
3.10.	ODREĐIVANJE BROJA STARTERA I PROBIOTIKA U JOGURTU, SIRU OD ULTRAFILTRIRANOG MLEKA I CRNOJ ČOKOLADI.....	82
3.10.1.	Određivanje broja starter kultura u jogurtu sa probioticima.....	82

3.10.2.	Određivanje broja starter kultura u siru od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama	82
3.10.3.	Određivanje broja probiotskih bakterija u jogurtu, siru od ultrafiltriranog mleka i crnoj čokoladi.....	82
3.11.	SENZORNA ANALIZA PROBIOTSKIH PROIZVODA	83
3.11.1.	Jogurt sa probiotskim bakterijama	83
3.11.2.	Sir od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama	84
3.11.3.	Crna čokolada sa probiotskim bakterijama.....	85
3.12.	ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI PREŽIVLJAVANJA PROBIOTSKIH BAKTERIJA U GASTROINTESTINALNIM USLOVIMA- <i>IN VIVO</i> STUDIJA.....	87
3.12.1.	Mikrobiološka analiza fecesa.....	88
3.12.2.	Izolacija DNK laktobacila iz fecesa.....	89
3.12.3.	Molekularna metoda Randomply Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)	90
3.13.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	91
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	92
4.1.	IZOLACIJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE	92
4.2.	MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE	92
4.2.1.	Katalaza test	92
4.2.2.	Fermentacija šećera.....	93
4.2.3.	Sposobnost rasta pri različitim temperaturama.....	93
4.2.4.	Sposobnost rasta u različitim koncentracijama soli	94
4.2.5.	Sposobnost produkcije egzopolisaharida.....	95
4.2.6.	Sposobnost rasta na različitim pH vrednostima.....	96
4.2.7.	Acidogena sposobnost	96
4.2.8.	Sposobnost produkcije aromogenih jedinjenja	98
4.2.9.	Proteolitička aktivnost	98
4.3.	IDENTIFIKACIJA IZOLATA.....	99
4.3.1.	API sistem.....	99
4.3.2.	Identifikacija selektovanih izolata pomoću PCR metode	101
4.4.	PROBIOTSKE KARAKTERISTIKE SELEKTOVANIH IZOLATA.....	104
4.4.1.	Rezultati sposobnosti preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova <i>in vitro</i>	104
4.4.2.	Osetljivost na antibiotike	107
4.4.2.1.	Difuzni test.....	107

4.4.2.2.	Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) antibiotika	110
4.4.3.	Antimikrobna aktivnost	113
4.5.	MIKROINKAPSULACIJA POTENCIJALNIH PROBIOTSKIH BAKTERIJA SPREJ SUŠENJEM.....	115
4.5.1.	Osetljivost potencijalnih probiotskih bakterija na povišene temperature	115
4.5.2.	Vijabilnost potencijalnih probiotskih bakterija nakon sprej sušenja ..	117
4.5.3.	Spособnost preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija	121
4.6.	PRIMENA PROBIOTSKIH BAKTERIJA U PROIZVODNJI JOGURTA, SIRA OD ULTRAFILTRIRANOG MLEKA I CRNE ČOKOLADE.....	123
4.6.1.	Broj slobodnih i inkapsulisanih ćelija probiotskih bakterija	124
4.7.	pH VREDNOSTI JOGURTA I SIRA OD ULTRAFILTRIRANOG MLEKA SA PROBIOTSKIM BAKTERIJAMA	125
4.8.	VIJABILNOST STARTER KULTURA I PROBIOTSKIH BAKTERIJA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA SA PROBIOTSKIM BAKTERIJAMA.....	127
4.8.1.	Vijabilnost starter kultura u jogurtu sa probiotskim bakterijama	127
4.8.2.	Broj starter kultura u siru od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama	131
4.8.3.	Vijabilnost probiotskih bakterija u prehrambenim proizvodima.....	133
4.8.3.1.	Vijabilnost probiotskih bakterija u jogurtu	133
4.8.3.2.	Vijabilnost probiotskih bakterija u siru od ultrafiltriranog mleka ..	137
4.8.3.3.	Vijabilnost probiotskih bakterija u crnoj čokoladi	141
4.9.	SENZORNA OCENA PROIZVODA SA PROBIOTSKIM BAKTERIJAMA.....	147
4.9.1.	Senzorna ocena jogurta sa probiotskim bakterijama	147
4.9.2.	Senzorna ocena sireva od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama	151
4.9.3.	Senzorna ocena crne čokolade sa probiotskim bakterijama	155
4.10.	SPOSOBNOST PREŽIVLJAVANJA PROBIOTSKIH BAKTERIJA U GASTROINTESTINALNIM USLOVIMA- <i>IN VIVO</i> STUDIJA.....	159
4.10.1.	Mikroflora fecesa volontera.....	159
4.10.1.1.	Odnos laktobacila, sulfitoredujućih klostridija, enterobakterija i enterokoka u fecesu volontera, pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama.....	173
4.10.2.	Spособnost preživljavanja probiotskih bakterija u gastrointestinalnim uslovima.....	184

5. ZAKLJUČAK.....	195
LITERATURA	202
SPISAK SKRAĆENICA.....	243
PRILOZI	244
BIOGRAFIJA AUTORA.....	247

1. UVOD

Poslednjih godina, nepravilna ishrana dovela je do različitih negativnih posledica koje u velikoj meri utiču na ljudsko zdravlje. Današnju svetsku populaciju zahvatila je epidemija dijabetesa, gojaznosti, problema sa krvnim pritiskom, bolesti srca i krvnih sudova, raznih tumora, itd. Takođe, brz i nepravilan tempo života često je povezan sa nepravilnom ishranom. Shodno tome, različite zdravstvene institucije su prepoznale problem ishrane i uvele pojam funkcionalne hrane, koja pored svog osnovnog nutritivnog sadržaja može biti obogaćena dodatnim komponentama, kao što su na primer probiotici. Zbog toga, prehrambena industrija je sve više usmerena na proizvodnju različite funkcionalne hrane sa probiotskim bakterijama koja ostvaruje mnogobrojne pozitivne efekte na ljudsko zdravlje, usled čega proizvođači ulažu velika novčana sredstva u edukaciju populacije i različita marketinška sredstva promovujući pozitivne efekte funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

Probiotske bakterije predstavljaju žive mikroorganizme, koji primenjeni u odgovarajućim količinama ispoljavaju pozitivne efekte na ljudsko zdravlje (FAO/WHO, 2001). Vrste bakterija koje pripadaju rodovima *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp. su ostvarile najveću primenu kao probiotske bakterije. Istraživanjima je ustanovljeno da brojne bakterije mlečne kiseline, izolovane iz različitih sredina (gastrointestinalni trakt, fermentisani biljni proizvodi, tradicionalni mlečni proizvodi, itd.), poseduju probiotske karakteristike. Autohtone bakterije mlečne kiseline izolovane iz tradicionalnih sireva predstavljaju veliki potencijal za selekciju novih sojeva, koji mogu posedovati probiotske karakteristike, pa je stoga poslednjih godina kao jedan od osnovnih kriterijuma za selekciju izolata bakterija mlečne kiseline iz tradicionalnih proizvoda, pored ispitivanja tehnoloških i biohemijskih karakteristika, sve aktuelnije ispitivanje potencijalnih probiotskih karakteristika.

Prilikom određivanja probiotskih karakteristika autohtonih bakterija mlečne kiseline izolovanih iz sireva dobijenih na tradicionalan način, neophodno je ispitati tehnološke karakteristike, kako bi se ispitala sposobnost preživljavanja tehnološkog postupka proizvodnje, potom sposobnost preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova

(niske pH vrednosti i prisustvo žučnih soli), rezistencija na antibiotike, antimikrobna aktivnost, itd.

Da bi probiotske bakterije primenjene u prehrambenim proizvodima ostvarile terapijski efekat, neophodno je da se unesu u odgovarajućem broju, odnosno neophodno je održati vijabilnost probiotika tokom proizvodnje i skladištenja proizvoda na nivou većem od 10^6 cfug⁻¹, kako bi se preporučenim dnevnim unosom namirnica ostvario dnevni unos probiotskih bakterija na nivou 10^8 - 10^9 ćelija. Isto tako, posle konzumiranja proizvoda probiotske bakterije moraju zadržati visok broj i tokom prolaza kroz gastrointestinalni trakt. U tom smislu, sve više se primenjuje zaštita probiotskih bakterija procesom mikroinkapsulacije.

Mikroinkapsulacija predstavlja pogodan metod u zaštiti probiotskih bakterija u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine. Postoje više tehnika mikroinkapsulacije, pri čemu se tehnika sprej sušenja izdvaja kao jedna od najekonomičnijih tehnika, sa relativno visokim brojem preživelih probiotskih ćelija. Odabirom odgovarajućeg nosača i optimalnih uslova tokom procesa sprej sušenja, može se dobiti visok broj sprej sušenih probiotskih ćelija. Izolacijom i pravilnom selekcijom potencijalnih probiotskih bakterija izolovanih iz tradicionalnih sireva, njihovom inkapsulacijom tehnikom sprej sušenja i ispitivanjem vijabilnosti sprej sušenih probiotskih ćelija i njihovih karakteristika, moguće je ispitati uticaj sprej sušenja na vijabilnost probiotskih bakterija i sposobnost preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova.

Primena sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija omogućava ispitivanje vijabilnosti, odnosno sposobnosti preživljavanja probiotskih bakterija tokom proizvodnje i skladištenja različitih prehrambenih proizvoda. Probiotske bakterije se primenjuju u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka, kao što je jogurt. Takođe, sve više je popularna njihova primena u proizvodnji sireva, pri čemu različite vrste sireva predstavljaju veoma pogodan medijum za inkorporaciju probiotskih bakterija. Međutim, konzumacija probiotskih mlečnih proizvoda je ograničena određenom delu populacije koji je netolerantan na laktozu ili alergična na mlečne proteine. U tom smislu, proizvodnja probiotskih nemlečnih proizvoda je sve popularnija u prehrambenoj industriji, pri čemu je veoma bitno odabrati odgovarajući medijum koji sadrži neophodne komponente za primenu probiotskih bakterija. Čokolada, kao najpopularniji

konditorski proizvod, predstavlja pogodan prehrambeni proizvod koji ispunjava neophodne zahteve.

Prilikom primene probiotskih bakterija u proizvodnji određenog prehrambenog proizvoda, senzorne karakteristike proizvoda treba da ostanu nepromenjene, odnosno probiotske bakterije ne bi trebalo da utiču na promenu teksture, boje, konzistencije, i ostalih površinskih i mehaničkih svojstva proizvoda. Isto tako, najbitniji senzorni parametri, ukus i miris proizvoda, treba da ostanu nepromenjeni prilikom primene probiotskih bakterija.

Da bi probiotske bakterije ostvarile svoj terapijski efekat na ljudsko zdravlje, potrebno je da proces mikroinkapsulacije i prehrambeni proizvod u koji je probiotik inkorporiran, pruže odgovarajuću zaštitu i omoguće da probiotik dospe na mesto svog delovanja. Preživljavanje probiotskih bakterija tokom prolaza kroz nepovoljne uslove gastrointestinalnog trakta je povezano sa izborom odgovarajućeg soja, njegove interakcije sa ostalim mikroorganizmima u proizvodu, kao i sa karakteristikama prehrambenog proizvoda. U tom smislu, odabir odgovarajućeg prehrambenog proizvoda koji obezbeđuje neophodnu zaštitu prehrambenim proizvodima, predstavlja pogodan nosač probiotskih bakterija tokom prolaza kroz gastrointestinalni trakt. Samim tim, primenom probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta, kao tradicionalnog nosača probiotika, sira od ultrafiltriranog mleka i crne čokolade, moguće je uporediti ulogu nosača navedenih prehrambenih proizvoda, odnosno koji proizvod omogućava da probiotske bakterije prežive u najvećem broju nakon prolaza kroz gastrointestinalni trakt. Isto tako, moguće je uporediti i efekat probiotskih bakterija na nepoželjnu mikrofloru fecesa.

Pravilnom selekcijom potencijalnih probiotskih bakterija izolovanih iz tradicionalnih sireva, njihovom mikroinkapsulacijom tehnikom sprej sušenja i primenom u proizvodnji jogurta, sira od ultrafiltriranog mleka i crne čokolade i ispitivanje navedenih proizvoda kao nosača probiotskih bakterija, moguće je izvršiti izbor pogodnog nosača probiotskih bakterija, koji sadrži probiotike u visokom broju i omogućava njihovo delovanje u gastrointestinalnom traktu.

1. PREGLED LITERATURE

1.1. Opšte karakteristike bakterija mlečne kiseline

Bakterije mlečne kiseline (BMK) predstavljaju široku grupu mikroorganizama koja poseduje veoma slične fiziološke, fenotipske i genotipske karakteristike. Osnovne karakteristike BMK jeste da su Gram pozitivne, asporogene, katalaza negativne, nepokretne, mikroaerofilne, bez citohroma, itd. Prilikom fermentacije ugljenih hidrata BMK proizvode mlečnu kiselinu. U zavisnosti od toga da li je mlečna kiselina jedini produkt fermentacije ili nastaju još neki produkti, BMK se mogu podeliti na homofermentativne koje 95% šećera prevode u mlečnu kiselinu i heterofermentativne koji pored mlečne kiseline proizvode i sirćetnu kiselinu, etanol, mravlju kiselinu, CO₂, acet-aldehid. Na osnovu oblika mogu se razlikovati štapičaste i okruglaste BMK, odnosno laktobacili, laktokoke i streptokoke.

BMK se mogu izolovati iz različitih prehrambenih proizvoda, kao što su kiselo-mlečni proizvodi, različiti sirevi, ukišeljeno povrće (kisel kupus, šargarepa, krastavci, masline), različite fermentisane prerađevine (kobasice, salame), žitarice, vino, silaža, itd. Takođe, BMK su prisutne i u gastrointestinalnom traktu čoveka, koži čoveka i životinja, nekim biljkama, itd.

Usled veoma kompleksnog metabolizma, BMK pored produkcije mlečne kiseline, mogu da sintetišu različita jedinjenja koja doprinose specifičnom mirisu i ukusu proizvoda (Urbach, 1995; Settanni i Moschetti, 2010), koja imaju antimikrobno delovanje na nepoželjne ili patogene mikroorganizme, itd. Produkcijom antimikrobnih jedinjenja, BMK inhibitorno deluju prema nepoželjnoj mikroflori, čime doprinose bezbednosti proizvoda. Antimikrobna jedinjenja koja BMK proizvode su najčešće produkti primarnog metabolizma (H₂O₂, diacetil, organske kiseline) i sekundarnog metabolizma (bakteriocini).

Prvu izolaciju čiste kulture BMK je izveo Joseph Lister 1878. godine, izdvojivši pri tome vrstu *Betabacterium lactis*. Kasnije, 1904. godine, značajan doprinos kvalifikaciji BMK daje Henneberg, kada je ustanovio sličnost između bakterija koje zakiseljavaju

mleko i ostalih bakterija koje stvaraju mlečnu kiselinu. Kasnije se klasifikacija vršila na osnovu morfologije, načina fermentacije glukoze, mogućnosti korišćenja šećera i rasta na određenim temperaturama. Na ovaj način, BMK su se svrstale u dve porodice, Streptococcaceae i Lactobacillaceae. Porodica Lactobacillaceae je obuhvatala sve homofermentativne i heterofermentativne štapićaste bakterije, dok su u porodicu Streptococcaceae bile uključene homofermentativne koke, a u rod *Leuconostoc* heterofermentativne koke. Homofermentativne koke koje formiraju tetrade su bile odvojene u rod *Pediococcus*.

Podela BMK koja je bazirana na fenotipskim karakteristikama, korišćena je sve do 1980. godine, kada sa razvojem genetičkih metoda za identifikaciju i klasifikaciju bakterija, dolazi i do preraspodele nekih rodova BMK i definisanje novih rodova. Primenom molekularnih metoda, npr. DNK-DNK homologije, omogućeno je determinisanje bliskih relacija na nivou vrste i podvrste.

Rodovi bakterija mlečne kiseline koje su najviše zastupljene u tradicionalnoj fermentisanoj hrani su *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Oenococcus* i vrsta *Streptococcus thermophilus*, kao i vrste slične *St. thermophilus*, koje pripadaju rodu *Streptococcus* (Axelsson, 2004). Porodici Lactobacillaceae pripadaju rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus*, kao i relativno novi rodovi *Paralactobacillus* i *Sharpea*. *Weissella*, *Leuconostoc* i *Oenococcus* pripadaju porodici Leuconostocaceae, kao i rod *Fructobacillus*. *Lactococcus* i *St. thermophilus*, iako pripadaju istom redu *Lactobacillales* kao i rod *Lactobacillus*, u potpunosti su drugačije od roda *Lactobacillus*. Moglo bi se reći da oni pripadaju istoj opštoj grani evolucije (Molin, 2013).

Generalno posmatrajući, BMK koje imaju najveći značaj u prehrambenoj industriji su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptosoccus*, *Oenococcus* i *Weissella*, čije će karakteristike biti opisane.

Carnobacterium, *Enterococcus* i *Bifidobacterium* su ranije definisani kao rodovi BMK, međutim ispitivanjem je ustanovljeno da navedeni rodovi ne pripadaju bakterijama mlečne kiseline (Axelsson, 2004; Ballongue, 2004). *Bifidobacterium* se često primenjuju kao probiotske bakterije, dok bakterije roda *Enterococcus* i *Carnobacterium* pretežno nisu poželjne u prehrambenim proizvodima zbog svojih karakteristika.

Da bi se BMK primenile u proizvodnji hrane potrebno je da poseduju GRAS (Generally Regarded as Safe) status, odnosno da su bezbedne po čoveka i životinje. Prilikom ispitivanja BMK, nije zabeleženo da izazivaju neku bolest. Pored GRAS statusa, sojevi izolovani iz različitih fermentisanih proizvoda moraju biti tehnološki okarakterisani i identifikovani, zbog široke mogućnosti njihove primene u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda. U prehrambenoj industriji, BMK mogu da se koriste kao starter kulture u proizvodnji različitih fermentisanih proizvoda (jogurt, različiti sirevi, fermentisane kobasice, itd.), kao dodatne kulture radi poboljšanja senzornih karakteristika proizvoda ili produžetka roka trajanja ili kao zaštitne kulture, u slučaju antimikrobne aktivnosti. Takođe, BMK se danas uspešno koriste kao industrijski mikroorganizmi za sintezu određenih supstanci. Međutim, određene BMK mogu da poseduju i probiotske karakteristike koje danas zauzimaju značajno mesto, kako u farmaceutskoj, tako i u prehrambenoj industriji.

1.1.1. Rod *Lactococcus*

Bakterije mlečne kiseline koje pripadaju rodu *Lactococcus* su najčešće ćelije okruglastog oblika, koje se javljaju pojedinačno, u parovima, lancima i često su izdužene u pravcu lanca. Vršer fermentaciju šećera do mlečne kiseline, a glavni produkt fermentacije glukoze je L-mlečna kiselina. Mogu da rastu na temperaturi od 10°C, ali ne rastu na 45°C. Sojevi *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* tolerišu samo 2% NaCl, dok sve ostale vrste uglavnom rastu i u prisustvu 4% soli.

Rod *Lactococcus* obuhvata 9 različitih vrsta, pri čemu je najčešća vrsta *Lactococcus lactis*, sa podvrstama *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* i *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Na osnovu molekularnih metoda, pre svega hibridizacijom nukleinskih kiselina i komparativnim imunološkim ispitivanjima, ustanovljeno je da su vrste roda *Lactococcus* međusobno blisko srodne. Međutim, razlike između blisko srodnih vrsta moguće je ustanoviti i pomoću fenotipskih razlika. Na primer, *L. lactis* ssp. *cremoris* ne raste u prisustvu 4% NaCl, kao ni na temperaturi od 40°C, za razliku od *L. lactis* ssp. *lactis*. Kiselinu ne proizvodi iz maltoze i riboze, a većina sojeva ni iz salicina i trehaloze i ne vrši hidrolizu arginina. Takođe, za razliku od *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* koristi citrate kao izvor ugljenika.

Lactococcus vrste se uglavnom koriste u proizvodnji različitih vrsta sireva, kao starter kulture, ali i u proizvodnji različitih fermentisanih mlečnih proizvoda, kao što je na primer „Filmjolk“ (Molin, 2013).

1.1.2. Rod *Streptococcus*

Vrsta *Streptococcus thermophilus* zajedno sa još tri *Streptococcus* vrste formira taksonomsku jedinicu koja je relativno drugačija od ostalih *Streptococcus* vrste. Istraživanjima je ustanovljeno da ova vrsta nije patogena i da se može smatrati bakterijom mlečne kiseline. Vrsta *St. thermophilus* fermentiše šećere do ugljenih hidrata veoma brzo, ali s obzirom na to da sporo hidrolizuje kazein pokazuje veoma spor rast u mleku. Tradicionalno, *St. thermophilus* se koristi u proizvodnji jogurta zajedno sa *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* koji vrši proteolizu kazeina. Vrsta *St. thermophilus* je termofilna bakterija koja raste na temperaturi od 45°C. U prirodi, ova vrsta je pronađena u mukozni životinja, što ukazuje da je ova vrsta više povezana sa pticama, uzimajući u obzir njihovu visoku telesnu temperaturu (oko 40°C).

1.1.3. Rod *Oenococcus*

Vrste roda *Oenococcus* su kokoidnog ili elipsoidnog oblika, pri čemu fermentišu šećere heterofermentativnim putem. Postoje dve vrste ovog roda, *Oenococcus oeni* i *Oenococcus kitaharae*. Vrste roda *Oenococcus* mogu da rastu pri koncentraciji etanola od 10% i u niskim pH vrednostima, zbog čega se mogu naći u visokom broju u vinu i pivu.

1.1.4. Rod *Leuconostoc*

Vrsta roda *Leuconostoc* su kokoidne ćelije, ali mogu biti i sočivaste, u zavisnosti od podloge na kojoj rastu. Najčešće se javljaju u parovima ili u lancima. *Leuconostoc* vrste fermentišu šećere heterofermentativnim putem, odnosno pored mlečne kiseline kao krajnji produkt nastaje i CO₂, etanol, a u zavisnosti od okolnosti može nastati i sirćetna kiselina. Temperaturni opseg za rast je između 20°C i 30°C. Nemaju izraženu

proteolitičku aktivnost, ne vrše hidrolizu arginina i imaju slabiju acidogenu sposobnost. U prirodi, vrste roda *Leuconostoc* su često prisutne na insektima i puževima. Međutim, u prehrambenim proizvodima mogu biti izolovane iz vina (vrsta *L. oenos*), kao i iz mleka i mlečnih proizvoda. Takođe, *Leuconostoc* vrste se primenjuju u proizvodnji pavlake, maslaca, različitih vrsta sireva, a zbog tolerancije na povišene koncentracije šećera (više od 60%) mogu da rastu u sirupu i sladoledu.

1.1.5. Rod *Pediococcus*

Rod *Pediococcus* obuhvata 15 vrsta. Prilikom mikroskopiranja ovih bakterija mlečne kiseline mogu da se uoče pojedinačne koke, u paru ili u lancima, ali i u obliku tetrada. *Pediococcus* vrste fermentišu šećere do mlečne kiseline. Rastu na temperaturama od 7-45°C, a optimalne temperature za rast su im između 25-32°C. Takođe, rastu u salamurama sa 5% soli, a nešto slabije pri koncentraciji od 10%. Mogu da se izoluju iz mleka i mlečnih proizvoda, fermentisanog povrća, žitarica i piva, a koriste se u proizvodnji fermentisanih kobasica (vrsta *P. cerevisiae*).

1.1.6. Rod *Weissella*

BMK koje pripadaju rodu *Weissella* su štapićastog oblika. Fermentacijom šećera proizvode mlečnu kiselinu heterofermentativnim putem. Rodu *Weissella* pripada 13 vrsta, koje su uglavnom zastupljene u fermentisanoj hrani, ali su izolovane i iz gastrointestinalnog trakta.

1.1.7. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* sadrži više od 90 različitih vrsta i podvrsta. Ovaj rod bakterija mlečne kiseline uglavnom dominira u tradicionalnoj fermentisanoj hrani, gastrointestinalnom traktu, itd.

Laktobacili su štapićastog oblika, nepokretni su i ne formiraju spore. Na osnovu prisustva ili odsustva određenih enzima tokom fermentacije ugljenih hidrata, laktobacili se mogu podeliti u tri grupe (Kandler i Weiss, 1986):

1. Obligatno homofermentativni laktobacili koji fermentišu heksoze (putem fruktoza-1,6-bifosfata) do mlečne kiseline, ali ne fermentišu pentoze i glukonat. U ovu grupu se ubrajaju grupa *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri*, *Lb. amylovarus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbruecki* ssp. *lactis*, i drugi.
2. Fakultativno heterofermentativni laktobacili, koji fermentišu heksoze do mlečne kiseline, ali mogu da proizvode i gas. Predstavnici ove grupe su *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus casei*.
3. Obligatno heterofermentativni laktobacili, koji vrše fermentaciju heksoza do mlečne i sirćetne kiseline, CO₂ i etanola. Ovoj grupi pripadaju *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, itd.

Filogenetski, *Lactobacillus* je heterogen rod sa guanin+citozin % (G+C) sastavom koji varira u intervalu od 32-53%. Taksonomski efekti u shvatanju filogenetskih veza među laktobacilima su uspešno savladani zahvaljujući analizi primarno 16S rRNK sekvence, ali su još bolje ispitani analizom celokupnog genoma sojeva laktobacila (Molin, 2013). Analize sekvenciranja su pokazale odstupanje pojedinih vrsta od roda *Lactobacillus*, ali su podržale i priznavanje nekih novih vrsta, što je dovelo do nove podele *Lactobacillus* u nekoliko grupa. Pored toga, ustanovljeno je da su pojedine fakultativno heterofermentativne vrste *Lactobacillus* ssp. veoma slične *Pediococcus* ssp. Na osnovu sekvenciranja, nastale su tri nove grupe koje nisu skroz u saglasnosti sa podelom koja je izvršena na osnovu fermentacije šećera. Na primer, veliki broj obligatornih homofermentativnih laktobacila kao što su *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* i *Lactobacillus gasseri*, formiraju jednu grupu. Ova grupa se naziva „*Lb. delbrueckii*-grupa“. Druga grupa obuhvata *Lactobacillus* vrste, koje se nalaze u sve tri fermentativne grupe, kao i neke *Pediococcus* vrste, koja se naziva „*Lactobacillus casei*“ grupa. I na kraju, treća grupa „*Leuconostoc*“, obuhvata *Leuconostoc* vrste, kao i neke obligatorno homofermentativne *Lactobacillus* vrste i *Weissella* vrste (Molin, 2013).

Međutim, *Lactobacillus* ssp. bi u budućnosti mogle biti podeljene u šest grupa: *Lb. salivarius*, *Lb. acidophilus*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* i *Lb. casei*.

1.1.7.1. Vrsta *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum pripada fakultativno heterofermentativnim laktobacilima, pri čemu se od ostalih *Lactobacillus* vrsta razlikuje po sledećim karakteristikama (Molin, 2012):

- ✓ *Lb. plantarum* fermentiše različite ugljene hidrate
- ✓ Posедуje relativno veliki genom, što uslovljava sposobnost adaptiranja različitim uslovima
- ✓ Preživljava niske pH vrednosti, s obzirom na to da je dominantna vrsta u fermentisanim namirnicama sa pH vrednošću 4. Takođe, ima veoma dobru sposobnost preživljavanja kiselih uslova gastrointestinalnog trakta
- ✓ *Lb. plantarum* može da akumulira visok intracelularni nivo mangana, zbog čega i zahteva određenu količinu mangana za rast. Mangan ima zaštitnu ulogu, budući da štiti *Lb. plantarum* od toksičnog dejstva kiseonika koji nastaje redukcijom kiseonik radikala do vodonik peroksida
- ✓ *Lb. plantarum* može da metaboliše fenolnu kiselinu i poseduje tanaza aktivnost

Vrsta *Lb. plantarum* se vrlo često nalazi u fermentisanoj hrani, pogotovo u biljnim proizvodima, gde je na primer, izolovana iz soka od grožđa i vina (Vaquero et al., 2004), maslina u rastvoru soli (Fernandez Gonzales et al., 1993), kapra (Pulido et al., 2005), Nigerijskog ulja (Johansson, 1995), kao i iz gastrointestinalnog trakta, gde je pronađen u ustima, ali i u rektumu (Molin et al., 1993; Ahrne et al., 1998).

Prilikom ispitivanja *Lb. plantarum* sojeva, *Lb. plantarum* 299v (DSM 9843) je pokazao veoma dobre probiotske karakteristike sa određenim pozitivnim efektima na ljudsko zdravlje. Soj *Lb. plantarum* 299v je humanog porekla, ima izrazitu sposobnost vezivanja pomoću manoze, pri čemu se vezuje za mucin (Tallon et al., 2007), ispoljava antagonističko dejstvo prema nepoželjnoj mikroflori gastrointestinalnog trakta i povećava broj poželjnih bakterija (Goossens et al., 2005). *Lb. plantarum* 299v predstavlja probiotsku kulturu s veoma širokim spektrom pozitivnih zdravstvenih efekata. S obzirom na to da soj *Lb. plantarum* 299 (Molin et al., 1993), izolovan iz kiselog testa, ima veoma slične karakteristike kao i *Lb. plantarum* 299v, postoji

opravdana sumnja da se iz drugih fermentisanih proizvoda takođe mogu izolovati neki probiotski *Lb. plantarum* sojevi, kao što su na primer tradicionalni sirevi.

1.2. Opšte karakteristike *Bifidobacterium*

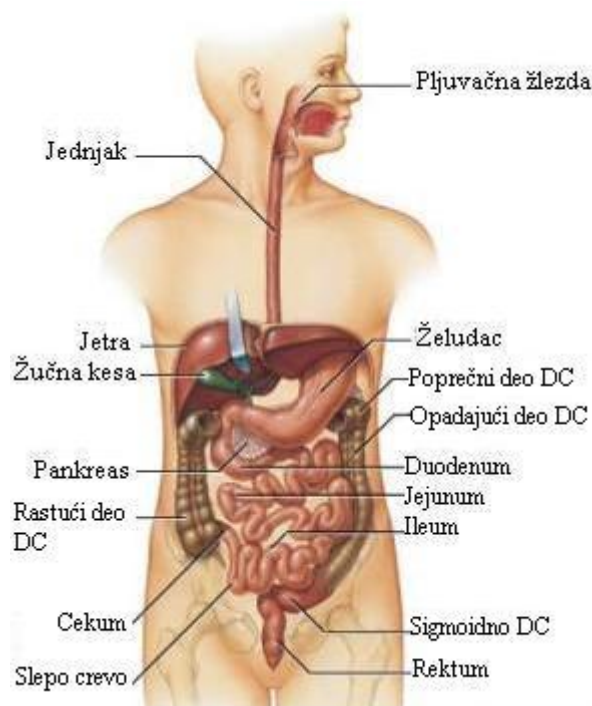
Bifidobakterije se često povezuju sa rodnom *Lactobacillus*, iako su u potpunosti različite od ovog roda, kao i od roda *Lactococcus*. *Bifidobacterium* pripada redu *Actinobacteria*, dok *Lactobacillus* i *Lactococcus* rodovi pripadaju redu *Firmicutes*. Rod *Bifidobacterium* obuhvata više od 45 vrsta, pri čemu fermentiše ugljene hidrate do sirćetne i mlečne kiseline i poseduje jedinstven metabolički put. Vrste roda *Bifidobacterium* su osetljive na kiseonik. *Bifidobacterium* su najčešće prisutne u tankom i debelom crevu gastrointestinalnog trakta i ne javljaju se u prirodno fermentisanim proizvodima.

1.3. Gastrointestinalni trakt

1.3.1. Funkcija mikrobiote

Mikroflora ljudskog gastrointestinalnog (GI) trakta predstavlja izuzetno složen ekosistem koji obuhvata fakultativno anaerobne i anaerobne mikroorganizme. Procenjeno je da je u proseku zastupljeno više od 400 vrsta bakterija u GI traktu (Moore i Holdeman, 1974). Među njima, samo 30 do 40 vrsta čini 99% celokupne crevne mikroflore GI trakta. Sastav mikroorganizama koji je zastupljen u GI traktu ljudskog organizma je aktivno ispitivan zadnjih 15-tak godina, pri čemu su korišćene različite metode identifikacije. Veliki broj bakterija koje su zastupljene u GI traktu ne mogu biti izolovani i identifikovani tradicionalnim metodama, zbog čega je razvoj molekularnih metoda omogućio detaljnije ispitivanje mikrobiološkog sastava GI trakta. Većina molekularnih metoda se zasniva na ekstrakciji DNA iz uzorka, amplifikaciji i sekvenciranju 16S rRNA, odnosno region koji omogućava taksonomsku identifikaciju od domena i filuma, pa sve do nivoa vrste (Alonso i Guarner, 2013). Poređenjem 16S rRNA sekvence uzorka sa referentnim sekvencama iz baze, dobijaju se informacije o mikroflori GI trakta. Metagenomika predstavlja jednu od najnovijih metoda za ispitivanje mikrobiološkog sastava GI trakta, gde se direktno iz uzorka određuje sastav mikroorganizama GI trakta. Na slici 1 prikazan je izgled gastrointestinalnog trakta.

Gastrointestinalni trakt počinje usnom dupljom gde je zastupljen kompleks mikroorganizama sa više od 700 različitih vrsta sa predstavnicima iz 6 različitih podgrupa (Aas et al., 2005). Usta se sastoje od različitih tipova površina, pri čemu svaka površina ima različit mikrobiološki sastav. Rodovi koji se nalaze na svakom delu usne duplje su *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* i *Veillonella* (Aas et al., 2005). Gornji digestivni trakt se potom nastavlja sa jednjakom, gde se bakterije uvode gutanjem ili refluksum iz kolonizovanog stomaka. Veliki broj mikroorganizama koji je nađen u jednjaku je zastupljen i u usnoj duplji (Dicksved, 2008). Ranije se smatralo da je jednjak sterilan, međutim istraživanja su pokazala da sluzokoža jednjaka sadrži raznoliku mikrofloru, gde je pronađeno 95 vrsta mikroorganizama iz 6 različitih podgrupa (Pei et al., 2004).



Slika 1. Gastrointestinalni trakt

Želudac ili stomak se smatra prvom linijom odbrane GI trakta od stranih mikroorganizama. U želucu je zastupljena kisela sredina koja predstavlja efikasnu barijeru u kojoj većina mikroorganizama ne može da preživi. Mikroflora želuca se sastoji od aerobnih mikroorganizama koji se nalaze na nivou većem od 10^3 cfu/ml.

Malom broju mikroorganizama doprinosi kratko vreme zadržavanja (Guarner, 2006). Jedna od zastupljenih bakterija u želucu jeste *Helicobacter pylori*, koja dovodi do različitih oboljenja GI trakta. Ekspresija enzima ureaze *Helicobacter pylori* omogućava preživljavanje u kiseloj sredini želuca tokom prolaza u mukozni sloj želuca gde je pH skoro neutralna. Takođe, vrste *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Enterobacteriaceae* su pronađene u želucu (Savage, 1977).

Tanko crevo, koje se sastoji od dvanaestopalačnog creva, jejunuma i ileuma predstavlja glavno mesto za varenje i adsorpciju hranljivih materija u organizmu. Žučne soli, pankreatin i mehanizmi ispiranja ograničavaju broj bakterija u početnom delu tankog creva, dok manji tranzit povećava broj bakterija u distalnom delu creva (O'Hara i Shanahan, 2006). Karakterizacija mikroflore tankog creva nije najbolje proučena zbog teškoća uzorkovanja. Prema dosadašnjim saznanjima, mikrofloru dvanaestopalačnog creva i jejunuma pretežno sačinjavaju fakultativno anaerobni mikroorganizmi, koji su uglavnom tolerantni na kisele uslove sredine, kao što su laktobacili i streptokoke (Hayashi et al., 2005; Wang et al., 2005). Anaerobni mikroorganizmi koji pripadaju redu *Firmicutes*, koji dominira u debelom crevu, nije pronađen i u tankom crevu. Međutim, distalni deo ileuma ima značajno raznovrsniju mikrofloru, koja je vrlo slična mikroflori debelog creva.

Debelo crevo se sastoji od rastućeg, poprečnog, opadajućeg debelog creva i rektuma i predstavlja primarno mesto za perzistenciju mikroorganizama u ljudskom telu. Procenjuje se da je u debelom crevu zastupljeno od 10^{11} - 10^{12} bakterija/g sadržaja debelog creva (O'Hara i Shanahan, 2006). S obzirom na to da su zastupljeni anaerobni uslovi, broj obligatno anaerobnih mikroorganizama je znatno veći od broja fakultativno anaerobnih mikroorganizama. Iako u debelom crevu postoji velika raznolikost bakterija, zastupljeno je nekoliko podgrupa, pri čemu su dominantne *Bacteroidetes* i *Firmicutes* koje čine 90% bakterijske populacije debelog creva (Ley et al., 2006a). Bakterije su ravnomerno raspoređene duž celog debelog creva, uprkos velikim fiziološkim razlikama između proksimalnog i distalnog dela debelog creva.

1.3.2. Faktori koji utiču na mikrobiološki sastav gastrointestinalnog trakta

Pre rođenja, GI trakt se smatra sterilnim, ali već pri rođenju, novorođenče je izloženo raznim bakterijama koje potiču iz bolnice, od lekarskog osoblja, kao i od same majke, u zavisnosti od načina rođenja. Prvobitna mikroflora novorođenčadi je od velikog značaja za razvoj neonatalnog imunog sistema. Već prvog dana života broj kopija 16S rRNK gena se kreće u rasponu od 10^4 - 10^{10} po g fecesa (Palmer et al., 2007).

S obzirom na to da je GI trakt novorođenčadi sterilan prilikom rođenja, jedan od prvobitnih i najbitnijih faktora koji će uticati na sastav GI trakta jeste način rođenja. Prilikom prirodnog porođaja, novorođenčad su u kontaktu s mikroflorom vagine, gde dolazi do transfera mikroorganizama sa majke na novorođenče. Kod zdrave žene, mikroflora vagine se pretežno sastoji od *Lactobacillus* vrsta kao što su *Lb. ineris*, *Lb. crispatus*, *Lb. jensenii* i *Lb. gasseri* (Vasquez et al., 2002; Martin et al., 2007; Thies et al., 2007; Yamamoto et al., 2009). Karlsson et al. (2011b) su ustanovili da je kod pojedinih novorođenčadi pronađen isti soj *Lb. inneris* kao i kod njihovih majki, kao i *Lb. gasseri* i *Lb. crispatus*, koji su takođe pronađeni kod novorođenčadi. Zbog vaginalnog transfera mikroorganizama, smatra se da su laktobacili prvi mikroorganizmi GI trakta prirodno rođenih beba. Kod porođaja putem carskog reza, mikrofloru novorođenčadi prvobitno nastanjuju mikroorganizmi iz okoline, npr. iz vazduha, opreme i medicinskog osoblja. Istraživanjima je ustanovljeno da je diverzitet mikroflore GI trakta znatno smanjen i da se pretežno sastoji od *Staphylococcus*, *Propionibacterium* i *Corynebacterium* koji su zastupljeni na koži (Dominguez-Bello et al., 2010).

Različite studije su pokazale da sastav crevne mikroflore zavisi od genetskog materijala čoveka. Istraživanja su uglavnom sprovedena upoređivanjem crevne mikroflore individue i mikroflore jednojajčanih blizanaca koji su živeli odvojeno. U ovom istraživanju, blizanci su živeli određeni vremenski period u dve potpuno različite sredine, pri čemu je ustanovljeno da je sastav njihove crevne mikroflore imao više sličnosti međusobno, nego sa sastavom crevne mikroflore ljudi koji su živeli u istom okruženju kao i blizanci (Zoetendal et al., 2001).

Način ishrane je naročito interesantan za ispitivanje sastava crevne mikroflore zbog svog potencijala modulacije crevne mikroflore, bez obzira da li je pozitivna ili štetna. Od rođenja, način ishrane utiče na uspostavljanje mikroflore GI trakta, koja ima uticaj i

na mikrofloru u kasnijem dobu. Mikroflora intestinalnog trakta novorođenčadi se tokom prva dva meseca pretežno kolonizuje sa *Enterobacteria* i *Enterococci* vrstama, ali su ustanovljene određene razlike između novorođenčadi koja se hrane majčinim mlekom i onih koja se hrane infant formulom (Naidu et al., 1999). Kod novorođenčadi koja se hrane majčinim mlekom, broj *Bifidobacterium* drastično raste, *Lactobacillus* i *Bacteroides* su zastupljene u manjem broju, a broj *Enterobacteria* i *Enterococci* je značajno smanjen. Bifidobakterije kod odojčadi predstavljaju 80-90% mikroflora fecesa, gde su najviše zastupljeni *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve* i *B. bifidum*. Kod novorođenčadi koja su hranjena infant formulom, broj *Enterobacteria* i *Enterococci* je na istom nivou nakon dve nedelje ishrane, dok je broj *Bifidobacterium* i *Bacteroides* vrlo sličan broju koji je zastupljen kod dojenih novorođenčadi. Međutim, sadržaj nekih drugih mikroorganizama predstavlja bitnu razliku u mikroflori dojenih i infant formulom hranjenih novorođenčadi. S obzirom na to da se vremenom menja ishrana i da je sve više zastupljena čvrsta i raznovrsnija hrana, mikroflora beba postaje gusto naseljena određenim vrstama mikroorganizama (Balmer et al., 1994). Mikroflora dece postaje progresivno složena do druge godine života, kada sastav mikroflora postaje stabilan i veoma sličan sastavu mikroflora odraslog.

Kod odraslih su zastupljene brojne razlike u mikroflori GI trakta. Istraživanjima je pokazano da postoje velike razlike između ljudi hranjenih „Zapadnom dijetom“, koja se uglavnom sastoji od masti i proteina animalnog porekla, u odnosu na ljude koji se hrane „Japanskom ishranom“, u kojoj je uglavnom zastupljeno povrće i manji sadržaj masti (Finegold i Sutter, 1978). Razlike se javljaju u nekoliko rodova. Takođe postoje velike razlike u mikroflori GI trakta između gojaznih ljudi u odnosu na ljude telesne mase u granicama normale (Ley et al., 2006b).

Od ranije je poznato da na sastav crevne mikroflora u velikoj meri utiče terapija antibioticima. Nedavno je dokazano da sastav crevne mikroflora može biti narušen antibioticima duži vremenski period, npr. i dve godine u nekim slučajevima, a sve u zavisnosti od vrste antibiotika i dužine terapije (Lofmark et al., 2006; Jernberg et al., 2007).

Gastrointestinalni trakt predstavlja veoma kompleksnu sredinu, s velikim brojem različitih mikroorganizama, gde način ishrane, kao i mnogi drugi faktori, imaju veliku ulogu u formiranju specifične mikroflora. S obzirom na to da hrana s godinama

ostvaruje sve veći uticaj na mikrofloru GI trakta, koja ima veliki uticaj na celokupni ljudski organizam, može se reći da ishrana utiče i na druge aspekte ljudskog organizma, a samim tim i na zdravlje.

1.4. Funkcionalna hrana

Moderan način današnjeg života je uslovio sve veću izloženost stresu, nezdravoj ishrani, nekretanju i mnogim drugim postupcima koji dovode do lošijeg zdravlja (Kailasapathy, 2009). Jedan od načina da se poboljša zdravstveno stanje organizma, a samim tim i kvalitet života, jeste upotreba hrane koja ostvaruje mnogobrojne pozitivne efekte na ljudsko zdravlje. Na osnovu toga uveden je pojam „funkcionalne hrane“ koja obuhvata svežu ili procesuiranu namirnicu koja pored osnovnih nutritivnih sastojaka (proteini, ugljeni hidrati, masti, minerali, itd.), sadrži i biološke komponente koje doprinose poboljšanom kvalitetu hrane, a isto tako i povećavaju njenu nutritivnu vrednost. Na taj način, funkcionalna hrana ostvaruje pozitivan uticaj na opšte zdravlje ljudi i učestvuje u smanjenju rizika od pojave bolesti. Funkcionalna hrana utiče i na poboljšanje telesnih funkcija, podizanje imuniteta, usporavanje procesa starenja, brži oporavak od različitih bolesti, itd.

Smatra se da je koncept funkcionalne hrane prvo uveden u Japanu osamdesetih godina prošlog veka, dok je kasnije prihvaćena u Evropi i SAD-u.

Funkcionalnu hranu čine prirodno-nutritivna hrana koja je obogaćena funkcionalnim sastojcima, kao i hrana iz koje su uklonjene određene komponente ili su izmenjena svojstva. U praksi, postoji tradicionalna, prirodno funkcionalna hrana, kao i hrana koja je određenim procesima ili dodatim komponentama učinjena funkcionalnom.

Mleko i proizvodi od mleka, kao i meso koji su obogaćeni esencijalnim sastojcima, imaju direktan uticaj na ljudsko zdravlje. Ukoliko se navedene namirnice obogate nekim dodatnim biološkim komponentama, kao što su na primer probiotske bakterije, doprinosi se povećanju vitalnog značaja mesa i mleka, kao i njihovih proizvoda, koji su namenjeni svim kategorijama stanovništva (Tamime et al., 2003; Radulović et al., 2014).

U funkcionalne komponente koje su biljnog porekla, a koje takođe obogaćuju funkcionalnu hranu, ubrajamo rastvorljiva vlakna, fitohemikalije, fitoestrogen, kao i

omega-3 masne kiseline, flavonoide, itd. Međutim, među svim dodatnim komponentama, probiotske bakterije predstavljaju bitan sastojak koji značajno doprinosi poboljšanju dejstva funkcionalne hrane (Ekinci et al., 2008; Radulović et al., 2011a,b, 2012b,c).

Prehrambeni proizvodi sa probiotskim bakterijama zauzimaju sve važnije mesto na tržištu, kako zbog pozitivnog uticaja na ljudsko zdravlje tako i zbog odgovarajućeg senzornog kvaliteta proizvoda.

1.5. Probiotske bakterije

Probiotska bakterija ili probiotik je relativno nov pojam koji znači „za život“ (Fuller, 1989), a koristi se da opiše grupu bakterija koje kada se unesu u organizam u adekvatnoj količini doprinose zdravlju čoveka i životinja. Međutim, koncept probiotskih bakterija je veoma star, a vezuje se za fermentisanu hranu koja se konzumirala više od hiljadu godina. Pozitivno dejstvo fermentisane hrane poznato je od davnina. Od antičkog vremena, čovek je pravio i konzumirao funkcionalnu hranu koja je sadržala probiotske bakterije. Najstarija vrsta probiotske hrane bili su sirevi i fermentisani proizvodi od mleka, kao i prirodno fermentisana hrana nastala usled dejstva bakterija mlečne kiseline, kao i drugi fermentisani proizvodi nastali dejstvom kvasaca. Hipokrat i ostali naučnici iz antičkog doba su primetili da se bolesti digestivnog trakta mogu izlečiti konzumiranjem fermentisanog mleka, kao i Pinus, Rimski naučnik, koji je konstatovao da se fermentisano mleko može koristiti za lečenje gastroenteritisa.

U kasnijem modernijem dobu, poraslo je interesovanje za razumevanjem mehanizma dejstva probiotskih bakterija na ljudsko zdravlje. Početkom dvadesetog veka ruski mikrobiolog Elie Metchnikoff ustanovio je da Bugari žive zdravije i duže usled redovnog konzumiranja fermentisanog proizvoda od mleka, jogurta. Pored toga, Metchnikoff nije samo identifikovao bakterije koje ostvaruju pozitivan efekat na ljudsko zdravlje, već je i zaključio da je ljudsko zdravlje u funkciji ravnoteže između „dobrih“ probiotskih bakterija i „loših“ bakterija koje prouzrokuju različite bolesti gastrointestinalnog trakta. Princip njegove teorije se zasniva na inhibitornom delovanju BMK na toksine mikroorganizama koji su normalno prisutni u crevima, što rezultira

produženim životom. Takođe, produkcijom mlečne kiseline, BMK sprečavaju rast i toksičnost anaerobnih sporogenih mikroorganizama.

U isto vreme, francuski pedijatar Henry Tissier je primetio da su deca s dijarejom imala manji broj bakterija u obliku slova Y u stolici, dok je mnogo veći broj istih bakterija primećen u stolici zdrave dece. Takođe, Tissier je ustanovio da su bifidobakterije prisutne u znatno većem broju kod beba koje su dojene. Tom prilikom, izolovana je bakterija *Bacillus bifidus*, koja je kasnije preimenovana u rod *Bifidobacterium*. Istraživanja Metchnikoff i Tissier o značaju probiotskih bakterija su bila prva među mnogobrojnim.

Godine 1960, termin „probiotik“ je prvi put definisan kao supstanca nastala dejstvom mikroorganizama, a koja podstiče rast drugih mikroorganizama. Fuller (1989) je definisao probiotike kao „žive mikroorganizme koji se dodaju hrani radi održavanja ravnoteže intestinalne mikroflore“. Kasnije, probiotici su definisani kao dijetesko pomoćno sredstvo koje blagotvorno utiče na domaćina, moduliranjem mukoznog i sistematskog imuniteta, kao i poboljšanjem nutritivne i mikrobiološke ravnoteže u gastrointestinalnom traktu (Naidu et al., 1999). Po trenutno zvaničnoj definiciji, „probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se unesu u adekvatnoj količini u organizam ostvaruju svoja pozitivna dejstva“ (FAO/WHO, 2001).

Bakterije mlečne kiseline sa probiotskim karakteristikama su uglavnom deo enterične mikroflore gastrointestinalnog trakta, a veruje se da imaju značajnu ulogu u ekosistemu ljudskog GI trakta. Probiotske bakterije koje su danas zastupljene na tržištu su humanog porekla. Međutim, novijim ispitivanjima ustanovljeno je da se i iz tradicionalnih proizvoda mogu izolovati autohtone BMK sa probiotskim karakteristikama.

Spektar probiotske aktivnosti se može podeliti na hranljivo, fiziološko i antimikrobno dejstvo. Ova zapažanja su dovela do razvoja funkcionalne hrane koja sadrži BMK sa probiotskim karakteristikama koje doprinose zdravlju ljudi i životinja. U tabeli 1 su prikazani proizvodi sa probioticima koji su danas dostupni potrošačima.

Neki od različitih nutritivnih i terapijskih efekata koji su propisani probiotskim karakteristikama BMK mogu se prikazati na sledeći način (Naidu et al., 1999):

- ✓ Unapređenje nutritivnog kvaliteta hrane i hrane za životinje
- ✓ Metabolički stimulans sinteze vitamina i proizvodnje enzima
- ✓ Stabilizacija mikroflore stomaka inhibicijom patogenih mikroorganizama

- ✓ Smanjenje nivoa holesterola mehanizmom asimilacije
- ✓ Smanjena opasnost od raka debelog creva detoksikacijom kancerogenih ćelija
- ✓ Potiskivanje tumora

Tabela 1. Prehrambeni proizvodi sa dodatkom probiotskih bakterija (Naidu et al., 1999; Collins et al., 1998)

Prehrambeni proizvod	Vrste probiotskih bakterija	Zemlja porekla
Acidofilno mleko	<i>Lb. acidophilus</i>	SAD
AB jogurt	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>	Danska
Acidophilus bifidus jogurt	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> ili <i>B. longum</i>	Nemačka
B A®	<i>B. longum</i>	Francuska
Bifidus mleko	<i>B. bifidum</i> ili <i>B. longum</i>	Nemačka
Bifidus mleko sa ukusom jogurta	<i>B. bifidum</i> , <i>B. longum</i> ili <i>B. infantis</i>	UK
Bifidus jogurt	<i>B. bifidum</i> ili <i>B. longum</i>	Mnoge zemlje
Bifighurt	<i>B. bifidum</i> ili <i>B. longum</i>	Nemačka
Bifilact ®	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Bifidobacterium sp.</i>	Rusija
Biogarde	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i>	Nemačka
Biokys	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>P. acidilactici</i>	Češka
Biomild	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium sp.</i>	Nemačka
Cultura®	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> ,	Danska, Norveška
Mil-Mil®	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>Lb. acidophilus</i>	Japan
Ofilus®	<i>B. bifidum</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>St. thermophilus</i>	Francuska
Progurt	<i>Lc. lactis biovar. diacetylactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Lb. acidophilus</i>	Čile
Slatko acidofilno bifidus mleko	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> ,	Japan
Slatko bifidus mleko	<i>Bifidobacterium sp.</i>	Japan
Philus	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>St. thermophilus</i>	Švedska
BA live	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , jogurtne kulture	UK
A-38	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , mezofilne LD culture	Danska
Acidofilno mleko	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , mezofilne LD culture	Švedska
Kyr	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , jogurtne kulture	Italija
BIO	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , jogurtne kulture	Francuska

ABC ferment	<i>Lb. acidophilus, B. bifidum, Lb. casei</i>	Nemačka
AKTIFIT plus	<i>Lb. acidophilus, B. bifidum, Lb. casei GG, St. thermophilus</i>	Švajcarska
Symbalance	<i>Lb. acidophilus, B. bifidum, Lb. reuteri, Lb. casei</i>	Švajcarska
Mona fysis	<i>Lb. acidophilus</i>	Holandija
Actimell	<i>Lb. casei</i>	Nemačka
LC-1	<i>Lb. acidophilus</i>	Nemačka
Vifit	<i>Lb. casei</i>	Nemačka
Primo	<i>BactoLab kulture</i>	Nemačka
Zabady	<i>B. bifidum i jogurtne kulture</i>	Egipat
Proviva	<i>Lb. plantarum</i>	Švedska
Balans jogurt	<i>Lb. acidophilus, B. bifidum</i>	Srbija
Balans sir	<i>Lb. acidophilus, B. bifidum</i>	Srbija
Viva jogurt	<i>B. longum</i>	Srbija
AB jogurt	<i>Lb. acidophilus, B. bifidum</i>	Srbija

1.5.1. Kriterijumi za selekciju probiotskih bakterija

Da bi neka bakterija mlečne kiseline mogla da se deklarise kao probiotska bakterija, mora da ispuni određene kriterijume za selekciju probiotika. Dosadašnji kriterijumi za ispitivanje potencijalnih probiotika su definisani u nekoliko radova koji su obuhvatili pregled literature (Adams, 1995; Lee i Salminen, 1995; Salminen et al., 1998; Saarela et al., 2000).

Većina izolovanih i ispitivanih probiotika dostupnih na tržištu su humanog porekla. Međutim, sve se veći značaj pridaje se i potencijalnim probiotskim bakterijama mlečne kiseline, izolovanih iz različitih tradicionalnih proizvoda (Nigatu, 1998; Bude-Ugarte et al., 2006; Duangjitcharoen et al., 2008).

Opšti kriterijumi za selekciju potencijalnih probiotskih bakterija uključuju (Salminen et al., 1998; Saarela et al., 2000):

1. Poreklo, karakterizaciju i identifikaciju
2. GRAS status probiotika
3. Stabilnost soja, odnosno odgovarajuća vijabilnost u proizvodu i preživljavanje niskih pH vrednosti i žučne soli
4. Da ne nose rezistentne gene na određene antibiotike

5. Da ne vrše dekonjugaciju žučnih soli (Marteau et al., 1995)
6. Da su klinički potvrđene

U ranijim istraživanjima, humano poreklo probiotskih bakterija je bilo jedan od kriterijuma, ali u novijim literaturnim podacima ovaj kriterijum se ne navodi.

Funkcionalni kriterijumi za selekciju potencijalnih probiotika se uglavnom ispituju *in vitro* testovima, kao vid preliminarnog ispitivanja, da bi se kasnije ovi rezultati potvrdili u kontrolisanim *in vivo* ispitivanjima.

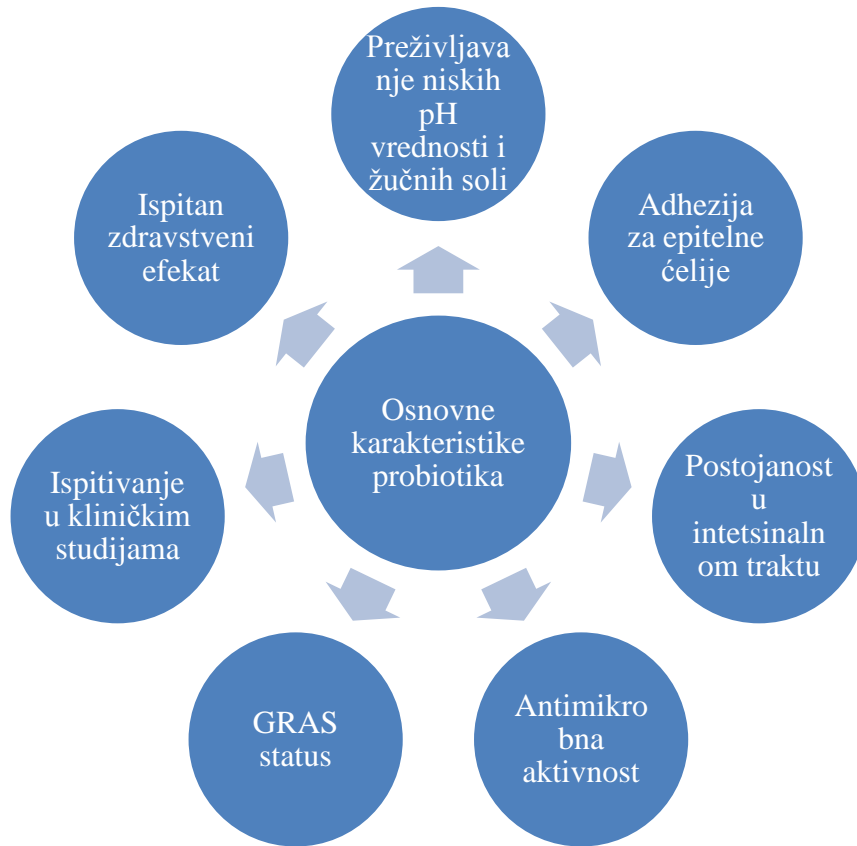
Pored opštih kriterijuma, potencijalne probiotske bakterije trebalo bi da ispune i nekoliko fizioloških kriterijuma, u koje ubrajamo:

1. Sposobnost adherencije za epitelne ćelije GI trakta i sposobnost održavanja
2. Imunostimulaciju
3. Antimikrobno dejstvo na patogene mikroorganizme
4. Selektivnu stimulaciju poželjnih bakterija i inhibiciju nepoželjnih mikroorganizama

Da bi, nakon ispitivanja osnovnih i funkcionalnih kriterijuma, bile primenjivane u hrani, potencijalne probiotske bakterije treba da ispunjavaju i određene tehnološke kriterijume u koje se ubrajaju:

1. Tehnološke karakteristike (rast na različitim temperaturama, koncentracijama soli, pH vrednosti, itd.)
2. Dobre senzorne karakteristike proizvoda sa primenjenim probiotikom
3. Rezistencija na bakteriofage
4. Interakcija s drugim mikroorganizmima
5. Stabilnost tokom skladištenja
6. Uticaj kiseonika

Ukoliko ispitivane potencijalne probiotske bakterije ispunjavaju navedene kriterijume, trebalo bi ispitati i uticaj probiotskih bakterija na poboljšanje mikroflore gastrointestinalnog trakta, različita oboljenja GI trakta, kao što su Kronova bolest, sindrom iritabilnog creva, kancer, holesterol, sinteza vitamina, itd, odnosno ispitati zdravstvene efekte potencijalnih probiotskih bakterija.



Slika 2. Osnovne karakteristike probiotskih bakterija (Saarela et al., 2000)

1.5.2. Opšti probiotski kriterijumi

1.5.2.1. Poreklo, identifikacija, GRAS status

Prvobitan korak u ispitivanju probiotskih karakteristika izolata BMK, jeste identifikacija izolata do nivoa vrste. S obzirom na to da BMK mogu da budu izolovane iz različitih sredina, GI trakta, fermentisane hrane, silaže, itd, poželjno je da se identifikacija izvrši do nivoa soja, s obzirom na to da u zavisnosti od enzimske aktivnosti i specifičnih karakteristika, u okviru jedne vrste mogu postojati velike razlike između sojeva. Za identifikaciju BMK do nivoa vrste koriste se različite molekularne metode. Takođe, veoma bitnu ulogu ima i poreklo probiotskih bakterija, jer u zavisnosti od sredine odakle je soj izolovan, već unapred mogu biti poznate određene karakteristike.

Aspekt bezbednosti soja se ostvaruje GRAS statusom, koji poseduju gotovo sve vrste BMK koje se upotrebljavaju u prehrambenoj industriji. Probiotski sojevi ne smeju da ispoljavaju patogene karakteristike niti da izazivaju infekcije ili bolesti. Međutim,

ukoliko u okviru neke vrste postoji neki patogen soj, tada se novi izolat mora ispitati pre njegove dalje upotrebe u prehrambenim proizvodima.

1.5.2.2. Vijabilnost probiotskih bakterija u prehrambenim proizvodima

Da bi se određena namirnica deklarirala kao probiotska hrana, dnevni unos probiotskih bakterija u prehrambenom proizvodu treba da bude iznad 10^6 - 10^7 cfu/g ili mL namirnice, u zavisnosti od vrste namirnice i količine koja se dnevno može konzumirati. Ako je u pitanju jogurt sa dodatkom probiotskih bakterija, dnevni unosom od 200 ml unese se 10^8 - 10^9 probiotskih ćelija, ukoliko je broj u ml jogurta iznosio 10^6 - 10^7 probiotskih ćelija. Konzumiranjem, na primer, sira sa probioticima, dnevni unosom od nekoliko desetina grama sira, treba uneti 10^8 - 10^9 probiotskih ćelija, što zahteva prisustvo od 10^7 - 10^8 probiotskih ćelija po g sira. Kao i kod sira sa probioticima, konzumiranjem čokolade sa probiotskim bakterijama, potrebno je dnevno uneti nekoliko desetina grama ili otprilike 1 do 2 štangle čokolade, kako bismo dnevno uneli 10^8 - 10^9 probiotskih ćelija. Istraživanja su pokazala da se u pojedinim probiotskim proizvodima nalazi manje ćelija nego što je potrebno (Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001; Petrušić et al., 2009). Do smanjenja broja probiotskih bakterija može doći usled različitih nepovoljnih uslova tokom proizvodnje prehrambenog proizvoda sa probiotskim bakterijama. Tokom proizvodnje namirnice, probiotske bakterije su izložene dejstvu niske ili visoke temperature, pri čemu može doći do smrzavanja ili sušenja namirnice, kao i dejstvu pH vrednosti. Isto tako, kod pojedinih probiotskih bakterija može doći do oštećenja, zbog čega ove ćelije imaju smanjenu sposobnost preživljavanja GI trakt.

Zbog svega navedenog, veoma je bitno ispitati stabilnost i održivost probiotskih bakterija na različite uslove proizvodnje. Na osnovu rezultata može se izvršiti selekcija probiotskih bakterija koje su pokazale otpornost i stabilnost na nepovoljne uslove proizvodnje. Isto tako, na osnovu rezultata ispitivanja, potrebno je izabrati odgovarajući medijum i podesiti odgovarajuće uslove proizvodnje (temperatura, prisustvo enzima, pH vrednost, itd.), usled kojih bi probiotska bakterija pokazala određenu stabilnost i neophodan broj tokom proizvodnje.

Ispitivanje vijabilnosti probiotika dovodi do potrebe za jednostavnim i pouzdanim metodama za rutinsko određivanje broja probiotika. Takođe, potrebno je precizno odrediti broj probiotika nakon proizvodnje, kao i nakon određenog perioda skladištenja i u lancu distribucije proizvoda.

1.5.2.3. Preživljavanje niskih pH vrednosti i žučnih soli

Sposobnost preživljavanja probiotika u nepovoljnim uslovima gastrointestinalnog trakta, kao i kolonizacija gastrointestinalnog trakta, važna je karakteristika za procenu mogućih pozitivnih efekata probiotskih bakterija. U zavisnosti od soja, probiotske bakterije različito preživljavaju određene delove GI trakta. Pojedini sojevi bolje preživljavaju prisustvo pepsina i kisele uslove koji su zastupljeni u želucu (pH 2-3) ili bolje preživljavaju dejstvo pankreatina i žučnih soli u duodenumu, dok pojedini sojevi preživljavaju sve delove GI trakta u visokom broju (Marteau i sar., 1993). Generalno posmatrajući, laktobacili ispoljavaju svoje pozitivne efekte u tankom crevu-ileumu, dok su bifidobakterije aktivne u debelom crevu.

Preživljavanje probiotika zavisi od:

- karakteristika soja
- unetog broja probiotskih ćelija
- sastava i odnosa mikroorganizama GI trakta
- prisustva kiseonika
- prisustva inhibitora i promotora rasta
- funkcionalne hrane koja sadrži ispitivani probiotik

U literaturnim podacima je pronađen veliki broj studija koji je proučavao sposobnost preživljavanja GI uslova laktobacila izolovanih iz tradicionalnih proizvoda u *in vitro* uslovima (Bude-Ugarte et al., 2006; Radulović et al., 2010; Zago et al., 2011). S obzirom na to da probiotske bakterije humanog porekla preživljavaju uslove GI trakta, ispitivanje sposobnosti preživljavanja autohtonih laktobacila izolovanih iz tradicionalnih sireva bi bilo od velikog značaja za deklarisanje ovih bakterija kao potencijalnih probiotskih bakterija. Rezultati istraživanja su pokazali da veliki broj laktobacila izolovanih iz tradicionalnih proizvoda poseduje veoma dobru sposobnost

preživljavanja gastrointestinalnog trakta u *in vitro* uslovima. Prilikom ispitivanja 29 sojeva *Lactobacillus* sp. izolovanih iz mlečnih proizvoda, svi sojevi su preživeli pH vrednost 3 tokom 3 sata inkubacije. Isto tako, tokom inkubacije u rastvoru pepsina pri pH vrednosti 2, pojedini sojevi su pokazali stepen redukcije između 1 i 2 log cfuml⁻¹, dok su najbolju sposobnost preživljavanja nakon 3 sata u rastvoru pepsina pokazali *Lb. rhamnosus* ACA-DC112, izolovan iz Galotiri sira i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 130, izolovan iz sirovog mleka (Maragkoudakis et al., 2006). Isto tako, u simuliranim intestinalnim uslovima sa rastvorom pankreatina i žučnih soli, ustanovljeno je da *Lb. plantarum* sojevi preživljavaju veoma dobro, dok je kod samo nekoliko sojeva primećena redukcija od 0.5 log cfuml⁻¹ (Jensen et al., 2012). Isto tako, *Lb. sakei*, *Lb. reuteri*, *Lb. pentosus*, *Lb. gasseri*, itd. su takođe pokazali veoma dobru sposobnost preživljavanja simuliranih intestinalnih uslova (Jensen et al., 2012). Budući da se pojedinačni soj probiotske bakterije vrlo retko koristi samostalno u proizvodnji funkcionalne hrane, jer jedan soj ne može da ispuni sve zahteve i zdravstvene efekte, najčešće se probiotici kombinuju sa drugim probiotskim bakterijama ili bakterijama mlečne kiseline (Timmerman et al., 2004). Među najpopularnijim proizvodima koji sadrži više probiotskih sojeva jeste ABT-2 kultura koja se sastoji od probiotika *Lb. acidophilus* i *B. bifidum*, dok se u sastavu ove kulture nalazi i *St. thermophilus*, koja ima ulogu starter kulture.

1.5.2.4. Osetljivost na antibiotike

Primena antibiotika u medicini je počela sredinom prošlog veka, pri čemu su korišćeni za lečenje različitih upala, infekcija rana i urinarnog sistema, sepsi, meningitisa, itd, i time su spašeni milioni ljudi. U poslednjoj deceniji, oslobađanje antibiotika u biosferu značajno se povećalo, što je dovelo do pojave rezistentnosti bakterija na dejstvo antibiotika. S obzirom na to da je antibiotska rezistencija prenosiva, pomoću genetskog materijala koji je odgovoran za rezistenciju različitih vrsta bakterija, rezistencija na antibiotike se može preneti i na patogene bakterije. Na taj način, antibiotska rezistencija uspeva da se proširi i na životinje, proizvode animalnog porekla, ljude i na kontaminante životne sredine (WHO, 2011).

Bakterijska rezistencija na antibiotike postaje predmet interesovanja nakon upotrebe antibiotika u terapijske svrhe. Ubrzo nakon početka upotrebe penicilina u lečenju ljudi, pokazalo se da su neke vrste stafilokoka otporne na njegovo dejstvo. Danas se zna da je preko 80% stafilokoka otporno na penicilin (Ammor et al., 2007). S upotrebom streptomocina, tetraciklina i hloramfenikola, veoma brzo se pojavila i vrsta iz roda *Shigella* koja je otporna na dejstvo navedenih antibiotika. Antibiotik vankomicin, koji ima širok spektar delovanja, počeo je da se koristi nešto kasnije, ali je brzo ustanovljeno da pojedine vrste enterokoka poseduje rezistenciju na vankomicin (Korhonen, 2008).

Lanac hrane predstavlja jedan od ključnih puteva prenosa antibiotske rezistencije kod bakterijskih populacija, sa životinja na ljude. Skoro polovina antibiotika se godišnje upotrebi u medicinske svrhe. Druga polovina ostvaruje primenu u stočarstvu, što uzorkuje prisustvo antibiotika i u proizvodnji prehrambenih proizvoda animalnog porekla. Većina antibiotika se primenjuje u terapijske svrhe, dok se veliki deo antibiotika koristi u prehrani stoke, gde služe kao promotori rasta (Pappas, 2011). Postoji urgentna potreba za ograničenjem širenja rezistentnih gena kroz lanac hrane, budući da oni mogu biti preneti na patogene bakterije (Patel et al., 2012).

Međutim, veliko pitanje predstavlja antibiotska rezistencija bakterija mlečne kiseline. Pošto su BMK prirodno prisutne u fermentisanoj hrani i GI traktu, a takođe imaju primenu u prehrambenoj industriji kao starter kulture ili probiotske bakterije, postoji izražena zabrinutost zbog stečene rezistencija na antibiotike ovih korisnih bakterija (Radulović et al., 2012a). Takođe, probiotske bakterije pomažu u održavanju ravnoteže probavnog trakta u slučaju dijareje izazavane antibioticima, zbog čega postoji rizik od prenosa antibiotske rezistencije na bakterije prisutne u GI traktu.

Rezistencija na antibiotike je različita između rodova BMK. Ustanovljeno je da je većina BMK prirodno rezistentna na metronidazole, kao i na sulfonamide i trimetoprim (Danielsen i Wind, 2003). S druge strane, postoje jasne razlike između rodova BMK, na primer *Leuconostoc*, *Pediococcus* i većina *Lactobacillus* su prirodno otporni na dejstvo vankomicina, dok je većina *Lactococcus* osteljiva na dejstvo ovog antibiotika. Prirodno stečena rezistencija na cefoksitin primećena je kod *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc* vrsta (Korhonen, 2010).

BMK sadrže mobilne genetske elemente, kao što su plazmidi i transpozoni, koji omogućavaju horizontalan prenos i širenje gena rezistencije. Po usvajanju svojstva

rezistencije, determinante rezistencije se amplifikuju i mogu se predati drugom domaćinu.

Zbog svega prethodno navedenog, sasvim je opravdan zahtev da se potencijalni probiotski sojevi bakterija mlečne kiseline, kao i starter kulture, ispituju na sposobnost prenosa rezistencije na antimikrobne lekove, pored potrebe da se tehnološki okarakterišu (Kastner et al., 2006). Takođe, veoma je bitno da se definišu granične vrednosti na osnovu kojih se vrši kategorizacija na rezistentne i osetljive sojeve, odnosno takozvana prelomna tačka minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika (breakpoint MIC, engl.) (EFSA, 2012). Posebnu vrednost ima razlikovanje prirodne (svojsvene, nespecifične, neprenosive) i stečene rezistencije, postupkom koji zahteva poređenje profila rezistencije na antimikrobne lekove velikog broja bakterija mlečne kiseline poreklom iz različitih izvora (Teuber et al., 1999).

1.5.3. Fiziološki probiotski kriterijumi

1.5.3.1. Sposobnost adhezije

Da bi ostvarili svoj probiotski efekat, BMK moraju da se održavaju u dovoljnom broju u GI traktu. Sposobnost probiotika da se vezuju za površinu mukoze je jako važna za održavanje potrebnog broja probiotskih bakterija u GI traktu, kao i za ostvarivanje pozitivnih efekata na ljudsko zdravlje. Shodno tome, veoma je bitno da probiotske bakterije poseduju sposobnost adhezije za crevni epitel, kako bi izvršili kolonizaciju i na taj način ostvarili rezistenciju na nepovoljne uslove GI trakta.

Postoje različiti mehanizmi vezivanja probiotika za crevni epitel. Probiotske bakterije se vezuju za humane intestinalne ćelije mehanizmima u kojima su uključene različite kombinacije proteinskih i ugljeno hidratnih faktora koji utiču na površinu bakterije i eukariotske ćelije. Prilikom ispitivanja adhezije probiotskih bakterija vrste *Lb. acidophilus*, ustanovljeno je da lipotejhoinska kiselina i proteini koji se nalaze na površini ćelijskog zida omogućavaju vezivanje za creva. Isto tako, ispitivanja su ukazala da veza između ugljenih hidrata na površini ćelijskog zida probiotika i glikolipida ili glikoproteina epitelnih ćelija intestinalnog trakta omogućava vezivanje probiotika (Green i Klaehammer, 1994).

Kod probiotskih bakterija *Lb. casei*, *Lb. johnsonii* i *Lb. rhamnosus* ustanovljena je najjača sposobnost vezivanja za crevni epitel (Tuomola et al., 1999). Probiotske bakterije se, pored vezivanja za epitelne ćelije intestinalnog trakta, mogu vezivati i za mukozni sloj koji izlučuju humane crevne ćelije. Mnogi sojevi roda *Bifidobacterium* sp. takođe poseduju sposobnost adhezije (Bernet et al., 1993).

Iako se dosta zna o uticaju *Lb. plantarum* sojeva na zdravlje ljudi, znanje o mehanizmu adhezije je ograničeno. Određivanje genomske sekvence *Lb. plantarum* bi svakako proširilo znanje o mogućim funkcijama.

1.5.3.2. Imunostimulacija

Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da postoji potreba za novim načinima modulacije imuniteta, bilo da je u pitanju povećanje ili smanjenje imunog odgovora organizma, pri čemu određene komponente hrane predstavljaju idealne kandidate. Imuni sistem ljudskog organizma se sastoji od određenih organa i nekoliko tipova ćelija. Prilikom antigen interakcija organizama, indukuje se ćelijski imuni odgovor koji se ostvaruje antitelima i aktiviranim ćelijama. Potencijalni efekti koje probiotske bakterije mogu da ostvare su zaštita od enteričnih infekcija, prevencija hemijski indukovanih kancera, kao i upotreba probiotika kao oralnog adjuvanta. Takođe, probiotici mogu da utiču na povećanje nivoa citokina, imunoglobulina, kao i nivoa gama interferona, čime se značajno povećava otpornost organizma od infekcija (Naidu et al., 1999).

Konsumiranje probiotskih bakterija može da poboljša ćelijski nespecifični imuni odgovor GI trakta povećanjem makrofaga i granulocita fagocitoze. Kaila et al. (1992) su sprovedi studiju za procenu probiotik-indukovanih antitela koje ćelije luče tokom bolesti. Grupa dece obolela od dijareje konzumirala je dva puta dnevno po 125 g fermentisane hrane u kojoj se nalazilo 10^{10} - 10^{11} cfu/g *Lb. rhamnosus* LGG. Kontrolna grupa je dobijala fermentisanu hranu sa 10^3 cfu/g bakterija mlečne kiseline. Ustanovljeno je da je period trajanja dijareje kod dece koja su konzumirala LGG bio znatno kraći. Takođe, prvog dana studije primećeno je da je prelazni nespecifični imuni odgovor bio duplo viši kod dece koja su konzumirala probiotik, nego kod dece u kontrolnoj grupi.

Različite studije su ispitivale sposobnost *Lb. plantarum* da vrši produkciju bioaktivnih molekula koja dovode do imunog odgovora organizma. U jednoj studiji je pokazano da je *Lb. plantarum* 299v kolonizovao konginetalno izložene humane imunodefijencije (HIV) kod dece, pri čemu su preliminarni rezultati pokazali povećanje specifičnog imunog odgovora (Cunningham-Rundles et al., 2000).

1.5.3.3. Antimikrobna aktivnost probiotskih bakterija

Nekoliko istraživanja je pokazalo da različite vrste probiotskih bakterija ostvaruju inhibitorno dejstvo prema crevnim i hranom unesenim patogenim mikroorganizmima. Takođe, probiotske bakterije imaju sposobnost vezivanja, replikacije i inhibitornog dejstva na određene enteropatogene mikroorganizme. Antimikrobna svojstva probiotskih bakterija se manifestuju (Naidu et al., 1999):

1. Smanjenjem pH lumena, proizvodnjom isparljivih masnih kiselina kratkog lanca (SCFA) kao što su sirćetna, mlečna i propionska kiselina
2. Proizvodnjom specifičnih hranljivih materija koje patogeni mikroorganizmi ne mogu da koriste
3. Smanjenjem redoks potencijala
4. Proizvodnjom hidrogen peroksida u anaerobnim uslovima
5. Proizvodnjom specifičnih antimikrobnih jedinjenja, kao što su bakteriocini

U različitim istraživanjima antimikrobne aktivnosti BMK, velika pažnja posvećena je ispitivanju bakteriocina, koji su kao konzervansi sve zastupljeniji u proizvodnji hrane. Veliki broj istraživanja je usmeren ka delovanju bakteriocina i otkrivanju novih vrsta, koja se mogu primenjivati u konzervisanju namirnice (Devlieghere et al., 2004). Jedan od najpoznatijih bakteriocina i jedini bakteriocin koji je ostvario primenu kao konzervans jeste nizin, koji produkuje predstavnici vrste *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Probiotske bakterije produkuju bakteriocine koji deluju na širok spektar Gram pozitivnih bakterija. Iako je delovanje bakteriocina veoma efikasno, inhibicija patogenih mikroorganizama može biti ograničena, jer pojedini bakteriocini mogu da ostvaruju svoje dejstvo i prema blisko srodnim vrstama, odnosno prema drugim BMK. U tom slučaju, neki bakteriocini ne ostvaruju svoje dejstvo prema *Clostridium* ili *Bacillus*

vrstama (Holzapfel et al., 1995). Pojedini bakteriocini inhibiraju rast *Listeria monocytogenes*, što ujedino predstavlja i najbitnije inhibitorno dejstvo prema patogenim mikroorganizmima (Dal Bello et al., 2012; Pimentel-Filho et al., 2014). Do sada, bakteriocini su ostvarili primenu kao konzervansi u različitim namirnicama, kao zaštitna kultura u proizvodnji sendviča pakovanih u kontrolisanoj atmosferi, ali i u proizvodnji sapuna i paste za zube (Perez et al., 2014).

1.5.4. Tehnološki probiotski kriterijumi

1.5.4.1. Tehnološke karakteristike

Prilikom izolacije bakterija mlečne kiseline iz različitih uzoraka, nakon ispitivanja osnovnih, pristupa se i ispitivanju tehnoloških karakteristika, u koje se ubrajaju način fermentacije šećera, acidogena sposobnost, rast na različitim temperaturama, produkcija aromogenih jedinjenja, sinteza egzopolisaharida, rast na različitim koncentracijama soli i proteolitičke karakteristike. Ispitivanje ovih osobina je takođe veoma bitno i za probiotske bakterije, kako zbog karakterizacije, tako i zbog njihove dalje primene u tehnološkim postupcima proizvodnje prehrambenih proizvoda.

BMK vrše fermentaciju šećera prvenstveno zbog dobijanja energije koja je potrebna za odvijanje ostalih metabolitskih biohemijskih procesa. Mono i disaharidi su od primarnog značaja za BMK. Osnovni preduslov za fermentaciju šećera i produkciju energije jeste transport šećera u unutrašnjost BMK, gde se, u zavisnosti od vrste BMK, mogu vršiti dva različita sistema transporta šećera: aktivni transport uz učešće enzima permeaza i fosfoenolpiruvat-zavisnifosfotransferazni sistem (PEP/PTS). S obzirom na to da kod aktivnog transporta laktoza ostaje nepromenjena za vreme transporta, ovaj sistem se drugačije naziva i „laktozo-permeazni“ sistem. Kod većine BMK zastupljen je laktozo-permeazni sistem, dok je kod homofermentativnih laktokoka i nekih laktobacila zastupljen PEP/PTS. U prehrambenim proizvodima se uglavnom primenjuju homofermentativne BMK, jer kod heterofermentativnih BMK stvaranje gasa može dovesti do produkcije šupljika, što negativno utiče na izgled proizvoda. Takođe, produkcija sirćetne kiseline i etanola može dovesti i do stvaranja nepoželjnog ukusa proizvoda. Istraživanja su pokazala da većina probiotskih bakterija pripada vrstama koje

fermentišu šećere homofermentativnim putem (Klein et al., 1998; Strahinic et al., 2007; Petrović, 2011).

Prilikom selekcije starter kultura za proizvodnju fermentisanih proizvoda od mleka i sireva, jedan od osnovnih uslova za primenu jeste acidogena sposobnost BMK. Budući da starter kulture imaju veoma bitnu ulogu u procesu fermentacije mlečnih proizvoda, potrebno je da poseduju izraženu acidogenu sposobnost. Na osnovu ispitivanja BMK, ustanovljeno je da laktokoke pretežno imaju izraženiju acidogenu sposobnost, zbog čega se one i više koriste kao starter kulture u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka i sireva. S druge strane, laktobacili, a samim tim i probiotske bakterije, uglavnom imaju umerenu do izraženu acidogenu sposobnost. S obzirom na to da probiotske bakterije ostvaruju primenu i u drugim prehrambenim proizvodima gde nisu zastupljene niske pH vrednosti, umerena ili slaba acidogena sposobnost je poželjna karakteristika. Izražena acidogena sposobnost može dovesti do preterano niske pH vrednosti proizvoda, što može da utiče na senzorne karakteristike.

Sposobnost rasta probiotskih bakterija na različitim temperaturama ima veliki značaj u proizvodnji prehrambenih proizvoda. Optimalna temperatura za rast probiotskih bakterija je najčešće u intervalu od 30-37°C. Temperaturni opseg može da bude veoma različit, a sve u zavisnosti od uzorka odakle su izolovane probiotske bakterije. S obzirom na to da tokom proizvodnje fermentisanih proizvoda od mleka postoji širok temperaturni raspon (od momenta inokulisanja na 40°C, pa do hlađenja na 4°C), veoma je bitno ispitati sposobnost rasta probiotskih bakterija na niskim, ali i visokim temperaturama. Isto tako, u proizvodnji konditorskih proizvoda prisutna je visoka temperatura, zbog čega je bitno ispitati termorezistentnost probiotskih bakterija. Takođe, ispitivanje sposobnosti preživljavanja visokih temperatura bitno je i za inkapsulaciju probiotskih bakterija, pogotovo za tehniku sprej sušenja.

Produkcija egzopolisaharida (EPS), predstavlja još jednu bitnu karakteristiku BMK. EPS mogu biti kovalentno povezani s površinom bakterijske ćelije ili u obliku rastvornih sluzi, koje su izlučene u spoljašnjoj sredini (Jolly i Stinglele, 2000). Sposobnost produkcije EPS je od posebnog značaja za starter kulture koje se koriste u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka, budući da EPS doprinose viskozitetu i teksturi proizvoda, kao i punoći ukusa. Produkcija EPS je primećena kod pojedinih sojeva *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *St.*

thermophilus, itd. (Jolly i Stinglee, 2000; Radulović, 2007). Kod probiotskih bakterija, sposobnost produkcije EPS je od značaja u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka, dok je u proizvodnji sireva nepoželjna, usled pojave sluzi koja negativno utiče na sinerezis grušta i željenu teksturu proizvoda.

Sposobnost rasta BMK u različitim koncentracijama soli je od naročito značaja u proizvodnji sireva, gde prilikom proizvodnje mogu biti prisutne i veće koncentracije soli. U tabeli 2 je prikazan prosečan sadržaj soli za pojedine vrste sireva.

Tabela 2. Prosečan sadržaj soli pojedinih vrsta sireva (Dozet i Maćej, 2006; Puđa, 2009)

Vrsta sira	Procenat soli (%)
Gorgonzola	3,5
Čedar	1,4
Parmezan	3,0
Mocarela	1,0
Trapist	1,7
Feta	2,9
Njeguški sir	2,5
Homoljski sir	2,1
Sjenički sir	2,9
Kačkavalj	2,2

Probiotske bakterije, koje se u proizvodnji sireva koriste kao dodatne kulture, takođe moraju da poseduju sposobnost rasta u većim koncentracijama soli, kako bi mogle da prežive u odgovarajućem broju tokom proizvodnje sireva, ali i tokom skladištenja.

Bakterije mlečne kiseline imaju vrlo složene nutritivne zahteve u pogledu prisustva aminokiselina i drugih komponenata koje utiču na rast. Poznato je da su BMK slabi proteoliti, ali da umerena proteolitička aktivnost obezbeđuje dovoljne količine azota, koji je neophodan za rast i sintezu ćelijskih proteina. S obzirom na to da se većina BMK primenjuje u proizvodnji mleka i mlečnih proizvoda, mleko kao sirovina je veoma bogato proteinima, u odnosu na sadržaj peptida i aminokiselina. Zbog niske koncentracije aminokiselina, BMK su prinuđene da vrše hidrolizu proteina mleka do peptida i aminokiselina, kako bi obezbedile odgovarajuće uslove za rast. U proizvodnji sireva, nestarterska mikroflora i probiotske bakterije imaju veliku ulogu u proteolizi sireva. Uticaj probiotskih bakterija na proteolizu sireva je uglavnom prikazana

promenama u peptidnom profilu i u koncentraciji slobodnih aminokiselina (McSweeney et al, 1993; Bergamini et al., 2006; Ong et al., 2007). Isto tako, istraživanja su pokazala da pojedini mezofilni laktobacili poseduju ključne enzime koji dovode do formiranja specifičnog ukusa sireva, zahvaljujući sadržaju specifičnih aminokiselina (Thage et al., 2005). Međutim, pojedini sojevi ne dovode do proteolitičkih promena kod sireva (Poveda et al., 2003). Autori Milesi et al. (2009) ispitivali su uticaj potencijalnih probiotskih bakterija izolovanih iz sireva na senzorne karakteristike sireva i proteolitičke promene. Rezultati ispitivanja su pokazali da potencijalni probiotici *Lb. plantarum* I91 i *Lb. casei* I90 dobro rastu u mekanim i polutvrđim sirevima i da dovode do umerene protelize sireva, kao i da ne vrše značajan uticaj na senzorne karakteristike sireva. S druge strane, potencijalni probiotici *Lb. rhamnosus* I73 i *Lb. rhamnosus* I75, vrše izraženiju proteolizu, ali ne dovode do značajnijeg poboljšanja senzornog kvaliteta sireva.

Produkcija aromogenih jedinjenja je od posebnog značaja za proizvodnju fermentisanih proizvoda od mleka. Proizvodi metaboličkih funkcija BMK, odnosno produkti proteolize kazeina, glikolize i lipolize masti, dovode do formiranja specifičnog ukusa sireva i drugih mlečnih proizvoda. Najznačajnija aromogena jedinjenja su diacetil, acetoin i 2,3-butandiol, koja nastaju iz piruvata. Kod BMK, sojevi *Lactococcus lactis* ssp. *lactis biovar diacetylactis*, pojedini sojevi *Leuconostoc* i nekoliko sojeva *Lb. plantarum*, *Lb. pentosaceus*, dovode do formiranja aromogenih jedinjenja, naročito diacetila ukoliko rastu u sredini sa citratima (Radulović, 2007). Diacetil, pored formiranja specifičnog ukusa, deluje inhibitorno i na pojedine G pozitivne i G negativne bakterije. Probiotska bakterija *Lb. acidophilus* zajedno sa *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* vrši produkciju diacetila iz aminokiseline treonin (Cocaign-Bousquet et al., 1996).

Probiotske bakterije humanog porekla ili izolovane iz tradicionalnih proizvoda treba da ispunjavaju osnovne tehnološke karakteristike, kako bi mogle da ostvare primenu u proizvodnji određenih prehrambenih proizvoda. Takođe, tehnološke karakteristike probiotskih bakterija mogu da ukažu i na odgovarajuće uslove proizvodnje i skladištenja prehrambenih proizvoda, ali i na mogući uticaj probiotskih bakterija na senzorne karakteristike proizvoda.

1.5.4.2. Uticaj probiotskih bakterija na senzorne karakteristike proizvoda

Prilikom primene probiotskih bakterija u proizvodnji prehrambenih proizvoda, jedan od najbitnijih faktora jeste da probiotske bakterije ne utiču na karakteristične i prepoznatljive senzorne karakteristike proizvoda, posebno ukus i miris. Na svetskom tržištu prisutan je veliki broj proizvoda, od mlečnih, preko konditorskih, pa sve do proizvoda sa žitaricama i različitih sokova, sa dodatkom probiotskih bakterija (Johansson et al., 1993; Cruz et al., 2009a; Settanni i Moschetti, 2010; Radulović et al., 2011a, b, 2014; Laličić-Petronijević et al., 2015). Među svim tim probiotskim proizvodima do sada nije zabeležen značajan uticaj probiotskih bakterija na senzorne karakteristike proizvoda, odnosno često nije zapažena nikakva razlika u senzornom kvalitetu proizvoda sa dodatim probiotskim bakterijama u odnosu na proizvod bez probiotskih bakterija.

1.5.4.3. Interakcije probiotskih bakterija sa ostalim mikroorganizmima

Probiotske bakterije treba da ostvare odgovarajuću vezu sa starter kulturama koje se koriste za proizvodnju različitih fermentisanih proizvoda. Interakcija između starter kultura i probiotskih bakterija je veoma bitna, jer može da utiče na senzorni kvalitet proizvoda. Istraživanjem bi trebalo da se ustanovi kompetitivni rast probiotskih bakterija, ali isto tako i starter kultura, kao i njihova vijabilnost tokom skladištenja proizvoda.

U mnogobrojnim istraživanjima (Lourens-Hatting i Viljoen, 2001), izborom odgovarajućeg startera dobijen je fermentisani proizvod od mleka sa probiotskim bakterijama sa odličnim senzornim karakteristikama, ali i neophodnim brojem probiotskih bakterija. Izbor najpogodnijeg startera i probiotske bakterije bi trebalo da se odredi procesom skrininga, pri čemu se ispituje uticaj različitih startera na broj probiotskih bakterija tokom fermentacije i nakon proizvodnje, kao i senzorni kvalitet proizvoda. Takođe, starter kulture mogu da sintetišu određene komponente koje omogućavaju bolji rast probiotskih bakterija. Kao primer može da se uzme *B. longum* koji je senzitiv na kiseonik, ali izborom specifičnog soja *St. thermophilus*, dolazi do povećanja broja *B. longum* (Ishibashi i Shimamura, 1993). Isto tako, *Lb. delbrueckii*

ssp. bulgaricus takođe može da utiče na povećanje broja bifidobakterija proteolitičkom aktivnošću, što rezultira produkcijom valina, glicina i histidina (Talwalkar i Kailasapathy, 2004).

1.5.4.4. Stabilnost probiotskih bakterija tokom skladištenja proizvoda

Danas se kao bitan parametar, pored ispitivanja vijabilnosti probiotskih bakterija tokom proizvodnje, uzima u obzir i vijabilnost tokom skladištenja i roka trajanja proizvoda, o čemu govore i mnogobrojne studije (Shah, 2000; Tuomola et al., 2001). Tokom skladištenja na vijabilnost probiotika utiču temperatura i vlažnost vazduha, kao i pH vrednosti određenih proizvoda i period skladištenja. Uslovi skladištenja su veoma bitni, naročito za probiotske bakterije humanog porekla. Takođe, materijali za pakovanje prehrambenih proizvoda su veoma važni za očuvanje vijabilnosti probiotika (Petrović, 2011; Laličić-Petronijević, 2012).

1.5.4.5. Uticaj kiseonika na probiotske bakterije

Kiseonik može da ima uticaj na probiotske bakterije na dva načina. Jedan od načina je direktna toksičnost na probiotske ćelije, u kojoj su pojedine probiotske bakterije veoma senzitivne na kiseonik i odumiru u njegovom prisustvu. U slučaju kada kiseonik deluje na indirektan način, pojedine kulture izlučuju peroksid u medijum za rast koji deluje na probiotske bakterije.

Kao zaštita probiotskih bakterija od uticaja kiseonika najčešće se koriste antioksidansi, kao na primer askorbinska kiselina.

1.5.5. Zdravstveni efekti probiotskih bakterija

Probiotske bakterije mogu da ostvare širok spektar pozitivnih efekata na ljudsko zdravlje. Danas se probiotske bakterije koriste za lečenje različitih poremećaja crevne mikroflore i povećane nepropustljivosti stomaka, u koje ubrajamo akutnu dijareju izazvanu rotavirusom, alergije na hranu, poremećaje debelog creva, metaboličke promene izazvane radioterapijom, promene u razvoju kancera debelog creva, itd.

Takođe, probiotske bakterije utiču i na smanjenje nivoa holesterola, poboljšano varenje laktoze, poseduju antikancerogenu aktivnost, vrše inhibiciju *Helicobacter pylori*, itd. Uzimajući u obzir širok spektar zdravstvenih efekata probiotskih bakterija, prilikom karakterizacije potencijalnih probiotika svakako bi trebalo ispitati i njihove zdravstvene efekte. Isto tako, teško je očekivati da jedna probiotska bakterija ostvaruje sve zdravstvene efekte. Zbog toga se u većini probiotskih proizvoda nalazi kombinacija dva ili više probiotika, radi što boljeg zdravstvenog efekta probiotskog proizvoda.

Probiotske bakterije proizvode širok spektar metaboličkih proizvoda, od masnih kiselina kratkog lanca do folne i orotične kiseline (pirimidin karboksilna kiselina). Ova jedinjenja dovode do pada pH vrednosti i na taj način podešavaju niz fizioloških uslova u korist domaćina. Razni enzimi koje probiotske bakterije oslobađaju u lumen creva ispoljavaju potencijalne sinergističke efekte na varenje i ublažavaju simptome crevnih poremećaja. Elmer et al. (1996) su na osnovu pregleda literature u periodu od 1966 do 1995. godine u vezi s profilaktičkim i terapijskim dejstvom probiotskih BMK na nivo oboljenja i periodom trajanja crevnih infekcija kod novorođenčadi i odraslih ljudi, kao zaključak naveli da je administracija probiotika korisna u sprečavanju intestinalnih infekcija. Saavedra et al. (1994) su takođe objedinili sve kontrolisane placebo studije koje su ispitivale efikasnost probiotika u smanjenju sekundarnih bolesti kod novorođenčadi. Kao zaključak ovog istraživanja navodi se da konzumiranje infant formula sa *B. bifidum* i *St. thermophilus* dovodi do smanjenja pojave dijareje. Danas postoje mnogobrojni dokazi da primena određenih probiotika ima pozitivan uticaj u prevenciji i lečenju određenih crevnih infekcija, a u pojedinim slučajevima i vaginalnih infekcija. S obzirom na to da je danas sve više zastupljen trend smanjenja lečenja antibioticima, došlo je vreme da se pažljivo istraže terapijske primene probiotskih bakterija.

Većina gastrointestinalnih infekcija koje potiču od rotavirusa koji kolonizuju creva, utiču na decu u zemljama koje su u razvoju, ali i u razvijenim zemljama. Trenutno se veliki broj studija bavi uticajem probiotskih bakterija na simptome gastrointestinalnih infekcija, pri čemu je potvrđeno da soj *Lb. casei* i *Lb. rhamnosus* GG smanjuje težinu i dužinu trajanja dijareje kod dece. Konzumiranje ovih probiotika može da izazove i imuni odgovor organizma, kao i povećanje IgA antitela protiv rotavirusa (Fric, 2002).

Istraživanja su takođe ustanovila da probiotske bakterije sprečavaju dijareju koji može da nastane usled primene antibiotika. Bakterije *Klebsiella oxytoca* i *Clostridium difficile* doprinose pojavi dijareje koja je povezana sa upotrebom antibiotika (Gorkiewicz, 2009). Probiotske bakterije u tom slučaju imaju ulogu u stabilizaciji mikroflore debelog creva obnovom rezistentne mikroflore i stimulacijom imunog odgovora. Stabilizacija mikroflore će dovesti do produkcije masnih kiselina kratkog lanca, posebno acetata, propionata i butirata, fermentacijom polisaharida i oligosaharida, proteina, peptida i glikoproteina. Isto tako, simptomi „putničke“ dijareje takođe mogu biti sprečeni upotrebom probiotskih bakterija (Katelaris et al., 1995).

Nekoliko studija je ispitivalo uticaj probiotskih bakterija na poboljšanje crevne mobilnosti, kao i na opstipaciju (zatvor). Opstipacija najviše utiče na većinu hospitalizovanih pacijenata starijeg životnog doba usled poremećene crevne mobilnosti. U studiji u kojoj je učestvovalo 18 starijih osoba ispitivao se uticaj bifidus mleka (pasterizovano i homogenizovano mleko sa dodatkom *Bifidobacterium* sp.) na crevnu mobilnost, gde je ustanovljeno da dolazi do značajnog poboljšanja (Seki et al., 1978). Takođe, istraživanjima je ustanovljeno da svakodnevno konzumiranje 200 do 300 ml acidofilnog mleka (pasterizovano i homogenizovano mleko sa dodatkom *Lb. acidophilus*) dovodi do smanjenja problema sa opstipacijom, kao i do umanjene potrebe za laksativima (Alm et al., 1993).

Sindrom iritabilnog creva (irritable bowel syndrome-IBS, engl.) jedan je od najčešćih gastroenteroloških poremećaja. IBS predstavlja funkcionalni gastrointestinalni poremećaj sa hroničnim bolom ili simptomima povratnog bola u stomaku, pri čemu je narušena učestalost i postojanost redovne stolice. Takođe, kod obolelih od IBS je primećen nizak broj *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrsta i visok broj *Clostridium* spp. (Sen et al., 2002). Međutim, kliničke studije su pokazale da konzumiranje probiotskih bakterija predstavlja odgovarajuću terapiju. Dokazano je da acidofilno mleko pomaže pacijentima obolelim od IBS-a uspostavljanjem ravnotežne crevne mikroflore i omogućava bolje tolerisanje nedostatka laktaze, obezbeđivanjem bakterijske laktaze u tankom crevu. Pored toga, studija je pokazala da konzumiranje probiotske bakterije *Lb. acidophilus* 2×10^{10} cfu/dnevno dovodi do smanjenja sindroma IBS-a (bolova u stomaku, nadimanja, psiho-fizičko stanje, itd.) (Halpern et al., 1996).

Inflamatorno oboljenje creva (inflammatory bowel disease-IBD, engl.) je opšti termin za bolesti koje se manifestuju hroničnim i ponavljajućim upalama digestivnog trakta. Preciznije rečeno, IBD obuhvata ulcerativni kolitis, Kronovu bolest, itd. koje si ispoljavaju kao upale debelog creva, digestivnog trakta ili ileuma. Istraživanja su pokazala da je ulcerativni kolitis u Evropi zastupljen sa prevalencom od 505 osoba na 100 000 ljudi, dok je Kronova bolest zastupljena sa prevalencom od 322 osobe na 100 000 ljudi (WGO, 2015). Iako poreklo bolesti još uvek nije definisano, mnogobrojne studije ukazuju da dolazi do neravnoteže u crevnoj mikroflori, odnosno prisutan je visok broj enterohemoragične i enteroadhezivne *Escherichie coli* i nizak broj *Bifidobacteria*, što dovodi do zapaljenja (Sartor, 1995; Saarela et al., 2002; Rath, 2003). Probiotske bakterije dovode do smanjene aktivnosti zapaljenja i inhibiraju rast patogenih bakterija snižavajući pH vrednost, stimulišu specifični i nespecifični imuni odgovor i formiraju zaštitnu barijeru. Iako postoji relativno manji broj humanih studija, istraživanja su pokazala da probiotske bakterije imaju ulogu u IBD remisiji (Wang et al., 2014; Saez-Lara et al., 2015).

Netolerancija na laktozu je prisutna kod približno 70% svetskog stanovništva. Osobe koje su netolerantne na laktozu nakon konzumiranja mleka imaju izrazite bolove, grčeve i nadimanje u stomaku, a može doći i do dijareje usled nemogućnosti hidrolize laktoze ili slabe apsorpcije. Dijareja može da bude i posledica osmotskog efekta same laktoze ili slabe apsorpcije kiselih produkata fermentacije. Istraživanja su pokazala da probiotske bakterije imaju ulogu u ublažavanju simptoma laktoza netolerancije.

Prvenstveno su *Lb. bulgaricus* i drugi laktobacili koji imaju primenu u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka pokazali da enzim β -galaktozidaza dovodi do lakšeg varenja mlečnih proizvoda (Kilara i Shahani, 1975; Gilliland et al., 1984; Kolars et al., 1984). Kasnije je ustanovljeno i da mleko sa *B. longum* dovodi do umanjenja simptoma laktoza netolerancije (Jiang et al., 1996). Pored toga, pokazano je da pojedini laktobacili humanog porekla poseduju β -galaktozidaznu, fosfo- β -galaktozidaznu i fosfo- β -glukozidanznu aktivnost, koje ublažavaju netoleranciju na laktozu (Honda et al., 2007).

Probiotska bakterija *Lb. acidophilus* poseduje određene karakteristike koje dovode do unapređenja zdravlja, u koje ubrajamo antikancerogena i hipoholesterolemična svojstva (Gilliland et al., 1985), kao i antagonističko dejstvo na patogene mikroorganizme.

Hipoholesterlemično dejstvo *Lb. acidophilus* se ogleda u inhibiciji 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA reduktaze, enzima koja ograničava brzinu biosinteze endogenog holesterola u organizmu. Takođe, *Lb. acidophilus* dovodi do pojačanog izlučivanja holesterola u feces (Naidu et al., 1999). Isto tako, istraživanjem je pokazano da probiotik *Lb. plantarum* PH04 dovodi do smanjenja nivoa holesterola i serum triglicerida (Nguyen et al., 2007).

Različita istraživanja ukazuju da konzumiranje fermentisanih proizvoda od mleka ili probiotskih bakterija dovodi do antitumornih efekata. Ovi efekti se mogu prepisati sledećem (Naidu et al., 1999):

- a) inhibiciji mutagenih aktivnosti,
- b) redukciji aktivnosti enzima koji učestvuju u aktivnosti kancera, mutagena i jedinica koje podstiču tumor,
- c) suzbijanju tumora,
- d) epidemiologiji, koja je u korelaciji sa načinom ishrane i tumorom.

Različiti eksperimentalni dokazi iz humanih studija ukazuju da neki sojevi probiotskih bakterija mogu da izmene aktivnost fekalnih enzima (β -glukuronidaze, azoreduktaze i nitroreduktaze) koje su povezane s rakom debelog creva.

Probiotici mogu imati uticaj i na dermatitis koji se javlja kod novorođenčadi i male dece, a koji je izazvan fizičkim, hemijskim, enzimskim i mikrobiološkim faktorima pelena. U slučaju konzumiranja probiotskih bakterija, deca su generalno otpornija na infekcije, sprečava se kolonizacija patogenih mikroorganizama u GI traktu, a probiotici takođe inhibiraju i biofilmove koji se mogu pojaviti na površini pelena (Reid et al., 1995).

Buduća istraživanja probiotskih bakterija trebalo bi da ustanove mehanizme delovanja na definisane zdravstvene efekte kroz kliničke studije, s obzirom na to da je većina utvrđenih efekata sprovedena u *in vitro* uslovima. Takođe, budući da prehrambeni proizvodi ostvaruju određene pozitivne zdravstvene efekte, trebalo bi ispitati uticaj određenih prehrambenih proizvoda sa dodatkom probiotskih bakterija na zdravstvene efekte domaćina.

1.5.6. Autohtone potencijalne probiotske bakterije

Različiti proizvodi od mleka, posebno tradicionalno proizvedeni sirevi, predstavljaju bogat izvor autohtonih BMK specifičnih i jedinstvenih karakteristika.

Autohtone bakterije mlečne kiseline izolovane iz tradicionalno proizvedenih sireva predstavljaju veliki potencijal za aplikaciju u biotehnologiji. Prilikom izolacije BMK iz različitih tradicionalnih sireva ispitivanjem je ustanovljeno da određeni sojevi mogu posedovati i probiotske karakteristike. Zbog toga je karakterizacija autohtonih BMK proširena i na ispitivanje njihovih potencijalnih probiotskih karakteristika, koja je sve više zastupljena u brojnim istraživanjima (Milesi et al., 2009; Radulović et al., 2010; Zago et al., 2011; Hermanns et al., 2014).

Autori Maragkoudakis et al. (2006) su ispitivali laktobacile izolovane iz različitih proizvoda od mleka na sposobnost preživljavanja simuliranih GI uslova, antimikrobnu aktivnost, sposobnost adhezije Caco-2 ćelija, hemolitičku aktivnost, rezistenciju na antibiotike, itd, pri čemu su došli do zaključka da sojevi *Lb. casei* Shirota ACA-DC 6002, *Lb. plantarum* ACA-DC 146 i *Lb. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4037 poseduju potrebne probiotske karakteristike. Isto tako, *Lb. brevis* LB32 i *Lb. pentosus* LP05, izolovani iz tradicionalnih mlečnih proizvoda od ovčijeg mleka, poseduju probiotske karakteristike (Mojgani et al., 2015). Takođe, iz tradicionalno napravljenog Sjeničkog sira su izolovane *Lactobacillus* vrste koje su pokazale odgovarajuće probiotske karakteristike (Radulović et al., 2010).

Tradicionalno napravljeni proizvodi kao što su jogurt, maslac, kiselo mleko i različiti sirevi, koji su proizvedeni u ruralnom području, veoma su poznati ne samo po svojim specifičnim senzornim karakteristikama, već i po određenim zdravstvenim efektima (Kushi et al., 1995). Upravo ovi zdravstveni efekti mogu se pripisati prisustvu bakterija mlečne kiseline, odnosno potencijalnim probiotskim bakterijama, koje su prisutne u tradicionalnim proizvodima.

Autohtone BMK mogu se primeniti i u proizvodnji sireva ili drugih fermentisanih proizvoda, gde mogu da se koriste kao starter kulture (Miočinović et al., 2012), u cilju standardizacije tradicionalne proizvodnje sireva (Radulović et al., 2011c) ili kao dopunske kulture (Radulović et al., 2011a,b).

1.6. Mikroinkapsulacija probiotskih bakterija

Mikroinkapsulacione tehnike imaju široku primenu u prehrambenoj industriji, gde mogu da se koriste u stabilizaciji komponenata hrane, kontroli oksidacionih reakcija, održavanju ili kontrolisanom otpuštanju aktivnih sastojaka hrane (minerali, vitamini, fitosteroli, itd.), maskiranju neprijatnih ukusa i mirisa, itd. (Đorđević et al., 2015). Mikroinkapsulacija je tehnologija koja je razvijena za upotrebu u prehrambenoj industriji u različitim proizvodima, ali se takođe može koristiti i za zaštitu bakterijskih ćelija (Borgogna et al., 2010; Nedović et al., 2016).

Ispitivanja ukazuju da probiotske bakterije slabo preživljavaju u proizvodima u kojima se nalaze kao slobodne ćelije (De Vos et al., 2010). Vijabilnost probiotskih bakterija je od izuzetnog značaja, s obzirom na to da probiotici moraju da prežive veoma nepovoljne uslove, od procesa proizvodnje namirnice, skladištenja tokom određenog vremenskog perioda, pa do preživljavanja gastrointestinalnih uslova, da bi na kraju opstali u velikom broju i ostvarili svoje pozitivno dejstvo na zdravlje domaćina. Zbog toga postoji veliko interesovanje za različite metode mikroinkapsulacije koje mogu da obezbede odgovarajuću zaštitu probiotskim bakterijama, u cilju što bolje vijabilnosti (Kailasapathy, 2009).

Vijabilnost inkapsulisanih probiotika zavisi od fizičko-hemijskih osobina kapsule, odnosno nosača. Nosač probiotika bi trebao da bude neka komponenta hrane koja je sposobna da formira barijeru koja predstavlja zaštitu probiotskim bakterijama. Vrsta i koncentracija nosača koji pruža odgovarajuću zaštitu probiotskim bakterijama, veličina inkapsulisanih čestica, početni broj probiotskih ćelija samo su neki od parametara koji utiču na vijabilnost probiotika (Chen et al., 2007).

Mikroinkapsulacija probiotskih bakterija ima ulogu i u zaštiti bioloških svojstava, koja se postiže tokom transporta probiotika kroz dvanestopalačno crevo, što predstavlja uslov za dalji tranzit i postizanje visokog broja probiotskih ćelija u jejunumu i ileumu. Budući da je ustanovljeno da mikroinkapsulacija pruža zaštitu probiotskim bakterijama u GI traktu, inkapsulisane čestice bi trebalo testirati i na žvakanje, preživljavanje simuliranih želudačnih i intestinalnih uslova i tečnosti (Manojlović et al., 2010), pre njihove primene u prehrambenoj industriji.

1.6.1. Tehnike mikroinkapsulacije probiotskih bakterija

Postoje različite tehnike mikroinkapsulacije u koje ubrajamo tehnike sušenja (liofilizacija, sprej sušenje), emulzione tehnike, tehnike oblaganja i tehnike ekstruzije (Manojlović et al., 2010). Probiotske bakterije se u proizvodnji hrane najčešće primenjuju u smrznutoj ili sušenoj formi, kao liofilizovani ili sprej sušeni prahovi (Holzapfel et al., 2001).

Sušenje smrzanjem ili liofilizacija se postiže smrzanjem probiotika u prisustvu krioprotektanta, nakon čega se vrši sublimacija vode pod vakumom. Krioprotektanti ostvaruju ulogu u zaštiti probiotskih karakteristika tokom procesa liofilizacije, ali i tokom skladištenja liofilizovane kulture. Neka od jedinjenja koja se koriste kao protektivne komponente u liofilizaciji su fruktoza, laktoza, manoz, sorbitol, trehaloza, maltodekstrin ili različite kombinacije komponenata (Champagne et al., 1991; De Castro et al., 2000; Carvalho et al., 2002).

Proces mikroinkapsulacije probiotika, koji ima slične karakteristike kao i proces liofilizacije, je vakum sušenje. Proces vakum sušenja traje od 30 minuta, pa do nekoliko sati, na temperaturi od 0-40°C. Velika prednost ovog procesa je sama brzina, kao i temperatura krajnjeg proizvoda, s obzirom na to da nije prisutna temperatura smrzanja proizvoda, usled čega može doći do brojnih oštećenja (Manojlović et al., 2010).

Probiotici takođe mogu biti inkapsulisani u kapsulama od gela ili polimernog matriksa, tj. u mikrosferi, gde su probiotici obloženi spoljašnjim omotačem koji pod određenim uslovima omogućava otpuštanje probiotika (Anal i Singh, 2007). Polimerni matriksi se koriste u ekstruzionim tehnikama za zaštitu probiotskih bakterija u nepovoljnim uslovima GI trakta, odnosno u uslovima niske pH vrednosti i visoke koncentracije žučnih soli. Isto tako, ekstruzione tehnike omogućavaju lakšu primenu probiotika u prehrambenoj industriji. U emulzifikacionim tehnikama ili ekstruziji, alginat se najviše koristi kao inkapsulacioni matriks za mikroinkapsulaciju probiotskih bakterija, gde se kao krajnji proizvod dobijaju polimerna kuglice prečnika 0.3-3 mm (Truelstrup Hansen et al., 2002; Krasaekoopt et al., 2003; Mandal et al., 2006).

Takođe, danas su sve popularnije mikroinkapsulacione tehnike u kojima se formira višeslojni omotač, a u kojima se koristi kombinacija više inkapsulacionih tehnika.

Primer je inkapsulisani probiotik sa tri sloja, gde je prvi sloj liofilizovan oblik u tečnoj masti, nakon čega sledi tvrdi omotač i na kraju omotač u kombinaciji želatin-pektin (Asada i sar., 2003; <http://www.jintanworld.com>). Prve kapsule ove tehnike su napravljene u dizni (multi nozli) u kombinaciji sa ekstruzionim tehnikama. Međutim, veliki nedostatak ove metode je visoka cena.

Sve mikroinkapsulacione tehnike zadovoljavaju najbitniji parametar probiotskih bakterija, tj. formiraju zaštitni omotač koji omogućava bolju vijabilnost probiotskih bakterija u GI traktu, ali i tokom proizvodnje prehrambenih proizvoda. Međutim, veliku ulogu u izboru odgovarajuće mikroinkapsulacione tehnike igra i ekonomska isplativost tehnike. Zbog toga, kao jedna od zastupljenijih mikroinkapsulacionih tehnika u prehrambenoj industriji, ali i u mikroinkapsulaciji probiotskih bakterija, jeste tehnika sprej sušenja.

1.6.2. Tehnika mikroinkapsulacije sprej sušenjem

Proces mikroinkapsulacije sprej sušenjem predstavlja proces koji može da proizvede velike količine krajnjeg proizvoda za relativno kratko vreme, pri čemu postupak ima veoma male troškove. S obzirom na to da se tokom procesa sprej sušenja uspostavlja visoka temperatura, može doći do pojave termičke inaktivacije probiotskih bakterija. Međutim, upotreba odgovarajućeg medijuma za sprej sušenje, kao i promena parametara u metodologiji, značajno povećava broj preživelih probiotskih ćelija (Picot i Lacroix, 2003). U literturnim podacima se kao primer navodi inkorporacija termoprotektanata, kao što su obrano mleko ili adinol (Selmer-Olsen et al., 1999), trehaloza (Conrad et al., 2000), rastvorljiva vlakna (Crittenden et al., 2001), koji omogućavaju bolju vijabilnost probiotskih bakterija tokom sušenja i skladištenja. Pored toga, sprej sušene probiotske bakterije mogu da imaju još jedan zaštitni sloj koji omogućava bolju zaštitu u kiseloj sredini GI trakta, kao i odgovarajuću zaštitu od dejstva žučnih kiselina (Semyonov et al., 2010).

U literaturi je pronađen veliki broj studija gde je proces sprej sušenja korišćen za mikroinkapsulaciju različitih probiotskih *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* bakterija, kao što su na primer *Lb. paracasei* (Gardiner et al., 2000; Desmond et al., 2002), *Lb. curvatus* (Mauriello et al., 1999), *Lb. acidophilus* (Prajapati et al., 1987), *Lb. plantarum*

(Radulović et al., 2011b, 2012c), *Lb. rhamnosus* (Corcoran et al., 2004) i *Bifidobacterium ruminantium* (O’Riordan et al., 2001). Većina navedenih probiotika je takođe ostvarila primenu u prehrambenim proizvodima.

1.6.2.1. Proces sprej sušenja

Proces sprej sušenja se sastoji od tri osnovne faze (Petrović, 2011). Prva faza predstavlja raspršivanje medijuma za sušenje u fine čestice. U drugoj fazi, čestice dolaze u dodir s toplim vazduhom temperature do 200°C, nakon čega se prevode u suve čestice. Poslednja faza obuhvata separaciju osušenih čestica od vlažnog vazduha i sakupljanje dobijenog praha u odgovarajućoj posudi. Na slici 3 prikazana je laboratorijska sprej sušnica.

Medijum za sušenje se sastoji od nosača i uzorka koji se inkapsulira, u ovom slučaju probiotske bakterije. Nakon zasejavanja i rastvaranja probiotskih bakterija u odgovarajućem nosaču, medijum se uvodi u aparat za sprej sušenje i zagreva do temperature znatno više od tačke ključanja vode. Kada medijum dospe u oblast visoke temperature, dolazi do raspršivanja uzorka. Veličina čestica zavisi od izbora igle za raspršivanje.



Slika 3. Laboratorijska sprej sušnica, model B-290, BUCHI (Švajcarska)

Nakon raspršivanja, čestice se susreću sa strujom zagrejanog vazduha. Ulazna i izlazna temperatura vazduha za sušenje, kao i protok vazduha za sušenje i njegova relativna vlažnost, predstavljaju parametre koji utiču na sušenje čestica u ciklonu. Ulazna temperatura predstavlja nezavisno promenljivu, dok je izlazna temperatura određena ulaznom temperaturom, brzinom protoka medijuma za sušenje i brzinom protoka vazduha. Nosač za sprej sušenje, kao i brzina isparavanja mogu uticati na morfologiju čestica, jer prilikom previsoke izlazne temperature sušenja može doći do deformacije čestica, dok se pri isuviše niskim izlaznim temperaturama mogu dobiti vlažne i lepljive čestice (Celik, 2006).

Dobijeni prah se razdvaja od vlažnog vazduha pomoću centrifugalne sile u ciklonu. Centrifugalna sila se javlja kada prah i vlažan vazduh izlaze iz ciklona, usled povećane brzine strujanja vazduha. Suve čestice praha se kreću prema zidovima ciklona i gube energiju usled udaranja u zidove ciklona, nakon čega se prah sakuplja na dnu ciklona u posudi.

Na veličinu čestica i kvalitet sušenja utiču odnos ulazne i izlazne temperature, brzina rada pumpe, brzina aspiracije, raspršavanja, kao i koncentracija rastvora koji se suši.

1.6.2.2. Nosači za mikroinkapsulaciju probiotskih bakterija sprej sušenjem

Supstrati za mikroinkapsulaciju sprej sušenjem mogu biti veoma različiti, a najčešće se koriste nosači iz grupe proteina, peptida, polisaharida, mikroceluloznih vlakana, itd.

Kao jedan od najčešće primenjenih nosača za inkapsulaciju probiotskih bakterija koristi se rekonstituisano obrano mleko. Proteini mleka dovode do formiranja zaštitne barijere oko probiotskih bakterija, dok kalcijum povećava sposobnost preživljavanja probiotskih bakterija nakon dehidratacije. Isto tako, prednosti mleka kao nosača za inkapsulaciju sprej sušenjem se ogledaju i u prilagođenom rastu probiotskih bakterija u mleku, gde sposobnost autoagregacije probiotskih bakterija na povišenoj temperaturi dovodi do povećanja vijabilnosti.

Polisaharidi koji se koriste kao nosači probiotskih bakterija su inulin, skrob, dekstrini, itd., dok se od oligosaharida najčešće koriste frukto-oligosaharidi, sojini oligosaharidi, laktuloza, itd. (Shimura et al., 1991).

1.6.2.3. Određivanje broja vijabilnih ćelija nakon sprej sušenja

Određivanje vijabilnosti bakterija generalno se smatra preduslovom za optimalnu aktivnost probiotskih bakterija, gde veoma bitnu ulogu ima sposobnost metode da razdvoji oštećene ili mrtve od živih ćelija. Tradicionalno, metoda razređenja se koristi za ispitivanje vijabilnosti probiotika, iako ova metoda poseduje određene nedostatke kao što su nemogućnost razlikovanja mrtvih i živih ćelija, relativno dugo vreme potrebno za rast kolonija, izbor odgovarajuće podloge za rast bakterija itd. (Breeuwer i Abee, 2000). Prilikom izbora odgovarajuće metode za određivanje broja probiotskih bakterija, kao najbitniji parametar se navodi mogućnost razlikovanja mrtvih ili oštećenih i živih ćelija. S obzirom na to da je tokom procesa sprej sušenja prisutna visoka temperatura koja može dovesti do liziranja ćelija, određivanje broja sprej sušenih ćelija je od velike važnosti za dalju primenu probiotika. Pored toga, mnoge karakteristike probiotskih bakterija zavise više od aktivnosti probiotika nego od njegovog broja.

U literaturnim podacima pronađen je predlog da su zastupljena četiri različita oblika ćelija: vijabilan (aktivne i kulturabilne ćelije), uspavan (neaktivne i pri kraju kulturabilnosti), aktivne, ali nekulturabilne ćelije i mrtve (neaktivne i nekulturabilne ćelije) (Kramer et al., 2009). Ustanovljeno je da uspavane probiotske bakterije mogu biti prisutne i u mlečnim proizvodima, kao i u fermentisanim proizvodima tokom dužeg perioda skladištenja. Isto tako, u pojedinim istraživanjima je ustanovljeno i da mrtve probiotske ćelije mogu da ostvare određene efekte (Ouwehand et al., 2000; Zhang et al., 2005).

Shodno tome, tokom ispitivanja probiotskih bakterija razvile su se metode brzog određivanja vijabilnosti ćelija, s mogućnošću razlikovanja mrtvih i živih ćelija. Kao moguća rešenja za određivanje broja probiotskih bakterija u literaturnim podacima navodi se real time PCR metoda, kao i fluorescentne tehnike koje imaju potencijal da zamene tradicionalno određivanje broja probiotskih bakterija. Real time PCR metoda je jedna od mnogobrojnih molekularnih metoda, u kojoj se na veoma jednostavan i brz način može odrediti broj probiotskih ćelija. Ova metoda je ostvarila svoju primenu u određivanju broja patogenih mikroorganizama u različitim prehrambenim proizvodima i

skoro u potpunosti zamenila tradicionalne metode identifikacije patogenih koje mogu da traju i do nekoliko dana.

Međutim, metoda određivanja broja pomoću real time PCR ima određene nedostatke. Izolacija DNK predstavlja jedan od osnovnih nedostataka ove molekularne metode, jer ne postoji mogućnost razlikovanja živih i mrtvih ćelija, zbog čega DNK mrtvih ćelija utiče na rezultate kvantifikacije ćelija. Zbog toga su uvedene određene promene prilikom izolacije DNK mikroorganizama. U literaturnim podacima se navodi korišćenje etidijum monoazida (EMA) kao interkalirajuće boje (Wang i Levin, 2006; Lee i Levin, 2007; Seratlić, 2014). Međutim, zbog nedostataka selektivnosti i sveobuhvatne primene, EMA je zamenjen propidijum monoazidom (PMA). PMA predstavlja DNK-interkalirajuću boju sa azidnom grupom koja omogućava vezivanje za DNK nakon izlaganja jakoj svetlosti, nakon čega PMA inhibira PCR amplifikaciju. Zbog svog dejstva, PMA omogućava PCR amplifikaciju samo intaktnih ćelija, odnosno omogućava inhibiciju mrtvih i oštećenih ćelija (Nocker et al. 2007a,b, 2009). U dosadašnjim istraživanjima uglavnom su PMA real time PCR metode korišćene za patogene mikroorganizme kao što su *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, itd. (Nocker et al., 2006). Međutim, u novijim istraživanjima, real time PCR metode sa PMA tretmanom su korišćene i za određivanje vijabilnosti probiotika nakon liofilizacije (Kramer et al., 2009; Bogović Matijašić et al., 2010), kao i nakon inkapsulacije alginatom (Oketić et al., 2015). Međutim, ispitivanje sprej sušenih probiotika vršeno je samo u pojedinim radovima (Radulović et al., 2012e), gde su ispitivane vijabilnost i probiotske karakteristike potencijalnih probiotika, pre i nakon inkapsulacije sprej sušenjem. Takođe, ispitana je i vijabilnost sprej sušenih potencijalnih probiotika nakon dve godine skladištenja (Mirković et al., 2012). Rezultati istraživanja su potvrdili efikasnost PMA, kao i brzinu i preciznost real time PCR metode.

1.7. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji hrane

Funkcionalna hrana sa dodatkom probiotskih bakterija se po prvi put pojavila na tržištu krajem devedesetih godina prošlog veka (Young, 1998), dok je danas široko zastupljena na svetskom tržištu i namenjena je svim kategorijama potrošača. Probiotske bakterije su

sve više dostupne u različitim prehrambenim proizvodima kao što su fermentisani proizvodi od mleka, termički obrađena mleka, voćni jogurt, različiti sirevi, mlečni namazi, sladoled, maslac, ali isto tako i zdravi „snack bar“-ovi, infant formule, dečija hrana, sokovi, ovsene kaše i različiti konditorski proizvodi, kao na primer čokolada, itd. Takođe, veliki broj prehrambenih proizvoda sa probiotskim bakterijama je u fazi razvoja. Međutim, bitno je istaći da pre primene u proizvodnji funkcionalne hrane, probiotske bakterije moraju biti ispitane u industrijskim uslovima, gde treba da zadovolje sve probiotske kriterijume, odnosno da zadrže svoju funkcionalnost i vijabilnost nakon distribucije u smrznutom, sušenom ili inkapsulisanom obliku. Pored toga, probiotske bakterije ne smeju da utiču na prepoznatljiv ukus prehrambenog proizvoda, što je već navedeno. S druge strane, veoma je poželjno da utiču na poboljšanje senzornog kvaliteta.

Široka paleta proizvoda sa dodatkom probiotskih bakterija dovodi do sve veće popularnosti probiotika i promovisanja njihovih pozitivnih efekata na ljudsko zdravlje. Takođe, funkcionalna hrana sa dodatkom probiotskih bakterija predstavlja pomak na putu promovisanja hrane sa zdravstvenim efektima, zbog čega se ova vrsta hrane popularno naziva „nutriceuticals“. Ova grupa proizvoda ima ulogu u očuvanju zdravlja i poboljšanju određenih fizioloških funkcija organizma.

Pored probiotika, u proizvodnji prehrambenih proizvoda koriste se i različiti prebiotici u koje ubrajamo oligosaharide, poput frukto-oligosaharida, laktuloze, rafinoze, inulina, itd. Pod pojmom prebiotici se podrazumevaju nesvarljivi sastojci hrane (obično polisaharidi), koji selektivno stimulišu rast probiotskih bakterija u crevima. Na taj način, prebiotici podstiču sposobnost kolonizacije GI trakta probiotskim bakterijama, čime se povećava i njihovo inhibitorno dejstvo prema patogenim bakterijama (Gibson i Robrefroid, 1995; Cummings i Macfarlane, 2002).

Iako je u svetu primena probiotika i prebiotika široko zastupljena u proizvodnji različitih vrsta namirnica biljnog i animalnog porekla (proizvodi od mleka, proizvodi od mesa, snack obroci, konditorski proizvodi, margarin, sladoledi, prelive za salate, sokovi, dečija hrana i dr.) kod nas je primena probiotika ograničena uglavnom na fermentisane proizvode od mleka.

U daljem tekstu, pažnja će biti posvećena primeni probiotika u proizvodnji tri različita prehrambena proizvoda, jogurta, siru od ultrafiltriranog (UF) mleka i crnoj čokoladi,

koji su u ovom radu proučavani kao nosači slobodnih i inkapsuliranih probiotskih bakterija.

1.7.1. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta

Na svetskom tržištu se nalazi više od 600 proizvoda od mleka koji koriste termin probiotski (Sveje, 2007), od kojih su najzastupljeniji fermentisani proizvodi od mleka. S obzirom na to da je navedeni broj probiotskih proizvoda registrovan pre skoro 10 godina, taj broj je danas vrlo verovatno znatno veći. Prema Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (Sl. glasnik, br. 34/2014) navodi se da se u fermentisane proizvode od mleka ubrajaju jogurt, kiselo mleko, fermentisani proizvodi od mleka sa probiotskim bakterijama, kefir i drugo. Jogurt je prema navedenom Pravilniku definisan kao proizvod dobijen fermentacijom mleka delovanjem simbiotske kulture *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, dok se fermentisani proizvodi od mleka sa probiotskim bakterijama definišu kao proizvodi dobijeni fermentacijom mleka delovanjem probiotskih starter kultura ili kombinacijom probiotskih starter kultura sa drugim bakterijama mlečne kiseline. S obzirom na to da je tokom eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije proizveden jogurt sa dodatkom probiotskih bakterija, gde su jogurtne starter kulture korišćene za fermentaciju mleka, a probiotske bakterije kao dodatne kulture, u nastavku teksta koristiće se termin jogurt sa probiotskim bakterijama.

Prema najnovijim istraživanjima, tržište probiotskih proizvoda će rasti za 6,8% godišnje, tokom narednih 5 godina, što trenutno predstavlja najinteresantnije tržište (<http://www.nutraingredients.com>). Smatra se da rastući interes potrošača za probioticima i njihovim mnogobrojnim pozitivnim efektima na ljudsko zdravlje ima ključnu ulogu u neprekidnom rastu tržišta probiotika. Fermentisani proizvodi od mleka sa probioticima su najzastupljeniji na tržištu probiotskih proizvoda. Jogurt, kao jedan od najpoznatijih fermentisanih proizvoda od mleka, odavno je poznat kao proizvod s mnogobrojnim pozitivnim zdravstvenim efektima na ljudsko zdravlje, zbog čega većina potrošača smatra jogurt „zdravom“ namirnicom. Poslednjih 20-tak godina došlo je do značajnog povećanja popularnosti jogurta kao prehrambenog proizvoda (Hamann i Marth, 1983), usled dodatka probiotskih bakterija, koje dovode do poboljšanja

nutritivne i fiziološke slike jogurta. *Lb. acidophilus* i *B. bifidum* su probiotske bakterije koje se najčešće primenjuju u proizvodnji jogurta.

Proizvodnja jogurta se vrši u strogo kontrolisanim uslovima, sa dodatkom jogurtne starter kulture *St. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ove dve kulture rastu u simbiozi, pri čemu *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* svojom proteolitičkom aktivnošću obezbeđuje potrebne aminokiseline, a *St. thermophilus* snižava pH produkcijom mlečne kiseline, čime se stvaraju povoljni uslovi za rast *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Jogurtne starter kulture se dodaju u odnosu 1:1.

Sposobnost preživljavanja probiotskih bakterija u jogurtu zavisi od različitih faktora, kao što su vrste bakterija mlečne kiseline, interakcija između prisutnih sojeva, hemijski sastav fermentisanog proizvoda, pH vrednost, dostupnost hranljivih materija neophodnih za rast, sadržaj inhibitora i promotora rasta, koncentracije šećera (osmotski pritisak), nivo inokulacije, temperature, fermentacije, vremena i temperature skladištenja, itd. (Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001).

Jedan od ograničavajućih faktora za primenu pojedinih kultura u jogurtu jeste nedostatak tolerancije na kisele uslove sredine (Klaver et al., 1993). S obzirom na to da se tokom fermentacije povećava sadržaj mlečne kiseline, pH vrednost se smanjuje. Nakon proizvodnje, u pojedinim slučajevima dolazi do naknadnog pada pH vrednosti proizvoda nakon fermentacije ili tokom skladištenja, što dovodi do pojave „post-acidifikacije“. Do preterane kiselosti proizvoda može doći usled nekontrolisanog rasta *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na niskim temperaturama i pH vrednostima. Pojava „post-acidifikacije“ se može sprečiti primenom kulture sa smanjenom „post-acidifikacijom“, kao i primenom dobre proizvođačke prakse (Kneifel et al., 1993).

Budući da broj probiotskih ćelija u jogurtu opada tokom skladištenja, neophodno je da se odaberu sojevi koji obezbeđuju visok kvalitet jogurta sa probiotskim bakterijama. Shodno tome, prilikom ispitivanja vijabilnosti *Lb. acidophilus* u jogurtu, ustanovljeno je da su pojedini sojevi ostvarili visoku vijabilnost i nakon 28 dana skladištenja na temperaturi od 7°C (Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001).

Probiotske bakterije se prilikom proizvodnje jogurta uglavnom primenjuju u vidu liofilizovanih ili smrznutih kultura, dok se u pojedinim istraživanjima primenjuju kao mikroinkapsulisani probiotici u vidu alginatnih čestica. U literaturnim podacima pronađeno je da su probiotske bakterije *Lb. acidophilus* DD910 i *B. lactis* DD920

ostvarile veoma dobru vijabilnost u inkapsulisanoj formi sa alginatom u jogurtu, u odnosu na slobodne ćelije probiotika (Sultana et al., 2000). Takođe, senzorne karakteristike jogurta sa probioticima su ostale nepromenjene. Međutim, tehnika sprej sušenja uglavnom je korišćena za sprej sušenje jogurta sa dodatim probiotskim bakterijama, gde se kao krajnji proizvod dobijao prah jogurta sa probioticima (Kearney et al., 2009; Medeiros et al., 2014). S obzirom na to da jogurt ima relativno kratak rok trajanja, kao i da je neophodno da se skladišti na niskim temperaturama, proces sprej sušenja je znatno olakšao transport, skladištenje i komercijalizaciju usled dehidriranosti proizvoda, što je takođe dovelo do niske aw vrednosti. Sprej sušeni jogurt sa probioticima je ostvario primenu u proizvodnji različitih fermentisanih proizvoda od mleka, pekarskih proizvoda, supa i deserta, a prema nekim literaturnim podacima sprej sušeni jogurt sa probioticima može da se koristi kao ključni sastojak funkcionalne hrane (Kearney et al., 2009). Takođe, rok trajanja ovog proizvoda je značajno povećan, čak do 4 meseca.

1.7.2. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji sira

Pored jogurta, sirevi kao mlečni proizvodi, takođe zauzimaju bitno mesto u proizvodnji hrane sa dodatkom probiotskih bakterija. Sir predstavlja jedan od najsvestranijih prehrambenih proizvoda s mnogobrojnim pozitivnim karakteristikama na ljudsko zdravlje, pri čemu postoje mnogobrojne vrste koje su pogodne za sve starosne grupe. Raznovrsnost sireva nudi niz mogućnosti za njegovu primenu kao nosača probiotskih bakterija. Međutim, razvoj probiotskih sireva podrazumeva obavezno poznavanje svih koraka proizvodnje, kao i uticaja sastava sira na vijabilnost probiotskih bakterija tokom proizvodnje, skladištenja i prolaza kroz gastrointestinalni trakt. Zbog svojih karakteristika i sastava, sir predstavlja pogodnu sredinu za preživljavanje probiotika. Sir ima veći puferski kapacitet, čime postiže veću pH vrednost kisele sredine gastrointestinalnog trakta i na taj način stvara povoljnije uslove za preživljavanje probiotika, u odnosu na fermentisane proizvode od mleka. Isto tako, gušći matriks i relativno veći sadržaj masti pruža bolju zaštitu probiotskim bakterijama prilikom prolaza kroz nepovoljne uslove gastrointestinalnog trakta (Ross et al., 2002; Bergamini et al., 2005).

S obzirom na to da većina fermentisanih proizvoda od mleka ima kratak rok trajanja, sir predstavlja dobru alternativu sa širokom paletom različitih vrsta, gde se ostvaruje mogućnost znatno dužeg perioda skladištenja. Međutim, određeni broj studija je pokazao pozitivan uticaj potencijalnih i komercijalnih probiotskih bakterija na senzorne karakteristike i teksturu svežih sireva, pri čemu su probiotici opstali u odgovarajućem broju tokom proizvodnje i skladištenja. Blanchette et al. (1996) su proizveli Kotidž sir koji je tokom 10 dana skladištenja sadržao *B. infantis* na nivou većem od 10^6 cfug⁻¹ sira. Pored Kotidž sira, *B. bifidum* i *Lb. casei* pokazali su dobru vijabilnost u svežem siru i nakon 15 dana skladištenja (Suarez-Solis et al., 2002). Probiotska bakterija *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 82 je tokom proizvodnje Minas sira bila na nivou 10^6 cfug⁻¹, da bi se taj broj nakon 21 dana skladištenja povećao na nivo 10^8 cfug⁻¹ (Buriti et al., 2005). Minas sir je proizveden i sa dodatkom *Lb. acidophilus* La-5, gde je ispitivana vijabilnost probiotika i senzorne karakteristike sira. Nakon 21 dana skladištenja, rezultati istraživanja pokazali su da je probiotik *Lb. acidophilus* La-5 bio na nivou 10^7 cfug⁻¹ i da je došlo do poboljšanja senzornih karakteristika.

Probiotski sirevi su sve više zastupljeni u različitim studijama o probioticima, obuhvatajući i ispitivanja uticaja probiotskih sireva na zdravlje ljudi. Shodno tome, istraživanja su pokazala da je probiotska bakterija *Lb. paracasei* ATCC334 imala veoma dobru vijabilnost u Čedar siru (Sharp et al., 2008). Pored toga, Čedar sir sa navedenim probiotikom pokazao je veći broj preživelih ćelija u simuliranim želudačnim uslovima u odnosu na jogurt sa istim probiotikom. Isto tako, različite probiotske bakterije, *B. animalis* BLC-1, *Lb. acidophilus* LAC-1, *Lb. paracasei* LSC-1, *Lb. brevis* LMG6906, pokazale su dobru sposobnost preživljavanja kisele sredine (pH 2,5-3,0) i pepsina (1000 U/ml), kao i žučnih soli (0,3 w/v) u portugalskom siru (Madureira et al., 2005).

Pojedini probiotski sirevi su u kliničkim studijama pokazali da probiotske bakterije ostvaruju svoje zdravstvene efekte i u industrijskim uslovima, odnosno nakon proizvodnje i skladištenja sireva (Cruz et al., 2009a). Probiotski argentinski sir sa *Lb. acidophilus* A9, *B. bifidum* A12 i *Lb. paracasei* A13 pokazao je imunomodulatorni kapacitet, omogućavajući povećanje fagocitne aktivnosti, kao i značajno povećanje broja IgA⁺ ćelija (Medici et al., 2004). Ahola et al. (2002), su ispitivali uticaj probiotskog Edam sira sa *Lb. rhamnosus* Lc705 i *Lb. rhamnosus* LGG na karijes zuba,

gde su ustanovili da inhibiraju rast *S. mutans*, koji predstavlja jednog od najčešćeg izazivača karijesa. Takođe, ispitan je uticaj probiotskog sira sa dodatkom *Lb. rhamnosus* LGG, *Lb. rhamnosus* LC705, *Propionibacterium freundenreichii* ssp. i *Shermani* JS na oralnu kandidijazu kod starije populacije (Hatakka et al., 2007). U istraživanju su učestvovala 92 starije osobe koje su konzumirale probiotski sir tokom 16 nedelja. Rezultati istraživanja su pokazali da je došlo do redukcije broja oralnih kvasaca za 25%, pri čemu je tretman sa probiotskim sirom smanjio rizik pojavljivanja oralnih kvasaca za 75%. Autori predlažu da probiotski sir može biti korišćen kao preventiva za smanjenje rizika od umanjavanja lučenja pljuvačke i suvih usta i da pozitivno utiče na oralno zdravlje.

Navedena ispitivanja, kao i mnoga druga, ukazuju na veliki potencijal primene probiotskih bakterija u proizvodnji različitih vrsta sireva, što doprinosi unapređenju kvaliteta sireva, kao i proširivanju palete probiotskih proizvoda.

1.7.3. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji čokolade

Kao što je do sada već navedeno, za primenu probiotskih bakterija su se uglavnom koristili mleko i mlečni proizvodi. Međutim, određeni broj potrošača nije u mogućnosti da konzumira mlečne proizvode sa probiotskim bakterijama usled alergije na proteine mleka, netolerancije na laktozu ili zbog vegeterijanske ishrane. Uzimajući u obzir navedene razloge, sve je više novih nemlečnih proizvoda sa dodatkom probiotskih bakterija koji su dostupni svim kategorijama potrošača, a koji predstavljaju izazov za primenu probiotskih bakterija (Andersen, 1998). Proizvodi kao što su snack-barovi, različite žitarice (npr. ovsene kaše), sokovi, fermentisane kobasice, itd. predstavljaju samo neke od nemlečnih namirnica gde se mogu primeniti probiotske bakterije.

Jedan od funkcionalnih nemlečnih prehrambenih proizvoda, s prepoznatljivim i karakterističnim slatkim ukusom, u koji je moguće inkorporirati probiotske bakterije jeste čokolada. Čokolada predstavlja suspenziju čokoladne mase koja se sastoji od kakao čestica, zaslađivača, kakao maslaca i u zavisnosti od vrste čokolade može da sadrži i mleko (mlečna čokolada). Najbitnije faze proizvodnje čokolade su pečenje kaka, končiranje i temperiranje, nakon čega se dobija finalni proizvod prepoznatljivog izgleda, ukusa i mirisa, sa karakteristikom da se na sobnoj temperaturi nalazi u čvrstom

stanju, dok se nakon unosa u organizam (usta) topi. Na osobine čokolade u koje se ubrajaju različite fizičko hemijske, reološke i prethodno navedene karakteristike, značajno utiču osobine kakao maslaca i mešavine sa drugim mastima.

Čokolada se prema sirovinskom sastavu i načinu proizvodnje može podeliti u više vrsta, pri čemu su najbitnije mlečna, bela i crna (Laličić-Petronijević, 2012). Tradicionalna čokolada se proizvodila od kakao zrna, koja predstavlja jedan od najznačajnijih koncentrisanih izvora flavanola, koji čine podgrupu prirodnih antioksidanasa biljnih jedinjenja, flavanoida. Ispitivanja koja su sprovedena u prethodnih 15 godina predstavljaju dokaz da umereno konzumiranje čokolade, pogotovo crne, može da ispoljava zaštitne efekte u borbi protiv kardiovaskularnih bolesti (Lippi et al., 2009). Pored toga, čokolada predstavlja i izvor kalcijuma, kao i mnogih drugih bioloških komponenti kao što su polifenoli i tokoferoli (Nebesny et al., 2007). Sastav crne čokolade, tačnije masne globule, značajne su u očuvanju živih ćelija probiotskih bakterija tokom dužeg perioda skladištenja, u pojedinim slučajevima i do godinu dana.

S obzirom na to da je u pojedinim fazama proizvodnje crne čokolade prisutna visoka temperatura, prilikom primene probiotskih bakterija potrebno je modifikovati tehnologiju proizvodnje, kako bi se ostvarila odgovarajuća vijabilnost probiotskih bakterija. Pošto crna čokolada ima karakterističan i prepoznatljiv ukus koji je veoma bitan potrošačima, prilikom primene probiotskih bakterija veoma je bitno da senzorne karakteristike čokolade ostaju nepomenjene.

Nebesny et al. (2007) su primenom liofilizovanih probiotskih bakterija *Lb. casei* ili *Lb. paracasei* u proizvodnji crne čokolade ustanovili da probiotska crna čokolada predstavlja proizvod sa pozitivnim zdravstvenim efektima na ljudsko zdravlje. Redovnom konzumacijom probiotske crne čokolade ostvaruje se profilaktički i terapijski efekat na potrošače, pri čemu je senzorni kvalitet crne čokolade ostao nepromenjen. Isto tako, primenom liofilizovanih kultura *Lb. acidophilus* NCFM i *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* HN 019 u proizvodnji crne čokolade, dobijen je funkcionalni proizvod sa nepromenjenim senzornim karakteristikama i neophodnim brojem probiotskih bakterija nakon 180 dana skladištenja na sobnoj temperaturi (Laličić-Petronijević, 2012). Takođe, pregledom literature je ustanovljeno da su i sprej sušene probiotske bakterije inkorporirane u čokoladi (Maillard i Landyut, 2008).

Pored crne čokolade, probiotske bakterije su ostvarile primenu i u drugim vrstama čokolade (Mandal et al., 2013; Laličić-Petronijević et al., 2015), kao i u čokoladnom musu (Aragon-Alegro et al., 2007) i sufleu (Malmo et al., 2013). Probiotske bakterije su u svakom istraživanju ostvarile veoma dobru vijabilnost, a u pojedinim slučajevima i zdravstveni efekat (Khanafari et al., 2012).

Čokolada sa probioticima je dostupna na svetskom tržištu, ali je ispitivanje uticaja ovog proizvoda kao nosača probiotika aktuelno u zadnjih nekoliko godina (Maillard i Landyut, 2008). Prema navodima ovih autora, vijabilnost probiotskih bakterija koje su inkorporirane u čokoladi bila je tri puta veća u tankom crevu, u odnosu na probiotske bakterije primenjene u mlečnim proizvodima. Possemiers et al. (2010) su ustanovili da čokolada predstavlja bolji nosač probiotskih bakterija prilikom prolaza kroz gastrointestinalni trakt, u odnosu na mlečne proizvode. Takođe, ustanovljeno je da 80% probiotskih bakterija u crnoj čokoladi preživljava simulirane uslove gastrointestinalnog trakta pomoću simulatora ljudskog intestinalnog mikrobnog sistema (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem—SHIME), dok je kod mlečne čokolade preživelo i do 91% probiotskih ćelija. Sposobnost preživljavanja probiotskih kultura je bila značajno manja u mleku, gde je preživelo samo 17% ćelija. Autori su takođe utvrdili da se probiotici veoma dobro kolonizuju u crevima, kao i da dovode do povećanja broja korisnih bakterija, što ukazuje na činjenicu da čokolada, crna ili mlečna, predstavlja veoma dobar nosač probiotika kroz GI trakt.

Pored obogaćivanja čokolade sa probiotskim bakterijama, u pojedinim istraživanjima su primenjeni i prebiotici. Autor Carić (2010) je liofilizovani *Lb. helveticus* M92, zajedno sa inulinom i malitolom, primenila u proizvodnji crne i mlečne čokolade. Ispitivanjima vijabilnosti probiotske bakterije ustanovljeno je da kultura preživljava na zadovoljavajućem nivou i nakon godinu dana skladištenja. Takođe, probiotik *Lb. helveticus* M92 je ostvario veći broj ćelija u čokoladi u simuliranim uslovima, u odnosu na samu liofilizovanu kulturu, čime je čokolada još jednom pokazala veoma dobru zaštitnu ulogu.

Generalno posmatrano, probiotske bakterije su ostvarile primenu u različitim prehrambenim proizvodima, od mleka i mlečnih proizvoda, pa sve do omiljenog konditorskog proizvoda, čokolade. U svim tim istraživanjima, probiotske bakterije su ostvarile odgovarajući broj i nakon veoma dugog perioda skladištenja i nisu uticale na

senzorni kvalitet proizvoda. Međutim, pronađen je veoma mali broj literaturnih podataka koji su ispitivali zaštitnu funkciju prehrambenih proizvoda u *in vivo* studijama, odnosno ulogu nosača probiotskih bakterija prilikom prolaza kroz GI trakt.

1.7.4. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji drugih prehrambenih proizvoda

Kao što je prethodno navedeno, probiotske bakterije su sve više zastupljene u nemlečnim proizvodima, gde ostvaruju odgovarajući broj i nakon dužeg perioda skladištenja, kao i mnogobrojne pozitivne zdravstvene efekte. Međutim, na tržištu je veoma popularan još jedan mlečni proizvod sa dodatkom probiotskih bakterija, sladoled.

Sladoled predstavlja još jedan proizvod u koji je moguće inokulisati probiotske bakterije. Sladoled se sastoji od mleka, zaslađivača, stabilizatora, emulzifikatora i dodataka ukusa (Marshall et al., 2003). Zbog svog sastava, sladoled predstavlja veoma dobar nosač probiotskih bakterija zahvaljujući prisustvu masti i laktoze, mlečnim proteinima i drugim komponentama (Cruz et al., 2009b). Probiotske bakterije *Lb. acidophilus*, *Lb. agilis* i *Lb. rhamnosus* su primenjene u proizvodnji sladoleda sa dodatkom saharoze i aspartama, pri čemu je proizvod skladišten tokom 6 meseci na temperaturi od -20°C (Basygit et al., 2006). Tokom skladištenja, vijabilnost probiotika je praćena na svakih mesec dana, a ispitivana je i rezistencija na žučne soli i hidrohloridnu kiselinu, kao i antibiotska rezistencija. Na osnovu rezultata, autori su zaključili da su probiotske bakterije ostvarile vijabilnost na odgovarajućem nivou, kao i da nije došlo do bilo kakvog uticaja na senzorne karakteristike proizvoda. Probiotska bakterija *Lb. johnsonii* La-1 je takođe primenjena u proizvodnji sladoleda, pri čemu su autori ispitivali uticaj različitih sastava masti (5% i 10% w/v), šećera (15% i 22%) i temperature skladištenja (-16°C i -28°C). U svim varijantama sladoleda, probiotska bakterija *Lb. johnsonii* La-1 je preživela na nivou većem od 10^7 cfug⁻¹, a tekstura i senzorni kvalitet proizvoda su ostali nepromenjeni (Alamprese et al., 2002). Slične rezultate autori Alamprese et al. (2005) dobili su i za probiotsku bakteriju *Lb. rhamnosus* CG, koja je opstala u sladoledu na nivou od 10^8 cfug⁻¹ i nakon godinu dana skladištenja.

Pojedina istraživanja su ustanovila da bi voćni sok mogao da bude dobar medijum za primenu probiotskih bakterija. Voćni sok bi trebalo smatrati zdravim proizvodom usled visokog sadržaja vitamina, antioksidanasa i polifenola, koji ispoljavaju nekoliko pozitivnih zdravstvenih efekata (Granatao et al., 2010). S obzirom na to da voćni sokovi imaju karakterističan ukus u zavisnosti od vrste voća, veoma je bitno da probiotske bakterije ne utiču na umanjeње gorčine ili kiselosti sokova. Međutim, Luckow i Delahunty (2004) su sproveli test među potrošačima koji su konzumirali voćni sok sa i bez dodatka probiotskih bakterija. Potrošači su probiotski voćni sok okarakterisali kao proizvod sa „mlečnim“, „medicinskim“ i „prljavim“ ukusom. Kasnija istraživanja su pokazala da dodatak tropskog voća (mango, ananas, itd.) može da doprinese poboljšanju ukusa finalnog proizvoda i da umanja uticaj probiotskih bakterija (Luckow et al., 2006). Probiotski proizvod, koji sadrži voćni sok kao jednu od komponenata, veoma popularan u Skandinavskim zemljama, jeste napitak ProViva, koji sadrži fermentisanu ovsenu kašu i voćni sok. Tokom proizvodnje ovog napitka, prvo se vrši fermentacija ovsene kaše pomoću probiotske bakterije *Lb. plantarum* 299v. Nakon završene fermentacije, u ovsenoj kaši je prisutno 1×10^{12} cfuml⁻¹ probiotskih ćelija *Lb. plantarum* 299v, koja se potom dodaje voćnom napitaku koji se proizvodi od šipurka, borovnice, jagode, tropskog voća, itd. Krajnji proizvod sadrži 5×10^{10} cfuml⁻¹ *Lb. plantarum* 299v (Molin, 2001). U mnogobrojnim istraživanjima dokazana je efikasnost ovog probiotskog proizvoda, koji je ostvario mnogobrojne pozitivne efekte: inhibira *Enterobacteriaceae* u intestinalnoj mukozi (Mao et al., 1996b), poboljšava uslove intestinalne mukoze (Kasravi et al., 1997), utiče na poboljšanje jetre u slučaju oboljenja (Adawi et al., 1997), poboljšava imuni status (Mao et al., 1996a), umanjuje upale mukoze (Mao et al., 1996b), itd.

Pored sokova, različiti bezalkoholni napici takođe mogu da predstavljaju pogodan medijum za probiotske bakterije. Togva (Togwa, engl.) je napitak od skroba koji se proizvodi u Africi i koji je korišćen kao medijum za probiotske bakterije. Probiotske bakterije nisu ostvarile uticaj na senzorni kvalitet, a takođe su održale broj ćelija na odgovarajućem nivou (Prado et al., 2008).

Pored različitih sokova i napitaka, probiotske bakterije ostvarile su primenu i u „zdravim“ konditorskim proizvodima. Kompanija Kraft je 2008. godine lansirala na tržište probiotsku štanglu koja je sadržala probiotsku bakteriju *Lb. plantarum* 299v.

Ovaj proizvod je sadržao probiotsku bakteriju na odgovarajućem nivou tokom dužeg vremenskog perioda. Zbog veoma dobrog senzornog kvaliteta i zdravstvenih efekata, ovaj proizvod se masovno proizvodi zbog sve veće popularnosti.

Danas su sve popularniji soja i njeni proizvodi koji su sve više zastupljeni u mnogobrojnim istraživanjima, uglavnom zbog visokog sadržaja proteina. Pored toga, soja predstavlja izvor vlakana, vitamina K, fosfora, magnezijuma, folne kiseline, itd. Sojino zrno sadrži i oligosaharide, koji predstavljaju dobar izvor ugljenika za različite *Lactobacillus* vrste. Sojino mleko, kao jedan od popularnijih proizvoda od soje, pokazao se kao dobar medijum za rast *Bifidobacterium*, ali s nešto sporijim rastom u odnosu na rekonstituisano obrano mleko (Granatao et al., 2010). Prilikom proizvodnje probiotskih fementisanih sojinih proizvoda trebalo bi izvršiti selekciju odgovarajuće probiotske bakterije koja može da ostvari odgovarajući broj tokom proizvodnje i skladištenja. Probiotske bakterije koje su ostvarile primenu u sojinim napicima su *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum* i nekoliko vrsta bifidobakterija (Champagne et al., 2009). Zbog pozitivnih osobina soje i njenih proizvoda, dobrih senzornih karakteristika, kao i jednostavne inkorporacije probiotskih bakterija, prisutna je sve veća proizvodnja probiotskih sojinih proizvoda. Takođe, ovi proizvodi ostvaruju višestruke zdravstvene efekte.

Primena probiotskih bakterija u proizvodnji nemlečnih proizvoda predstavlja veliki izazov za prehrambenu industriju. S obzirom na to da na vijabilnost probiotskih bakterija utiče veliki broj faktora kao što su temperatura skladištenja, pH vrednost, nivo kiseonika, prisustvo inhibitora, itd, veoma je važno da pravilna primena i odgovarajući uslovi proizvodnje i skladištenja održe probiotske bakterije u potrebnom broju tokom dužeg perioda.

1.8. *In vivo* ispitivanje sposobnosti preživljavanja gastrointestinalnih uslova

Sposobnost preživljavanja niskih pH vrednosti i žučnih soli potencijalnih probiotskih bakterija jedan je od prvih kriterijuma prilikom selekcije probiotskih bakterija. Kao što je već spomenuto, jednostavni *in vitro* testovi uglavnom su korišćeni za procenu tolerancije na gastrointestinalne uslove, zbog čega ovi testovi mogu imati samo ulogu u

predviđanju sposobnosti preživljavanja nepovoljnih uslova GI trakta. Tokom istraživanja, *in vitro* testovi su se prilično prilagodili simuliranju gastrointestinalnih uslova, a kao jedan od najboljih način simulacije navodi se SHIME sistem, koji je korišćen u mnogobrojnim istraživanjima (Molly et al., 1994; Kontula et al., 1998; Allander et al., 1999; Gmeiner et al., 2000). Međutim, simulirani GI uslovi mogu da pruže nepouzdanе i nelogične podatke o sposobnosti preživljavanja potencijalnih probiotskih bakterija, u odnosu na *in vivo* studije (Mattila-Sandholm, 1999).

Uzimajući u obzir prethodno navedeno, može se ustanoviti da ni jedan od mnogobrojnih načina simulacije GI trakta nije pouzdan metod u određivanju sposobnosti preživljavanja potencijalnih probiotskih bakterija. Zbog toga je veoma bitno da se ispitivanje potencijalnih probiotskih bakterija vrši pomoću različitih *in vivo* studija, gde se analizom fecesa ili biopsijom određenih delova GI trakta može ispitati sposobnost preživljavanja. Isto tako, *in vivo* testovi koji su predloženi u literaturi, imaju potencijal da daju informacije o mogućem ponašanju bakterija u nepovoljnim uslovima GI trakta. Ova zapažanja mogu da pomognu u određivanju potrebnog početnog broja probiotika, kao i o merama zaštite probiotskih bakterija.

Ispitivanje sposobnosti preživljavanja potencijalnih probiotika u GI uslovima u *in vivo* studijama se u većini istraživanja vršila analizom fecesa. Autori Johanson et al. (1998) su pored sposobnosti preživljavanja *Lb. plantarum* 299v u soku sa fermentisanom ovsenom kašom, ispitivali i uticaj probiotika na sadržaj masnih kiselina kratkog lanca u fecesu. Rezultati istraživanja su pokazali da je *Lb. plantarum* 299v pronađen u velikom broju u fecesu, kao i da je došlo do značajnog povećanja sadržaja koncentracije sirćetne i propionske kiseline. Isto tako, analizom fecesa može se ustanoviti uticaj probiotskih bakterija na mikrofloru fecesa, tj. da li inhibiraju sulfitoredujuće klostridije, *Enterobacterium* i *Enterococcus*.

In vivo studije bi trebalo da predstavljaju jedan od osnovnih kriterijuma u ispitivanju potencijalnih probiotskih bakterija, s obzirom na to da ovakav vid ispitivanja probiotika, pored sposobnosti preživljavanja daje višestruke informacije i o uticaju probiotskih bakterija na gastrointestinalni trakt, sposobnosti adhezije, inhibitornom dejstvu prema nepoželjnim mikroorganizmima, uticaju na imuni sistem, itd. Takođe, pomoću *in vivo* studija moguće je ustanoviti i zaštitnu funkciju prehrambenih proizvoda, tj. ulogu nosača probiotskih bakterija prilikom prolaza kroz GI trakt. Na taj način, može se

ustanoviti koji prehrambeni proizvod pruža najbolju zaštitu probiotskim bakterijama. Budući da se probiotske bakterije najviše primenjuju u jogurtu, *in vivo* studijom bi se mogla ispitati efikasnost jogurta kao nosača probiotskih bakterija. Takođe, s obzirom na to da su istraživanja pokazala da probiotske bakterije mogu da se primene i u drugim prehrambenim proizvodima, kao što su na primer sir ili čokolada, u kojima je postignut visok broj probiotika nakon proizvodnje i skladištenja i nepromenjen senzorni kvalitet, *in vivo* studijom bi se mogla ispitati i zaštitna uloga ovih prehrambenih proizvoda.

2. CILJ RADA

Autohtone bakterije mlečne kiseline izolovane iz tradicionalnih sireva predstavljaju neiscrpan izvor bakterija različitih karakteristika s velikim potencijalom primene u biotehnologiji. Tradicionalni sirevi Srbije, naročito sirevi u salamuri i kačkavalj s dugim periodom zrenja, sadrže veliki broj potencijalnih probiotskih bakterija, što je i potvrđeno u dosadašnjim istraživanjima.

Na osnovu literaturnih podataka primećeno je da je uticaj mikroinkapsulacije tehnikom sprej sušenja na vijabilnost probiotskih bakterija i njihove karakteristike, nedovoljno ispitan. Primena sprej sušenih autohtonih potencijalnih probiotika u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda i ispitivanje vijabilnosti tokom proizvodnje i skladištenja proizvoda, može da pruži uvid o značaju sprej sušenja kao inkapsulacione tehnike. Isto tako, senzornom analizom prehrambenih proizvoda može da se utvrdi uticaj autohtonih sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija na senzorne karakteristike proizvoda. Ispitivanjem sposobnosti preživljavanja nepovoljnih uslova gastrointestinalnog trakta sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija, primenjenih u određenom prehrambenom proizvodu, može da se ustanovi zaštitna uloga određenog prehrambenog proizvoda, odnosno uloga nosača probiotskih bakterija prilikom prolaza kroz gastrointestinalni trakt.

Imajući u vidu sve prethodno navedene činjenice, osnovni ciljevi istraživanja u okviru doktorske disertacije su:

- Izolacija, karakterizacija i identifikacija autohtonih bakterija mlečne kiseline iz tradicionalnih sireva
- Selekcija sojeva bakterija mlečne kiseline sa probiotskim karakteristikama
- Mikroinkapsulacija tehnikom sprej sušenja autohtonih potencijalnih probiotskih bakterija i ispitivanje uticaja sprej sušenja na vijabilnosti i probiotske karakteristike
- Primena slobodnih i sprej sušenih ćelija autohtonih potencijalnih probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta, sira od ultrafiltriranog mleka i crne čokolade

- Ispitivanje vijabilnosti potencijalnih probiotskih bakterija u probiotskim proizvodima i njihov uticaj na senzorne karakteristike proizvoda tokom skladištenja
- Ispitivanje sposobnosti preživljavanja potencijalnih probiotskih bakterija u gastrointestinalnim uslovima u probiotskim proizvodima *in vivo* studijom
- Utvrđivanje uticaja potencijalnih probiotika na mikrofloru fecesa, naročito na nepoželjne mikroorganizme koji su prisutni u gastrointestinalnom traktu.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Tradicionalni sirevi

Autohtone bakterije mlečne kiseline izolovane su iz Pirotskog kačkavalja, koji je proizveden na tradicionalan način u Mlekarskoj školi “Dr Obren Pejić” u Pirotu. Izolacija autohotnih BMK je izvršena iz Pirotskog kačkavalja različitog stepena zrelosti, odnosno 3, 6 i 9 meseci zrenja. Takođe, autohotne BMK su izolovane i iz Sjeničkog sira koji je proizveden na tradicionalan način na Sjeničko-peštarskoj visoravni, a nabavljen je direktno od proizvođača ili na gradskoj pijaci. Izolacija i karakterizacija BMK iz Sjeničkog sira je prethodno urađena u doktorskoj disertaciji Radulović (2007), nakon čega su izolovani sojevi postali deo kolekcije kultura Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerzitet u Beogradu.

3.2. Izolacija bakterija mlečne kiseline

Uzorci sireva od po 20 g su u sterilnim uslovima stavljeni u sterilne Stomaher kese sa 180 ml 2% Na-citrata, nakon čega su homogenizovani u Stomaher aparatu (Lab Blender Stomacher 400, Seward, Engleska).

Za ispitivanje prisustva termofilnih i mezofilnih *Lactobacillus* vrsta, 1 ml odgovarajućeg razređenja je prenet u sterilnu petri šolju, nakon čega je prelišen sa MRS agarom (Merck, Francuska). Petri šolje su inkubirane u anaerobnim uslovima u Gas Pak sistemu (BBL, Nemačka) na temperaturama od 43°C i 37°C tokom 48 časova. MRS agar sadrži triptozni pepton 10 g, mesni ekstrakt 8 g, kvašćev ekstrakt 4 g, glukozu 20 g, Tween80 1 ml, K₂HPO₄ 2 g, natrijum acetat-trihidrat 5 g, tri-amonijum 2 g, MgSO₄x7H₂O 200 mg, MnSO₄x4H₂O 5 mg, agar-agar 15 g na 1L destilovane vode.

Takođe, ispitano je i prisustvo mezofilnih i termofilnih *Lactococcus* vrsta, međutim s obzirom na to da *Lactococcus* vrste nisu deo ove doktorske disertacije, rezultati ispitivanja neće biti prikazani.

Nakon inkubacije, pojedinačne kolonije s petri šolja su zasejane metodom iscrpljenja na petri šolje sa izlivenim MRS agarom i inkubirane na optimalnoj temperaturi. Postupak

iscrpljenja je ponavljan još dva puta radi dobijanja čiste kulture. Mikroskopskim pregledom preparata bojenih po Gramu provereno je da li su kulture čiste, kao i da li su G pozitivne, a takođe je utvrđen izgled i oblik laktobacila. Čiste kulture su potom zamrznute na -80°C u MRS bujonu sa dodatkom 20% glicerola.

3.3. Karakterizacija i selekcija izolata laktobacila

Čiste kulture *Lactobacillus* vrsta su presejane na MRS bujon i inkubirane na 37°C tokom 24 časa. Morfološkim, fiziološkim i biohemijskim testovima izvršena je karakterizacija izolata.

3.3.1. Katalaza test

Katalaza testom je ispitano prisustvo enzima katalaze, tako što su kulture izolata sterilnom ezom nanošene na mikroskopsku pločicu s par kapi 3% rastvora vodonik peroksida (H_2O_2). Pojava mehurića u kapi vodonik peroksida ukazivala je na prisustvo enzima katalaze, što nije karakteristika laktobacila, pa su katalaza pozitivni izolati eliminisani iz daljeg rada.

3.3.2. Način fermentacije šećera

Fermentacijom šećera je ispitivano da li izolati fermentišu šećere homofermentativnim ili heterofermentativnim putem. Izolati su zasejani u MRS bujon s Durham cevčicama sa dodatkom 1% laktoze, nakon čega su bujoni inkubirani na 37°C tokom 24 časa. Nakon inkubacije, zamućenje bujona i pojava mehurića u Durham cevčicama je ukazivala na heterofermentativne laktobacile, a zamućenje bujona bez pojave gasa je ukazivalo na homofermentativne laktobacile.

3.3.3. Sposobnost rasta na različitim temperaturama

Odabrani izolati BMK su testirani na mogućnost rasta na različitim temperaturama u MRS bujonu. Za ova ispitivanja, sveže bujonske kulture su zasejane u MRS bujon, koji

je inkubiran na temperaturama od 15° i 45 °C tokom 24 časa. Zamućenje bujona je ukazivalo na rast izolata na ispitivanim temperaturama.

3.3.4. Sposobnost rasta pri različitim koncentracijama soli

Za ispitivanje mogućnosti rasta ispitivanih izolata u prisustvu različitih koncentracija natrijum hlorida (NaCl), MRS bujonu su dodate različite koncentracije NaCl-a i to: 2%, 4.5% i 6% nakon čega je inokulisan sa izolatima na odgovarajućoj temperaturi tokom 24 časa. Nakon inkubacije, zamućenje MRS bujona s različitim koncentracijama soli je ukazivalo na rast izolata.

3.3.5. Sposobnost rasta u različitim pH vrednostima

Sposobnost rasta u uslovima različite pH vrednosti je ispitivan pomoću MRS bujona sa pH vrednostima 4, 5 i 7, pri čemu su pH vrednosti 4 i 5 podešavane pomoću 1M HCl, dok je pH vrednost 7 podešavana pomoću 1M NaOH. Merenje pH vrednosti MRS bujona je vršeno pomoću pH-metra WTW Inolab (Nemačka). Nakon podešavanja pH vrednosti, izolati su zasejavani u MRS bujone, nakon čega su inkubirani na optimalnim temperaturama.

3.3.6. Ispitivanje acidogene sposobnosti

Acidogena sposobnost izolata je praćena zasejavanjem 1 ml svežih bujonskih kultura selektovanih izolata u 100 ml rekonstituisanog obranog mleka koncentracije 10% koje je inkubirano na temperaturi od 37°C. Tokom 24 časa pH mleka je meren nakon 2, 4, 6, 8 i 24 časa pomoću pH-metra WTW Inolab (Nemačka).

3.3.7. Sposobnost produkcije egzopolisaharida

Ispitivani izolati su zasejani na MRS agar i inkubirani na odgovarajućim temperaturama tokom 24 časa. Nakon inkubacije, dodiranjem pojedinačnih kolonija ezom, ustanovljeno je da li izolati proizvode egzopolisaharide (EPS).

3.3.8. Sposobnost produkcije aromogenih jedinjenja

Reakcijom Voges-Proskauera je ispitivano da li izolati poseduju sposobnost produkcije aromogenih jedinjenja. Peptozno-glukozni bujon je zasejan ispitivanim izolatima, nakon čega su inkubirani na odgovarajućoj temperaturi tokom 24 časa. Nakon inkubacije, u svaku epruvetu je dodato 0,2 ml α -naftola i 0,6 ml kalijum-hidroksida (KOH), pri čemu je pojava crvenog prstena na površini ukazivala na produkciju aromogenih jedinjenja.

3.3.9. Proteolitička aktivnost

Ispitivani izolati su zasejani na mlečni MRS agar koji sadrži 10% sterilnog mleka, nakon čega su inkubirani na optimalnoj temperaturi. Pojava prosvetljenih zona oko kolonija je ukazivala na ekstracelularnu proteolitičku aktivnost.

3.4. Identifikacija selektovanih sojeva

Na osnovu rezultata testova karakterizacije, odabrano je 5 sojeva izolovanih iz Pirotskog kačkavalja koji su označeni sa K16, K27, K50, K71 i K621. Selektovani izolati su dalje identifikovani API sistemom, a zatim i molekularnim metodama. Takođe, odabranim izolatima su priključeni i sojevi izolovani iz Sjeničkog sira, koji pripadaju kolekciji Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerzitet u Beogradu. Odabrani su sojevi *Lactobacillus paracasei* 564, *Lactobacillus paracasei* Z8, *Lactobacillus paracasei* Z5 i *Lactobacillus plantarum* Z9, koji su u ranijim ispitivanjima pokazali dobre tehnološke karakteristike i identifikovani API sistemom (Radulović, 2007).

3.4.1. API sistem

Selektovani izolati iz Pirotskog kačkavalja (K16, K27, K50, K71 i K621) identifikovani su API 50 CH sistemom (Biomerieux, Francuska). Postupak identifikacije izolata je rađen po uputstvu proizvođača API sistema. Selektovani izolati su zasejavani na MRS agar, nakon čega su inkubirani na optimalnim temperaturama. Nakon inkubacije,

kolonije selektovanih izolata su zasejavane u 10 mL API 50 CH medijuma, nakon čega su zasejavane kupole sistema. Inokulisani stripovi su prelivani mineralnim uljem, kako bi se postigli anaerobni uslovi. Stripovi su potom inkubirani na odgovarajućim temperaturama, a reakcije su očitavane nakon 24 časa. Rezultati očitavanja zasejanih API testova su analizirani pomoću API Lab plus softvera.

3.4.2. Izolacija totalne DNK iz selektovanih izolata

Izolacija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) selektovanih izolata iz kačkavalja i odabranih sojeva izolovanih iz Sjeničkog sira vršena je korišćenjem kita za izolaciju DNK (Promega, SAD), po uputstvu proizvođača. Prekonoćne kulture ispitivanih sojeva su centrifugirane na 16000 g (Boecko, Nemačka)/5 minuta/4°C. Nakon centrifugiranja, supernatant je odlivan, a talog ili pelet resuspendovan u 600 µl rastvora (6 mg lizozima (Sigma Aldrich, SAD), 6 µl mutanolizina koncentracije 250U/mL (Sigma Aldrich, SAD) u 600 µl 50mM etilen diamin tetra sirćetne kiseline (EDTA) (Sigma Aldrich, SAD). Potom je vršena inkubacija ćelija na 37°C tokom 30-60 minuta. Po završenoj inkubaciji, ćelije su centrifugirane 2 minuta na 13000 g, odliven je supernatant i dodato je 500 µl Nucleic Lysis rastvora iz kita koji je polako mešan s peletom ćelija. Potom su ćelije zagrevane 5 minuta na 80°C, nakon čega su hladene oko 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodato 200 µl Protein Precipitation rastvora iz kita, koji je potom resuspendovan na vorteks aparatu tokom 20 sekundi i ostavljen da se hladi na ledu tokom 1-2 h. Nakon hlađenja, uzorci su centrifugirani 3 minuta na 13000 g. U supernatante je dodato po 600 µl izopropanola, a zatim su lagano mešani. Ukupna DNK je taložena centrifugiranjem 2 min na 13000 g. Talozi ukupne DNK su isprani etanolom (75%), centrifugirani 2 min na 13000 rpm, sušeni i resuspendovani u 100 µl Rehydration rastvora iz kita.

3.4.3. Umnožavanje DNK fragmenata metodom PCR (Polymerase Chain Reaction)

Selektovane kulture laktobacila su identifikovane za više različitih laktobacila, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, koji su uzeti u

obzir kao najčešće izolovane kulture iz tradicionalnih sireva. Reakciona smeša za PCR je sadržala 10 x reakcioni pufer (10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,1% Triton X-100, pH 9.0) sa 2,5 mM MgCl₂, 200 μM svakog dezoksinukleotida (dNTP), dva prajmera (10 pmol-a) i 1U *Taq* DNK-polimeraze (Fermentas UAB, Litvanija). Za identifikaciju selektovanih izolata za *Lb. casei* vrstu korišćeni su prajmeri 27f i L1a, za *Lb. paracasei* Y2 i Para 1 i za *Lb. plantarum* vrstu Lfpr i PlanII. Sekvence prajmera date su u tabeli 3.

Tabela 3. Sekvenca prajmera koji su korišćeni za identifikaciju selektovanih izolata

<i>Lactobacillus</i> vrsta	Sekvenca	Referenca
<i>Lb. casei</i>	Y2: 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTAGGCCCG-3' Cas1: 5'-TGCACCTGAGATTGACTTAA-3'	Ward i Timmis, 1999
<i>Lb. paracasei</i>	Y2: 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTAGGCCCG-3' Para1: 5'-CACCGAGATTCAACATGG-3'	Ward i Timmis, 1999
<i>Lb. plantarum</i>	Lfpr: GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT PlanII: TTACCTAACGGTAAATGCGA	Walter et al., 2000

U svaku reakciju dodavano je 2 μl DNK ispitivanih kultura. PCR reakcija za *Lb. plantarum* je rađena po sledećem programu (Walter i sar., 2000): početna denaturacija na 95°C tokom 3 minuta, potom umnožavanje DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacija 95°C tokom 30 sekundi, vezivanje prajmera 55 tokom 30 sekundi, polimerizacija 72°C tokom 30 sekundi, poslednja polimerizacija 72°C tokom 5 minuta. Kao pozitivna kontrola korišćen je *Lb. plantarum* IM 112. Za *Lb. casei* i *Lb. paracasei* korišćen je sledeći program (Ward i sar., 1995): 95°C tokom 3 minuta, potom umnožavanje u 30 ciklusa: 95°C tokom 30 sekundi, 50°C tokom 30 sekundi, 72°C tokom 1 minuta i na kraju polimerizacija na 72°C tokom 5 minuta. Kao pozitivna kontrola korišćene su kulture *Lb. casei* IM 33 i *Lb. paracasei* IM 242. Nakon PCR reakcije, umnoženi PCR produkti su vizualizovani pomoću horizontalne gel elektroforeze.

3.4.4. Horizontalna elektroforeza DNK na agaroznom gelu

Elektroforeza totalne DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA). Gelovi su bojani sa SYBR Green bojom (Promega, SAD). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1 x TAE pufer. Korišćeni su 1% agarozni gelovi, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. PCR produkti u količini od 5 µl su bojani pomoću 2 µl DNA Gel Loading Dye (Fermentas UAB, Litvanija), nakon čega su dodavani u bunariće horizontalne gel elektroforeze. Gelovi su posmatrani i fotografisani pod UV svetlom pomoću UV Transilluminator (Biometra, Watman company, Nemačka). Za određivanje molekulske mase PCR produkta korišćen je leder Genruler od 100 bp (Fermentas UAB, Litvanija). Veličina PCR produkta selektovanih izolata je vizuelno određivana.

3.5. Određivanje probiotskih karakteristika selektovanih sojeva *in vitro* testovima

3.5.1. Gastro uslovi

Nakon identifikacije, ispitivana je sposobnost preživljavanja u simuliranim gastro (želudačnim) uslovima po metodologiji Doleyres et al. (2004). Za simulaciju želudačnih uslova, korišćen je rastvor 0,5% NaCl i 0,3% pepsina (Sigma Aldrich, SAD) pri čemu je rastvor podešen na pH 2 sa 1M HCl i sterilisan filtracijom. U 9 ml rastvora dodavano je 1 ml sveže prekonoćne bujonske kulture selektovanog izolata i inkubirano na 37°C tokom 60 minuta. Nakon inkubacije, metodom razređenja određen je broj preživelih ćelija u simuliranim želudačnim uslovima u odnosu na početni broj zasejanih ćelija.

3.5.2. Intestinalni uslovi

Za simulaciju uslova u tankom i debelom crevu korišćen je rastvor koji se sastoji od 12% rekonstituisanog obranog mleka, 0,4% žučnih soli (Sigma Aldrich, SAD) i 0,2% pankreatina (Sigma Aldrich, SAD) (Doleyres et al., 2004). U 9 ml rastvora za simuliranje intestinalnih uslova, dodato je 1 ml sveže bujonske kulture selektovanog

izolata. Nakon inkubacije na 37°C tokom 60 minuta, metodom razređenja određen je broj preživelih ćelija u odnosu na početni broj zasejanih ćelija.

3.5.3. Rezistencija na antibiotike

Ispitivana je rezistencija selektovanih izolata na sledeće antibiotike: penicilin (10U), ampicilin (10 µg), vankomicin (30 µg), streptomycin (10 µg), kanamicin (30 µg), eritromicin (15 µg), tetraciklin (30 µg), gentamicin (10 µg), hloramfenikol (30 µg), neomicin (30 µg) i oksacilin (1 µg) proizvođača Becton-Dickinson (BD, SAD). Postupak zasejavanja selektovanih izolata i metoda difuznog testa rađena je po uputstvu proizvođača antibiotik diskova.

Selektovani izolati su zasejavani na petri šolje sa MRS agarom, nakon čega su inkubirani na 37°C. Nakon inkubacije, kolonije selektovanih izolata su ezom inokulisani u epruvete sa sterilnim fiziološkim rastvorom do zamućenja od 0.5 Mc Farland. Zasejana suspenzija je potom sterilnim brisevima utrljavana po površini petri šolja sa razlivenim MRS agarom u tri pravca, rotirajući petri šolje po 60° svaki put kad bi se suspenzija ravnomerno rasporedila po agaru. Petri šolje su ostavljane da se osuše petnaestak minuta nakon čega su se na površinu petri šolja nanosili diskovi antibiotika. Petri šolje su potom inkubirane na 37°C tokom 24 časa nakon čega su očitavani rezultati. Očitavanje je vršeno i nakon 48 časova inkubacije. Zona senzitivnosti na antibiotike se merila od ivice do ivice zone, pri čemu je meren prečnik zone zajedno sa diskom antibiotika, koji je iznosio 6 mm. Zone senzitivnosti antibiotika su bile različite u zavisnosti od vrste antibiotika.

3.5.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika

Selektovanim izolatima koji su pokazali određenu rezistenciju na antibiotike određivana je minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika (MIC). Za ispitivanje MIC korišćen je E-test (Biomérieux, Francuska). Postupak zasejavanja suspenzija selektovanih izolata bio je isti kao i kod disk difuzione metode za ispitivanje rezistencije na antibiotike. Nakon zasejavanja suspenzija selektovanih izolata i sušenja petri šolja, stripovi E-testa su nanošeni na površinu petri šolje. Petri šolje su potom inkubirane na 37°C tokom 24

časa, nakon čega su očitavani rezultati. MIC svakog antibiotika je očitavana kao najniža koncentracija koja je inhibirala rast selektovanih izolata.

3.5.5. Antimikrobna svojstva

Za detekciju antimikrobnih supstanci korišćen je spot metod. Kao indikator sojevi, korišćeni su patogeni mikroorganizmi: *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Candida albicans* ATCC 10231. Selektovani izolati su inokulisani u MRS bujon i inkubirani na 37°C tokom 24 časa, dok su patogeni mikroorganizmi zasejani na odgovarajuće bujone i inkubirani na 37°C tokom 24 časa. Nakon inkubacije, na petri šolje s razlivenim MRS agarom nanošeni su spotovi od 10 μ l selektovanih izolata, nakon čega su se spotovi sušili oko 20-30 minuta. Patogeni mikroorganizmi su zasejavani u odgovarajući soft (0.7%-tni) agar-agar i to: *E. coli*, *St. aureus*, *B. subtilis* i *P. aeruginosa* u hranljivi agar (Merck, Francuska), koji je imao sledeći sastav: mesni ekstrakt 1g/L, pepton 5 g/L, NaCl 5 g/L, ekstarkt kvasca 2 g/L i agar-agar 15 g/L. Za rast *L. monocytogenes* je korišćen TSB agar (Merck, Francuska) koji je sadržao: tripton 15 g/L, sojton (enzimska digestija sojine sačme) 5g/L, NaCl 5g/L i 15 g/L agar-agara, dok je *C. albicans* zasejavan u sladni agar koji se sastoji od: pepton 5 g/L, sladni ekstrakt 30 g/L i agar 15 g/L. Nakon dodavanja 100 μ l patogenog mikroorganizma u 10 ml odgovarajućeg soft agara, prelivane su petri šolje sa osušenim spotovima selektovanih izolata, nakon čega se vršila inkubacija na 37°C tokom 24 časova. Prisustvo antimikrobnih supstanci je detektovano na osnovu pojave prosvetljene zone oko spotova, koja se javlja kao posledica inhibicije rasta senzitivnog bakterijskog indikator soja.

3.6. Mikroinkapsulacija potencijalnih probiotskih bakterija sprej sušenjem

Nakon identifikacije selektovanih izolata molekularnim metodama i ispitivanjem njihovih probiotskih karakteristika, dva soja, *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 selektovani su za mikroinkapsulaciju metodom sprej sušenja.

3.6.1. Ispitivanje osetljivosti potencijalnih probiotskih bakterija na povišene temperature

S obzirom na to da su prilikom mikroinkapsulacije tehnikom sprej sušenja prisutne visoke temperature, ispitivana je osetljivost potencijalnih probiotskih bakterija na visoke temperature: 55°C, 58°C, 59°C, 60°C i 61°C (Teixeira et al., 1997). Potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 su inokulisane u MRS bujon i inkubirane na temperaturi od 37°C tokom 24 časa. Sveže bujonske kulture su potom presejavane u koncentraciji 1% u 50 ml podloge koja sadrži 20% obranog mleka i 0,5% kvašćevog ekstrakta. Za određivanje početnog broja potencijalnih probiotskih ćelija, 1% sveže bujonske kulture je inokulisan u podlogu nakon postizanja temperature od 37°C. Za ispitivanje osetljivosti na visoke temperature, korišćena su dva erlenmajera s podlogom, pri čemu je jedan erlenmajer korišćen za praćenje temperature. U trenutku kada se postigla ispitivana temperatura, 1% sveže bujonske kulture je inokulisan u drugi erlenmajer s podlogom. Inokulisane podloge su inkubirane na visokim temperaturama tokom 4 minuta, pri čemu je broj potencijalnih probiotskih ćelija određivan svake minute metodom razređenja. Odgovarajuće razređenje je zasejavano na MRS agar, a petri šolje su potom inkubirane u anaerobnim uslovima u GasPak sistemu (BBL, Nemačka) na 37°C tokom 24 časa. Vreme decimalne redukcije je određivana pomoću formule (Stumbo, 1965):

$$D = \tau / \log N_0 - \log N$$

gde je τ -vreme delovanja ispitivane temperature

N_0 -početni broj potencijalnih probiotskih ćelija

N-broj potencijalnih probiotskih ćelija nakon delovanja ispitivane temperature

3.6.2. Priprema inokuluma za sprej sušenje

Potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8, zasejane su u MRS bujon i inkubirane na 37°C tokom 24 časova. Nakon inkubiranja, sveže bujonske kulture su presejane još jednom i inkubirane u istim uslovima. 1% inokulum prekonoćnih kultura je zasejan u 300 ml MRS bujona, koji je potom inkubiran do početka stacionarne faze, odnosno na 37°C tokom 20 časova (Teixeira et al., 1994). Nakon inkubacije, 300 ml bujona je centrifugirano tokom 15 minuta na 4500 g, na temperaturi od 10°C. Supernatant je odlivan, a pelet bakterijskih ćelija je ispran fiziološkim rastvorom. Proces centrifugiranja i ispiranja bakterijskih ćelija je ponovljen dva puta. Nakon drugog ispiranja, pelet je resuspendovan u 300 ml 20% sterilnog rekonstituisanog obranog mleka. Radi adaptacije potencijalnih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 na temperaturu sušenja, inokulisani medijumi su držani na 37°C tokom 30 minuta.

3.6.3. Tehnika sprej sušenja

Za inkapsulaciju inokulisanog medijuma za sušenje potencijalnih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 tehnikom sprej sušenja korišćena je laboratorijska sušnica, Mini Spray Dryer (B290, BÜCHI, Švajcarska), sa istostrujnim tokom sušenog medijuma i vazduha. Na osnovu prethodnih istraživanja (Petrović, 2011), korišćeni su optimalni parametri za sprej sušenje koji su obuhvatali: ulaznu temperaturu oko 140°C, konstantni protok od 5 ml/min, a izlazna temperatura je održavana na oko 80°C. Pročišćavanje nozle je vršeno na svakih 30-tak sekundi. Nakon završenog procesa, sprej sušene probiotske bakterije su sakupljane u odgovarajuće sterilne posude.

3.7. Ispitivanje vijabilnosti potencijalnih probiotskih bakterija nakon sprej sušenja

Budući da proces sprej sušenja usled visoke ulazne temperature može dovesti do oštećenja, kao i do smrti ćelije, vršeno je određivanje broja živih ćelija sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8. Određivanje broja preživelih ćelija rađeno je metodom razređenja i real time PCR metodom, primenom propidijum monoazida (PMA).

3.7.1. Metoda razređenja

Metodom razređenja, 1 g praha sprej sušenih ispitivanih potencijalnih probiotskih bakterija je zasejavan u 9 ml fiziološkog rastvora (0,86% NaCl), nakon čega je prah homogenizovan na vorteks aparatu 5 min radi potrebne rehidracije. Iz odgovarajućeg razređenja, 1 ml je prenet u praznu petri šolju koja je prelivena sa MRS agarom (Merck, Francuska). Petri šolje su potom inkubirane u anaerobnim uslovima u Gas Pak sistemu (BBL, Nemačka), na temperaturi od 37°C tokom 48 časova. Broj ćelija potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 je određivan metodom razređenja pre sprej sušenja iz sveže prekonoćne bujonske kulture i upoređen je s brojem preživelih ćelija nakon sprej sušenja. Procenat preživelih ćelija je izračunat pomoću formule:

$$\% \text{ preživelih ćelija} = N / N_0$$

N_0 - broj ćelija pre sprej sušenja

N - broj ćelija nakon sprej sušenja

3.7.2. Metoda real time PCR

3.7.2.1. Tretman sa propidijum monoazidom (PMA)

Sprej sušeni potencijalni probiotici *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 su tretirani sa PMA (Biotium, SAD) metodom Noecker et al. (2006). Po 1 g sprej sušenih potencijalnih probiotika *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 je resuspendovano u 9 ml 2% rastvor Na-citrata. Jedan mililitar napravljenog razređenja je centrifugiran 5 minuta

na 5000 g. Takođe, napravljen je 20 mM rastvor PMA koji je rastvoren u dejonizovanoj vodi i skladišten na temperaturi od -20°C. Nakon centrifugiranja, supernatant je odlivan i talog je resuspendova u 2,5 µl 20 mM rastvora PMA, nakon čega su uzorci ostavljeni u mraku 5 minuta kako bi se PMA vezao za DNK ćelija. Nakon toga, uzorci su izloženi halogenom izvoru svetlosti (650 W, 150 V) tokom 5 minuta, pri čemu su uzorci bili na ledu na 20 cm od lampe, kako bi se izbeglo pregrevanje uzorka. Nakon fotoindukovanog unakrasnog povezivanja ćelije sa PMA, uzorci su centrifugirani na 5000 g tokom 10 minuta, nakon čega je izvršena izolacija DNK.

3.7.2.2. Izolacija DNK sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija

Genomska DNK sprej sušenih potencijalnih probiotika je izolovana u aparatu Maxwell™ 16 (Promega, SAD), pri čemu je uzorak prethodno pripremljen korišćenjem kita Maxwell™ 16 Cell Tissue DNA Purification kit (Promega, SAD), po uputstvu proizvođača, sa manjim modifikacijama. Nakon tretmana uzoraka sa PMA, dodato je 400 µl TE pufera i 100 µl lizozima (25 mg/ml) (Sigma Aldrich, SAD) sa mutanolizinom (10U/ml) (Sigma Aldrich, SAD), nakon čega je uzorak resuspendovan i inkubiran na 37°C tokom 2 časa, kako bi se izvršilo liziranje ćelija. Celokupna zapremina uzorka je potom prenetu u odgovarajuće tube na Maxwell™ 16 aparatu, nakon čega je dodato 300 µl elucionog pufera i 0,6 µl RNA-ze (20 mg/ml). Dalji postupak izolacije DNA je nastavljen po uputstvu proizvođača.

3.7.2.3. Real time PCR

PCR amplifikacija slobodnih i inkapsulisanih ćelija potencijalnih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 sprovedena je na aparatu MX3000P (Stratagene, LA Jolla, SAD) po protokolu Kramer et al. (2009). Master mix (25 µl) je sadržao Platinum SYBR Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogene, SAD), 0,2 µM svakog prajmera i 5 µl rastvorene 10 puta genomske DNK. Prajmeri koji su korišćeni u reakciji su LactoR`F (5`-CACAAATGGACG(A/C)AAGTCTGATG-3`) i LBFR (5`-CGCCACTGGTGTCTTCCAT-3`) (Songjinda et al., 2007). Program real time PCR se

sastojao od: 50°C tokom 2 min i 95°C tokom 2 min, 35 ciklusa sa 95°C tokom 30 s, 60°C tokom 15 s, 72°C tokom 20 s, a potom 95°C tokom 1 min i 55°C tokom 30 s.

Analizirane su i standardne krive sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija. Standardne krive potencijalnih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 su pripremljene pomoću DNK izolata čistih 18 časovnih kultura. DNK je izolovana pomoću aparata Maxwell™ 16, a postupak izolacije je prethodno naveden. Dvostruka serija razblaženja genomske DNA ispitivanih kultura je amplifikovana real time PCR, dok je broj sveže bujonske kulture potencijalnih probiotskih bakterija određen metodom razređenja. Pomoću Stratagene System programa određena je korelacija između Ct vrednosti i broja živih ćelija, određenog metodom razređenja, odnosno cfu_{ml}^{-1} .

3.7.3. Određivanje probiotskih karakteristika potencijalnih probiotskih bakterija nakon sprej sušenja *in vitro* testovima

Sposobnost preživljavanja gastrointestinalnih uslova sprej sušenih potencijalnih probiotika *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 je ispitivana metodom simuliranih želudačnih i intestinalnih uslova, koja je prethodno navedena (Doleyres et al., 2004).

3.8. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta, sira od ultrafiltriranog mleka i crne čokolade

Nakon određivanja broja preživelih sprej sušenih ćelija i ispitivanja probiotskih karakteristika sprej sušenih potencijalnih probiotika *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8, na osnovu dobijenih rezultata za dalja ispitivanja odabran je *Lb. plantarum* 564.

S obzirom na to da su se dalja ispitivanja odnosila na ispitivanje vijabilnosti potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 u hrani i gastrointestinalnim uslovima, u ispitivanja je uključen i komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v (DSM 9843) kao kontrola. Komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v je inkapsulisan metodom sprej sušenja u istim uslovima kao i potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564.

3.8.1. Određivanje broja ćelija potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v

Broj probiotskih ćelija određivan je metodom razređenja iz svežih bujonskih kultura. Nakon inkubacije MRS bujona sa potencijalnom probiotskom bakterijom *Lb. plantarum* 564 i komercijalnom probiotskom bakterijom *Lb. plantarum* 299v na temperaturi od 37°C tokom 24 časa, 1 ml sveže bujonske kulture je zasejavan u 9 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0,86% NaCl). Odgovarajuće razređenje je zasejavano na MRS agar, nakon čega su petri šolje inkubirane u anaerobnim uslovima pomoću Gas Pak sistema (BBL, Nemačka) na temperaturi od 37°C tokom 48 h. Takođe, broj ćelija sprej sušenog komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v je određivan pomoću metode razređenja koja je prethodno opisana za sprej sušene potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8.

3.8.2. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta

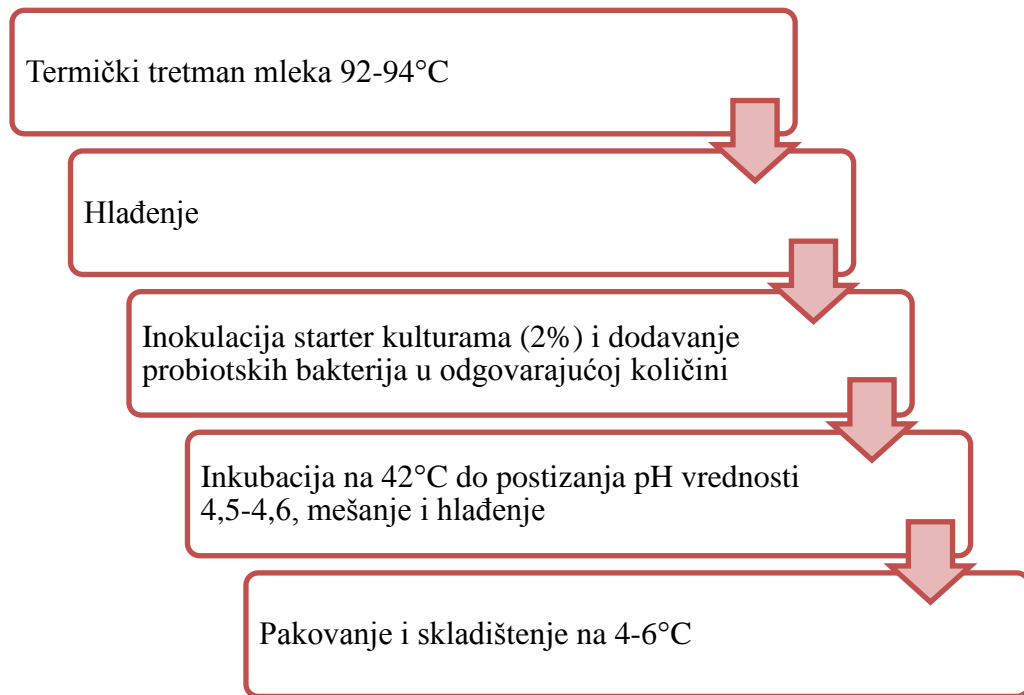
Tehnološki postupak proizvodnje jogurta sa slobodnim i inkapsulisanim ćelijama probiotskih bakterija prikazana je na šemi 2. Mleko koje je korišćeno u proizvodnji jogurta je dobijeno od mlekare „Granice“, Mladenovac.

Proizvedeno je 5 varijanti jogurta:

- **JK**-kontrolna varijanta sa jogurnim kulturama *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Chr. Hansen, Danska);
- **J564**-varijanta jogurta sa jogurnim kulturama i 0,2% svežeg bujonskog inokuluma potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564
- **JSS564**-varijanta jogurta sa jogurnim kulturama i sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564, pri čemu je dodavano 1 g praha/L kako bi se postigao neophodan broj probiotskih ćelija
- **J299v**-varijanta jogurta sa jogurnim kulturama i 0,2% inokuluma komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v
- **JSS299v**-varijanta jogurta sa jogurnim kulturama i sprej sušenim komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564, pri čemu je dodavano 1 g praha/L kako bi se postigao neophodan broj probiotskih ćelija

Za proizvodnju jogurta korišćeno je mleko sa 2,8% mlečne masti, koje je pasterizovano na temperaturi od 92-94°C, nakon čega je hlađeno. Na temperaturi od 40°C dodavane su jogurtne starter kulture u koncentraciji od 2%, kao i probiotske bakterije u odgovarajućim količinama i to: 0,2% svežeg bujonskog inokuluma (varijante J564 i J299v) i 1 g/L praha sprej sušenih probiotskih bakterija (varijante JSS564 i JSS299v). Nakon dodavanja starter kultura i probiotskih bakterija, vršena je fermentacija na temperaturi od 42°C do postizanja pH vrednosti od 4,5-4,6, nakon čega je vršeno mešanje i hlađenje jogurta. Nakon hlađenja, uzorci jogurta su skladišteni tokom 3 nedelje na 4°C.

Šema 2. Proizvodnja jogurta sa probiotskim bakterijama

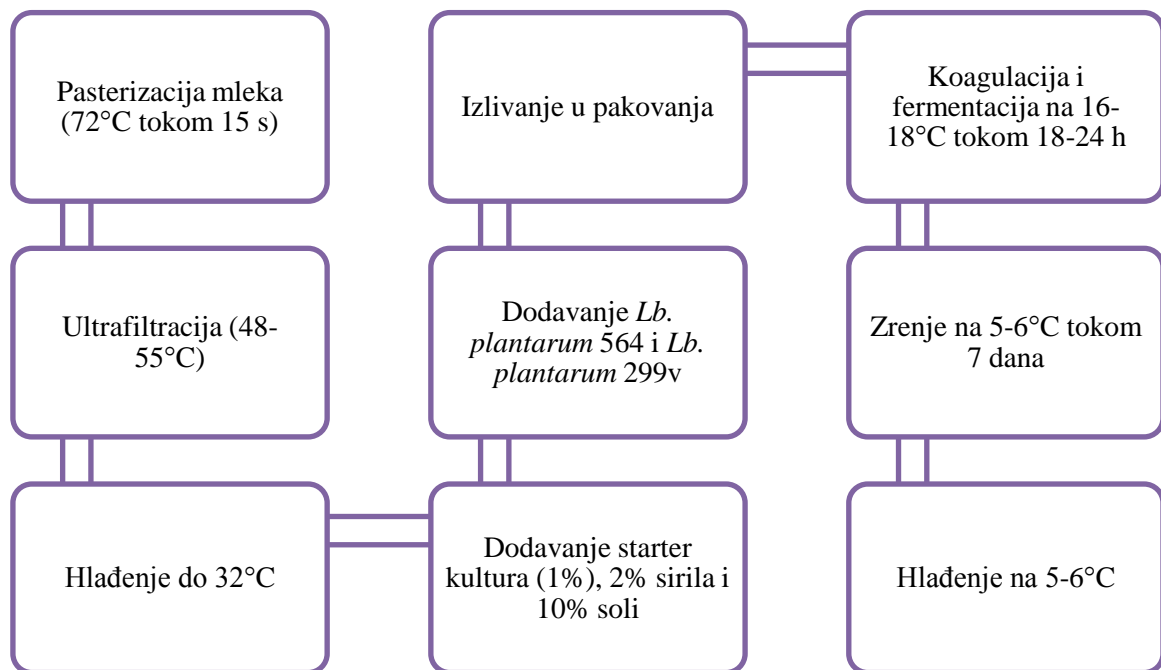


3.8.3. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji sira od ultrafiltriranog mleka

Proizvodnja sira od ultrafiltriranog mleka sa dodatkom slobodnih i inkapsulisanih ćelija probiotskih bakterija vršeno je u modifikovanim industrijskim uslovima u mlekari „Granice“ u Mladenovcu.

Postupak proizvodnje sira od UF mleka sa probiotskim bakterijama je prikazan na šemi 3. Mleko je pasterizovano na temperaturi od 72°C tokom 15 sekundi. Pasterizovano mleko sa 3,2% mlečne masti je ultrafiltrirano na temperaturi od 48-55°C, do postizanja odgovarajućeg stepena koncentrovanja mleka. Završetak ultrafiltracije je određen talogom retentata. Nakon procesa ultrafiltracije, u ohlađeni retentat na temperaturi od 32°C dodato je 1% starter kulture *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* i *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Chr. Hansen, Danska), 2% sirila i 10% soli. Nakon toga, dodato je 1% sveže bujonske kulture probiotskih bakterija, kao i 10 g/L retentata sprej sušenih probiotskih bakterija. Nakon toga, retentat sa dodatim starterima i probiotskim bakterijama je razliven u odgovarajuća pakovanja, nakon čega je vršena koagulacija i fermentacija na temperaturi od 16-18°C tokom 18-24 časova. Zrenje sireva je vršeno na temperaturi od 5-6°C tokom 7 dana, nakon čega su uzorci skladišteni na temperaturi od 4°C tokom 56 dana.

Šema 2. Proizvodnja sira od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama



Kao i kod jogurta sa probiotskim bakterijama, proizvedeno je 5 varijanti sireva od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama:

- **SK**-kontrolna varijanta sira koja je sadržala starter kulture *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* i *Lactococcus lactis* ssp. *lacti* (Chr. Hansen, Danska)

- **S564**-varijanta sira sa dodatkom 1% svežeg bujanskog inokuluma slobodnih ćelija potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564
- **SSS564**-varijanta sira sa dodatkom 10 g/kg praha sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564
- **S299v**-varijanta sira sa dodatkom 1% svežeg bujanskog inokuluma slobodnih ćelija komercijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 299v
- **SSS299v**-varijanta sira sa dodatkom 10 g/kg praha sprej sušenog komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v

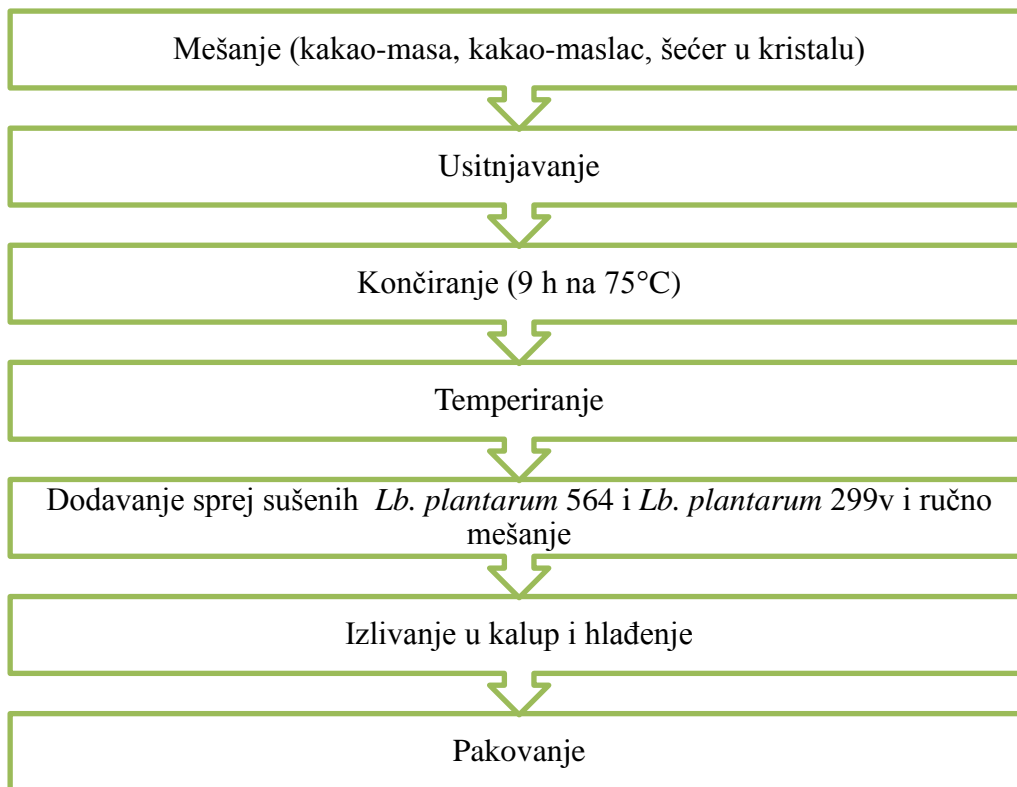
3.8.4. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji crne čokolade

Crna čokolada sa 70% kakao delova sa dodatkom sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v proizvedena je u poluindustrijskim uslovima, modifikovanim postupkom proizvodnje crne čokolade. Crne probiotske čokolade su proizvedene u „Soko Štaku“, Beograd, a postupak proizvodnje je prikazan na šemi 4.

Proces proizvodnje crne probiotske čokolade je obuhvatio standardni postupak proizvodnje crne čokolade, koji se sastoji od mešanja, usitnjavanja (rafinacije), končiranja, temperiranja, oblikovanja i hlađenja, pri čemu su određene faze u procesu proizvodnje modifikovane zbog primene probiotskih bakterija.

Nakon temperiranja, deo čokoladne mase je izdvojen s proizvodne linije kako bi se dodale probiotske bakterije. Sprej sušene probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v dodavane su u količini od po 10 g praha na 1 kg čokoladne mase, kako bi se postigao adekvatan broj probiotika, tj. 10^8 broj ćelija/g čokolade. Nakon dodavanja i mešanja probiotskih bakterija, čokoladna masa je ručno izlivena u odgovarajuće kalupe i ravnomerno raspoređena u kalupe stresavanjem i pomoću noža. Kalupi su prethodno bili oprani, obrisani i zagrejani na 26°C kako bi razlika u temperaturi između čokoladne mase i kalupa bila što manja.

Šema 3. Proizvodnja crne čokolade sa probiotskim bakterijama



Nakon izlivanja, kalupi su smešteni na hlađenje na temperaturu od oko 15°C tokom 15-20 min, nakon čega su ohlađene čokolade izvađene iz kalupa, mašinski upakovane u odgovarajuću ambalažu, odnosno lakiranu aluminijumsku foliju i štampanu ambalažu. Uzorci probiotske crne čokolade su skladišteni na sobnoj temperaturi.

3.9. Određivanje pH vrednosti jogurta i sira od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama

Merenje pH vrednosti je vršeno nakon proizvodnje, 7, 14. i 21. dana za jogurt, kao i 35. i 56. dana za sir od ultrafiltriranog mleka, pomoću pH-metra WRW Inolab (Nemačka). Merenje pH vrednosti je vršeno u tri ponavljanja.

3.10. Određivanje broja startera i probiotika u jogurtu, siru od ultrafiltriranog mleka i crnoj čokoladi

3.10.1. Određivanje broja starter kultura u jogurtu sa probioticima

U sterilnim uslovima je odmereno 20 g, odnosno ml, probiotskog proizvoda u Stomacher kesu, nakon čega je dodato 180 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0,86%) i homogenizovano u Stomacher aparatu (Lab Blender Stomacher 400, Seward, Engleska), pri čemu je dobijeno osnovno razređenje. Određivanje broja ćelija jogurtne starter kulture je vršeno zasejavanjem odgovarajućeg razređenja. Za određivanje broja *St. thermophilus* korišćen je M17 agar, pri čemu su petri šolje inkubirane na 42°C tokom 48 časova, dok je za određivanje broja *Lb. bulgaricus* ssp. *delbrueckii* korišćen MRS agar, pri čemu se inkubacija vršila na temperaturi od 42°C tokom 48 h u anaerobnim uslovima u GasPak sistemu (BBL, Nemačka). Svi uzorci su zasejavani u tri ponavljanja.

3.10.2. Određivanje broja starter kultura u siru od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama

Prilikom određivanja broja starter kultura *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* i *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, koje su korišćene u proizvodnji probiotskih sireva od UF mleka, odgovarajuće razređenje je preliveno sa M17 agarom, pri čemu se inkubacija vršila na temperaturi od 30°C tokom 48 časova. Svi uzorci su zasejavani u tri ponavljanja.

3.10.3. Određivanje broja probiotskih bakterija u jogurtu, siru od ultrafiltriranog mleka i crnoj čokoladi

Broj živih ćelija probiotskih bakterija u primenjenim proizvodima je određen metodom razređenja. Odmereno je 20 g ili ml probiotskog proizvoda u Stomacher kesu u sterilnim uslovima, a potom je dodato 180 ml sterilnog fiziološkog rastvora (0,86%). Nakon toga, osnovno razređenje je homogenizovano u Stomacher aparatu (Lab Blender Stomacher 400, Seward, Engleska).

Prilikom određivanja broja probiotskih bakterija u jogurtu, siru od UF mleka i crnoj čokoladi, odgovarajuće razređenje je preliveno MRS agarom, nakon čega je inkubirano

u anaerobnim uslovima u GasPak sistemu (BBL, Nemačka), na temperaturi od 37°C tokom 48 časova. Uzorci probiotskih proizvoda su zasejavani u tri ponavljanja.

3.11. Senzorna analiza probiotskih proizvoda

3.11.1. Jogurt sa probiotskim bakterijama

Senzorna analiza jogurta sa dodatkom slobodnih i sprej sušenih ćelija potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v je vršena korigovanim petobalnim bod sistemom (Radovanović i Popov-Raljić, 2001). Kao parametri ocenjivanja uzimani su u obzir izgled, boja, konzistencija, miris i ukus. Svaki parametar senzornog kvaliteta jogurta sa probiotskim bakterijama određen je koeficijentom važnosti (KV), pomoću kojeg se vršila korekcija parametra množenjem sa dobijenom ocenom. Koeficijenti važnosti za svaki parametar kod senzorne analize jogurta su iznosili: izgled-1, boja-2, konzistencija-4, miris-10 i ukus-3. Zbir dobijenih ocena koje su pomnožene sa odgovarajućim KV predstavlja procenat od maksimalnog kvaliteta, koji predstavlja pokazatelj ukupnog senzornog kvaliteta proizvoda.

Sve varijante jogurta sa probiotskim bakterijama, uključujući i kontrolnu varijantu bez probiotskih bakterija, senzorno su ocenjivane od strane 5 ocenjivača koji su prošli obuku za senzorno ocenjivanje (ISO 8586-1:1993 i ISO 8586-2: 1994), pri čemu se raspon ocena kretao od 1,00 do 5,00, sa mogućnošću davanja poluboda. U tabeli 4 prikazan je ocenjivački listić s parametrima senzornog ocenjivanja jogurta, kao i odgovarajući koeficijenti važnosti.

Senzorna analiza svih varijanti jogurta je rađena neposredno nakon proizvodnje, potom nakon 7, 14. i 21. dana skladištenja. Svi uzorci su bili označeni i posluženi u belim čašicama.

Tabela 4. Izgled ocenjivačkog listića za jogurt

Parametri senzornog kvaliteta	Koeficijent važnosti	Ocena
Izgled	1	
Boja	2	
Konzistencija	4	
Ukus	10	
Miris	3	

3.11.2. Sir od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama

Prilikom senzorne analize sira od UF mleka sa dodatkom slobodnih i inkapsuliranih ćelija potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v, korišćen je petobalni bod sistem, kao i kod jogurta sa probiotskim bakterijama. Ocenjivali su se izgled, boja, konzistencija, miris i ukus, pri čemu su KV iznosili 1, 2, 4, 10 i 3, redom.

Svi ostali uslovi senzornog ocenjivanja su bili identični kao i prilikom ocenjivanja jogurta sa probiotskim bakterijama. Svi uzorci sireva su ocenjivani 7, 14, 21, 35 i 56 dana skladištenja, pri čemu su sve varijante bile označene. U tabeli 5 prikazan je ocenjivački listić za senzorno ocenjivanje sireva od UF mleka s parametrima senzornog kvaliteta i koeficijentima važnosti.

Tabela 5. Izgled ocenjivačkog listića za sir od ultrafiltriranog mleka

Parametri senzornog kvaliteta	Koeficijent važnosti	Ocena
Izgled	1	
Boja	2	
Konzistencija	4	
Ukus	10	
Miris	3	

3.11.3. Crna čokolada sa probiotskim bakterijama

Senzorna ocena crne čokolade sa dodatkom potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v rađena je primenom modifikovane senzorne metode ocenjivanja čokolade Popov-Raljić i Laličić-Petronijević (2009). Senzorna analiza probiotske crne čokolade rađena je po parametrima koji su navedeni u tabeli 6. Zbir svih koeficijenata važnosti kod senzorne ocene čokolade iznosi 20, pri čemu svaki koeficijent važnosti ima svoju vrednost u zavisnosti od njegovog uticaja na ukupan senzorni kvalitet crne čokolade. Probiotska crna čokolada je senzorno ocenjena nakon 60 i 180 dana skladištenja.

Probiotske crne čokolade, kao i kontrolni uzorak bez probiotika, ocenjeni su od strane stručnog tima za kontrolu kvaliteta „Soko Štarka“, Beograd. Ukupno 7 ocenjivača je ocenjivalo crne čokolade sa i bez dodatka probiotskih bakterija, pri čemu je korišćen bodovni raspon od 1 do 5, sa mogućnošću davanja pola boda. Koeficijenti važnosti svakog parametra su navedeni u tabeli 6. Ukupni senzorni kvalitet probiotske crne čokolade predstavljen je procentom od maksimalnog kvaliteta, koji se izračunava na isti način kao i kod sira i jogurta.

Tabela 6. Parametri senzorne ocene crne probiotske čokolade

Senzorno svojstvo kvaliteta		KV	Komentar
IZGLED	Boja Sjaj Oblik Površina	2,0	5-Svojstven oblik i struktura (prema udelu kakao-delova), površina glatka i sjajna, jasna gravura
			4-Neznatno odstupanje od svojstvenog oblika, boje i površine, gravura slabije izražena
			3-Primetno odstupanje od svojstvenog oblika, boje i sjaja, na površini primetni otisci prstiju uz prisustvo vidljivih mehurića
			2-Jasno izraženo odstupanje od svojstvenog oblika i sjaja, površina delimično siva ili bela, prisustvo strugotina
			1-Jako izraženo odstupanje od svojstvenog oblika-deformisan oblik, površina siva ili bela, jača oštećenja, gravura izuzetno slaba
TEKSTURA	Mehanička svojstva Tvrdoća Lomljivost Žvakljivost Adhezivnost	2,0	5-Svojstvena čvrstoća i ujednačen, krt prelom, svojstvena žvakljivost i neprionjivost
			4-Neznatno odstupanje od svojstvene čvrstoće i preloma, vrlo dobra žvakljivost, neznatna prionjivost
			3-Primetno odstupanje od svojstvene čvrstoće i preloma uz prisustvo mehurića vazduha na preseku, dobra žvakljivost, primetno jača prionjivost
			2-Jasno izraženo odstupanje od svojstvene čvrstoće i preloma uz pojavu sivljenja, jasno izražena mrvljivost i prionjivost, zadovoljavajuća žvakljivost
			1-Jako izražena tvrdoća i mrvljivost uz izraženo sivljenje na prelomu, izrazito loša žvakljivost i izrazito jaka prionjivost
	Geometrijska svojstva Zrnastost	2,5	5-Svojstvena zrnastost ili odsustvo zrnastosti-svojstvena glatka tekstura
			4-Neznatno odstupanje od svojstvene zrnastosti
			3-Primetno odstupanje od svojstvene zrnastosti
			2-Jasno izražena zrnastost ili peskovitost
			1-Jako izražena zrnastost ili peskovitost-jako izražena gruba tekstura
	Površinska svojstva Vlažnost Masnost	0,5	5-Bez površinski izdvojene vode/masti
			4-Neznatno izdvajanje vode/masti na površini
			3-Primetno izdvajanja vode/masti na površini
			2-Jasno izraženo izdvajanje vode/masti na površini
			1-Jako izraženo izdvajanje vode/masti na površini
	Ostala dinamička svojstva Topivost	0,5	5-Svojstvena, postepena topivost
4-Neznatno odstupanje od svojstvene, postepene topivosti			
3-Primetno odstupanje od svojstvene, postepene topivosti			
2- Jasno izraženo odstupanje od svojstvene, postepene topivosti			
1-Jako izraženo odstupanje od svojstvene, postepene topivosti-vrlo spora ili vrlo brza topivost			
AROMA	Miris	4,0	5-Svojstven, zaokružen, aromatičan miris
			4-Svojstven, slabije zaokružen, aromatičan miris
			3-Svojstven, slabo zaokružen, slabo aromatičan
			2-Nije svojstven, kiselkast, ustajao miris
			1-Strani, kiseo, ustajao, plesniv miris
	Ukus	7,0	5-Svojstven, zaokružen, aromatičan ukus
			4-Svojstven, slabije zaokružen, aromatičan ukus
			3-Slabo zaokružen, slabo aromatičan ukus
			2-Slabo kiseo, nije zaokružen miris
			1-Strani, kiseo, gorak ukus

3.12. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja probiotskih bakterija u gastrointestinalnim uslovima-*in vivo* studija

Nakon primene sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i sprej sušenog komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v u proizvodnji jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade, kao sledeći korak u ispitivanju probiotskih karakteristika je bila *in vivo* studija. U *in vivo* studiji je učestvovalo 40 volontera koji su konzumirali probiotske proizvode sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 i komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v. U studiji su učestvovali volonteri koji nemaju dijagnostiranu bilo koju intestinalu bolest, alergiju na gluten ili bilo koje sastojke ispitivanih namirnica. Takođe, volonteri koji su koristili antibiotike u prethodnih 6 nedelja su isključeni iz studije. Tokom trajanja studije, volonterima je bilo zabranjeno konzumiranje drugih probiotskih bakterija, bilo u obliku hrane ili farmaceutskih preparata.

Formirane su 2 grupe od po 10 volontera koji su tokom 14 dana konzumirali prehrambene proizvode sa dodatkom probiotskih bakterija u odgovarajućim količinama. Pored prehrambenih proizvoda sa dodatkom probiotskih bakterija, u *in vivo* studiji bilo je uključeno i konzumiranje praha sprej sušenih probiotskih bakterija, koji su predstavljali probiotike kao farmaceutske proizvode. Svaki volonter je konzumirao sva četiri probiotska proizvoda, s tim što je između konzumiranja proizvoda pravljena pauza od po 3 meseca, kako bi se volonter u potpunosti očistio od probiotika. Usled nepredviđenih okolnosti, bolesti ili korišćenja antibiotika, pojedini volonteri su bili isključeni iz studije i zamenjeni sa novim volonterima.

Volonteri su dnevno konzumirali probiotske bakterije u sledećim količinama:

1. 0,1 g praha sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 ili komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v razređenog u vodi
2. 20 g crne čokolade sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 ili komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v
3. 30 g sira od ultrafiltriranog mleka sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 ili komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v
4. 200 ml fermentisanog jogurta sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 ili komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v

Rezultati ispitivanja vijabilnosti probiotskih bakterija u primenjenim proizvodima su pokazali da volonteri treba da dnevno konzumiraju navedene količine proizvoda, kako bi unosili probiotske bakterije na nivou 10^9 ćelija/dnevno.

3.12.1. Mikrobiološka analiza fecesa

Tokom trajanja *in vivo* studije, volonterima je uziman uzorak fecesa pre i nakon 14 dana konzumiranja odgovarajuće namirnice. Uzorci fecesa su čuvani na niskoj temperaturi i transportovani na analizu istog dana.

Mikrobiološkom analizom fecesa određivan je ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija na BHI agaru, koji se sastoji od: substrata kulture (moždano-srčani ekstrakt i pepton) 27,5g/L, glukoza 2,0 g/L, natrijum hlorid 5,0 g/L, di-natrijum hidrogen fosfat 2,5 g/L i agar-agar 15g/L (Merck, Francuska). Inkubacija je vršena na 30°C tokom 72 h, dok je ukupan broj anaerobnih mezofilnih bakterija određivan na BHI agaru inkubacijom na 30°C tokom 72 časova u anaerobnim uslovima u GasPak sistemu (BBL, Nemačka). Ukupan broj *Enterobacteriaceae* je određen na VRBG agaru koji sadrži: enzimska digestija želatina 7,0 g/L, ekstrakt kvasca 3,0 g/L, dekstroza 10,0 g/L, žučne soli 1,5 g/L, natrijum hlorid 5,0 g/L, neutralna crvena 0,03 g/L, kristalno ljubičasta 0,002 g/L i agar-agar 15 g/L (Merck, Francuska). Petri šolje su inkubirane na 37°C tokom 24 časa. Ukupan broj *Enterococcus* sp. određivan je na podlozi Slantzey-Bartley koja sadrži: triptozu 20 g/L, ekstrakt kvasca 5,0 g/L, glukozu 2,0 g/L, di kalijum hidrogen fosfat 4,0 g/L, natrijum azid 0,4 g/L, tetrazolijum hlorid 0,1 g/L i agar-agar 10 g/L (Merck, Francuska). Petri šolje su tokom 24 časa inkubirane na 37°C. Ukupan broj sulfitoreduksijskih klostridija je određen inkubacijom odgovarajućeg razređenja na gvožđe sulfitnom agaru koji se sastoji od: triptona 10,0 g/L, natrijum sulfita 0,5 g/L, gvožđe (III) citrata 0,5 g/L i agar-agar 12 g/L (HI media, Indija). Petri šolje su inkubirane u anaerobnim uslovima u Gas Pak sistemu (BBL, Nemačka) i inkubirane na 37°C tokom 72 časa. Ukupan broj štapićastih bakterija mlečne kiseline je određivan na Rogosa agaru koji sadrži: pepton iz kazeina 10 g/L, ekstrakt kvasca 5,0 g/L, glukozu 2,0 g/L, kalijum dihidrogen fosfat 6,0 g/L, amonijum citrat 2,0 g/L, Tween® 80 1,0 g/L, natrijum acetat 15 g/L, magnezijum sulfat 0,575 g/L, gvožđe (II) sulfat 0,034 g/L, mangan sulfat 0,12 g/L i agar-agar 15 g/L (Merck, Francuska). Inkubacija petri šolja je

vršena na 37°C tokom 72 časa u anaerobnim uslovima u GasPak sistemu (BBL, Nemačka) (Johansson et al., 1993).

Ispitivanje sposobnosti preživljavanja sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564, odnosno da li se navedeni probiotik nalazi u fecesu volontera vršeno je izolacijom laktobacila s petri šolja sa Rogosa agarom. Ukoliko je navedeni probiotik preživeo sve ulove GI trakta, potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 bi trebao da se pronade među izolovanim kolonijama laktobacila. Zbog toga je iz uzoraka fecesa volontera nakon konzumiranja probiotskog proizvoda, s petri šolja sa Rogosa agarom, nasumice pikirano 10 pojedinačnih kolonija laktobacila. Uzimane su u obzir petri šolje na kojima je izraslo oko 200-300 kolonija. Izolati su potom prečišćeni metodom iscrpljenja i bojeni po Gramu. Nakon dobijanja čiste kulture, izolati su zamrznuti na -80°C sa 20% glicerola.

S obzirom na to da je za komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v utvrđeno da preživljava uslove GI trakt (Johansson et al., 1993, 1998), navedeni probiotik je predstavljao kontrolu u prethodno navedenim ispitivanjima.

3.12.2. Izolacija DNK laktobacila iz fecesa

Iz čistih kultura izolata laktobacila izolovanih iz fecesa volontera nakon konzumiranja probiotskog proizvoda izvršena je izolacija DNK (Ahrne et al., 2005). Kolonije izolovanih laktobacila sa Rogosa agara su rastvarane u 1 ml Mili-Q vode, nakon čega je vršeno centrifugiranje na 14000 rpm tokom 2 minuta. Nakon centrifugiranja, supernatant je odlivan, a pelet je ispran sa 1 ml Mili-Q vode i centrifugiran pod istim uslovima. Postupak ispitivanja peleta je ponovljen 2 puta. Nakon centrifugiranja, pelet je resuspendovan u 250 µl Mili-Q vode. Potom je dodato 8-12 staklenih kuglica (prečnika 2mm) (Karl Roth, SAD), nakon čega su uzorci tretirani u Thermomixeru (Eppendorf, Nemačka) pri brzini od 1200 rpm, tokom 30 minuta na temperaturi od 4°C. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 2 min na 14000 rpm, a u supernatantu se nalazila ukupna DNK.

3.12.3. Molekularna metoda Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR)

Deo ispitivanja prisustva probiotskih bakterija među izolovanim laktobacilima je rađen na Odseku za tehnologiju hrane, inženjerstva i ishrane, Fakulteta inženjeringa LTH, Univerziteta u Lundu, Lund, Švedska, dok je drugi deo ispitivanja sproveden na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Pomoću molekularne metode RAPD ustanovljeno je prisustvo probiotskih bakterija među izolovanim laktobacilima iz fecesa. Metoda RAPD se vršila na termosajkleru Eppendorf (Nemačka) i Techne (UK). Master mix je sadržao 10 x PCR pufer sa 1,5 mM MgCl₂ (Kapabiosystem, SAD), 10 mmol svakog nukleotida (Kapabiosystem, SAD), 5 U/μl Taq DNA polimeraze (Kapabiosystem, SAD), 10 pmol RAPD prajmer sekvence 5'-ACGCGCCCT-3' i sterilnu Mili-q vodu. Dodavano je 2 μl supernatanta u 48 μl master mixa. Program RAPD se sastojao iz 4 ciklusa: 94°C tokom 45 s, 30°C tokom 120 s, 72°C tokom 60 s, nakon čega je sledilo 26 ciklusa koja su se sastojala od: 94°C tokom 5 s, 36°C tokom 30 s (s produžetkom od 1 s za svaki ciklus), 72°C tokom 30 s i 72°C tokom 10 minuta (Ahrne et al., 2005).

Nakon PCR reakcije, PCR produkti su vizualizovani na 1,5% agaroznom gelu sa 1 x TB puferom, pri čemu je gel bojen bojom Gel Red (VWR, SAD). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1 x TB pufer, pri čemu je elektroforeza tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. PCR produkti su nanošeni u bunariće gela u količini od 7μl. Gelovi su posmatrani i fotografisani pod UV transluminatorom (Biometra, Watman company, Nemačka).

U delu ispitivanja koja su sprovedena na Poljoprivrednom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, PCR produkti su vizualizovani pomoću kapilarne elektroforeze QIAxcel (Qiagen, SAD). Prilikom ispitivanja PCR produkta korišćen je High Resolution kit. Postupak pripreme PCR produkta se sastojao od nanošenja Separation buffer i Wash buffer u odgovarajuće odeljke, Aligment markera veličine 15 bp-1 kb i nanošenja minimum 15 μl PCR produkta u odgovarajuće tubice. Pomoću softvera Qiaxcel Screen Gel Software dobijane su fotografije gelova sa PCR produktima.

Nakon posmatranja gelova pomoću agarozne ili kapilarne elektroforeze, izolati laktobacila sa istim paternom (rasporedom bendova) kao i potencijalni probiotik *Lb.*

plantarum 564 ili komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v smatrani su da pripadaju istom soju, odnosno probiotiku koji su volonteri konzumirali (Johansson i sar., 1998).

3.13. Statistička obrada rezultata

Rezultati vijabilnosti starter kultura i probiotskih bakterija, kao i senzorna analiza su prikazani sa srednjom vrednošću±standardna devijacija, pri čemu su dobijene vrednosti izračunate u Microsoft Excel-u (2007). Statistička analiza podataka je urađena pomoću programa STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc, SAD), dok je ispitivanje statistički značajne razlike obavljeno ANOVA analizom, a razlike između srednjih vrednosti su testirane pomoću Fisher-ovog (LSD) testa značajne razlike. Za značajnu statističku razliku je uziman u obzir $p < 0,05$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Izolacija bakterija mlečne kiseline

Izolacija autohotnih bakterija mlečne kiseline izvršena je iz 5 uzoraka Pirotskog kačkavalja i iz 2 uzorka Sjeničkog sira. Pirotski kačkavalj je bio starosti 3, 6 i 9 meseci, dok je jedan uzorak Sjeničkog sira bio 1-2 meseca, a drugi 4-5 meseci starosti.

Iz obe vrste tradicionalnih sireva izolovan je ukupno 61 izolat laktobacila, od čega 21 termofilnih (14 iz Pirotskog kačkavalja i 7 iz Sjeničkog sira) i 40 mezofilnih laktobacila (22 iz Pirotskog kačkavalja i 18 iz Sjeničkog sira). Kod sireva koji su bili zreliji, izolovano je nešto manje sojeva, s obzirom na to da sa starošću broj bakterija mlečne kiseline opada.

4.2. Morfološke karakteristike

Izolovani laktobacili su bojeni po Gramu i mikroskopirani, pri čemu je ustanovljeno da su svi izolati G pozitivni štapići, koji su se javljali pojedinačno, u paru ili u lancima. Takođe, mikroskopiranjem izolata vršena je i provera čistoće kulture, pri čemu je primećeno da su svi izolati bile čiste kulture.

4.2.1. Katalaza test

Kao prvi test u ispitivanju i razdvajanju bakterija mlečne kiseline, urađen je katalaza test. Prilikom ispitivanja katalaza testa, ustanovljeno je da su od 61 izolata, koji su se pokazali kao čiste G pozitivne bakterije štapićastog oblika, 55 izolata bili katalaza negativni. Ostalih 6 izolata su bili katalaza pozitivni, zbog čega su eliminisani iz daljeg ispitivanja.

4.2.2. Fermentacija šećera

Ispitivanjem načina fermentacije šećera izolovanih laktobacila iz tradicionalnih sireva, utvrđeno je da li izolati vrše fermentaciju šećera homofermentativnim ili heterofermentativnim putem, odnosno da li pored zamućenja bujona dolazi i do izdvajanja gasa u Durham cevčici. Od 55 ispitivanih izolata, ustanovljeno je da 38 izolata fermentiše šećere homofermentativnim putem, dok preostalih 17 izolata fermentiše šećere heterofermentativnim putem (dolazi do izdvajanja gasa u Durham cevčici). S obzirom na to da je jedan od ciljeva istraživanja doktorske disertacije primena potencijalnih probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade, heterofermentativni izolati su isključeni iz daljeg ispitivanja, usled moguće produkcije CO₂, sirćetne ili mravlje iseline, koji mogu negativno da utiču na senzornu ocenu proizvoda.

Kod sireva proizvedenih na tradicionalan način, bez dodavanja starter kultura, prisustvo homofermentativnih i heterofermentativnih bakterija mlečne kiseline je uobičajen rezultat (Herrerros et al., 2003). Ukoliko se sirevi proizvode uz dodavanje starter kultura, prisustvo heterofermentativnih izolata se prepisuje nestarterskoj mikroflori. Međutim, tradicionalni sirevi poseduju znatno bogatiju mikrofloru, zbog čega je teško odrediti da li heterofermentativni izolati potiču od mleka, ukoliko nema termičkog tretmana, ili se spontano javljaju tokom zrenja.

4.2.3. Sposobnost rasta pri različitim temperaturama

Preostalih 38 izolata zasejano je na podloge i inkubirano na optimalnim temperaturama, nakon čega su ispitivani na rast na temperaturama od 15°C i 45°C. Rezultati ispitivanja sposobnosti rasta na različitim temperaturama su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Sposobnost rasta izolata na različitim temperaturama

Izolati	Broj	15°C		45°C	
		+*	++	+	++
Mezofilni	23		20	7	9
Termofilni	15	3	12	2	13

*Intezitet rasta u bujonu: + slab rast, ++ dobar rast

Svi izolati su pokazali rast na temperaturi od 15°C, dok je na temperaturi inkubacije od 45°C izostao rast pojedinih izolata (7 izolata). Primećeno je da su pojedini mezofilni izolati pokazali slab rast na temperaturi od 45°C (9 izolata), dok su pojedini termofilni izolati pokazali slab rast na temperaturi od 15°C (3 izolata). Isto tako, termofilni izolati su pokazali vrlo dobar rast na temperaturi od 45°C (13 izolata).

Nakon proizvodnje jogurta i sira od UF mleka, oba proizvoda se skladište na temperaturi frižidera, zbog čega su 3 izolata koja su pokazala slab rast na temperaturi od 15°C eliminisana iz daljeg ispitivanja. Pored toga, u proizvodnji crne čokolade su zastupljene visoke temperature, zbog čega je 7 izolata koji nisu pokazali rast na temperaturi od 45 °C isključeno iz daljeg ispitivanja. Sveobuhvatno, 10 izolata je isključeno iz daljeg ispitivanja.

Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje vrlo raznolike mikroflore tradicionalnih sireva, što je primećeno i u ranijim ispitivanjima autohtonih bakterija mlečne kiseline (Veljović et al., 2007; Nikolić et al., 2008; Radulović et al., 2012d). Međutim, pojedini izolati su rasli i na temperaturama koje nisu optimalne za njihov rast, što ukazuje na prisustvo “divljih” sojeva, koji mogu da odstupaju od predviđenih granica za njihove vrste (Callon et al., 2004).

4.2.4. Sposobnost rasta u različitim koncentracijama soli

U tabeli 8 su prikazani rezultati ispitivanja sposobnosti rasta u različitim koncentracijama soli, odnosno u bujonima sa 2%, 4% i 6,5% soli. Posmatrajući rezultate, može se primetiti da su svi izolati pokazali rast u bujonu sa 2% soli. Međutim, prilikom ispitivanja rasta u bujonu sa 4% soli ustanovljeno je da 6 izolata nije pokazalo rast, dok su 4 izolata pokazala nešto slabiji rast na navedenoj koncentraciji soli.

Tabela 8. Sposobnost rasta izolata na različitim koncentracijama soli

Izolati	Broj	2% soli		4% soli		6,5% soli	
		+*	++	+	++	+	++
Mezofilni	17	1	16	2	11	5	1
Termofilni	11		11	2	7		4

*Intezitet rasta u bujonu: + slab rast, ++ dobar rast

U bujonu sa 6,5% soli, porast je pokazalo 10 ispitivanih izolata, pri čemu je 5 izolata pokazalo slab rast. Prikazani rezultati ukazuju da generalno većina izolata dobro podnosi veći procenat soli.

U literaturnim podacima je pronađeno da pojedini sojevi laktobacila mogu da podnesu i veće koncentracije od 8% soli (Dimitrijević-Branković, 1998). Takođe, dobijeni rezultati su u skladu s drugim autorima (Radulović, 2007; Nikolić et al., 2008).

Ispitivanje sposobnosti rasta izolata u većim koncentracijama soli je značajno za proizvodnju sireva, s obzirom na to da je kod pojedinih sireva zastupljena veća koncentracija soli. Kao što je već navedeno, prosečna vrednost sadržaja soli u kačkavalju je 2,2%, a u Sjeničkom siru 2,9%, tako da su dobijeni rezultati očekivani. Isto tako, kod sira od ultrafiltriranog mleka (Feta sir) prosečan sadržaj soli je 2,9%, što ukazuje da bi većina ispitivanih izolata mogla da se primeni u proizvodnji ovog sira. Međutim, pojedini izolati nisu pokazali rast u bujonu sa 4% soli ili su pokazali slab rast, zbog čega su isključeni iz daljeg ispitivanja (10 izolata).

4.2.5. Sposobnost produkcije egzopolisaharida

Od ukupno 28 izolata, sposobnost produkcije egzopolisaharida je ustanovljena kod 5 izolata laktobacila pomoću testa sa ezom. Sposobnost produkcije egzopolisaharida je veoma značajna za proizvodnju fermentisanih proizvoda od mleka, s obzirom na to da EPS imaju uticaj na viskozitet i teksturu proizvoda (Marshall i Rawson, 1999). U proizvodnji sireva, prisustvo EPS pozitivnih sojeva je nepoželjno u cilju dobijanja željene konzistencije, a uticaj EPS u proizvodnji čokolade do sada nije ispitivan.

S obzirom na to da je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio i uticaj potencijalnih probiotskih kultura na senzorne karakteristike jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade, izolati koji su EPS pozitivni su isključeni iz daljih ispitivanja.

4.2.6. Sposobnost rasta na različitim pH vrednostima

Prilikom ispitivanja rasta ispitivanih izolata u bujonima sa različitim pH vrednostima, ustanovljeno je da su 2 izolata pokazala veoma slab rast pri pH vrednosti 4. Ostali izolati su pokazali rast na bujonima sa pH vrednostima 4, 5 i 7. Budući da je jedan od ciljeva doktorske disertacije selekcija potencijalnih probiotskih bakterija izolovanih iz tradicionalnih sireva i njihova primena u proizvodnji prehrambenih proizvoda, navedena 2 izolata su isključena iz daljeg ispitivanja.

4.2.7. Acidogena sposobnost

Acidogena sposobnost bakterija mlečne kiseline je veoma bitna karakteristika, pogotovo onih bakterija koje se koriste kao starter kulture u proizvodnji različitih fermentisanih proizvoda, zbog čega predstavlja veoma bitnu tehnološku karakteristiku. Cilj ovog ispitivanja je bio da se ispita acidogena sposobnost ispitivanih izolata iz tradicionalnih sireva, kao jedna od osnovnih tehnoloških karakteristika autohtonih bakterija mlečne kiseline. Za određivanje acidogene sposobnosti korišćeno je 10% rekonstituisano obrano mleko, pri čemu se početna pH vrednost mleka kretala u rasponu od 6,45-6,50.

Rezultati ispitivanja acidogene sposobnosti su prikazani u tabeli 9, pri čemu su prikazani samo rezultati selektovanih izolata koji su, nakon ispitivanja tehnoloških karakteristika, korišćeni u daljim istraživanjima.

Od ukupno 11 izolata laktobacila, 5 izolata je posedovalo izrazitu acidogenu sposobnost, pri čemu su, nakon 24 časa inkubacije, pH vrednosti mleka bile u granicama od 4,4-4,8. Nešto slabiju acidogenu sposobnost sa pH vrednostima 4,9-5,0 je pokazalo 4 izolata laktobacila, a ostalih 2 izolata je vršilo sporu produkciju mlečne kiseline sa postignutim pH vrednostima od 5,0-6,1

Tabela 9. Acidogena sposobnost selektovanih izolata

pH	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h
16'	6,36	6,38	6,28	6,20	4,71
27''	6,34	6,37	6,35	6,17	5,00
50	6,30	6,35	6,27	6,20	4,95
71'	6,27	6,39	6,32	6,27	4,97
062-1	6,35	6,37	6,29	6,17	5,14
564	6,33	6,26	6,23	5,98	4,74
Z5	6,31	6,22	6,12	5,80	4,32
Z8	6,31	6,29	6,26	6,10	4,93
Z9	6,33	6,32	6,24	6,13	4,66

Prikazani rezultati ukazuju na to da skoro svi selektovani izolati imaju veoma dobru acidogenu sposobnost. Izolati K16 (izolat iz Pirotskog kačkavalja), Z5 i Z9 (izolati iz Sjeničkog sira) su pokazali veoma dobru acidogenu sposobnost, pri čemu se pH vrednost mleka nakon 24 časa kretala u rasponu od 4,3-4,7. Slabiju acidogenu sposobnost su pokazali izolati K27, K50 i K71 (izolati iz Pirotskog kačkavalja), pri čemu se pH vrednost mleka kretala u rasponu od 4,9-5,0. Izolat K621 je pokazao veoma sporo snižavanje pH vrednosti mleka, pri čemu je nakon 24 časa pH vrednost bila 5,14. S obzirom na to da laktobacili imaju slabiju acidogenu sposobnost u odnosu na laktokoke, dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjima drugih autora (Herrerros et al., 2003; Radulović, 2007).

U ovom istraživanju, dobijene pH vrednosti su u skladu s vrednostima koje su poželjne kod probiotskih bakterija. S obzirom na to da se probiotske bakterije uglavnom primenjuju kao dopunske kulture u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda, izražena acidogena aktivnost nije opredeljujući parametar za selekciju probiotika. Takođe, proces inkapsulacije dovodi do sporije acidogene aktivnosti od slobodnih probiotskih ćelija (Petrović, 2011; Mirković et al., 2014), zbog čega će inkapsulisane probiotske bakterije sa izrazitom acidogenom sposobnošću u proizvodnji prehrambenih proizvoda imati slabiju acidogenu sposobnost, usled čega neće ostvariti značajan uticaj na senzorni kvalitet prehrambenog proizvoda.

4.2.8. Sposobnost produkcije aromogenih jedinjenja

Pomoću reakcije Voges-Proskauera ispitivana je sposobnost produkcije aromogenog jedinjenja acetil-metil-karbinola. Rezultati ispitivanja su pokazali da ispitivani laktobacili ne poseduju sposobnost produkcije navedenog aromogenog jedinjenja. Ovakvi rezultati ispitivanja su i očekivani, s obzirom na to da su prethodna istraživanja pokazala da je produkcija aromogenih jedinjenja karakteristika rodova *Lactococcus* i *Leuconostoc*, koji mogu da produkuju acetate, diacetil, acetoin, itd. Međutim, u pojedinim istraživanjima laktobacili izolovani iz tradicionalnih proizvoda vršili su produkciju diacetila (Nikolić et al., 2008).

4.2.9. Proteolitička aktivnost

Ispitivanjima koja su sprovedena prethodnih godina jasno je ukazano značaj bakterija mlečne kiseline u razgradnji kazeina u mlečnim proizvodima. Ispitivanjem proteolitičke sposobnosti jednostavnim metodom pomoću mlečnog agara, ustanovljena je tendencija izolata u proteolizu kazeina u mleku. Prisustvo prosvetljene zone oko kolonije ispitivanih izolata je ukazivalo na ekstracelularnu proteolitičku aktivnost. Od 13 preostalih ispitivanih izolata, 6 izolata je pokazalo prosvetljene zone oko kolonija. Intezitet zone je bio različit među ispitivanim izolatima, što može da ukaže na intezitet proteolitičke aktivnosti. Dalja ispitivanja proteolitičke aktivnosti pomoću, na primer, elektroforeze na SDS poliakrilamidnom gelu, svakako je potrebno radi određivanja inteziteta proteolitičke aktivnosti. Rezultati ispitivanja izolata iz Sjeničkog sira su pokazali da pojedini izolati laktobacila poseduju ekstracelularne enzime koji vrše razgradnju β -kazeina (Radulović, 2007). Izolati iz Pirotskog kačkavalja u prethodnim istraživanjima su takođe pokazali da vrše razgradnju kazeina (Radulović et al., 2012d). Autori Milesi et al. (2009) su ispitivali proteolitičku sposobnost potencijalnih probiotskih bakterija u proizvodnji tvrdih sireva, gde su ustanovili da pojedini sojevi vrše proteolizu i ne utiču na senzorne karakteristike sireva, dok pojedini sojevi vrše intezivniju proteolizu zbog čega utiču na karakterističan ukus tvrdih sireva.

S obzirom na to da je jedan od ciljeva rada primena selektovanih izolata u proizvodnji jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade, izražena proteolitička aktivnost nije bila

opredeljujući parametar za dalju primenu, pa je 6 izolata sa ekstracelularnom proteolitičkom aktivnošću eliminisano iz daljeg rada.

4.3. Identifikacija izolata

Na osnovu rezultata ispitivanja tehnoloških karakteristika 38 izolata izolovanih iz Pirotskog kačkavalja i Sjeničkog sira, za dalja ispitivanja selektovano je 5 izolata iz Pirotskog kačkavalja, koji su obeleženi kao K16, K27, K50, K71 i K621. S obzirom na to da iz 2 uzorka Sjeničkog sira iz kojih je rađena izolacija laktobacila, nije bilo izolata sa tehnološkim karakteristikama od značaja, izolatima iz Pirotskog kačkavalja je priključeno 4 izolata 564, Z5, Z8, i Z9 iz Sjeničkog sira, koji pripadaju kolekciji kultura Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu. Izolati iz Sjeničkog sira su prethodno okarakterisani i identifikovani pomoću API sistema u istraživanju Radulović (2007). Dalja istraživanja su nastavljena sa 9 izolata iz Pirotskog kačkavalja i Sjeničkog sira, pri čemu su prvo identifikovani pomoću API sistema i molekularnih metoda.

4.3.1. API sistem

Za identifikaciju selektovanih izolata korišćen je API sistem 50CH. Očitavanje rezultata je sprovedeno u API Lab plus softveru sa tačnošću 96,4 do 100%. U tabeli 10 su prikazani rezultati ovog ispitivanja.

Tabela 10. Rezultati identifikacije selektovanih laktobacila API sistemom

Selektovani izolati	Rezultati identifikacije API 50 CH
K16	<i>Lactobacillus brevis</i>
K27	<i>Lactobacillus brevis</i>
K50	<i>Lactobacillus plantarum</i>
K71	<i>Lactobacillus brevis</i>
K621	<i>Lactobacillus casei</i>
564	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Z5	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Z8	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Z9	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Na osnovu prikazanih rezultata može se ustanoviti da API sistem ima veoma mali opseg razlikovanja vrsta BMK, s obzirom na to da je od 5 selektovanih izolata iz Pirotskog kačkavalja 4 identifikovano kao *Lb. brevis*. U prethodnim ispitivanjima je ukazano da API sistem nije pouzdan metod za identifikaciju BMK, budući da nema mogućnost razlikovanja određenih vrsta BMK koje imaju veoma slične sposobnosti fermentacije šećera (De Vuyst i Vancanneyt, 2007). Selektovani izolati iz Sjeničkog sira su pomoću API sistema identifikovani kao *Lb. paracasei* 564, *Lb. paracasei* Z8, *Lb. casei* Z5 i *Lb. plantarum* Z9.

Rezultati ispitivanja karakteristične mikroflore tradicionalnih sireva ukazuju na prisustvo pretežno *Lb. casei* i *Lb. plantarum*, ali i *Lb. paracasei* vrsta (Centeno et al., 1995; Martinović et al., 2005; Terzić-Vidojević et al., 2007; Golić et al., 2013). Smatra se da navedene vrste ostvaruju ulogu u proteolitičkim promenama tokom kasnih faza zrenja sireva, što doprinosi karakterističnom ukusu sireva (Williams et al., 2001). Vrsta *Lb. brevis* je takođe prisutna u različitim fazama zrenja sireva (Corroler et al., 1998). Međutim, može se reći da svaka vrsta ima svoju specifičnu ulogu u biohemijskim promenama, produkciji aromogenih jedinjenja, itd. tradicionalnih sireva, pri čemu su pojedine vrste značajne u početnim, a neke u kasnijim fazama zrenja.

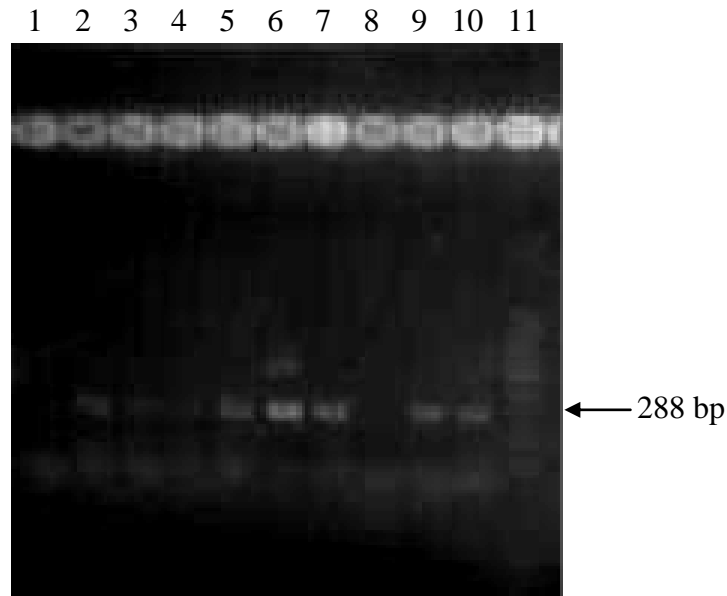
Nakon identifikacije selektovanih izolata molekularnim metodama, rezultati identifikacije biće različiti u odnosu na rezultate API sistema, što će potvrditi nepouzdanost API sistema. Shodno tome, API sistem je pogodnije koristiti za određivanje biohemijskih karakteristika bakterija mlečne kiseline.

4.3.2. Identifikacija selektovanih izolata pomoću PCR metode

Nakon identifikacije pomoću API sistema, selektovani izolati su dalje identifikovani molekularnim metodama. Selektovani izolati su identifikovani pomoću PCR reakcije sa specifičnim prajmerima. Prvo se vršila identifikacija *Lactobacillus* vrsta koje su najčešće prisutne u tradicionalnim srpskim sirevima, odnosno Pirotskom kačkavalju i Sjeničkom siru (Topisirović et al., 2006; Radulović et al., 2007, 2012d; Golić et al., 2013).

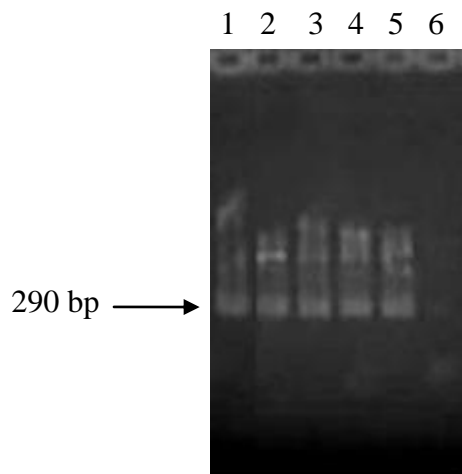
Prilikom identifikacije, prvobitno se krenulo sa identifikacijom pomoću specifičnih prajmera za *Lb. casei* vrstu. Međutim, ni jedan selektovani izolat nije amplifikovao specifični gen za *Lb. casei* vrstu (slika nije prikazana). Nakon toga, selektovani izolati su identifikovani za *Lb. plantarum* vrstu. Na slici 3 prikazan je gel sa PCR produktima sa specifičnim prajmerima za *Lb. plantarum*.

Na osnovu slike gela (slika 4) može se ustanoviti da su izolati 564, Z5, Z9, K16 i K50 amplifikovali specifični gen za *Lb. plantarum* vrstu (Walter et al., 2000) i dali produkt od 288 bp. Kao pozitivna kontrola korišćen je *Lb. plantarum* IM 112 (Kolekcija Laboratorije za probiotike, Odsek za zootehniku, Biotehnički fakultet, Univerzitet u Ljubljani).



Slika 4. Agarozni gel sa selektovanim izolatima sa prajmerima za *Lb. plantarum* vrstu
 1. Izolat K27; 2. Izolat K16; 3. Izolat K71; 4. Izolat K621; 5. Izolat K50; 6. Izolat 564,
 7. Izolat Z5; 8. Izolat Z8; 9. Izolat Z9; 10. Pozitivna kontrola *Lb. plantarum* IM 112; 11.
 DNK leder

S obzirom na to da sojevi K27, K71, K621 i Z8 nisu amplifikovani specifični gen za *Lb. plantarum* vrstu, oni su dalje ispitani za *Lb. paracasei* vrstu sa specifičnim prajmerima Y2 i Para1. Gel sa PCR produktima za *Lb. paracasei* vrstu je prikazan na slici 5.



Slika 5. Agarozni gel sa selektovanim izolatima sa prajmerima za *Lb. paracasei* vrstu
 1. Izolat K27; 2. Izolat K71; 3. Izolat K621; 4. Izolat Z8; 5. Pozitivna kontrola *Lb. paracasei* IM; 6. Negativna kontrola

Selektovani sojevi K27, K71, K621 i Z8 su amplifikovali specifični gen za *Lb. paracasei* vrstu s navedenim prajmerima i na osnovu produkta od 290 bp pokazali su da

pripadaju navedenoj vrsti (Ward i Timmis, 1999). U tabeli 11 prikazani su rezultati identifikacije selektovanih sojeva molekularnom metodom.

Tabela 11. Rezultati identifikacije selektovanih laktobacila PCR metodom

Selektovani izolati	Rezultati identifikacije
K16	<i>Lactobacillus plantarum</i>
K27	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K50	<i>Lactobacillus plantarum</i>
K71	<i>Lactobacillus paracasei</i>
K621	<i>Lactobacillus paracasei</i>
564	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Z5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Z8	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Z9	<i>Lactobacillus plantarum</i>

S obzirom na to da je soj *Lb. plantarum* 564 ranije identifikovan kao *Lb. paracasei* pomoću API testa i da je u pojedinim ispitivanjima primenjen kao ova vrsta (Radulović et al., 2010, 2011b, 2012b) vršeno je sekvenciranje soja, kako bi se potvrdila nova identifikacija soja. Korišćeni su prajmeri za 16S rRNK, 27f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) i 1495R (CTACGGCTACCTTGTTACGA) (Yu et al., 2011). Nakon PCR reakcije, PCR produkt je pripremljen za sekvenciranje, odnosno prečišćen je pomoću Qiagen Purification Kit (Qiagen, SAD), nakon čega je PCR produkt poslat na sekvenciranje u Macrogene (Holandija). Dobijene sekvence fragmenata za ispitivani soj su dalje analizirane korišćenjem NCBI baze podataka, odnosno BLAST programom za pretraživanje homologih nukleotidnih sekvenci (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Rezultati sekvenciranja su potvrdili da soj *Lb. plantarum* 564 pripada navedenoj vrsti.

Rezultati sekvenciranja *Lb. plantarum* 564 su najbolji način potvrde nepouzdanih rezultata API sistema. Takođe, identifikacijom pomoću API testa i izolati K16, K27, K50, K71 i K621, kao i Z5 identifikovani su drugačije. Međutim, s obzirom na to da je jedino soj *Lb. plantarum* 564 ranije identifikovan i korišćen u brojnim istraživanjima kao *Lb. paracasei* 564, samo za ovaj soj je urađeno sekvenciranje, kao potvrda identifikacije molekularnih metoda pomoću specifičnih prajmera.

Identifikacija autohtonih izolata iz tradicionalnih sireva, pomoću molekularnih metoda, i ranije se pokazala kao pouzdan metod identifikacije, što potvrđuju i rezultati istraživanja (Joković et al., 2008; Nikolić et al. 2008).

4.4. Probiotske karakteristike selektovanih izolata

4.4.1. Rezultati sposobnosti preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova *in vitro*

Prilikom ispitivanja potencijalnih probiotskih bakterija prvobitno se ispituje sposobnost preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova pomoću *in vitro* testova, kao jedan od najbitnijih probiotskih kriterijuma. Međutim, prava slika se stiče ispitivanjem potencijalnih probiotika u *in vivo* studiji, s obzirom na to da je gastrointestinalan trakt podložan promenama tokom životnog doba, u skladu sa ishranom, spoljašnjim stresovima, upotrebom antibiotika, itd.

Ispitivanje sposobnosti preživljavanja GI uslova selekcionisanih sojeva je sprovedeno *in vitro* studijom pri čemu su dva medijuma korišćena za simuliranje gastrointestinalnih uslova. U tabeli 12 prikazani su rezultati preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova selektovanih sojeva nakon sat vremena inkubacije na 37°C.

Tabela 12. Sposobnost preživljavanja selektovanih sojeva u simuliranim gastrointestinalnim uslovima

Selektovani sojevi	Početan broj ^a (log cfug ⁻¹)	Želudačni uslovi (log cfug ⁻¹)	Pad broja ćelija (log)	Intestinalni uslovi (log cfug ⁻¹)	Pad broja ćelija (log)
K16	9,34±0,05	8,5±0,17	0,84	8,5±0,19	0,84
K27	9,4±0,12	8,25±0,05	1,15	8,84±0,14	0,56
K50	9,19±0,2	8,06±0,2	1,13	8,62±0,26	0,57
K71	9,71±0,17	8,21±0,19	1,5	8,43±0,15	1,28
K621	9,45±0,03	8,08±0,16	1,4	8,74±0,18	0,71
564	9,61±0,12	8,61±0,15	1	8,6±0,16	1,01
Z8	9,27±0,05	8,75±0,2	0,52	8,68±0,18	0,59
Z5	9,94±0,15	8,64±0,21	1,3	8,78±0,11	1,16
Z9	9,38±0,02	8,8±0,1	0,58	8,8±0,19	0,58

^aSrednja vrednost±standardna devijacija nakon tri ponavljanja (p≥0,05)

Rezultati ispitivanja sposobnosti preživljavanja simuliranih GI uslova sojeva *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 su prikazani u ranijim ispitivanjima (Radulović et al., 2010).

Želudačni uslovi, gde su prisutne izrazito niske pH vrednosti od 2,5-3,0 predstavljaju prve nepovoljne uslove GI trakta. Međutim, u ovom slučaju se može uočiti da selekcionisani sojevi autohtonih BMK imaju veoma dobru sposobnost preživljavanja simuliranih želudačnih uslova nakon 60 minuta inkubacije na 37°C. Kod pojedinih sojeva, kao na primer *Lb. plantarum* 564, *Lb. plantarum* Z5, *Lb. paracasei* K621, *Lb. paracasei* K71, *Lb. plantarum* K50 i *Lb. paracasei* K27, došlo je do pada broja preživelih ćelija i do 1 log cfug⁻¹. Sojevi *Lb. paracasei* Z8 i *Lb. plantarum* Z9 su imali najmanji pad logaritamske vrednosti (0,52 i 0,58 log cfug⁻¹, redom), dok je najveći pad imao soj *Lb. paracasei* K71 (1,5 log cfug⁻¹). Charteris et al. (1998a) navode da se smanjenje broja ćelija do 30% u odnosu na početni broj ćelija može smatrati prihvatljivim padom broja ćelija za definisanje soja kao rezistentnog na želudačne uslove.

Nakon ispitivanja sposobnosti preživljavanja simuliranih želudačnih uslova, ustanovljeno je da selektovani sojevi dobro preživljavaju i intestinalne uslove GI trakta. Rezultati ukazuju da su selekcionisani sojevi nakon inkubacije u simuliranim intestinalnim uslovima na 37°C tokom 60 min pokazali veoma dobru sposobnost preživljavanja. Svi sojevi su imali smanjenje broja ćelija manje od 1 log cfug⁻¹. Najmanje smanjenje broja ćelija uočeno je kod soja *Lb. plantarum* Z9 (0,5 log cfug⁻¹), dok je najveći pad broja ćelija primećen kod soja *Lb. paracasei* K71 (1,2 log cfug⁻¹).

Rezultati ispitivanja su pokazali da je kod *Lb. plantarum* Z9 primećena dobra sposobnost preživljavanja želudačnih i intestinalnih uslova. Istraživanja su pokazala da *Lb. plantarum* sojevi veoma dobro preživljavaju simulirane GI uslove (Jensen et al., 2012). Takođe, Zago et al. (2011) su ispitivali sposobnost preživljavanja simuliranih GI uslova za 99 *Lb. plantarum* soja izolovanih iz italijanskih i argentinskih sireva. Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja simuliranih želudačnih uslova, nije primećena značajna razlika nakon 60 minuta inkubacije na pH vrednosti koja se smanjivala od 5,0-2,5. Međutim, kada je nakon 90 minuta inkubacije dostignuta pH 2,2, samo 9 sojeva je pokazalo dobru sposobnost preživljavanja. Nakon želudačnih uslova, 9 sojeva je prebačeno u simulirane intestinalne uslove koje su sadržali 0,3% žučnih soli i 0,1%

pankreatina. Nakon sat vremena inkubacije na 37°C, kod 6 sojeva nije došlo do redukcije broja ćelija i njihov broj je bio veći od 10^6 cfu ml^{-1} .

Ispitivanjem autohtonih laktobacila izolovanih iz argentinskih sireva, utvrđeno je da većina izolovanih laktobacila ne može da preživi 4 sata inkubacije pri pH vrednosti 2,0, ali da je najveći procenat preživljavanja zabeležen pri pH vrednosti 2,5 sa dodatkom 0,3% pepsina (Hermanns et al., 2014). Potencijalne probiotske bakterije *Lb. paracasei* 34 i *Lb. casei* 339 izolovane iz sireva, pokazale su dobru sposobnost preživljavanja želudačnih uslova pri pH vrednosti 2,5 nakon 45 minuta inkubacije (Monteagudo-Mera et al., 2012). Kod navedenih potencijalnih probiotskih bakterija, nije primećena redukcija broja ćelija nakon 180 minuta inkubacije pri pH 3,0.

Ispitivanje potencijalnih probiotskih karakteristika laktobacila izolovanih iz srpskih tradicionalnih sireva su takođe pokazala veoma dobre rezultate u preživljavanju simuliranih želudačnih uslova (Radulović et al., 2010).

Prethodna istraživanja probiotskih bakterija različitog porekla ukazuju da ne postoje značajne razlike u sposobnosti preživljavanja gastrointestinalnih uslova. Istraživanja su pokazala da kod probiotika *Lb. reuteri* DSM 20016 (humanog porekla) i *P. pentosaceus* Q3 (izolovanog iz raži) nije došlo do redukcije broja ćelija nakon 180 minuta inkubacije u želudačnim uslovima (Jensen et al., 2012). Navedena istraživanja pokazuju da potencijalne probiotske bakterije izolovane iz različitih proizvoda mogu da prežive simulirane gastrointestinalne uslove u odgovarajućem broju. Pored toga, pojedine potencijalne probiotske bakterije mogu značajno da variraju u svojim tolerancijama prema intestinalnim uslovima, pogotovo prema žučnim solima (Petrović, 2011).

Generalno posmatrajući rezultate *in vitro* ispitivanja, može se ustanoviti da selekcionisani sojevi veoma dobro preživljavaju niske pH vrednosti i prisustvo pepsina, kao i prisustvo pankreatina i žučnih soli. Iako su dobijeni rezultati pokazali veoma dobru sposobnost preživljavanja, *in vitro* studije ne predstavljaju pouzdan metod u ispitivanju probiotskih karakteristika, ali su svakako veoma dobar metod za selekcionisanje sojeva tolerantnih na nisku pH vrednost i žučne soli.

4.4.2. Osetljivost na antibiotike

4.4.2.1. Difuzni test

Rezistencija na antibiotike kod bakterija mlečne kiseline koje predstavljaju komensalne mikroorganizme nekog ekosistema, indikator je selektivnog pritiska koji BMK podnose u uslovima kontaminacije staništa antimikrobnim sredstvima (Radulović et al., 2012a). Veliki broj bakterija mlečne kiseline koji je prisutan u fermentisanim proizvodima sasvim sigurno pomaže u ostvarivanju različitih mehanizama rezistencija na antibiotike putem mutacija. Dodatno, BMK poseduju mobilne genetske elemente (plazmide i transpozone), koji omogućavaju horizontalan prenos i širenje gena rezistencije. Istraživanjima je potvrđeno prisustvo antibiotske rezistencije BMK na određene antibiotike kao što su eritromicin, ampicilin, tetraciklin, itd. koja može da se prenosi na druge bakterije (Danielsen, 2002; Gevers et al., 2003). Zbog toga je sasvim opravdan zahtev da se autohtone potencijalne probiotske bakterija mlečne kiseline izolovane iz tradicionalnih sireva ispituju na sposobnost prenosa rezistencije na antibiotike.

U tabeli 13 prikazani su rezultati difuznog testa osetljivosti selektovanih sojeva na različite antibiotike. Proizvođač antibiotika je dostavio tabelu s listom mikroorganizama i njihovim zonama osetljivosti za svaki antibiotik, na osnovu čega je i određivana granica osetljivosti selektovanih laktobacila na antibiotike (Becton&Dickinson, SAD). Potpuno odsustvo rezistencije na ampicilin i penicilin je uočeno kod svih selektovanih sojeva. Dobijeni rezultati su i očekivani, uzimajući u obzir pretodna istraživanja gde je potvrđeno da su BMK osetljive na β -laktame (Danielsen i Wind, 2003; Hummel et al., 2007). Takođe, pojedini selektovani laktobacili pokazali su osetljivost i na oksacilin koji pripada navedenoj grupi.

Tabela 13. Rezultati osetljivosti selektovanih sojeva na antibiotike

Antibiotici	Prečnik zone inhibicije (mm)*								
	<i>Lb. plantarum</i> Z5	<i>Lb. paracasei</i> Z8	<i>Lb. plantarum</i> Z9	<i>Lb. plantarum</i> 564	<i>Lb. plantarum</i> K16	<i>Lb. paracasei</i> K27	<i>Lb. plantarum</i> K50	<i>Lb. paracasei</i> K71	<i>Lb. paracasei</i> K621
Eritromicin (15µg)	32	28	26	28	24	27	30	30	28
Vankomicin (30 µg)	- [†]	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksacilin (1 µg)	14	12	-	-	-	9	-	7	-
Tetraciklin (30 µg)	24	26	-	18	21	20	21	21	20
Streptomycin (10 µg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicin (10 µg)	-	-	-	8	-	-	-	-	-
Ampicilin (10 µg)	28	22	24	30	26	30	28	24	26
Hloramfenikol (30 µg)	30	32	26	28	26	27	25	30	24
Kanamycin (30 µg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomicin (30 µg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicilin (10 U)	36	42	36	16	30	31	37	37	28

*U prečniku zone se nalazi i prečnik diska koji iznosi 6 mm.

[†] odsustvo zone oko antibiotika

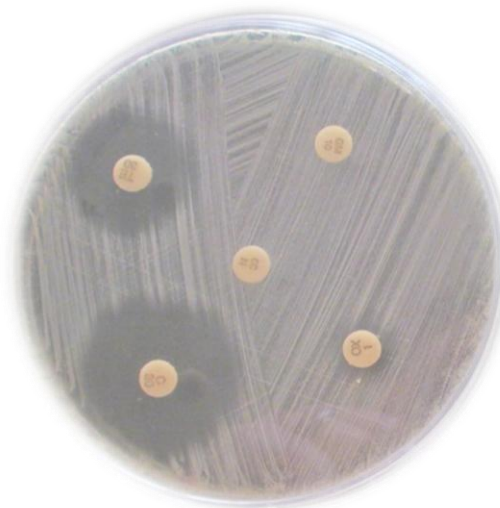
Dobijeni rezultati ukazuju na to da su svi sojevi osetljivi na hloramfenikol i eritromicin, uzimajući u obzir činjenicu da su laktobacili generalno osetljivi na ovu grupu antibiotika koji inhibiraju sintezu proteina (Ammor et al., 2007). Prilikom ispitivanja osetljivosti selektovanih sojeva na dejstvo tetraciklina, rezultati su pokazali da su svi selektovani sojevi osetljivi na dejstvo ovog antibiotika, osim soja *Lb. plantarum* Z9 koji je pokazao rezistenciju na tetraciklin. Selektovani sojevi su pokazali umerenu rezistentnost na antibiotike iz grupe aminoglikozida, u koje ubrajamo gentamicin, neomicin, kanamicin i streptomycin. Slični rezultati dobijeni su i kod drugih autora (Duškova i Karpišova, 2013; Sharma et al., 2015).

Isto tako, svi selekcionisani sojevi pokazali su rezistenciju na vankomicin. Vankomicin pripada grupi antibiotika glikopeptida, koji inhibiraju sintezu peptidoglukana, koji predstavlja bitnu komponentnu ćelijskog zida bakterija. Antibiotik vankomicin formira kompleks s karboksiterminal D-alanina (D-ala) reziduama prilikom građenja ćelijskog

zida sa peptidoglukanima (Reynolds, 1989). Formiran kompleks sprečava reakciju transglikosilacije koja je ključna u formiranju polimera peptidoglukana.

Rezistentnost na vankomicin je na neki način postala stalna osobina laktobacila. U pojedinim studijama se navodi da se na osnovu rezistencije na vankomicin mogu razlikovati vrste laktobacila, navodeći da je rezistencija specifična za pojedine vrste. Takođe, u pojedinim radovima se navodi da je rezistencija na vankomicin prirodna osobina laktobacila, osim laktobacila koji pripadaju *Lb. acidophilus* grupi (Salminen et al., 1998). Potpuna rezistencija autohtonih laktobacila, izolovanih iz sireva i drugih fermentisanih proizvoda, na vankomicin već je navođena i kod autora (Mathara et al., 2008; Monteagudeo-Mera et al., 2012).

Analizirajući rezultate, može se uočiti da skoro svi selekcionisani sojevi poseduju prirodnu rezistentnost na većinu antibiotike. Pored toga, bitno je istaći da skoro svi selekcionisani sojevi ne poseduje rezistenciju na antibiotike koji mogu dovesti do prenosa rezistencije na druge bakterije, kao što su penicilin, ampicilin, tetraciklin i eritromicin. Međutim, soj *Lb. plantarum* Z9 je pokazao rezistenciju na tetraciklin, zbog čega je on izuzet iz daljeg ispitivanja. Slični rezultati su primećeni i u drugim istraživanjima antibiotske rezistencije BMK (Danielsen i Wind, 2003; Korhonen, 2010).



Slika 6. Osetljivost soja *Lb. paracasei* 71 na pojedine antibiotike određeno difuznom metodom

Kao značajan uzrok pojave širenja rezistencije na antibiotike ističe se velika upotreba antibiotika pri uzgoju životinja od kojih se mleko i meso koriste kao primarne sirovine u prehrambenoj industriji. Autori Comunian et al. (2010) ističu da postoji jasna uzročno-

posledična veza između širenja antibiotske rezistencije kod bakterija u prehrambenoj industriji i upotrebe antibiotika u stočarstvu. U ovom radu ispitivana je antibiotska rezistencija na tetraciklin i eritromicin 121 soja *Lb. paracasei*, izolovanih iz italijanskih sireva i mesnih prerađevina proizvedenih na različitim geografskim regionima. Većina osetljivih sojeva bila je izolovana iz sireva koji se proizvode od mleka sa farmi gde se uzgoj stoke odvija na tradicionalan način, bez sistemske upotrebe antibiotika u svrhu promocije rasta. S druge strane, najveći broj rezistentnih sojeva je poticao iz proizvoda sa farmi gde se primenjuje intenzivnija praksa uzgoja u stočarstvu (Comunian et al., 2010). S obzirom na to da je osetljivost laktobacila na antibiotike veoma bitan kriterijum u selekcionisanju potencijalnih probiotskih bakterija, selekcionisani sojevi su na ovaj način ispunili još jedan kriterijum.

4.4.2.2. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) antibiotika

Mogućnost razlikovanja prirodne i stečene rezistencije na antibiotike od velikog je značaja za BMK. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i razlika koje se javljaju u okviru iste vrste, omogućava razikovanje mehanizma rezistencije (Radulović et al., 2012a). U slučaju kada određeni soj pokazuje rezistenciju na značajno većim koncentracijama antibiotika u odnosu na drugi soj iste taksonomske jedinice, prisustvo stečene rezistencije je indikovana i postoji potreba za potvrdom rezistencije pomoću genetskih metoda.

Rezultati ispitivanja MIC su prikazani u tabeli 14, pri čemu su navedene i granične vrednosti (cut-off values, engl.) za pojedine antibiotike. Prilikom ispitivanja MIC za vankomicin ustanovljeno je da su svi selekcionisani sojevi rezistentni na navedene antibiotike i pri znatno većim koncentracijama (> 364 µg/ml), što je i očekivano s obzirom da su vrste *Lb. plantarum* i *Lb. paracasei* prirodno rezistentni na vankomicin (EFSA, 2012). Takođe, prema EFSA smernicama za procenu antibiotske osetljivosti (2012), granična osetljivost za antibiotik kanamicin je 64 µg/ml, pri čemu je navedeno da, ukoliko je ispitivani soj rezistentan na većim koncentracijama od naznačene vrednosti, ispitivani sojevi mogu posedovati stečenu rezistenciju.

Tabela 14. Rezultati ispitivanja MIC selektovanih sojeva

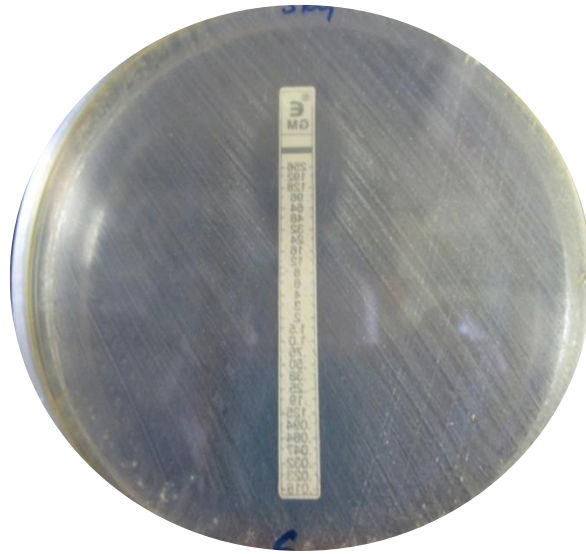
Anti biot.*	Koncentracije MIC (µg/ml)								
	<i>Lb. plantarum</i> Z5	<i>Lb. paracasei</i> Z8	<i>Lb. plantarum</i> Z9	<i>Lb. plantarum</i> 564	<i>Lb. plantarum</i> K16	<i>Lb. paracasei</i> K27	<i>Lb. plantarum</i> K50	<i>Lb. paracasei</i> K71	<i>Lb. paracasei</i> K621
Van.	>364	>364	>364	>364	>364	>364	>364	>364	>364
Oks.	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4
Stre.	- [†]	-	512	192	-	-	-	-	384
Gen.	96 (16) [‡]	96 (32) [‡]	-	48 (16)	-	-	-	-	64 (32)
Kan.	>364 (64) [‡]	>364 (64)	>364 (64)	>364 (64)	>364 (64)	>364 (64)	>364 (64)	>364 (64)	>364 (64)

*Van.-vankomicin; Oks.-oksacilin; Stre.-streptomicin; Gen.-gentamicin; Kan.-kanamicin

[†] odsustvo zone oko stripa E-testa

[‡] granične vrednosti (cut-off values) prema EFSA (2012)

Ispitivanjem MIC na streptomicin dobijeni su sledeći rezultati: *Lb. plantarum* 564 je pokazao osetljivost pri koncentraciji od 192 µg/ml navedenog antibiotika, *Lb. plantarum* K621 na 384 µg/ml i *Lb. plantarum* Z9 na 512 µg/ml streptomicina. S obzirom na to da je vrsta *Lb. plantarum* prirodno rezistentna na streptomicin, dobijeni rezultati su očekivani (EFSA, 2012). Što se tiče osetljivosti na gentamicin, dobijeni su sledeći rezultati za MIC: *Lb. plantarum* Z5 i *Lb. paracasei* Z8 su osetljivi pri koncentraciji od 96 µg/ml, *Lb. plantarum* K621 na 64 µg/ml i *Lb. plantarum* 564 na 48 µg/ml, što ukazuje na mogućnost postojanja stečene rezistencije selektovanih sojeva.



Slika 7. Izgled MIC za soj *Lb. plantarum* 564 prilikom dejstva E testa gentamicin

Prilikom ispitivanja antibiotske rezistencije starter kultura i probiotskih bakterija koje se primenjuju u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda, utvrđeno je da su sve probiotske bakterije, kao i pojedine jogurtne starter kulture i laktokoke koje se koriste u proizvodnji sireva, osetljive na streptomycin pri koncentracijama većim od 256 $\mu\text{g/ml}$ (Hummel et al., 2007). Slični rezultati su dobijeni i prilikom određivanja MIC za gentamicin istih bakterija, gde je većina probiotika postala osetljiva na dejstvo antibiotika pri koncentracijama većim od 256 $\mu\text{g/ml}$. Autori Matto et al. (2007) su ispitivali antibiotsku rezistenciju bifidobakterija različitog porekla, gde prilikom ispitivanja MIC za pojedine antibiotike dobijeni rezultati ukazuju da ne postoje značajne razlike između MIC koncentracija antibiotika streptomicina, gentamicina, vankomicina, kao i eritromicina i klindamicina.

Međutim, još uvek je nedovoljno ispitivana osetljivost BMK na antibiotike kao i određivanje prelomnih tačaka (breakpoints) MIC za većinu BMK (Charteris et al., 1998b; Danielsen i Wind, 2003; EFSA, 2012). Pored toga, izbor odgovarajućeg medijuma za rast BMK ima veliki uticaj na detekciju MIC. Pojedine podloge, kao na primer Muller-Hinton agar koji preporučuje National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002) ili Iso-Sensitest koji preporučuje British Society for Antimicrobial Chemotherapy (Andrews, 2001), nisu odgovarajući izbor budući da pojedine vrste BMK ne rastu. Isto tako, MRS agar koji podržava rast svih BMK, nije

uvek kompatibilan sa Iso-Sensitest agarom prilikom ispitivanja osetljivosti na antibiotike, kao što je prijavljeno za pojedine antibiotike (Huys et al., 2002).

4.4.3. Antimikrobna aktivnost

Inhibitorno dejstvo probiotskih bakterija na patogene mikroorganizme je jedan od najbitnijih kriterijuma prilikom selektovanja probiotika. Kao što je već navedeno, bakterije mlečne kiseline produkuju niz antimikrobnih jedinjenja, kao što su mlečna kiselina, vodonik peroksid, bakteriocini, itd, koja mogu da vrše inhibiciju patogenih mikroorganizama. Na osnovu antimikrobne aktivnosti, laktobacili često predstavljaju primarnu barijeru u borbi protiv infekcije gastrointestinalnog trakta.

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15. Rezultati antimikrobne aktivnosti selektovanih sojeva

Patogeni mikroorganizmi	Prečnik zone inhibicije (mm)*							
	<i>Lb. plantarum</i> Z5	<i>Lb. paracasei</i> Z8	<i>Lb. plantarum</i> 564	<i>Lb. plantarum</i> K16	<i>Lb. paracasei</i> K27	<i>Lb. plantarum</i> K50	<i>Lb. paracasei</i> K71	<i>Lb. paracasei</i> K621
<i>L.monocytogenes</i> ATCC 19111	13	11	13	11	13	13	13	13
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15	11	15	13	13	13	13	13
<i>St. aureus</i> ATCC 25923	15	13	15	11	13	13	13	11
<i>S. eneteritidis</i> ATCC 13076	25	23	23	19	21	19	19	21
<i>B. cereus</i> ATCC 6633	13	15	15	13	15	15	17	15
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	15	17	17	13	15	15	13	13
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	15	16	17	15	15	16	15	17

*Prečnik zone uključuje i 5 mm prečnika selektovanih sojeva

Prilikom određivanja antimikrobne aktivnosti korišćena je metoda difuznog testa sa spotovima, pri čemu su patogeni mikroorganizmi dodavani u top agar (0,7% agara) gde je inokulum patogenih mikroorganizama sadržao negde oko 10^5 - 10^6 cfuml⁻¹ ćelija.

Na osnovu rezultata se može primetiti da svi selektovani sojevi imaju slabiju ili intenzivniju antimikrobnu aktivnost prema navedenim patogenim mikroorganizmima. Najveće inhibitorno dejstvo selektovani sojevi su pokazali prema *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, gde je najveću zonu inhibicije pokazao *Lb. plantarum* Z5. Slični rezultati su dobijeni i prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti laktobacila izolovanih iz ovčijeg mleka, koji su pokazali najjaču inhibiciju prema *S. pneumoniae* (Mojgani et al., 2015). Selektovani sojevi su pokazali veoma slično inhibitorno dejstvo prema *L. monocytogenes* ATCC 19111, gde su nešto slabiju antimikrobnu aktivnost pokazali sojevi *Lb. paracasei* Z8 i *Lb. plantarum* K16. Slični rezultati su dobijeni i prilikom ispitivanja inhibitornog delovanja prema *E. coli* ATCC 25922, gde je *Lb. paracasei* Z8 pokazao nešto manju zonu inhibicije, dok su *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* Z5 pokazali nešto veću zonu.

Prilikom ispitivanja antimikrobnog delovanja na *B. cereus* ATCC 6633, selektovani sojevi su pokazali veoma slične zone inhibicije, pri čemu je najveći prečnik imao soj *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* K71. Inhibitorno dejstvo selektovanih sojeva prema *P. aeruginosa* ATCC 27853 je bilo veoma slično.

S obzirom na to da selektovani sojevi imaju jako slične zone inhibicije, u buduća ispitivanja antimikrobne aktivnost trebalo bi uključiti veći broj patogenih mikroorganizama, kako bi se ustanovile razlike u inhibitornom dejstvu bakterija mlečne kiseline. Međutim, poređenjem antimikrobne aktivnosti selektovanih sojeva primećeno je da je soj *Lb. plantarum* 564 imao kod svih patogenih mikroorganizama najveću ili među najvećim zonama inhibicije. Autohtona bakterija mlečne kiseline *L. lactis* subsp. *lactis* BGSM1-19, izolovana iz tradicionalnog srpskog sira, pokazala je antimikrobnu aktivnost prema *St. aureus*, *P. aeruginosa* i *S. paratyphi* (Topisirović et al., 2006). Takođe, *Lb. plantarum* TAUL 1539 je pokazao najširi spektar inhibitornog delovanja prema patogenim mikroorganizmima u odnosu na ostale laktobacile izolovane iz španskog kozijeg sira Armada (Herreros et al., 2005). Isto tako, potencijalne probiotske bakterije izolovane iz ovčijeg mleka su pokazale širok spektar inhibicije prema G pozitivnim i negativnim bakterijama (Mojgani et al., 2015). Potencijalna probiotska bakterija *Lb. paracasei* 34, izolovana iz sira, vrši inhibiciju *B. cereus*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*, za razliku od komercijalnog probiotika *Lb. paracasei* ATCC 11454, koji inhibira samo *P. aeruginosa* (Monteagudo-Mera et al., 2012).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da svi selektovani sojevi imaju odgovarajuću antimikrobnu aktivnost prema najbitnijim vrstama patogenih mikroorganizama. Pored toga, u budućim ispitivanjima bi trebalo ustanoviti mehanizam antimikrobnog delovanja, odnosno koje jedinjenje proizvode BMK.

4.5. Mikroinkapsulacija potencijalnih probiotskih bakterija sprej sušenjem

Nakon ispitivanja probiotskih karakteristika selektovanih autohtonih laktobacila, na osnovu rezultata preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova, antibiotske rezistencije i antimikrobne aktivnosti, za dalja ispitivanja su selektovana dva soja, *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8. Potencijalni probiotici *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 su u nastavku ispitivanja inkapsulisani metodom sprej sušenja u rekonstituisanom obranom mleku kao nosaču, nakon čega je određivan broj živih ćelija i sposobnost preživljavanja simuliranih GI uslova.

4.5.1. Osetljivost potencijalnih probiotskih bakterija na povišene temperature

Osetljivost *Lactobacillus* sp. na povišene temperature je u ranijim ispitivanjima varirala u zavisnosti od vrste, kao i od soja (Corcoran et al., 2004). S obzirom na to da je prilikom procesa sprej sušenja prisutna visoka temperatura, veoma je bitno da potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 dobro podnose visoke temperature. Navedene potencijalne probiotske bakterije su ispitivane na dejstvo visoke temperature u stacionarnoj fazi, jer je u prethodnim istraživanjima pokazano da je ova faza otpornija od eksponencijalne faze (Teixeira et al., 1994; Corcoran et al., 2004).

Rezultati ispitivanja osetljivosti *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 su prikazani u tabeli 16. Potencijalni probiotik *Lb. paracasei* Z8 je prethodno ispitan u doktorskoj disertaciji Petrović (2011).

Tabela 16. Rezultati ispitivanja osetljivosti potencijalnih probiotskih bakterija na povišene temperature

°C	Soj	Broj ćelija (log) ^a					Pad broja ćelija (log)
		Vreme (min)					
		0	1	2	3	4	
55	564	9,4±0,07	7,98±0,11	7,71±0,15	7,6±0,12	7,38±0,17	2.02
	Z8	9,08±0,0	7,8±0,14	7,63±0,21	7,52±0,16	7,12±0,17	1.96
58	564	9,4±0,07	7,96±0,05	7,69±0,15	7,36±0,16	7,25±0,12	2.15
	Z8	9,08±0,0	7,7±0,14	7,52±0,06	7,23±0,07	7,09±0,13	1.99
59	564	9,4±0,07	7,95±0,13	7,41±0,04	7,28±0,2	7,1±0,13	2.3
	Z8	9,08±0,0	7,8±0,18	7,29±0,04	7,1±0,06	6,93±0,05	2.15
60	564	9,4±0,07	7,46±0,2	6,94±0,17	6,43±0,16	4,41±0,17	4.95
	Z8	9,08±0,0	7,1±0,17	6,6±0,08	6,28±0,12	4,49±0,13	4.59
61	564	9,4±0,07	7,58±0,17	6,68±0,05	6,47±0,11	4,4±0,05	5
	Z8	9,08±0,0	7,62±0,12	6,48±0,11	6,22±0,11	4,2±0,08	4.88

^aSrednja vrednost±standardna devijacija nakon tri ponavljanja

Na osnovu prikazanih rezultata može se primetiti da su obe potencijalne probiotske bakterije imale vrlo sličnu osetljivost na povišene temperature. Kod potencijalne probiotske bakterije *Lb. paracasei* Z8 na temperaturi od 58°C, primećen je pad broja ćelija za skoro 2 logaritamske jedinice (1,96 log), dok je na temperaturi od 59°C broj ćelija pao za 2,15 logaritamske jedinice. Na temperaturi od 60°C i 61°C primećen je značajan pad broja ćelija za 4,59 i 4,88 logaritamskih jedinica, što ukazuje na veliku osetljivost na navedene temperature.

Kod potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 primećen je pad broja ćelija za 2 logaritamske jedinice na temperaturi od 55°C, a neznatano veći pad broja ćelija je primećen i na temperaturi od 58°C (2,15 log). Na temperaturi od 59°C, nakon 4 minuta primećen je pad broja ćelija za 2,3 logaritamske jedinice, dok je značajan pad broja ćelija ostvaren nakon tretmana na temperaturi od 60°C (4,95 log). Pri temperaturi od 61°C, primećen je pad broja ćelija za 5 logaritamskih jedinica. Rezultati preživljavanja potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 ukazuju na relativno dobru rezistentnost na povišene temperature.

Na osnovu rezultata, može se ustanoviti da su obe potencijalne probiotske bakterije imale vrlo sličnu osetljivost na povišene temperature, pri čemu je *Lb. paracasei* Z8 neznatno rezistentniji u odnosu na *Lb. plantarum* 564.

Takođe, ispitivanje osetljivosti na povišene temperature se može prikazati i pomoću D vrednosti, odnosno vreme decimalne redukcije. Za potencijalne probiotske bakterije D vrednosti su bile 1,86 minuta na temperaturi od 59°C i 0,82 na temperaturi od 61°C za *Lb. paracasei* Z8, dok je za *Lb. plantarum* 564 D vrednost na 59°C iznosila 1,74 minut, a na temperaturi od 61°C D vrednost je bila 0,8 minuta. D vrednost potencijalnih probiotskih bakterija je bila nešto niža u odnosu na D vrednosti probiotika *Lb. rhamnosus* E800 i *Lb. salivarium* UUC 500 (Corocoran et al., 2004), ali su bile veće u odnosu na D vrednosti probiotika *Lb. salivarium* UUC118 na temperaturi od 61°C (Gardiner et al., 2000).

Na osnovu pada broja ćelija, kao i na osnovu D vrednosti može se zaključiti da su oba potencijalna probiotika pokazali dobru rezistenciju na povišene temperature.

4.5.2. Vijabilnost potencijalnih probiotskih bakterija nakon sprej sušenja

S obzirom na to da su potencijalni probiotici *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 prikazali relativno dobru rezistenciju na povišene temperature, sojevi su inkapsulisani tehnikom sprej sušenja, nakon čega je određivan broj preživelih ćelija metodom razređenja i real time PCR metodom uz tretman propidijum monoazidom (PMA).

Kao što je već prethodno navedeno, vijabilnost i održivost u prehrambenom proizvodu je jedan od prvih kriterijuma za određivanje i selekcionisanje probiotskih bakterija. Zbog toga je veoma bitno odrediti broj inkapsulisanih probiotskih bakterija koje bi mogle da ostvare odgovarajući nivo ćelija tokom dužeg perioda skladištenja. Metoda određivanja broja ćelija real time PCR u kombinaciji sa PMA trebalo bi da razlikuje žive i mrtve ili oštećene ćelije i na taj način bi se dobijale informacije o ćelijskoj membrani, što predstavlja važan kriterijum za bakterijsku održivost.

Pre primene molekularnih metoda kao što je real time PCR, potrebno je uzeti u obzir nekoliko parametara kao što je DNK ekstrakcija, izbor odgovarajućeg prajmera i PCR protokola, itd. (Kramer et al. 2009). Proces izolacije DNK predstavlja jedan od ključnih faktora koji mogu da utiču na PCR reakciju. Prilikom izolacije genomske DNK pomoću

kitova za izolaciju ili toplote i triptona, može doći do dobijanja DNK male koncentracije usled resuspendovanja, pipetiranja, odlivanja supernatanta, što može da dovede do gubitka DNK. Prethodna istraživanja su pokazala da proces izolacije DNK pomoću Maxwell sistema značajno bolji načina izolacije, s obzirom na to da je koncentracija DNK veća i jednaka između ponavljanja (Bogović Matijašić et al., 2010). Pored toga, prilikom tretmana sa PMA bitno je obratiti pažnju i na proces bojenja, da li je temperatura bila odgovarajuća, itd. Navedeni faktori mogu da utiču na dobijene rezultate, zbog čega je veoma bitno izvršiti izolaciju DNK na odgovarajući način, pravilan tretman sa PMA, kao i odgovarajući izbor prajmera i ostalih faktora koji utiču na real time PCR metodu (Kramer et al., 2009).

Broj slobodnih ćelija potencijalnih probiotskih bakterija, određenih metodom razređenja je 9,44 log cfug⁻¹ za *Lb. plantarum* 564 i 10,32 log cfug⁻¹ za *Lb. paracasei* Z8. Između ponavljanja nije bilo statistički značajnih razlika (p≥0,05). Nakon sprej sušenja, broj potencijalnih probiotskih ćelija *Lb. plantarum* 564, određenih metodom razređenja, je bio 9,45 log cfug⁻¹ i 10,52 log cfug⁻¹ *Lb. paracasei* Z8 ćelija. Prema formuli koja je opisana u materijalu i metodama (3.7.1.), određen je procenat preživelih ćelija nakon procesa sprej sušenja, pri čemu je dobijeno da je kod potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 preživelo 93% ćelija, dok je kod *Lb. paracasei* Z8 preživelo 95,3% ćelija (tabela 17).

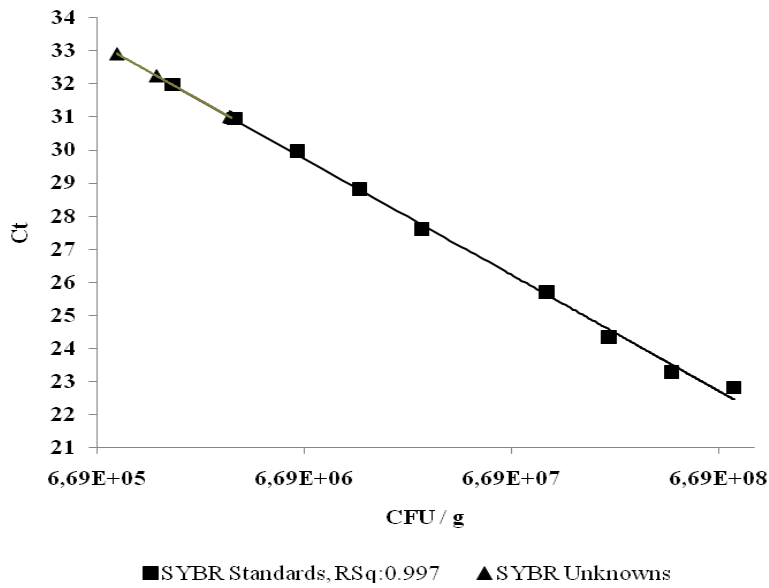
Tabela 17. Broj slobodnih i sprej sušenih ćelija određenih metodom razređenja

Potencijalni probiotici	Slobodne ćelije ^a (log cfug ⁻¹)	Sprej sušene ćelije (log cfug ⁻¹)	Procenat preživelih ćelija (%)
<i>Lb. plantarum</i> 564	9,44±0,1	9,45 ± 0,05	93,0
<i>Lb. paracasei</i> Z8	10,32±0,15	10,52 ± 0,04	95,3

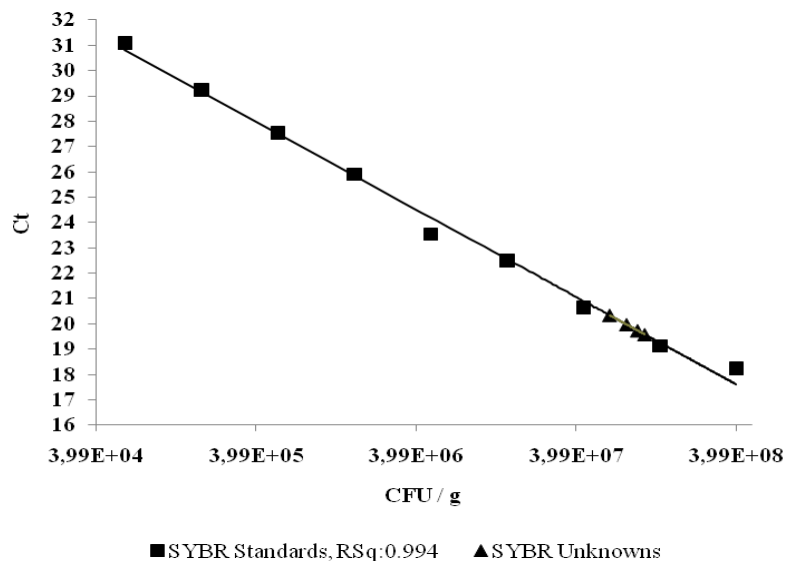
^a Srednja vrednost±standardna devijacija nakon tri ponavljanja (p≥0,05)

Rezultati vijabilnosti sprej sušenih potencijalnih probiotika *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 koji su određeni metodom razređenja i real time PCR prikazani su u tabeli 18. Rezultati real time PCR sa PMA tretmanom su izraženi u cfug⁻¹, da bi se olakšalo upoređivanje dobijenih vrednosti između navedenih metoda. Iz toga razloga, standardna kriva je napravljena na osnovu vrednosti cfug⁻¹. Standardna kriva real time PCR za *Lb.*

plantarum 564 prikazana je na grafiku 1, dok je na grafiku 2 prikazana standardna kriva za *Lb. paracasei* Z8.



Grafik 1. Standardna kriva *Lb. plantarum* 564 i Ct vrednost dobijena real time PCR metodom



Grafik 2. Standardna kriva *Lb. paracasei* Z8 i Ct vrednost dobijena real time PCR metodom

Prilikom ispitivanja živih ćelija potencijalnih probiotskih bakterija nakon sprej sušenja, prvo su konstruisane standardne krive svežih bujonskih kultura potencijalnih probiotika.

Početne tačke su predstavljale broj ćelija svežih bujonskih kultura određenih metodom razređenja, dok je svaka sledeća tačka standardne krive predstavljala umanjenu vrednost za 3 puta. Vrednost početnih tačaka se unosila u softver, dok je za sve ostale tačke standardne krive softver izračunao vrednosti. Na osnovu standardne krive određena je i efikasnost reakcije, kao i moguće inhibicije. Nakon unošenja početne tačke standardne krive i pravljenja odgovarajućih razređenja, pristupljeno je real time PCR analizi. Prva dva razređenja kod obe serije razređenja, su isključena iz standardne krive, jer su vrlo verovatno usled visoke DNK koncentracije ili prisustva nekih drugih agenasa vršila inhibiciju PCR reakcije (Kramer et al., 2009). Za potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 dobijeni su parametri standardne krive nakon dve serije razređenja gde je $R^2=0,997$, efikasnost amplifikacije 98,5% i nagib -3,225, dok je za potencijalni probiotik *Lb. paracasei* Z8 dobijeno da je $R^2=0,994$, efikasnost amplifikacije 0,994% i nagib -3,456 (Radulović et al., 2012e).

Tabela 18. Rezultati vijabilnosti potencijalnih probiotskih bakterija nakon sprej sušenja određenih metodom razređenja i real time PCR

Potencijalni probiotici	Metoda razređenja ^a	Real time PCR bez PMA ^b	Real time PCR sa PMA ^b
<i>Lb. plantarum</i> 564	9,45 ± 0,05	9,31 ± 1,11	9,20 ± 0,98
<i>Lb. paracasei</i> Z8	10,52 ± 0,04	10,42 ± 0,4	10,35 ± 0,50

^a Prosečne vrednosti ($\log cfug^{-1}$) i standardne devijacije su računati na osnovu tri ponavljanja ($p \geq 0,05$)

^b Prosečne vrednosti ($\log cfug^{-1}$) i standardne devijacije Ct vrednosti dobijene na odnosu dve paralelne DNA ekstrakcije i dve real time PCR reakcije

Prilikom poređenja rezultata određivanja broja sprej sušenih ćelija potencijalnih probiotskih bakterija, može se primetiti da nema statistički značajnih razlika između metode razređenja i real time PCR metode. Prisustvo visokih temperatura tokom procesa sprej sušenja očekivano bi dovelo do značajnog oštećenja ćelija, a samim tim i do određenog broja mrtvih ćelija. Shodno tome, dobijeni rezultati su bili iznenađujući, s obzirom na to da je očekivana značajna razlika u određivanju prisustva živih ćelija, kao i u broju potencijalnih probiotskih bakterija sa oštećenom membranom i mrtvih ćelija.

Tretman sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija sa PMA pre izolacije DNK, ostvario je selektivnu inhibiciju amplifikacije DNK mrtvih ili oštećenih ćelija (Lee i

Levin, 2006). Na osnovu broja živih ćelija, može se ustanoviti da PMA tretman nije doveo do značajnih razlika, odnosno nije pokazao svoju efikasnost. Isto tako, mogao bi da se izvede zaljučak da su tokom procesa sprej sušenja bili prisutni optimalni uslovi, što je dovelo do zanemarljivog broja oštećenih ili mrtvih ćelija.

Slični rezultati su dobijeni i u studiji Kramer et al. (2009) koji su ispitivali broj živih liofilizovanih ćelija pomoću real time PCR sa PMA. Broj liofilizovanih probiotskih bakterija *Lb. acidophilus* LA-5 i *B. animalis* ssp. *lactis* nije pokazivao značajne razlike u broju živih ćelija između metode razređenja i real time PCR sa ili bez PMA. Međutim, nakon 90 dana skladištenja liofilizovanih probiotskih bakterija, došlo je do značajne statističke razlike ($p < 0,05$) u broju živih ćelija određenih navedenim metodama. Pored navedenih metoda, autori su koristili i fluorescentnu metodu bojenja ćelija, koja takođe nije pokazala značajnu razliku u određivanju broja živih ćelija.

Isto tako, broj liofilizovanih bifidobakterija nakon inkapsulacije je ostao isti bez obzira na metodu određivanja broja ćelija koja je korišćena (Masco et al., 2007). Međutim, autori Oketič et al. (2015) su prilikom ispitivanja vijabilnosti probiotika *Lb. gasseri* K7 i *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CCM 7712 nakon 90 dana na temperaturi od 4°C, ustanovili da su postojale značajne razlike u broju ćelija određenih metodom razređenja i real time PCR sa PMA tretmanom. S obzirom na to da je broj ćelija nakon mikroinkapsulacije bio veoma sličan, razlike u broju ćelija nakon 90 dana skladištenja pripisuje se gubitku mogućnosti rasta mikroinkapsulisanih probiotskih bakterija, dok je integritet ćelijske membrane sačuvan kod velikog broja ćelija (Oketič et al., 2015).

Na osnovu dobijenih rezultata može se ustanoviti da nije bilo statistički značajnih razlika između broja ćelija sprej sušenih potencijalnih probiotika određenih metodom razređenja i real time metodom sa ili bez PMA. Isto tako, proces sprej sušenja je bio optimalan, što je dovelo do zanemarljivog broja mrtvih ćelija, ili ćelija gde je došlo do oštećenja ćelijske membrane.

4.5.3. Sposobnost preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija

Nakon ispitivanja vijabilnosti sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija, ispitivana je i sposobnost preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova. U

eksperimentu je korišćena podloga sa niskom pH od 2,5 i prisustvom pepsin, koja je simulirala želudačne uslove, dok su intestinalni uslovi simulirani dodatkom žučnih soli i pankreatina (Doleyres et al., 2004). U tabeli 19 prikazani su rezultati preživljavanja simuliranih GI uslova.

Tabela 19. Rezultati preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova nakon sprej sušenja

Potencijalni probiotici	Početni broj ^a (log cfug ⁻¹)	Želudačni uslovi (log cfug ⁻¹)	Pad broja ćelija (log)	Intestinalni uslovi (log cfug ⁻¹)	Pad broja ćelija (log)
564	9,45±0,05	8,65±0,05	0,8	6,92±0,03	2,53
Z8	10,52±0,04	8,96±0,03	1,56	6,98±0,01	3,54

^a Srednja vrednost±standardna devijacija nakon tri ponavljanja (p≥0,05)

Posmatrajući rezultate, može se primetiti da su potencijalni probiotici *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 imali veoma dobru vijabilnost nakon 60 minuta inkubacije u simuliranim želudačnim uslovima na temperaturi od 37°C.

Međutim, nakon simuliranja intestinalnih uslova, rezultati ukazuju da je došlo do značajnog pada broja sprej sušenih potencijalnih probiotskih ćelija. Kod sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 došlo je do pada broja ćelija za 2,53 log cfug⁻¹ u odnosu na početni broj inkapsulisanih ćelija, dok je kod sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. paracasei* Z8 došlo do pada broja ćelija za 3,54 log cfug⁻¹ nakon simuliranih intestinalnih uslova. Posmatrajući rezultate preživljavanja simuliranih GI uslova slobodnih ćelija potencijalnih probiotika, primećuje se da su se slobodne ćelije održale u visokom broju nakon 60 minuta inkubacije u rastvoru pankreatina i žučnih soli (tabela 12). Prikazani rezultati ukazuju da proces inkapsulacije potencijalnih probiotskih bakterija tehnikom sprej sušenja nije predstavljao značajnu zaštitu tokom prolaza kroz simulirane intestinalne uslove. S druge strane, sprej sušenje je obezbedilo veoma dobru zaštitu potencijalnim probiotskim bakterijama tokom prolaza kroz želudačne uslove i omogućilo sojevima da prežive veoma niske pH vrednosti sredine u visokom broju ćelija.

Slični rezultati su dobijeni i u drugim istraživanjima sposobnosti preživljavanja simuliranih GI uslova sprej sušenih probiotskih bakterija, gde je proces sprej sušenja ostvario zaštitnu ulogu u želudačnim uslovima, ali ne i u intestinalnim (Sultana et al., 2000; O'Riordan et al., 2001; Petrović, 2011). Međutim, Paez et al. (2012) su ispitali uticaj sprej sušenja u različitim nosačima na sposobnost preživljavanja GI uslova 22 komercijalna probiotika u koje ubrajaju nekoliko *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* i *Lb. acidophilus* soja. Nakon inkubacije tokom 150 minuta u simuliranim gastrointestinalnim uslovima, sprej sušeni probiotik *Lb. paracasei* A13 je imao veći broj preživelih ćelija u odnosu na slobodne ćelije istog probiotika (1,5 log jedinica više), dok su sprej sušeni probiotici *Lb. acidophilus* A9 i *Lb. casei* Nad pokazali znatno veći broj ćelija nakon simulacije GI uslova, u odnosu na slobodne ćelije. Autori Paez et al. (2012) takođe navode da su postojale značajne razlike u broju ćelija u odnosu na nosač koji je korišćen prilikom sprej sušenja. Istraživanja su pokazala da pored izbora odgovarajućeg nosača, odnosno protektanta (Desmond et al., 2002; Vinderola et al., 2011), veliki uticaj na karakteristike sprej sušenih probiotskih bakterija ima i period skladištenja (Matto et al., 2006), kao i prehrambeni proizvod u koji je inkorporirana inkapsulisana probiotska bakterija (Saarela et al., 2006).

Generalno posmatrajući rezultate može se ustanoviti da je broj sprej sušenih ćelija nakon simuliranja gastrointestinalnih uslova bio na odgovarajućem broju ($\geq 10^6$ cfug⁻¹), bez obzira na malo veći pad broja sprej sušenih ćelija nakon simuliranih intestinalnih uslova. U budućim ispitivanjima bi trebalo ustanoviti sposobnost preživljavanja sprej sušenih ćelija potencijalnih probiotika nakon sušenja s drugim nosačima. Na taj način bi mogli da se ustanove optimalni nosači i optimalni uslovi procesa sprej sušenja, a sve u cilju bolje vijabilnosti probiotskih ćelija nakon prolaska kroz simulirane gastrointestinalne uslove.

4.6. Primena probiotskih bakterija u proizvodnji jogurta, sira od ultrafiltriranog mleka i crne čokolade

Na osnovu rezultata ispitivanja vijabilnosti i probiotskih karakteristika sprej sušenih potencijalnih probiotika, *Lb. plantarum* 564 selektovan je za primenu u proizvodnji jogurta, sira od ultrafiltriranog mleka i crne čokolade. Kao kontrolni probiotik korišćen

je komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v (DSM 9843). Tokom proizvodnje i skladištenja navedenih proizvoda sa probiotskim bakterijama, ispitivana je vijabilnosti starter kultura i probiotskih bakterija, kao i njihov uticaj na senzorni kvalitet proizvoda. Takođe, sprovedena je *in vivo* studija gde se ispitivala sposobnost preživljavanja GI uslova *Lb. plantarum* 564 primenjenog u različitim proizvodima, a samim tim i uloga nosača jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade.

Prilikom proizvodnje jogurta i sira od UF mleka, potencijalna probiotska bakterija *Lb. plantarum* 564 je primenjena u obliku slobodnih i sprej sušenih ćelija. Takođe, u istom obliku je primenjen i komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v.

Primena slobodnih i sprej sušenih probiotskih ćelija u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda i ispitivanje vijabilnosti probiotika tokom proizvodnje i skladištenja, mogla bi da pruži informacije o značaju sprej sušenja na održivost probiotika. Isto tako, senzornom ocenom prehrambenih proizvoda sa probiotskim bakterijama mogao bi da se ustanovi uticaj slobodnih ili inkapsuliranih probiotskih ćelija na senzorni kvalitet proizvoda.

4.6.1. Broj slobodnih i inkapsuliranih ćelija probiotskih bakterija

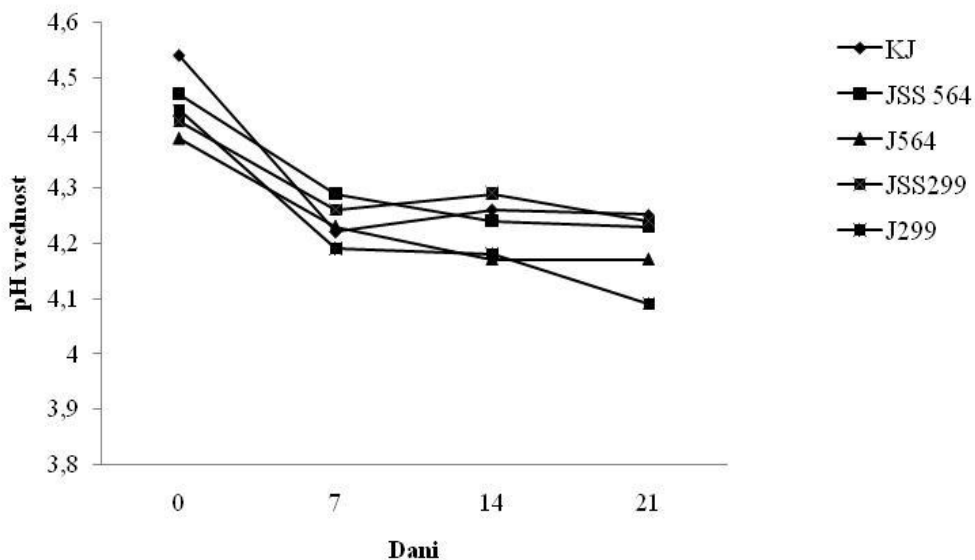
Da bi probiotik mogao da se primeni u proizvodnji određenog prehrambenog proizvoda, potrebno je prvenstveno znati broj ćelija, slobodnih ili inkapsuliranih. Dodatkom odgovarajuće količine inokuluma sveže bujonske kulture ili praha sprej sušenog probiotika, mogao bi da se ostvari odgovarajući broj probiotskih ćelija tokom proizvodnje i skladištenja proizvoda.

Broj slobodnih i sprej sušenih ćelija potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 određen je nakon sprej sušenja i prikazan je u tabeli 17. Komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v je sprej sušen u istim uslovima kao i *Lb. plantarum* 564. S obzirom na to da su rezultati istraživanja pokazali da nema značajne razlike u broju ćelija između metode razređenja i real time PCR sa PMA, odnosno da je proces sprej sušenja vršen u optimalnim uslovima, za određivanje broja *Lb. plantarum* 299v je korišćena samo metoda razređenja. Broj slobodnih ćelija *Lb. plantarum* 299v je bio $9,72 \log \text{ cfug}^{-1}$, dok je broj sprej sušenih ćelija $9,84 \log \text{ cfug}^{-1}$.

Navedene vrednosti broja slobodnih i sprej sušenih ćelija probiotika su dalje korišćene za određivanje potrebne količine inokuluma, odnosno praha, za primenu u proizvodnji jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade. S obzirom na to da je u literaturnim podacima navedeno da minimalni broj probiotika u proizvodu treba da bude na nivou većem od 10^6 cfug⁻¹ ili ml namirnice, *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v su dodati u količinama koje zadovoljavaju potreban dnevni unos probiotskih ćelija od 10^8 - 10^9 ćelija po mL ili g namirnice.

4.7. pH vrednosti jogurta i sira od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama

Prilikom proizvodnje jogurta sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v, pH vrednost jogurta je bila odlučujući faktor za zaustavljanje fermentacije. Optimalna pH vrednost jogurta, na kojoj je zaustavljena fermentacije, bila je 4,6. Nakon završetka fermentacije, pH vrednosti jogurta sa probioticima su merene tokom skladištenja, a rezultati pH vrednosti su prikazani na grafiku 3.



Grafik 3. Promena pH vrednosti jogurta sa probiotskim bakterijama tokom skladištenja

Prikazani rezultati ukazuju da su se pH vrednosti eksperimentalnih varijanti jogurta kretale u očekivanim granicama, kada je u pitanju proizvodnja i skladištenje jogurta. S

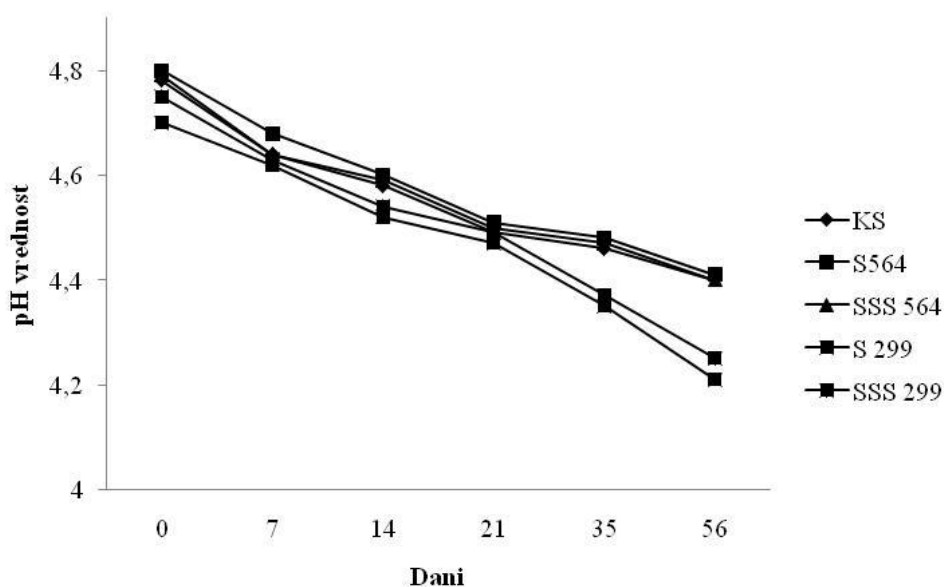
obzirom na to da starter kulture uslovljavaju pad pH vrednosti, promene pH vrednosti su u skladu brojem starter kultura. Prema Pravilniku o kvalitetu mleka i starter kultura (Sl. glasnik, br. 34/2014), pH vrednosti jogurta u roku trajanja ne sme da bude manja od 3,8, što ukazuje da su vrednosti svih varijanti jogurta sa probioticima bile na zadovoljavajućem nivou.

Kod kontrolne varijante (KJ), kao i kod eksperimentalnih varijanti jogurta, nije ustanovljena statistički značajna razlika u pH vrednostima tokom perioda skladištenja. Nakon 21 dana skladištenja jogurta, pH vrednosti svih varijanti jogurta su se kretale u opsegu od 4,3-4,6.

Ono što je veoma bitno jeste da kod varijanti jogurta sa slobodnim i sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 (J564 i JSS564) nije došlo do pojave postacidifikacije, koja predstavlja čest problem u proizvodnji jogurta. Međutim, kod jogurta sa sprej sušenim komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v (JSS 299v) primećena je nešto niža pH vrednost nakon 14 dana skladištenja, što je vrlo verovatno prouzrokovano pojavom postacidifikacije. Zbog toga, period skladištenja jogurta JSS 299v ne bi trebao da bude duži od 14 dana.

Na osnovu rezultata može se uočiti da dodatak potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564, kao slobodne ili inkapsulisane, nema uticaj na promene pH vrednosti jogurta tokom skladištenja. Međutim, jogurt sa sprej sušenom komercijalnom probiotskom bakterijom *Lb. plantarum* 299v može da se koristi samo u slučaju kraćeg perioda skladištenja. Granice promene pH vrednosti jogurta sa probioticima se u potpunosti slažu sa podacima drugih autora (Kailasapathy, 2006; Radulović et al., 2014).

Kod sira od UF mleka sa dodatkom probiotskih bakterija, neposredno nakon proizvodnje, pH vrednost sireva kretala se u rang od 4,7-4,8. Promene pH vrednosti sireva od UF mleka sa probioticima je prikazana na grafiku 4. Tokom skladištenja dolazi do postepenog pada pH vrednosti, tako da se na kraju skladištenja pH vrednost sireva kretala u opsegu od 4,21-4,4. Najveći pad pH vrednosti je primećen kod sireva sa dodatkom slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 299v (S29v i SSS299v), što je uticalo i na teksturu, ali i na ukus proizvoda, o čemu će više biti reči u senzornoj oceni proizvoda.



Grafik 4. Promene pH vrednosti sira od UF mleka sa probiotskim bakterijama tokom skladištenja

Između kontrolne varijante sira od UF mleka i varijanti sa probiotskim bakterijama nije bilo statistički značajne razlike pH vrednosti tokom skladištenja. Pad pH vrednosti sira od UF mleka je bio uslovljen blagim porastom broja starter kultura (grafik 5). Slične pH vrednosti sireva od UF mleka navode i drugi autori (Miočinović et al., 2011).

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da probiotske bakterije nisu uticale na pH vrednost jogurta i sira od UF mleka tokom proizvodnje i skladištenja.

4.8. Vijabilnost starter kultura i probiotskih bakterija u prehrambenim proizvodima sa probiotskim bakterijama

4.8.1. Vijabilnost starter kultura u jogurtu sa probiotskim bakterijama

Na svetskom tržištu, kao i u Srbiji, fermentisani proizvodi od mleka sa dodatkom probiotskih bakterija su najrasprostranjeniji funkcionalni prehrambeni proizvod. Jogurt predstavlja jedan od fermentisanih proizvoda od mleka koji je pogodan za primenu probiotskih bakterija (Shoji et al., 2013), a ujedno i pogodan nosač probiotika prilikom prolaska kroz GI trakt (Saxelin et al., 2010). Takođe jogurt pored probiotskih bakterija, predstavlja dobru sredinu za primenu drugih bioaktivnih dodataka kao što su prebiotici

(Allegeyer et al., 2010), omega masne kiseline (Sun-Waterhouse et al., 2013; Radulović et al., 2014), itd.

Promene broja starter kultura *St. thermophilus* i *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* u jogurtu sa dodatkom slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v tokom skladištenja su prikazane u tabeli 20, dok su logaritamske vrednosti predstavljene na grafiku 5 (*St. thermophilus*) i 6 (*Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*).

Tabela 20. Promene broja (cfuml⁻¹) starter kultura u probiotskom jogurtu

Jogurt	Starter kulture	Dani ^a			
		0	7	14	21
KJ	<i>St. thermophilus</i>	7,54x10 ⁸ ±0,16	9,32x10 ⁸ ±0,07	7,07x10 ⁸ ±0,12	1,07x10 ⁹ ±0,18
	<i>Lb. bulgaricus</i>	1,35x10 ⁸ ±0,09	2,93x10 ⁸ ±0,06	1x10 ⁷ ±0,04	1,3x10 ⁸ ±0,13
J 564	<i>St. thermophilus</i>	7,63x10 ⁸ ±0,07	7,21x10 ⁸ ±0,17	7,41x10 ⁸ ±0,24	7x10 ⁸ ±0,09
	<i>Lb. bulgaricus</i>	3,28x10 ⁸ ±0,013	4,3x10 ⁷ ±0,19	1,8x10 ⁸ ±0,36	4,5x10 ⁷ ±0,18
JSS 564	<i>St. thermophilus</i>	7,39x10 ⁸ ±0,21	1,06x10 ⁹ ±0,27	1,08x10 ⁹ ±0,22	6,36x10 ⁸ ±0,26
	<i>Lb. bulgaricus</i>	2,16x10 ⁸ ±0,3	5,8x10 ⁷ ±0,21	4,4x10 ⁷ ±0,18	1,13x10 ⁸ ±0,33
J 299	<i>St. thermophilus</i>	8,9x10 ⁸ ±0,27	9,2x10 ⁸ ±0,05	1,25x10 ⁹ ±0,29	7,22x10 ⁸ ±0,27
	<i>Lb. bulgaricus</i>	4,5x10 ⁸ ±0,16	2,68x10 ⁸ ±0,26	3,29x10 ⁸ ±0,34	3,76x10 ⁸ ±0,16
JSS 299v	<i>St. thermophilus</i>	9,15x10 ⁸ ±0,12	8,5x10 ⁷ ±0,3	8,33x10 ⁸ ±0,08	1,01x10 ⁹ ±0,05
	<i>Lb. bulgaricus</i>	2,25x10 ⁸ ±0,15	3,5x10 ⁷ ±0,04	1,55x10 ⁷ ±0,15	1,14x10 ⁸ ±0,12

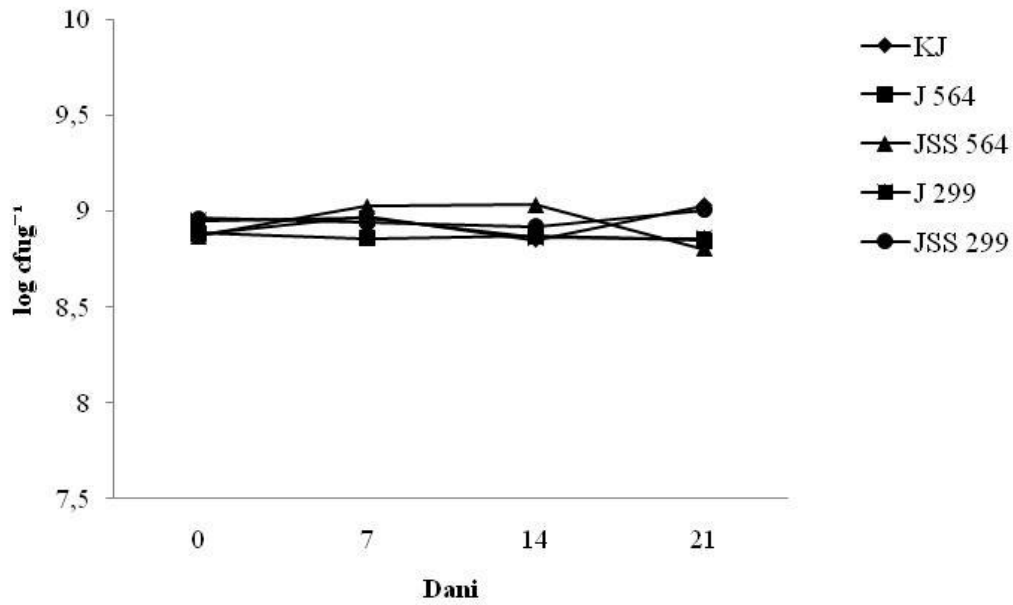
^a Srednja vrednost±standardna devijacija nakon tri ponavljanja (p≥0,05)

Početni broj streptokoka je bio iznad 10⁸ cfuml⁻¹ u svim varijantama. Nakon 7 dana skladištenja broj streptokoka je neznatno varirao, kao i nakon 14 dana. Na kraju 21 dana skladištenja, primećen je blagi porast broja streptokoka kod jogurta sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v (JSS 299v), dok je u svim ostalim varijantama broj

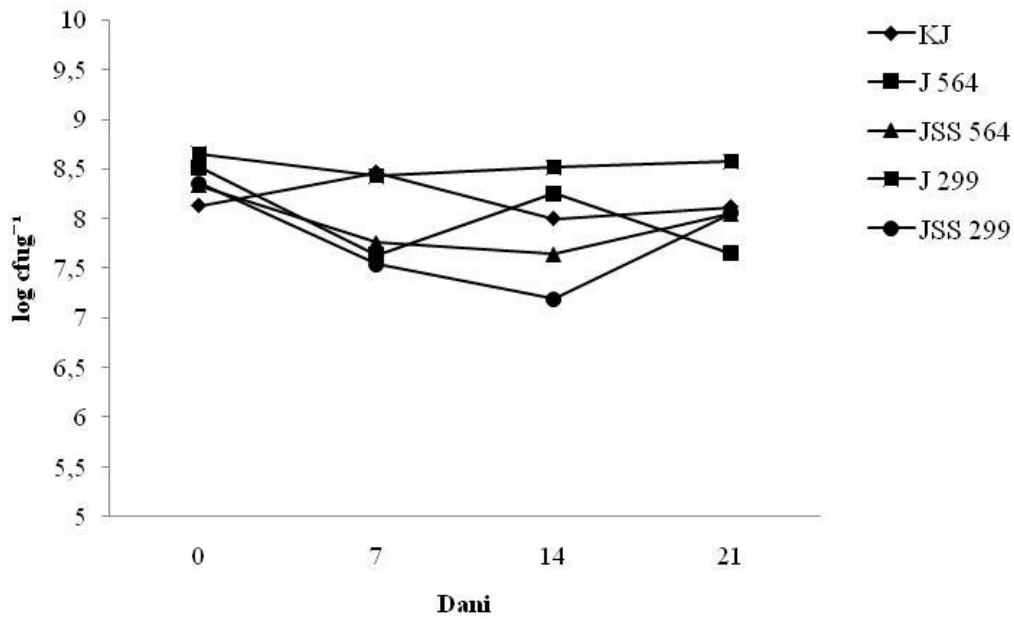
streptokoka bio veoma sličan. U svim varijantama jogurta, streptokoke su se održale na nivou većem od 10^8 cfuml⁻¹ tokom celokupnog perioda skladištenja. Ispitivanjem vijabilnosti laktobacila, nakon 7 dana skladištenja primećen je pad broja ćelija za 1 log u jogurtu sa dodatkom slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 (J 564 i JSS 564), kao i u jogurtu sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v (JSS 299v). Takođe, kod kontrolne varijante (KJ) ustanovljen je pad broja laktobacila nakon 14 dana skladištenja. Međutim, nakon 21 dana skladištenja primećen je porast broja laktobacila u jogurtu sa dodatkom slobodnih ćelija *Lb. plantarum* 564 (J 564), kao i kod jogurta sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v (JSS 299v).

Na kraju skladištenja, broj starter kultura je ostao na visokom nivou u svim varijantama jogurta. Između varijanti nije bilo statistički značajnih razlika ($p \geq 0,05$) u broju starter kultura, kao ni između varijanti sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama probiotskih bakterija. Isto tako, između ponavljanja nisu ustanovljene statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$).

Slični rezultati su pronađeni i kod drugih autora. Batista et al. (2015) su naveli da je broj starter kultura u jogurtu sa dodatkom probiotika *Lb. acidophilus* La 14 i *B. longum* BI05, bio visok tokom skladištenja. Isto tako, u jogurtu sa dodatkom *Lb. acidophilus* LA-5, *B. animalis* ssp *lactis* BB-12 i *P. jensenii* 702 došlo je do malog pada broja ćelija *St. thermophilus*, dok je broj *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* bio neznatno veći u odnosu na broj streptokoka. Međutim, broj starter kultura je bio na veoma visokom nivou, tj. iznad 10^7 cfuml⁻¹ (Ranadheera et al., 2012).



Grafik 5. Promene broja ($\log \text{cfu ml}^{-1}$) *Streptococcus thermophilus* u jogurtu sa probiotskim bakterijama tokom skladištenja



Grafik 6. Promena broja ($\log \text{cfu ml}^{-1}$) *Lb. delbreckii ssp. bulgaricus* u jogurtu sa probiotskim bakterijama tokom skladištenja

Takođe, utvrđeno je da u jogurtu sa dodatkom vlakana određenog voća dolazi do porasta broja starter kultura u varijantama sa probiotskim bakterijama (Espirito Santo et al., 2012).

4.8.2. Broj starter kultura u siru od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama

Sirevi kao prehrambeni proizvodi predstavljaju bogat izvor biogenih i bioaktivnih supstanci (biogeni peptidi, antimikrobne peptid, itd.), a dodatak probiotskih bakterija bi svakako poboljšao funkcionalna svojstva sireva i doprineo njihovom pozitivnom efektu na zdravlje potrošača. U pregledu literature je opširnije objašnjeno o siru kao nosaču probiotskih bakterija, kao i o efektu probiotskog sira na zdravlje potrošača. Veoma je bitno istaći da prilikom primene probiotskih bakterija, hemijske i senzorne karakteristike sireva treba da ostanu nepromenjene ili eventualno poboljšane. Pored toga, broj starter kultura bi trebalo da bude sličan broju starter kultura sireva bez probiotskih bakterija.

Nakon proizvodnje sira od UF mleka sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v, praćen je broj ćelija starter kultura sireva od UF mleka tokom 56 dana skladištenja. Promene broja starter kultura *L. lactis* ssp. *lactis* i *L.lactis* ssp. *cremoris* u siru od UF mleka prikazane su u tabeli 21, a logaritamske vrednosti promene broja su prikazane u na grafiku 7.

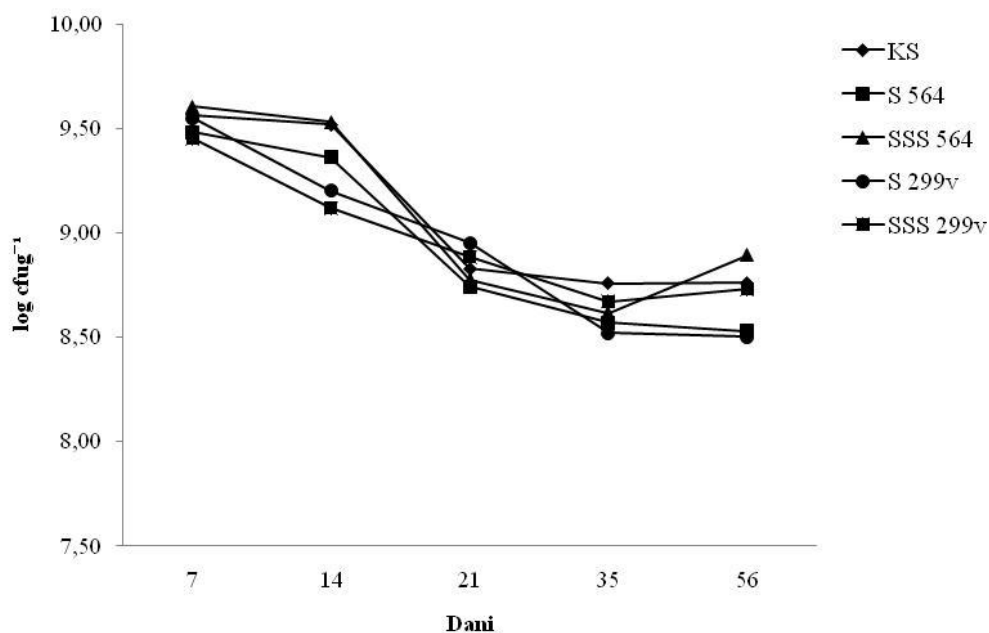
Tabela 21. Promena broja (cfug⁻¹) starter kultura u sirevima od UF mleka tokom skladištenja

Sir	Dani ^a				
	7	14	21	35	56
KS	3,74x10 ⁹ ±0,12	3,67x10 ⁹ ±0,3	6,82x10 ⁸ ±0,05	5,84x10 ⁸ ±0,13	5,84x10 ⁸ ±0,05
S 564	3,09x10 ⁹ ±0,21	2,33x10 ⁹ ±0,17	5,56x10 ⁸ ±0,12	3,75x10 ⁸ ±0,28	3,67x10 ⁸ ±0,12
SSS 564	4,1x10 ⁹ ±0,26	3,67x10 ⁹ ±0,15	5,6x10 ⁸ ±0,130 ⁸ ±	4,2x10 ⁸ ±0,06	6,85x10 ⁸ ±0,11
S 299v	3,75x10 ⁹ ±0,1	1,6x10 ⁹ ±0,2	9x10 ⁸ ±0,24	3,66x10 ⁸ ±0,16	3,64x10 ⁸ ±0,26
SSS 299v	3,07x10 ⁹ ±0,05	1,34x10 ⁹ ±0,04	6,84x10 ⁸ ±0,31	4,75x10 ⁸ ±0,04	5,4x10 ⁸ ±0,19

^a Srednja vrednost±standardna devijacija nakon tri ponavljanja (p≥0,05)

Početni broj starter kultura u siru od UF mleka je bio na visokom nivou (iznad 10^9 cfug⁻¹) u svim varijantama i taj broj se održao tokom 14 dana. Nakon 21 dana skladištenja, došlo je do pada broja starter kultura u svim varijantama sireva, pri čemu se broj ćelija održao na nivou iznad 10^8 cfug⁻¹. Ovaj visok nivo starter kultura se održao do kraja 56 dana skladištenja.

Takođe, bitno je istaći da između kontrolne varijante i varijanti sireva sa probiotskim bakterijama nije bilo značajnih razlika u broju starter kultura ($p \geq 0,05$).



Grafik 7. Promena broja (log cfug⁻¹) starter kultura u siru od UF mleka sa probiotskim bakterijama tokom skladištenja

U ranijim istraživanjima je dokazano da probiotske bakterije ne utiču na vijabilnost starter kultura tokom skladištenja, kao ni tokom zrenja. Prilikom primene probiotskih bakterija *Lb. fermentum* Ab5-18 i AK4-120, kao i *Lb. plantarum* AB16-65 i AC18-82, tokom proizvodnje i zrenja Turskog Beyaz sira, broj ćelija starter kulture *L. lactis* subsp. *cremoris* i *L. lactis* subsp. *lactis* je nakon 120 dana zrenja bio veći od 10^7 cfug⁻¹ (Kilic et al., 2009). Takođe, broj starter kultura *L.lactis* ssp. *lactis* i *L. lactis* ssp. *cremoris* je ostao nepromenjen tokom proizvodnje i zrenja vakum pakovanog belog sira sa probiotikom *Lb. acidophilus* (Kasimoglu et al., 2004). Prilikom primene probiotskih bakterija *Lb. acidophilus* i *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* u proizvodnji polutvrđog sira, broj ćelija starter kulture *St. thermophilus* je bio na nivou većem od 10^9 cfug⁻¹ nakon

presovanja i soljenja, i taj nivo se održao i nakon zrenja (Bergamini et al., 2006). Takođe, nije bilo statistički značajnih razlika u broju starter kultura između kontrolnog sira bez dodatka probiotika i varijante sira sa probioticima.

Potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 je prethodno primenjen u proizvodnji kiselokoagulišućeg kozijeg sira, gde je ispitivan uticaj potencijalnog probiotika na hemijske i senzorne karakteristike sira (Radulović et al., 2011b, 2012b). Autori su prilikom ispitivanja uticaja slobodnih i inkapsulisanih ćelija *Lb. plantarum* 564, ustanovili da je broj starter kultura veoma sličan broju starter kultura kontrolne varijante bez probiotskih bakterija, na osnovu čega su zaključili da potencijalni probiotik ne utiče na vijabilnost startera.

Pravilan odabir odgovarajućeg soja probiotika, ali i starter kulture svakako treba da doprinose dobroj interakciji između kultura, a samim tim i nepromenjenom broju ćelija starter kultura tokom skladištenja probiotskih sireva.

4.8.3. Vijabilnost probiotskih bakterija u prehrambenim proizvodima

4.8.3.1. Vijabilnost probiotskih bakterija u jogurtu

Prilikom proizvodnje jogurta, momenat dodavanja probiotskih bakterija može da se vrši na dva načina. Prvi način jeste da se probiotske bakterije dodaju u mleko neposredno pre fermentacije, dok se primenom drugog načina, probiotske bakterije dodaju nakon fermentacije, a neposredno pre pakovanja. Bez obzira na način dodavanja probiotskih bakterija, njihov broj je u većini slučajeva ostao nepromenjen (Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001). U prethodnim ispitivanjima, potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 je primenjen u proizvodnji jogurta sa probiotskim bakterijama i omega-3 masnim kiselinama (Radulović et al., 2014). Prilikom proizvodnje, *Lb. plantarum* 564 je dodat pre fermentacije jogurta i opstao je na odgovarajućem nivou tokom skladištenja. Takođe, rezultati ispitivanja su pokazali da dodati potencijalni probiotski soj *Lb. plantarum* 564 nije uticao na tok fermentacije, kao ni na senzorne karakteristike jogurta. Zbog svega prethodno navedenog, potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 i komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v dodati su pre fermentacije jogurta u odgovarajućim količinama. Isto tako, prilikom inkorporacije praha sprej sušenih

probiotskih bakterija znatno je lakše ravnomerno homogenizovati čestice praha u mleku u odnosu na jogurt.

Promene broja probiotskih ćelija u jogurtu tokom skladištenja su prikazane u tabeli 22, a logaritamske vrednosti su prikazane na grafiku 8 (slobodne i sprej sušene ćelije *Lb. plantarum* 564) i 9 (slobodne i sprej sušene ćelije *Lb. plantarum* 299v).

Tabela 22. Vijabilnost (cfuml⁻¹) probiotskih bakterija u jogurtu tokom skladištenja

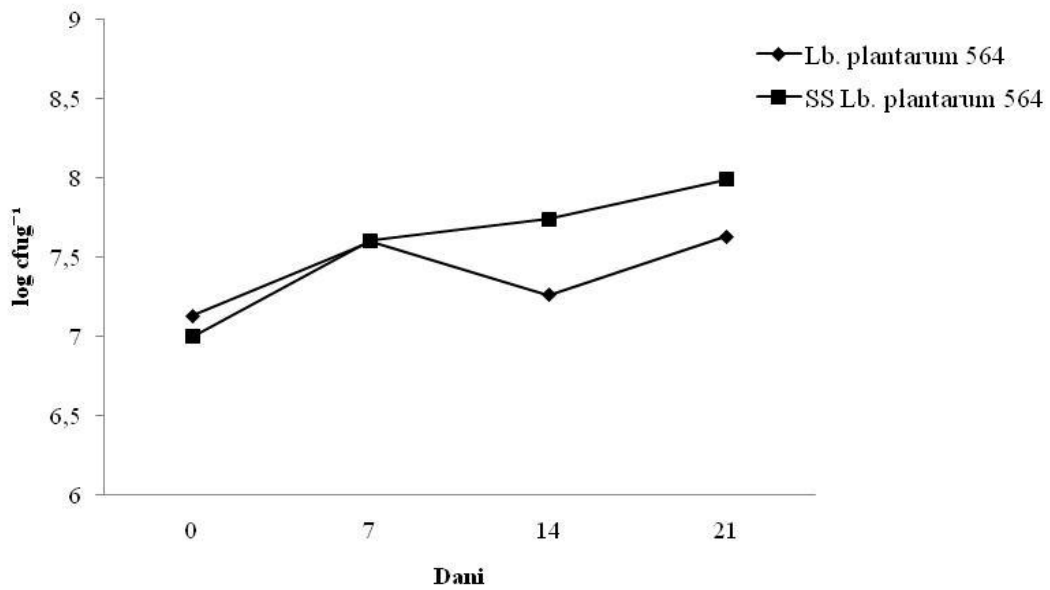
Probiotske bakterije	Dani ^a			
	0	7	14	21
<i>Lb. plantarum</i> 564	1,35x10 ⁷ ±0,06	4x10 ⁷ ±0,24	1,83x10 ⁷ ±0,05	4,3x10 ⁷ ±0,24
SS* <i>Lb. plantarum</i> 564	1x10 ⁷ ±0,13	4,03x10 ⁷ ±0,26	5,53x10 ⁷ ±0,14	9,8x10 ⁷ ±0,07
<i>Lb. plantarum</i> 299v	9x10 ⁷ ±0,29	2,61x10 ⁷ ±0,15	3,51x10 ⁷ ±0,24	2,7x10 ⁷ ±0,16
SS <i>Lb. plantarum</i> 299v	6x10 ⁷ ±0,07	8,5x10 ⁷ ±0,27	6,27x10 ⁷ ±0,31	4,01x10 ⁷ ±0,17

*SS-sprej sušene probiotske bakterije

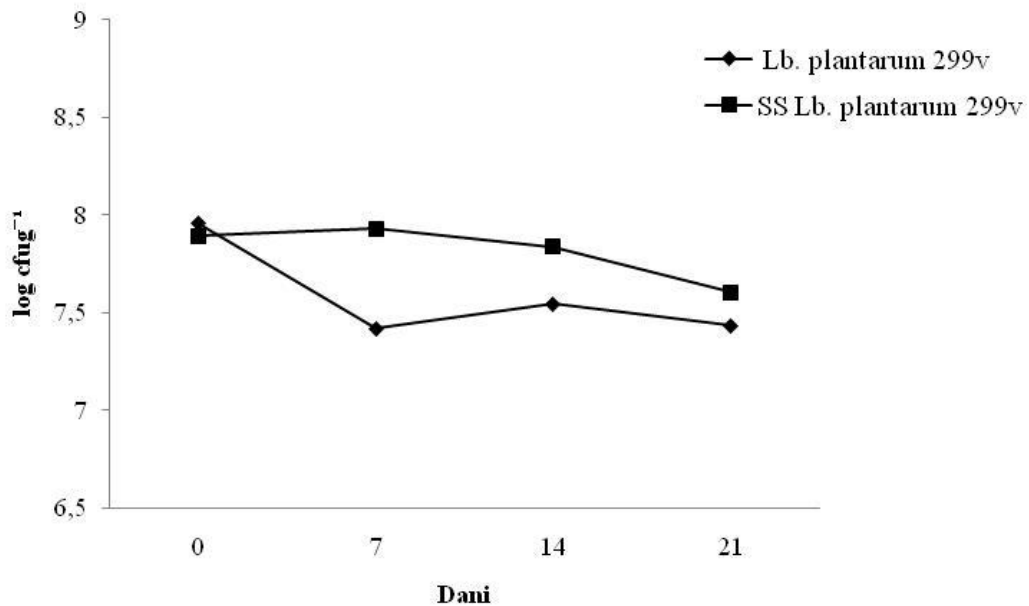
^a Srednja vrednost±standardna devijacija nakon tri ponavljanja (p≥0,05)

Sposobnost preživljavanja probiotskih bakterija u jogurtu zavisi od nekoliko faktora, kao što su vrsta soja koja se koristi, starter kultura, interakcija između bakterija, nivo kiselosti, sastav mleka, koncentracija šećera, prisustvo inhibitora ili promotora rasta, itd. (Lourens-Hattingh i Viljoen 2001; Zago et al. 2011). Da bi probiotske bakterije preživele na odgovarajućem nivou tokom skladištenja jogurta, treba voditi računa o uticaju navedenih faktora na broj probiotskih ćelija.

Nakon proizvodnje jogurta, broj slobodnih i inkapsulisanih ćelija *Lb. plantarum* 564 je bio nešto iznad 10⁷ cfuml⁻¹ (1,35x10⁷ cfuml⁻¹ i 1x10⁷ cfuml⁻¹, redom), dok je broj *Lb. plantarum* 299v bio nešto veći (9x10⁷ cfuml⁻¹ i 6x10⁷ cfuml⁻¹). Nakon 7 dana skladištenja, broj ćelija *Lb. plantarum* 564 se neznatno povećao (slobodne 4x10⁷ cfuml⁻¹ i inkapsulisane 4,03x10⁷ cfuml⁻¹), dok se broj ćelija *Lb. plantarum* 299v održao na istom nivou.



Grafik 8. Vijabilnost ($\log \text{cfuml}^{-1}$) slobodnog i sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 u jogurtu tokom skladištenja



Grafik 9. Vijabilnost ($\log \text{cfuml}^{-1}$) slobodnog i sprej sušenog komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v u jogurtu tokom skladištenja

Nakon 14 dana skladištenja probiotske bakterije su bile na nivou iznad 10^7 cfuml^{-1} , da bi se nakon 21 dana broj slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 održao na istom stepenu ($4,3 \times 10^7 \text{ cfuml}^{-1}$ slobodnih i $9,8 \times 10^7 \text{ cfuml}^{-1}$ sprej sušenih ćelija). Broj

slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 299v se održao na nivou većem od 10^7 cfuml⁻¹ ($2,7 \times 10^7$ cfuml⁻¹ slobodnih i $4,01 \times 10^7$ cfuml⁻¹ sprej sušenih ćelija).

Tokom skladištenja jogurta primećeno je da je broj slobodnih i sprej sušenih ćelija probiotskih bakterija bio veoma sličan, ali trend promene broja tokom skladištenja je bio različit, zbog čega je na kraju skladištenja došlo do razlike u broju. Zapaženo je da je broj slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 bio u porastu tokom skladištenja jogurta, za razliku od slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 299v gde je primećen pad broja ćelija tokom skladištenja. Isto tako, primećeno je da nije došlo do naglih promena broja sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v. S tim u vezi, može se ustanoviti da je inkapsulacija sprej sušenjem doprinela postepenom otpuštanju imobilisanih ćelija, zbog čega nije došlo do variranja broja ćelija tokom skladištenja jogurta. Broj inkapsulisanih ćelija *Lb. plantarum* 564 ($9,8 \times 10^7$ cfuml⁻¹) je bio neznatno veći nego broj slobodnih ćelija u jogurtu ($4,3 \times 10^7$ cfuml⁻¹) nakon 21 dana skladištenja. Ista situacija je primećena i kod *Lb. plantarum* 299v (inkapsulisane $4,014 \times 10^8$ cfuml⁻¹ i slobodne ćelije $2,7 \times 10^8$ cfuml⁻¹), što bi moglo da ukaže na bolju vijabilnost sprej sušenih ćelija u odnosu na slobodne probiotske ćelije u jogurtu. Međutim, razlike u broju ćelija nisu statistički značajne. Ukoliko bi se jogurt sa probiotskim bakterijama duže skladištio, moglo bi da se pretpostavi da bi došlo do značajnih razlika u broju slobodnih sprej sušenih probiotskih ćelija. Takođe, boljom vijabilnošću sprej sušenih ćelija bi se potvrdio pozitivan efekat sprej sušenja i zaština uloga ove inkapsulacione metode.

S obzirom na to da probiotske bakterije imaju najdužu primenu u proizvodnji jogurta, tokom godina sprovedena su mnogobrojna istraživanja o uticaju probiotskih bakterija na karakteristike jogurta. Probiotske bakterije *Lb. acidophilus* LA-5, *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 i *P. jensenii* 702 primenjeni su u proizvodnji običnog i voćnog jogurta, gde je tokom 4 nedelje skladištenja praćena vijabilnost probiotka (Ranahadeera et al., 2012). Tokom skladištenja, došlo je do pada broja probiotskih bakterija, naročito *Lb. acidophilus* LA-05. S obzirom na to da su probiotske bakterije dodavane u kombinaciji sa jogurnim starter kulturama, autori smatraju da je usled „borbe“ kultura za hranljivim materijama došlo do niske vijabilnosti probiotskih bakterija. Takođe, navode da bi broj bio znatno veći da su kulture dodavane pojedinačno, usled dovoljne količine hranljivih materija. Međutim, nivo probiotskih bakterija *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 i *P. jensenii*

702 bio je na zadovoljavajućem nivou (iznad 10^7 cfuml⁻¹) i nakon 4 nedelje skladištenja.

Tokom godina, ustanovljeno je da proces mikroinkapsulacije dovodi do bolje vijabilnosti probiotika u jogurtu. Kailasapathy (2006) je ustanovio da je tokom 8 nedelja skladištenja jogurta došlo do smanjenja broja slobodnih ćelija *Lb. acidophilus* DD920 i *B.lactis* DD920 za 4 log cfuml⁻¹. Međutim, primena sprej sušenih probiotika je dovela do smanjenja broja *Lb.acidophilus* DD920 za 2 log cfuml⁻¹, odnosno za 1 log cfuml⁻¹ *B.lactis* DD920. Slične rezultate su dobili Adhikari et al. (2000), gde su ustanovljene značajne razlike u broju slobodnih i inkapsulisanih probiotika u jogurtu nakon 30 dana skladištenja. Pored sprej sušenja kao tehnike mikroinkapsulacije, tehnika ekstruzije je takođe pružila veoma dobru vijabilnost probioticima *Lb. acidophilus* 2401 i *B.infantis* 1912 tokom 8 nedelja skladištenja jogurta (Sultana et al., 2000).

Posmatrajući rezultate istraživanja može se ustanoviti da nije bilo značajnih razlika u broju ćelija između slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v. Kod svih varijanti jogurta, broj probiotskih ćelija se održao na odgovarajućem nivou (iznad 10^7 cfuml⁻¹) tokom skladištenja. Takođe, nije bilo statistički značajnih razlika između ponavljanja ($p \geq 0,05$), kao ni između varijanti jogurta. S obzirom na to da su istraživanja drugih autora ukazala na značajne razlike u broju slobodnih i inkapsulisanih probiotskih ćelija nakon 8 nedelja skladištenja, svakako bi trebalo ispitati vijabilnost potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i nakon dužeg perioda skladištenja jogurta, gde bi realno bilo očekivati značajne razlike u broju slobodnih i sprej sušenih probiotskih ćelija.

4.8.3.2. Vijabilnost probiotskih bakterija u siru od ultrafiltriranog mleka

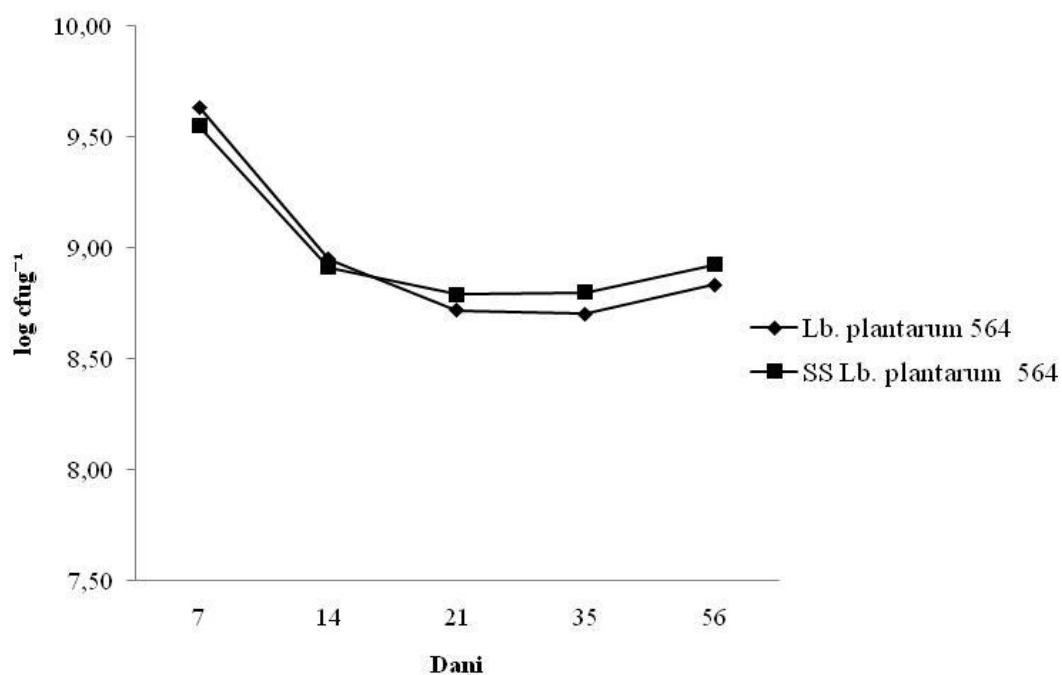
Vijabilnost probiotskih bakterija u siru od UF mleka tokom skladištenja prikazana je u tabeli 23, dok su logaritamske vrednosti prikazane na grafiku 10 (slobodne i sprej sušene ćelije *Lb. plantarum* 564) i 11 (slobodne i sprej sušene ćelije *Lb. plantarum* 299v).

Tabela 23. Vijabilnost (cfug^{-1}) probiotika u siru od UF mleka tokom skladištenja

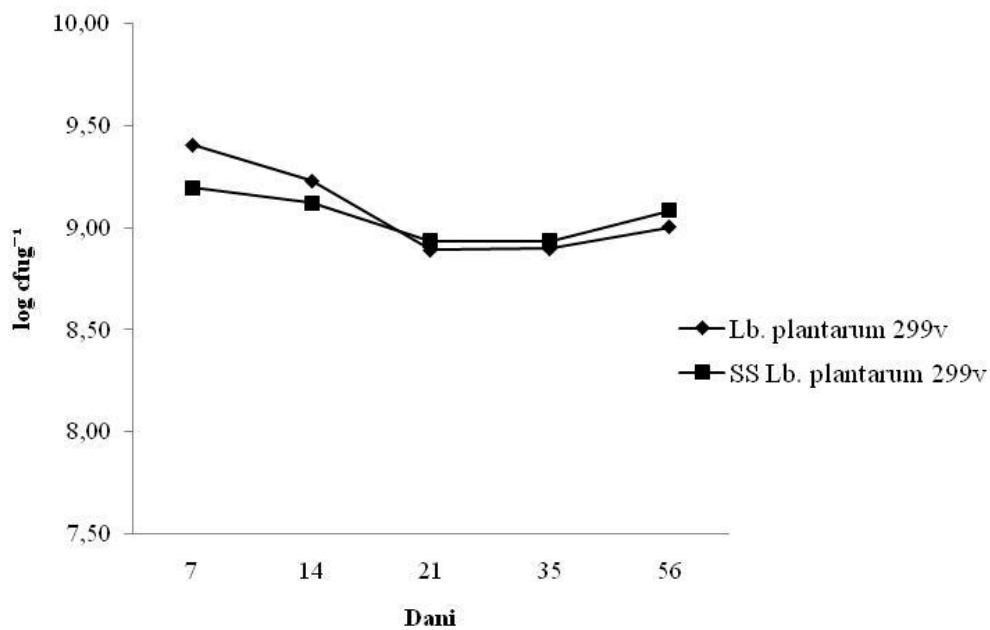
Probiotici	Dani ^a				
	7	14	21	35	56
564	$4,31 \times 10^9 \pm 0,12$	$8,95 \times 10^8 \pm 0,26$	$5,31 \times 10^8 \pm 0,17$	$5,26 \times 10^8 \pm 0,27$	$6,96 \times 10^8 \pm 0,3$
SS 564	$3,34 \times 10^9 \pm 0,05$	$8,21 \times 10^8 \pm 0,07$	$6,3 \times 10^8 \pm 0,06$	$6,41 \times 10^8 \pm 0,14$	$8,3 \times 10^8 \pm 0,25$
299v	$2,56 \times 10^9 \pm 0,13$	$1,7 \times 10^9 \pm 0,19$	$7,72 \times 10^8 \pm 0,09$	$7,76 \times 10^8 \pm 0,08$	$9,5 \times 10^8 \pm 0,16$
SS 299v	$1,57 \times 10^9 \pm 0,26$	$1,34 \times 10^9 \pm 0,08$	$8,73 \times 10^8 \pm 0,19$	$8,73 \times 10^8 \pm 0,13$	$1,23 \times 10^9 \pm 0,17$

*SS-sprej sušene probiotske bakterije

^a Srednja vrednost \pm standardna devijacija nakon tri ponavljanja ($p \geq 0,05$)



Grafik 10. Vijabilnost (log cfug^{-1}) slobodnog i sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 u siru od UF mleka tokom skladištenja



Grafik 11. Vijabilnost ($\log \text{cfug}^{-1}$) slobodnog i sprej sušenog probiotika *Lb. plantarum* 299v u siru od UF mleka tokom skladištenja

Tokom 56 dana skladištenja sira od UF mleka, broj slobodnih i inkapsulisanih probiotika se održao na nivou većem od 10^8 cfug^{-1} . Kod sireva sa slobodnim i sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 nije došlo do značajne razlike u broju ćelija, s tim što je primećeno da je nakon 21 dana skladištenja, broj sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 nešto veći od broja slobodnih ćelija. Navedena razlika se s vremenom povećavala. Slična razlika je primećena i kod sireva sa *Lb. plantarum* 299v, gde je na kraju skladištenja primećena neznatna razlika u broju slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 299v. Međutim, nisu primećene značajne statističke razlike ($p \geq 0,05$) između varijanti sireva od UF mleka sa slobodnim i sprej sušenim probiotskim ćelijama. Takođe, nije bilo statistički značajnih razlika ni između ponavljanja.

Zbog većeg procenta masti i boljeg pufernog kapaciteta, sir od ultrafiltriranog mleka je predstavljao pogodniju sredinu za rast probiotskih bakterija u odnosu na jogurt. Zahvaljujući karakteristikama sira od UF mleka, vijabilnost slobodnih i sprej sušenih probiotika bila je na višem nivou i tokom značajno dužeg vremenskog perioda u odnosu na jogurt sa probiotskim bakterijama. Međutim, kao i kod jogurta sa probiotskim bakterijama, nije zapažena značajna razlika između broja slobodnih i sprej sušenih probiotskih ćelija. Pretpostavlja se da bi razlika u broju slobodnih i sprej sušenih

probiotskih ćelija bila značajno veća, ukoliko bi sir od UF mleka bio duže skladišten, odnosno sprej sušeni probiotici bi se održali na većem nivou.

Rezultati istraživanja o primeni probiotskih bakterija u proizvodnji sireva ostalih autora su veoma slični rezultatima ove doktorske disertacije. Probiotske bakterije *Lb. fermentum* Ab5-18 i AK4-120 i *Lb. plantarum* AB16-65 i AC18-82 su pokazale veoma visok broj ćelija tokom 90 dana zrenja turskog Beyaz sira (iznad 10^8 cfug⁻¹). Međutim, nakon 120 dana došlo je do značajnog pada broja na nivo 10^5 cfug⁻¹ sira (Kilic et al., 2009). Bitno je napomenuti da su u ovom istraživanju probiotske bakterije primenjene kao slobodne ćelije. Pored Beyaz sira, 8 probiotskih bakterija je primenjeno u proizvodnji čedar sira, gde su zapažene značajne razlike u broju ćelija između sojeva (Phillips et al., 2006). Vrste *Bifidobacterium* su tokom 32 nedelja ostvarile maksimalan broj nakon 12 nedelja, da bi nakon toga došlo do blagog pada ćelija. Međutim, broj *Bifidobacterium* vrsta se održao na nivou većem od 10^8 cfug⁻¹ nakon 8 meseci. Probiotske bakterije *Lb. acidophilus* L10 i La5 održale su se u Čedar siru na veoma niskom nivou. Broj ćelija *Lb. acidophilus* L10 i La5 je nakon 8 nedelja bio stabilan, da bi nakon toga došlo do pada broja ćelija, pri čemu je na kraju 32. nedelje broj ćelija bio 10^3 cfug⁻¹. Međutim, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* i *Lb. rhamnosus* su pokazale vrlo sličan broj ćelija kao i *Bifidobacterium* vrste. Broj ćelija navedenih probiotika je nakon 32 nedelje bio na nivou većem od 10^7 cfug⁻¹.

Pored primene u obliku slobodnih ćelija, inkapsulisane probiotske bakterije su takođe primenjene u proizvodnji različitih vrsta sireva. U većini istraživanja probiotske bakterije su primenjene u obliku slobodnih i inkapsulisanih ćelija, kako bi se mogla ispitati i uporediti njihova vijabilnost tokom zrenja ili skladištenja. Kao jedan od primera se navodi čedar sir sa sprej sušenim probiotikom *Lb. casei* subsp. *paracasei* NCFB 338, koji je nakon proizvodnje sira bio na nivou 2×10^7 cfug⁻¹, da bi nakon 90 dana zrenja broj sprej sušenih ćelija bio na nivou 7.7×10^7 cfug⁻¹ (Gardinier et al., 2002). Isto tako, probiotske bakterije *Lb. acidophilus* LA-5 i *B. bifidum* BB-12 su inkorporirane u proizvodnji belog sira kao slobodne i inkapsulisane ćelije tehnikom ekstruzije (Ozer et al., 2009). Tokom skladištenja, inkapsulisane probiotske ćelije su se održale na odgovarajućem nivou, odnosno iznad 10^7 cfug⁻¹, dok su slobodne ćelije bile ispod potrebnog nivoa za terapijski efekat probiotika.

Sveži meki sirevi predstavljaju veoma pogodnu sredinu za rast probiotika, s obzirom na to da nema procesa zrenja i da se sirevi nakon fermentacije skladište na niskoj temperaturi, što dovodi do relativno kratkog roka trajanja proizvoda (Awaisheh, 2012). Pored toga, sveži meki sirevi su veoma popularni širom sveta, zbog veoma popularnog ukusa i mekane teksture. Potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 je u obliku slobodnih i sprej sušenih ćelija primenjen u proizvodnji kiselokoagulišućeg mekog sira od kozijeg mleka, gde je tokom 8 nedelja skladištenja praćen broj starter kultura i probiotskih bakterija, kao i hemijske i senzorne karakteristike sira. Inkapsulisane potencijalne probiotske ćelije *Lb. plantarum* 564 su opstale na nivou većem od 10^8 cfug⁻¹ nakon 8 nedelja, dok su slobodne ćelije nakon 35 dana bile na nivou 10^7 cfug⁻¹, pri čemu se taj nivo zadržao do kraja skladištenja. Takođe, senzorne i hemijske karakteristike proizvoda su ostale nepromenjene u odnosu na svojstva sireva bez probiotika (Radulović et al., 2011b, 2012b).

Pregledom literature primećen je veliki broj istraživanja u kojima su autohtone BMK izolovane iz tradicionalnih sireva primenjivane u proizvodnji različitih sireva, gde su ostvarile ulogu startera ili potencijalnih probiotskih bakterija. Potencijalne probiotske bakterije *Lb. casei* I90, *Lb. plantarum* I91, *Lb. rhamnosus* I73 i I77, izolovane iz sira primenjene su u proizvodnji argentinskog mekog Cremoso sira i polutvrdog Pategras sir. Tokom zrenja potencijalne probiotske bakterije su opstale na nivou 10^7 - 10^8 cfug⁻¹, pri čemu je soj *Lb. plantarum* I91 ostvario najveći nivo (Milesi et al., 2009).

Prikazani rezultati, kao i rezultati ostalih istraživanja, jasno ukazuju na veliki potencijal primene probiotskih bakterija u različitim vrstama sireva. Pored visokog broja probiotskih ćelija tokom dugog perioda zrenja ili skladištenja, istraživanja su pokazala da probiotske bakterije ne utiču na hemijske i senzorne karakteristike sireva. Samim tim, potrošači mogu da konzumiraju obogaćen sir s mnogobrojnim pozitivnim zdravstvenim karakteristikama, prepoznatljivih senzornih karakteristika, posebno ukusa i mirisa.

4.8.3.3. Vijabilnost probiotskih bakterija u crnoj čokoladi

Tradicionalno, probiotici se primenjuju u različitim fermentisanim proizvodima od mleka. Međutim, netolerancija na laktozu, alergija na mlečne proteine i ostali faktori

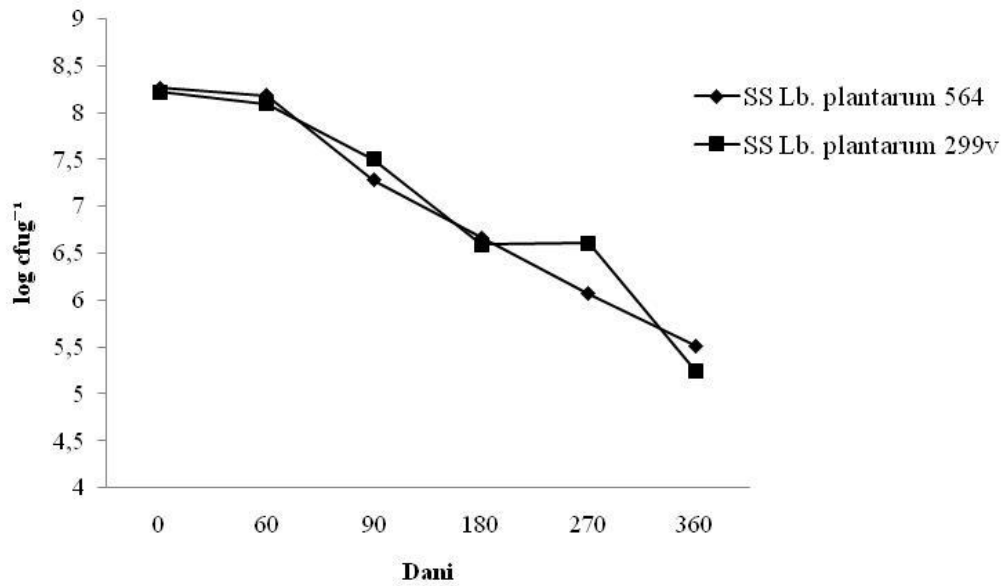
koji su navedeni u pregledu literature, onemogućavaju određenoj grupi potrošača konzumiranje mlečnih proizvoda sa dodatkom probiotika. Zbog toga je danas sve više prisutna primena probiotika u drugim prehrambenim proizvodima. Čokolada, kao proizvod koji je popularan u svim kategorijama potrošača, veoma je interesantna sa aspekta mogućnosti inkorporacije probiotika. U skladu sa razvojem proizvodnje probiotske čokolade, jedan od glavnih ciljeva jeste da probiotici budu prisutni u odgovarajućem broju (10^6 - 10^7 cfug⁻¹) tokom proizvodnje i skladištenja, pa sve do kraja roka trajanja crne čokolade. Na vijabilnost probiotika u crnoj čokoladi mogu da utiču mnogi faktori, pogotovo fizičko-hemijske karakteristike crne čokolade (sadržaj masti, šećera, itd), kao i dodatak određenih sastojaka kao što su stabilizatori, zaslađivači, itd. S obzirom na to da su rezultati ispitivanja vijabilnosti probiotskih bakterija u jogurtu i siru od UF mleka pokazali bolju vijabilnost sprej sušenih u odnosu na slobodne ćelije, kao i stabilan broj sprej sušenih ćelija i nepromenjene senzorne karakteristike proizvoda tokom skladištenja, prilikom proizvodnje crne čokolade *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v su primenjeni samo kao inkapsulisane ćelije. Vijabilnost inkapsulisanih probiotika u čokoladi je predstavljena na grafiku 12, dok je broj ćelija prikazan u tabeli 24.

Tabela 24. Vijabilnost (cfug⁻¹) sprej sušenih probiotskih ćelija u crnoj čokoladi

Probiotici	Dani ^a					
	0	60	90	180	270	360
SS 564*	2,1x10 ⁸ ±0,15	1,57x10 ⁸ ±0,15	1,91x10 ⁷ ±0,08	4,82x10 ⁶ ±0,16	1,16x10 ⁶ ±0,02	3,26x10 ⁵ ±0,05
SS 299v	1,67x10 ⁸ ±0,1	1,2x10 ⁸ ±0,03	3,15x10 ⁷ ±0,1	3,9x10 ⁶ ±0,08	4,04x10 ⁶ ±0,02	1,8x10 ⁵ ±0,09

*SS-sprej sušene probiotske bakterije

^a Srednja vrednost±standardna devijacija nakon tri ponavljanja (p≥0,05)



Grafik 12. Vijabilnost ($\log \text{cfug}^{-1}$) sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v u crnoj čokoladi

Tokom 360 dana skladištenja čokolade rezultati vijabilnosti pokazuju da su oba probiotika imala veoma dobru sposobnost preživljavanja. Kod crne probioticske čokolade sa *Lb. plantarum* 564 primećeno je da je tokom prvih 60 dana skladištenja broj inkapsuliranih ćelija bio iznad 10^8 cfug^{-1} . Nakon 90 dana skladištenja broj inkapsuliranih ćelija se postepeno smanjivao i dostigao broj $1,91 \times 10^7 \text{ cfug}^{-1}$. Po isteku 180 dana skladištenja, broj inkapsuliranog *Lb. plantarum* 564 je dostigao vrednost $4,82 \times 10^6 \text{ cfug}^{-1}$, da bi 270 dana skladištenja broj inkapsuliranih ćelija bio $1,16 \times 10^6 \text{ cfug}^{-1}$. Na kraju 360 dana skladištenja, broj sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 je bio manji od 10^6 cfug^{-1} ($3,26 \times 10^5 \text{ cfug}^{-1}$).

Slični rezultati su dobijeni i kod crne čokolade sa komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v. Broj inkapsuliranog probiotika *Lb. plantarum* 299v u crnoj čokoladi je tokom 60 dana skladištenja bio na nivou većem od 10^8 cfug^{-1} , da bi 90. dana broj ćelija pao na vrednost $3,15 \times 10^7 \text{ cfug}^{-1}$. Nakon 180 dana skladištenja, broj inkapsuliranog probiotika je pao za još jednu logaritamsku vrednost ($3,6 \times 10^6 \text{ cfug}^{-1}$) i taj broj se zadržao i nakon 270 dana skladištenja ($4,04 \times 10^6 \text{ cfug}^{-1}$). Po isteku 360 dana skladištenja, broj inkapsuliranog probiotika je bio $1,8 \times 10^5 \text{ cfug}^{-1}$.

Tokom skladištenja crne probiotske čokolade uočeno je da je broj probiotskih kultura bio na sličnom nivou, kao i da nije postojalo statistički značajnih razlika između ponavljanja ($p \geq 0,05$). Takođe, ukazano je da su probiotici ostvarili odgovarajuću vijabilnost tokom skladištenja na temperaturi od 20°C, čime crna čokolada ostvaruje svoju funkcionalnost i tokom skladištenja na sobnoj temperaturi, što je značajno za proizvođače, ali i za potrošače.

S obzirom na to da temperatura tokom proizvodnje crne čokolade može da dostigne vrednost i do 70°C, tradicionalna proizvodnja je modifikovana tako da su probiotici nakon temperiranja dodavani u čokoladi pri temperaturi od oko 30°C, čime je umanjen efekat temperature na vijabilnost probiotika tokom skladištenja proizvoda. Međutim, drugi proizvodni faktori i sadržaj crne čokolade, kao što su visoki sadržaj šećera, osmotski pritisak, vlaga, itd, mogu da utiču na broj probiotskih bakterija kako tokom proizvodnje, tako i tokom skladištenja crne čokolade.

Prethodno je navedeno da prilikom konzumiranja crne čokolade sa probiotskim bakterijama potrebno uneti nekoliko desetina grama čokolade koja sadrži 10^7 - 10^8 cfug⁻¹, kako bi se ostvario potreban dnevni unos probiotskih bakterija. Rezultati ispitivanja su pokazali da su probiotske bakterije preživele na potrebnom nivou (10^7 cfug⁻¹) tokom 180 dana skladištenja i da se nivo od 10^6 cfug⁻¹ zadržao tokom 270 dana skladištenja. Smatra se da crna čokolada sa navedenim brojem probiotskih ćelija može da obezbedi dovoljni unos probiotskih ćelija konzumiranjem 50 i više grama crne čokolade, jer bi na taj način uneli potreban dnevni unos probiotika. Stoga, može se ustanoviti da je tokom 9 meseci skladištenja proizvod mogao da ostvari terapijski efekat na ljudsko zdravlje, čemu je verovatno doprineo proces sprej sušenja probiotika. Isto tako, period održivosti probiotika tokom 9 meseci skladištenja je svakako znatno duži vremenski period u poređenju sa periodom skladištenja jogurt i sira od UF mleka koji je bio 21 dan, odnosno 56 dana.

Slične rezultate su dobili i autori Laličić-Petronijević et al. (2015) koji su ispitivali vijabilnost liofilizovanih komercijalnih probiotskih bakterija *Lb. acidophilus* NCFM i *B. lactis* HN019 u crnoj i mlečnoj čokoladi tokom 180 dana. *Lb. acidophilus* NCFM je bio na nivou 10^8 cfug⁻¹, dok je probiotik *B. lactis* HN019 bio na nivou 10^7 cfug⁻¹ nakon 30 dana skladištenja, gde se održao tokom 90 dana. Međutim, nakon 120 dana skladištenja, broj probiotskih ćelija *B. lactis* HN019 je bio ispod nivoa 10^6 cfu⁻¹g. Isto tako,

potencijalne probiotske bakterije *Lb. casei* i *Lb. paracasei* su primenjene u proizvodnji crne čokolade koja je skladištena na temperaturi od 4°C, 18°C i 30°C (Nebesny et al., 2007). Nakon 360 dana skladištenja na temperaturi 4°C i 18°C, probiotske bakterije su bile na nivou 10^7 cfug⁻¹, dok je na temperaturi od 30°C vijabilnost probiotika bila znatno niža (10^5 cfug⁻¹). Autori navode da su krucijalni faktori koji utiču na vijabilnost probiotika temperatura, aktivnost vode i osmotski pritisak, pri čemu rezultati istraživanja jasno ukazuju na efekat temperature. Autori Mandal et al. (2013) su primenili liofilizovanu i slobodnu probiotsku bakteriju *Lb. casei* NCDC 298 u proizvodnji mlečne čokolade. Probiotik *Lb. casei* NCDC 298 je bio na nivou 10^8 cfug⁻¹ tokom 60 dana skladištenja na temperaturi frižidera, pri čemu je broj slobodnih i liofilizovanih ćelija bio skoro isti. Probiotske bakterije su najčešće primenjene u proizvodnji čokolade kao liofilizovane ili inkapsulisane tehnikom ekstruzije, dok primena sprej sušenih probiotskih bakterija nije pronađena u literaturnim podacima.

Pored ispitivanja vijabilnosti probiotika i karakteristika čokolade, literaturni podaci navode brojne pozitivne zdravstvene efekte čokolade sa dodatkom probiotika. Probiotske bakterije *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. acidophilus* su pokazale određeno antimikrobno dejstvo na *Streptococcus mutans*, pri čemu je najjaču inhibiciju pokazala vrsta *Lb. plantarum* (Khanafari et al., 2012). Nakon primene probiotskih bakterija u čokoladi, čokolada sa *Lb. rhamnosus* je pokazala najbolju antimikrobnu aktivnost prema *S. mutans*. Prilikom primene liofilizovanih probiotskih bakterija *Lb. helveticus* CNCM I-1722 i *B. longum* CNCM I-3470 u mlečnoj čokoladi, ispitivana je mikroflora simuliranog trakta u SHIME sistemu (Possemiers et al., 2010). Pored veoma dobre vijabilnosti nakon prolaza kroz simulirane uslove GI trakta, analiza sadržaja simuliranog debelog creva pokazuje povećanje broja laktobacila i bifidobakterija nakon administracije probiotske čokolade. Najveće povećanje broja pozitivnih bakterija u simuliranom debelom crevu dostignuto je nakon 3 nedelje administracije probiotske čokolade. Povećanje sadržaja laktobacila i bifidobakterija u GI traktu pozitivno utiče na mikrofloru trakta, kao i na brojne druge funkcije GI trakta, što dovodi do pozitivnog uticaja na celokupno ljudsko zdravlje.

Pored primene probiotika u proizvodnji čokolade, kakao prah je takođe korišćen kao nosač probiotskih bakterija *Lb. helveticus*, *Lb. paracasei* i *Lb. rhamnosus*, koje su izolovane iz italijanskog tradicionalnog sira. U kakao prah su dodate liofilizovane

probiotske bakterije i ispitivana je njihova vijabilnost na temperaturi od 4°C i na sobnoj temperaturi. Rezultati istraživanja su pokazali da kakao predstavlja pogodan nosač probiotskih bakterija, gde prilikom konzumiranja 1-2 g kakao praha dnevno sa probiotskim bakterijama na nivou 10^8 cfug⁻¹, unosi dovoljna količina probiotika (Ricci et al., 2011). Isto tako, probiotska bakterija *Lb. paracasei* i prebiotik inulin primenjeni su u proizvodnji čokoladnog musa, gde su rezultati ukazali na visoku vijabilnost probiotika nakon 28 dana skladištenja na temperaturi 4°C (Aragon-Alegro et al., 2007). Pojedini autori su poredili vijabilnost probiotskih bakterija u različitim proizvodima i na taj način ustanovili koji proizvod predstavlja najbolji medijum za inkorporaciju probiotskih bakterija. Liofilizovani probiotski miks SYN BIO koji sadrži *Lb. rhamnosus* IMC 501 i *Lb. paracasei* IMC 502, koji se nalaze u odnosu 1:1, primenjeni su u proizvodnji italijanskih sireva Caciotta i Pecorino, svežeg švajcarskog sira Buscion, u italijanskim salamama Ciauscolo i Larded, švajcarskim malim salamama, potom u proizvodnji mlečne i crne čokolade, čokoladnog musa, organskog džema i Fiordilatte sladoleda. Ispitivanjem vijabilnosti probiotskih bakterija u navedenim proizvodima tokom njihovog roka trajanja, ustanovljeno je da obe vrste čokolade predstavljaju najbolje nosače probiotskih bakterija, s obzirom na to da su probiotske bakterije preživele na nivou 10^7 cfug⁻¹ tokom 6 meseci (Coman et al., 2012). Isto tako, autori navode da čokoladni mus predstavlja vrlo pogodan medijum za inkorporaciju probiotskih bakterija.

U dosadašnjim istraživanjima, probiotske bakterije su primenjene u brojnim konditorskim proizvodima, poput mlečne i crne čokolade, suflea (Malmo et al., 2013), čokoladnog musa, itd. Prema literaturnim podacima, sprej sušene probiotske bakterije do sada nisu primenjivane u proizvodnji crne čokolade. Shodno tome, primenom sprej sušenih potencijalnih probiotskih ćelija *Lb. plantarum* 564 i sprej sušenih komercijalnih probiotskih ćelija *Lb. plantarum* 299v u proizvodnji crne čokolade, dobija se novi funkcionalni proizvod. Takođe, vijabilnost navedenih probiotika u jogurtu, siru od UF mleka i crnoj čokoladi predstavlja najbolji pokazatelj zaštitne uloge navedenih proizvoda. Posmatrajući dobijene rezultate, jasno je ukazano da crna čokolada predstavlja izrazito dobar medijum za inkorporaciju probiotskih bakterija, uzimajući u obzir činjenicu da crna čokolada može da se definiše kao probiotski proizvod tokom 9 meseci, za razliku od jogurta i sira od UF mleka kojima je rok trajanja znatno kraći.

Visok broj probiotskih bakterija u crnoj čokoladi tokom dugog perioda skladištenja svakako se može prepisati odgovarajućem sastavu crne čokolade.

4.9. Senzorna ocena proizvoda sa probiotskim bakterijama

4.9.1. Senzorna ocena jogurta sa probiotskim bakterijama

Senzorna analiza jogurta je izvršena neposredno nakon proizvodnje, 7, 14. i 21. dana skladištenja. Rezultati senzorne analize su prikazani u tabeli 25.

Tabela 25. Senzorna ocena jogurta sa probiotskim bakterijama tokom skladištenja

Jogurt	Dani	Izgled ^a	Boja ^a	Konzistencija ^a	Ukus ^a	Miris ^a	Max kvalitet (%)	Ponderisana ocena
KJ	0	5,00±0,00	5,00±0,00	4,21±0,39	3,92±0,44	4,64±0,74	85,07	4,55
	7	5,00±0,00	5,00±0,00	4,42±0,44	4,42±0,44	4,78±0,39	91,35	4,72
	14	4,85±0,37	5,00±0,00	4,35±0,47	3,78±0,56	4,14±0,74	82,57	4,42
	21	5,00±0,00	5,00±0,00	4,28±0,48	3,85±0,47	4,85±0,37	85,28	4,43
J 564	0	5,00±0,00	5,00±0,00	4,92±0,18	5,00±0,00	5,00±0,00	99,71	4,98
	7	5,00±0,00	5,00±0,00	4,64±0,47	4,50±0,5	5,00±0,00	93,57	4,82
	14	4,90±0,18	5,00±0,00	4,50±0,4	3,42±0,34	4,42±0,73	80,50	4,45
	21	5,00±0,00	5,00±0,00	4,57±0,53	4,00±0,76	4,85±0,37	87,85	4,68
JSS 564	0	5,00±0,00	5,00±0,00	4,35±0,37	4,14±0,24	4,85±0,37	88,42	4,67
	7	5,00±0,00	5,00±0,00	4,71±0,48	4,21±0,48	5,00±0,00	91,00	4,78
	14	4,90±0,18	5,00±0,00	4,35±0,47	3,57±0,54	4,28±0,9	80,92	4,42
	21	5,00±0,00	5,00±0,00	4,64±0,47	3,71±0,56	4,85±0,37	85,28	4,64
J 299v	0	5,00±0,00	5,00±0,00	4,35±0,37	4,00±0,28	4,71±0,39	86,57	4,61
	7	4,85±0,37	5,00±0,00	4,50±0,64	3,50±0,4	4,85±0,37	82,42	4,54
	14	4,92±0,18	5,00±0,00	4,50±0,5	4,07±0,53	4,64±0,74	87,57	4,62
	21	5,00±0,00	5,00±0,00	4,57±0,53	3,50±0,4	4,78±0,39	82,64	4,57
JSS 299v	0	5,00±0,00	5,00±0,00	4,35±0,47	4,00±0,28	4,71±0,39	86,57	4,61
	7	4,71±0,48	5,00±0,00	4,07±0,83	3,50±0,5	4,85±0,37	80,57	4,71
	14	4,85±0,37	5,00±0,00	4,21±0,56	3,07±0,73	4,07±0,93	74,64	4,24
	21	5,00±0,00	5,00±0,00	4,57±0,53	3,00±0,5	4,71±0,39	77,42	4,45

^aSrednja ocena ± standardna devijacija (p≥0,05)

Sve varijante jogurta i njihovi senzorni parametri su ocenjeni visokim ocenama i mogu se opisati kao proizvodi s prihvatljivim senzornim karakteristikama. Iz datih rezultata može se videti da su senzorne karakteristike, kao što su izgled i boja, bili ujednačeni za sve varijante jogurta tokom skladištenja. Konzistencija je bila prilično različita između varijanti jogurta, pri čemu rezultati ukazuju da je jogurt sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 564 (J 564) imao nešto bolje ocene u odnosu na ostale varijante. Pored konzistencije, jogurt J564 je nakon proizvodnje dobio najbolju prosečnu ocenu za ukus, sa procentom od maksimalnog kvaliteta 99,71%. Tokom skladištenja, prosečna ocena jogurta J564 se lagano smanjivala, da bi na kraju skladištenja ova varijanta jogurta imala je najbolju prosečnu ocenu sa procentom od maksimalnog kvaliteta 87,85%.

Jogurt sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 (JSS 564) odlikovao se stabilnim senzornim kvalitetom, pri čemu je najbolje ocenjen 7. dana, sa prosečnom ocenom za ukus 4,21 i procentom od maksimalnog kvaliteta 91%. Nakon 14. dana, jogurt JSS564 dobio je nešto niže ocene za ukus, ali je na kraju skladištenja ostvario visok procenat od maksimalnog kvaliteta od 85,28%.

Jogurt sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 299v (J 299v) imao je nešto niže ocene za ukus u odnosu na jogurt sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 564. Kod jogurta J 299v nakon 7. dana skladištenja, primećen je izražen kiseo i opor ukus. Međutim, i pored nekarakterističnog ukusa, jogurt J299v je ocenjen vrlo dobrim ocenama za parametre senzornog kvaliteta sa procentom od maksimalnog kvaliteta koji se kretao u opsegu od 82,42-87,57% tokom skladištenja.

Jogurt sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v (JSS 299v) je tokom skladištenja dobio najniže ocene za ukus (3,0), ali i za miris (4,07). Shodno tome, jogurt JSS 299v je imao i najniže procenat od maksimalnog kvaliteta, ali su ti procenti i dalje bili u rangju prihvatljivog senzornog kvaliteta (74,64-86,57%). Isto tako, kod jogurta JSS 299v, kao i kod varijante sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 299v, primećen je neprijatno kiseo i opor ukus.

Posmatrajući dobijene rezultate, može se izvesti zaključak da primena slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 nije značajno uticala na promenu senzornog kvaliteta jogurta. Šta više, varijanta jogurta sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 564 bila je bolje ocenjena nego kontrolna varijanta bez probiotika, osim 14. dana kada su razlike bile neznatne. Takođe, jogurt sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 564 je visoko

ocenjen tokom celog perioda skladištenja. S druge strane, slobodne i sprej sušene ćelije *Lb. plantarum* 299v su uticale na promenu karakterističnog ukusa jogurta, zbog čega su ocene bile niže. Ono što je veoma bitno, slobodne i inkapsulisane ćelije probiotika nisu uticale na promenu izgleda, boje, konzistencije, dok su razlike u mirisu bile zanemarljive. Međutim, razlike u ukusu su bile prilično izražene između jogurta sa *Lb. plantarum* 564 i jogurta sa *Lb. plantarum* 299v, gde je jogurt sa *Lb. plantarum* 564 dobijao bolje ocene tokom celog perioda skladištenja, kako varijanta sa slobodnim ćelijama, tako i varijanta sa sprej sušenim sojem.

Potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 je u ranijim istraživanjima primenjivan u proizvodnji jogurta sa dodatkom omega-3 masnih kiselina. Autori Radulović et al. (2014) su ustanovili da nije došlo do statistički značajnih razlika u senzornom kvalitetu između jogurta sa potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 i jogurta sa navedenim probiotikom i omega masnim kiselinama u koncentraciji 100 mg/L i 200 mg/L.

Navedeni rezultati ukazuju da postoji veliki potencijal primene slobodnih i sprej sušenih ćelija potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 u proizvodnji jogurta. S obzirom na to da prilikom primene *Lb. plantarum* 564 nije došlo do bilo kakve značajne promene senzornog kvaliteta jogurta, navedeni potencijalni probiotik je ispunio još jedan probiotski kriterijum. Kao što je već spomenuto, komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v već dugi niz godina primenjuje kao probiotik u proizvodnji voćnog soka sa dodatkom ovsene kaše „ProViva“ u Švedskoj, zatim u proizvodnji „GoodBelly+“ u SAD, kao farmaceutske proizvod „Flobian“ koji je dostupan i u Srbiji, itd. Budući da su navedeni proizvodi nemlečni, uticaj *Lb. plantarum* 299v na senzorne karakteristike proizvoda je neznatan ili pozitivan, za razliku od mlečnih proizvoda, gde dovodi do nekarakterističnog ukusa.

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije su u skladu sa rezultatima drugih autora. Primena *Lb. acidophilus* La-5 u proizvodnji jogurta bez i sa dodatkom različitih procenata voća od kozijeg mleka nije značajno uticala na senzorne karakteristike proizvoda (Ranadheera et al., 2012). Prilikom poređenja varijanti jogurta sa različitim sadržajem voća i probiotskim bakterijama, najbolje ocene za ukus je dobila varijanta sa 10% voća i probiotikom *Lb. acidophilus* La-5, gde je najmanje bio zastupljen karakteristični „koziji“ ukus. Pored *Lb. acidophilus* La-5, probiotici *B.animalis* i *P. jensenii* nisu uticali na senzorne karakteristike jogurta (Ranadheera et al., 2012).

Rezultati ispitivanja primene slobodnih i inkapsuliranih ćelija *Lb. acidophilus* DD910 i *B. lactis* DD920 su pokazali da nema statistički značajne razlike između kontrolne varijante bez probiotika i jogurta sa probioticima u pogledu boje i izgleda (Kailasapathy, 2006). Međutim, prilikom ocenjivanja konzistencije primećene su značajne razlike kod jogurta sa inkapsuliranim probiotskim bakterijama, gde je došlo do tečnije konzistencije uz pojavu sinerezisa. Što se tiče ukusa i mirisa, nije bilo statistički značajnih razlika između kontrole i varijanti sa probioticima (Kailasapathy, 2006).

Generalno posmatrajući, može se ustanoviti da probiotske bakterije u slobodnom ili inkapsulisanom obliku ne dovode do promene senzornog kvaliteta jogurta.

4.9.2. Senzorna ocena sireva od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama

Rezultati senzorne analize sireva tokom 56 dana su prikazani u tabeli 26. Prikazane vrednosti predstavljaju srednje ocene i standardnu devijaciju svakog parametra.

Sirevi sa slobodnim i inkapsuliranim ćelijama probiotskih bakterija dobili su visoke ocene za sve parametre senzornog kvaliteta tokom skladištenja. Prilikom poređenja s kontrolnom varijantom bez probiotskih bakterija, može se primetiti da postoje određene razlike u pojedinim parametrima. Međutim, na osnovu procenta od maksimalnog kvaliteta, sve varijante sireva od UF mleka se mogu okarakterisati kao proizvodi s prihvatljivim senzornim karakteristikama.

Tabela 26. Senzorna ocena sireva od UF mleka sa slobodnim i sprej sušenim probiotskim ćelijama (^aSrednja ocena ± standardna devijacija)

Sir	Dani	Izgled ^a	Boja ^a	Konzistencija ^a	Ukus ^a	Miris ^a	Max kvalitet (%)	Ponderisana ocena
KS	7	5,00±0,0	4,90±0,12	5,00±0,0	5,00±0,0	4,83±0,25	98,75	4,95
	14	5,00±0,0	4,75±0,16	5,00±0,0	4,92±0,17	4,38±0,16	95,50	4,81
	21	5,00±0,0	4,57±0,24	5,00±0,0	4,93±0,21	4,25±0,32	94,18	4,75
	35	5,00±0,0	4,75±0,12	5,00±0,0	4,70±0,17	4,40±0,24	94,50	4,77
	56	5,00±0,0	4,78±0,1	4,85±0,05	4,50±0,16	4,20±0,19	92,17	4,66
S 564	7	5,00±0,0	4,40±0,06	5,00±0,0	4,80±0,1	4,14±0,15	92,30	4,67
	14	5,00±0,0	5,00±0,0	5,00±0,0	5,00±0,0	4,86±0,2	99,30	4,97
	21	5,00±0,0	4,83±0,34	5,00±0,0	4,92±0,04	4,10±0,17	94,42	4,77
	35	5,00±0,0	4,81±0,23	5,00±0,0	4,88±0,26	4,80±0,08	97,64	4,9
	56	5,00±0,0	4,86±0,17	4,83±0,1	4,57±0,16	4,17±0,16	92,63	4,69
SSS 564	7	5,00±0,0	4,70±0,04	5,00±0,0	4,90±0,15	4,71±0,29	96,85	4,86
	14	5,00±0,0	5,00±0,0	5,00±0,0	5,00±0,0	4,64±0,31	98,20	4,93
	21	5,00±0,0	5,00±0,0	5,00±0,0	4,83±0,09	4,90±0,17	98,65	4,95
	35	5,00±0,0	5,00±0,0	5,00±0,0	4,88±0,07	4,75±0,15	98,15	4,93
	56	5,00±0,0	4,50±0,16	4,67±0,13	3,93±0,34	2,83±0,4	80,81	4,60
S 299v	7	5,00±0,0	4,40±0,13	5,00±0,0	5,00±0,0	4,86±0,13	96,90	4,85
	14	4,80±0,12	4,58±0,09	4,83±0,04	4,83±0,15	4,29±0,26	92,81	4,67
	21	5,00±0,0	4,77±0,1	5,00±0,0	4,92±0,13	4,00±0,18	93,68	4,74
	35	5,00±0,0	4,38±0,04	4,88±0,07	4,30±0,16	3,80±0,36	87,66	4,47
	56	5,00±0,0	4,50±0,21	4,67±0,15	3,93±0,28	2,83±0,39	80,81	4,19
SSS 299v	7	5,00±0,0	4,80±0,16	5,00±0,0	4,83±0,07	4,43±0,14	95,50	4,81
	14	5,00±0,0	5,00±0,0	5,00±0,0	4,70±0,19	4,00±0,23	93,50	4,74
	21	5,00±0,0	4,60±0,2	5,00±0,0	4,67±0,15	3,90±0,33	91,25	4,63
	35	4,50±0,05	4,13±0,08	4,50±0,05	4,20±0,2	3,20±0,41	80,52	4,11
	56	4,86±0,15	4,36±0,1	4,67±0,14	3,92±0,37	3,25±0,38	81,88	4,21

Kod svih varijanti sireva primećen je dobar spoljašnji izgled. Iako je vršeno ručno izlivanje u kutije, prilikom ocenjivanja izgleda primećena je relativno mala pojava mehurića na površini. Takođe, prilikom sečenja sireva, kod sireva sa probiotikom *Lb. plantarum* 299v dolazilo je do drobljenja, dok su sirevi sa *Lb. plantarum* 564 pokazali prilično glatku i mazivu teksturu. Međutim, svi sirevi su bili slično ocenjeni za izgled i konzistenciju. Prilikom ocenjivanja boje sireva, došlo je do varijacija u ocenama, pri čemu je sir sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v dobio nešto lošije ocene (srednja ocena 4,13) nakon 35 dana skladištenja.

Sir sa slobodnim ćelijama potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 (S 564) je imao jako visok senzorni kvalitet tokom celog perioda skladištenja. U tabeli se može primetiti da je sir S 564 imao visoke ocene za ukus i miris, koje su se kretale u granicama od 4,1-4,8 sa procentom od maksimalnog kvaliteta 92,3-99,3%. Nakon 14 dana, sir S 564 je najbolje ocenjen, sa ocenom za ukus 5,00 i miris 4,86, pri čemu je procenat od maksimalnog kvaliteta bio 99,30%. Sir S 564 je pokazao vrlo dobre senzorne karakteristike, bez prisustva stranih ukusa i mirisa. Pored toga, između kontrolne varijante i sira S 564 nema statistički značajnih razlika. Poređenjem senzorne ocene ove varijante sira sa kontrolnom varijantom bez probiotika, primećuje se da je sir S 564 bio bolje ocenjen nakon 14, 21. i 35. dana skladištenja, dok su nakon 7 i 56 dana razlike u senzornom kvalitetu bile neznatne.

Sir sa sprej sušenom potencijalnom probiotskom bakterijom *Lb. plantarum* 564 (SSS 564) bio je odličnog senzornog kvaliteta do 35. dana skladištenja i kretao se u granicama od 98,5-96,85% od maksimalnog kvaiteta. Ocene za miris su bilo veoma slične i kretale su se u granicama od 4,64-4,9, dok su ocene za ukus bile odlične i kretale se u granicama 4,83-5,0. Međutim, nakon 56 dana skladištenja, sir SSS 564 je dobio niske ocene za ukus (3,93) i miris (2,83) i procenat od maksimalnog kvaliteta iznosio je 80,81%, kada je primećen užegao miris i izrazito kiseo ukus. Međutim, bez obzira na lošiji izgled i aromu sira SSS 564, njegov ukupni senzorni kvalitet je bio prihvatljiv. Prilikom poređenja s kontrolnom varijantom sira, može se primetiti da je sir SSS 564 bio bolje ocenjen nakon 14, 21 i 35 dana skladištenja, dok su u ostalim danima razlike u senzornom kvalitetu bile statistički zanemarljive ($p \geq 0,05$), pri čemu su zapažene značajne razlike kod mirisa i ukusa. Analizirajući rezultate, može se primetiti da su obe varijante sireva sa potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 imale veoma

visoke ocene za senzorni kvalitet i da su sirevi zadržali prepoznatljiv i karakterističan izgled, ukus i miris sireva od UF mleka. Slične rezultate su dobili i autori Ozer et al. (2009) prilikom inkorporacije slobodnih i ekstruzijom i emulzijom inkapsuliranih ćelija *B. bifidum* BB-12 i *Lb. acidophilus* LA-5 u proizvodnji belog sir u salamuri, gde je na osnovu dobijenih rezultatata primećeno da nema značajnih senzornih promena sireva tokom zrenja i skladištenja, kao ni promena izgleda i ukusa sireva u odnosu na kontrolnu varijanti bez probiotika.

Sir sa slobodnim ćelijama komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v (S 299v) je veoma dobro ocenjen nakon 7 dana skladištenja, sa procentom od maksimalnog kvaliteta 96,60%. Međutim, tokom skladištenja došlo je do pada senzornog kvaliteta sira S 299v, pri čemu se procenat od maksimalnog kvaliteta kretao u granicama od 80,81-92,81%, s prosečnim ocenama za ukus u granicama od 3,93-4,92 i miris 2,83-4,29. Prilikom ocenjivanja sira S 299v primećen je kiseo i opor ukus, kao i kod jogurta sa *Lb. plantarum* 299v. Sir 299v je prikazao prihvatljiv senzorni kvalitet sa nižim senzornim kvalitetom u odnosu na kontrolnu varijantu sira bez probiotika, pri čemu nije primećena statistički značajna razlika ukupne senzorne ocene između sira S 299v i kontrolne varijante.

Sir sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v (SSS 299v) je bio slično ocenjen kao i sir S 299v. Tokom skladištenja, procenat od maksimalnog kvaliteta sira SSS 299v se kretao u opsegu od 80,52-95,50%, sa prosečnim ocenama za miris i ukus koje su se kretale u opsegu od 3,2-4,43 za miris i 3,92-4,83 za ukus. Kao i kod sira S 299v, primećena je pojava kiselog i oporog ukusa. Prilikom poređenja senzornog kvaliteta kontrolne varijante sira bez probiotika i sira SSS 299v ustanovljeno je da sir SSS 299v dobio niže ocene za miris i ukus. Međutim, bez obzira na niže ocene sir SSS 299v je ostvario prihvatljiv senzorni kvalitet.

S obzirom na to da je i kod jogurta sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v primećen vrlo sličan pad senzornog kvaliteta tokom skladištenja, postoji verovatnoća da se možda i zbog toga ovaj probiotik uglavnom primenjuje u nemlečnim proizvodima, kao što su različita fermentisana pića od pšenica, sokovi, itd.

Rezultati ispitivanja ukazuju na to da su sve varijante sireva imale veoma dobar senzorni kvalitet, pri čemu probiotici nisu uticali na promenu karakterističnog izgleda, boje i konzistencije sira od UF mleka. Takođe, sir sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama

Lb. plantarum 564 je dobio znatno bolje ocene za senzorni kvalitet u odnosu na sir od UF mleka sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v, pogotovo nakon 21 dana skladištenja. Slične rezultate je dobio i Kasimoglu et al. (2004), gde je prilikom primene probiotika *Lb. aciophilus* LA-5 u proizvodnji belog sira u salamuri ustanovljeno da su vakuum pakovani sirevi sa probiotikom ostvarili najviše ocene za senzorni kvalitet tokom 90 dana zrenja. Isto tako, prilikom ispitivanja uticaja probiotskih kultura *Lb. casei* I90, *Lb. plantarum* 91, *Lb. rhamnosus* I73 i I77 na senzorne karakteristike Cremoso i Patregas sireva, ustanovljeno da su sirevi bili veoma prihvatljivi i slično ocenjeni kao kontrolna varijanta bez probiotika, s manjim promenama u teksturi (Milesi et al., 2009). Rezultati brojnih drugih ispitivanja ukazuju da probiotici kao slobodni ili inkapsulisani ne utiču na senzorne karakteristike različitih sireva (Gardiner et al., 2002; Kilic et al., 2009), dok neki probiotici utiču na poboljšanje ukusa sireva (Taboada et al., 2015).

S obzirom na to da se prilikom selekcije probiotskih bakterija ispituje i uticaj probiotika na senzorne karakteristike proizvoda, na osnovu rezultata može se zaključiti da potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 može da se primenjuje u proizvodnji sira od UF mleka. Do istog zaključka su došli i autori Radulović et al. (2011b, 2012b) koji su primenili navedeni potencijalni probiotik u proizvodnji kiselokoagulišućeg sira od kozijeg mleka.

U budućim istraživanjima, *Lb. plantarum* 564 bi svakako trebalo primeniti i u proizvodnji pojedinih vrsta sireva s dužim periodom zrenja, kako bi se ispitala vijabilnost potencijalnog probiotika tokom dužeg vremenskog perioda, ali i uticaj na senzorne karakteristike.

4.9.3. Senzorna ocena crne čokolade sa probiotskim bakterijama

S obzirom na to da je primena probiotika relativno nov postupak u proizvodnji crne čokolade, u literaturi nije pronađeno dovoljno podataka o uticaju probiotika na senzorne karakteristike crne čokolade. Samim tim, uticaj sprej sušenih *Lb. plantarum* kultura na izgled, boju, topljivost i lomljivost crne čokolade je skoro neispitan, kao i uticaj na aromu crne čokolade. Isto tako, probiotske bakterije mogu nepovoljno da utiču na kristalizaciju kakao-masti, zbog čega može da dođe do pojave sivljenja, pa čak i do

teksturalnih promena (Laličić-Petronijević, 2012). Pored toga, probiotske bakterije svojim metabolizmom mogu da produkuju pojedina jedinjenja koja mogu da dovedu do pojave stranih ukusa i mirisa, kao i do pojave sirćetne arome (Mohammadi et al., 2011). Nekarakterističan izgled i tekstura, kao i drugačija aroma crne čokolade, dovode do promene senzornog kvaliteta čokolade koji potrošači smatraju nepoželjnim.

Crne čokolade sa i bez probiotika (kontrolna varijanta) ocenjivane su nakon 60 i 180 dana skladištenja. Rezultati senzornog ocenjivanja crne čokolade prikazani su u tabeli 27 i 28. Crna čokolada sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 (SS 564) dobila je vrlo dobre ocene nakon 60 dana skladištenja. Nešto nižu prosečnu ocenu je dobila za izgled, što se može objasniti ručnim izlivanjem masa nakon dodavanja praha sprej sušenog potencijalnog probiotika u kalupe, usled čega je dolazilo do pojave mehurića, neravnomernog raspoređivanja mase, smanjenje sjaja, itd. Takođe, nešto nižu ocenu crna čokolada SS564 je dobila i za tvrdoću (4,38), dok je veoma dobre ocene dobila za lomljivost, žvakljivost i adhezivnost, čime su mehaničke osobine čokolade generalno vrlo dobro ocenjene. Što se tiče geometrijskih svojstava, crna čokolada SS 564 je ocenjena još bolje u odnosu na mehanička svojstva, dok je za površinska svojstva dobila nešto nižu ocenu (4,25). Za najbitnije parametre senzornog ocenjivanja, ukus i miris, crna čokolada SS 564 je dobila veoma visoke ocene, 4,50 i 4,75, pri čemu je procenat od maksimalnog kvaliteta bio 89,66%. Samim tim, može se ustanoviti da potencijalni probiotik nije doveo do pojave stranih ukusa i mirisa, da je čokolada zadržala svoje karakteristike, kao i da prah sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 nije doveo do promene boje, niti bilo kakve promene izgleda čokolade. U poređenju s kontrolnom varijantom crne čokolade bez probiotika, može se primetiti da je crna čokolada SS 564 dobila neznatno niže ocene za miris i ukus, pri čemu su svi ostali paramteri bili veoma slično ocenjeni. Nakon 180 dana skladištenja, crna čokolada sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 je dobila za svaki parametar bolju ocenu u odnosu na 60. dan, osim mirisa gde je ocena bila ista.

Tabela 27. Senzorna ocena crne čokolade sa sprej sušenim probiotskim bakterijama tokom skladištenja

	D*	I ^a	T ^a	L ^a	Ž ^a	A ^a	GS ^a	PS ^a	ODS ^a	M ^a	U ^a
K	60	4,31±0,46	4,31±0,46	4,75±0,46	4,5±0,53	4,5±0,46	4,81±0,37	4,37±0,52	4,63±0,74	4,81±0,37	4,63±0,52
	180	4,68±0,46	4,63±0,52	4,75±0,46	4,5±0,46	4,63±0,44	4,68±0,46	4,68±0,46	4,38±0,52	4,94±0,18	5,00±0,00
SS 564	60	4,00±0,76	4,38±0,52	4,50±0,53	4,50±0,53	4,56±0,50	4,63±0,52	4,25±0,71	4,38±0,74	4,75±0,46	4,50±0,53
	180	4,13±0,35	4,75±0,46	4,63±0,52	4,88±0,35	4,75±0,46	4,88±0,35	4,5±0,53	4,75±0,46	4,75±0,46	5,00±0,00
SS 299v	60	3,88±0,64	4,13±0,35	4,38±0,52	4,25±0,71	4,50±0,53	4,25±0,71	4,63±0,52	4,88±0,35	4,88±0,35	4,50±0,53
	180	4,13±0,35	4,75±0,46	4,75±0,46	4,50±0,53	4,63±0,52	4,50±0,53	4,50±0,53	5,00±0,00	5,00±0,00	5,00±0,00

*D-dani; I-izgled; T-tvrdoća; L-lomljivost; Ž-žvakljivost; A-adhezivnost; GS-geometrijska svojstva, PS-površinska svojstva; ODS-ostala dinamička svojstva; M-miris, U-ukus; MK-maksimalni kvalitet; ^aSrednja ocena ± standardna devijacija (p≥0,05)

Tabela 28. Maksimalni kvalitet i ponderisana ocena crne čokolade sa probiotskim bakterijama

Varijanta	Dani	Maksimalni kvalitet (%)	Ponderisana ocena
K	60	92,75	4,6
	180	96,63	4,68
SS 564	60	89,66	4,44
	180	95,25	4,70
SS 299v	60	89,06	4,43
	180	95,25	4,68

Nakon 180 dana skladištenja, crna čokolada je dobila maksimalnu ocenu za ukus, kao i kontrolna varijanta bez probiotika, kao i značajno veći procenat od maksimalnog kvaliteta u odnosu na 60. dan, 95,25%. U odnosu na kontrolnu varijantu bez probiotika, crna čokolada SS 564 je dobila veće ocene za većinu parametara, dok je za miris dobila neznatno nižu ocenu. Takođe, procenat od maksimalnog kvaliteta crne čokolade SS 564 (95,25%) bio je veoma sličan procentu kontrolne varijante bez probiotika (96,63%). Crna čokolada SS 564 nije pokazala statistički značajne razlike u odnosu na senzorne karakteristike kontrolne crne čokolade.

Probiotska crna čokolada sa sprej sušenim komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v (SS 299v) ocenjena je vrlo slično kao i crna čokolada sa potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564. Malo nižu ocenu za izgled (3,88) ostvarila je nakon 60 dana, opet verovatno prouzrokovano ručnim izlivanjem u kalupe. Ocene za mehanička svojstva, tvrdoću, lomljivost, žvkljivost, adhezivnost i geometrijska svojstva bile su vrlo slične, u opsegu od 4,13-4,63. Ocene za ukus i miris su bile veoma dobre, 4,88 za miris i 4,5 za ukus, čime je ostvaren veoma dobar procenat od maksimalnog kvaliteta, 89,06%. U odnosu na kontrolnu varijantu, crna čokolada SS 299v je ocenjena nešto niže, sa procentom od maksimalnog kvaliteta 89,06%, pri čemu nije došlo do pojave stranog ukusa i mirisa. Kao i kod probiotske crne čokolade SS 564, i ova probiotska crna čokolada je ostvarila bolje ocene nakon 180 dana skladištenja. Crna probiotska čokolada SS 299v je dobila veće ocene za izgled (4,13), tvrdoću (4,75), lomljivost (4,75), adhezivnost (4,63) i geometrijska svojstva (4,50), dok je za ukus i miris dobila maksimalnu ocenu (5,00). Takođe, procenat od maksimalnog kvaliteta je bio isti kao i kod crne čokolade sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564, 95,25%.

Posmatrajući rezultate, generalno se može konstatovati da ne postoje značajne statističke razlike ($p \geq 0,05$) u ocenama senzornog kvaliteta crne čokolade sa probiotskim bakterijama u odnosu na kontrolnu varijantu. Ono što je najbitnije jeste da probiotske bakterije nisu dovele do bilo kakve pojave stranog ukusa ili mirisa, a prah sprej sušenih probiotskih bakterija nije doveo do promene izgleda i teksture crne čokolade, kao ni do geometrijskih ili površinskih svojstava. Međutim, nakon 180 dana ostvaren je bolji senzorni kvalitet obe crne čokolade sa probioticima, što nije u skladu sa rezultatima drugih autora (Laličić-Petornijević, 2012), gde je senzorni kvalitet mlečne, crne i menaž

čokolade sa *Lb. acidophilus* NCFM i *B. lactis* HN019 sa skladištenjem opadao. Povećanje senzornog kvaliteta crne čokolade sa probioticima može da bude posledica ručnog mešanja praha sprej sušenih bakterija i izlivanja u kalupe. Samim tim, dolazi do neujednačenog kvaliteta, prouzrokovanog razlikama u izgledu, ali i u ukusu i mirisu crne čokolade.

Senzorna analiza drugih probiotskih bakterija u proizvodnji crne ili mlečne čokolade je takođe pokazala minimalan uticaj probiotika na senzorne karakteristike čokolade. Prema rezultatima drugih istraživača, primena *Lb. paracasei* i *Lb. casei* u proizvodnji crne čokolade nije dovela do promene karakterističnog ukusa proizvoda. Crna čokolada sa liofilizovanim probiotskim kulturama koje sadrže određene količine aspartama i izomalta, tokom skladištenja je dobila veoma visoke ocene (4,83-4,86), kao i varijanta sa slobodnim ćelijama *Lb. casei* i *Lb. paracasei* (Nebesny et al., 2007). Senzorni kvalitet mlečne čokolade sa dodatkom slobodnih i inkapsulisanih ćelija *Lb. casei* NCDC 298 ostao je nepromenjen u poređenju sa kontrolnom varijantom bez probiotika tokom skladištenja (Mandal et al., 2013).

Na osnovu svega navedenog, može se ustanoviti da primena sprej sušene potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i komercijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 299v ne dovodi do promena senzornog kvaliteta crne čokolade. Pored toga, probiotske bakterije dovode do obogaćivanja zdravstvenih i nutritivnih vrednosti crne čokolade, što dovodi do formiranja novog funkcionalnog proizvoda koji usled prepoznatljivog ukusa može biti prihvaćen od strane potrošača.

4.10. Sposobnost preživljavanja probiotskih bakterija u gastrointestinalnim uslovima-*in vivo* studija

4.10.1. Mikroflora fecesa volontera

Laktobacili predstavljaju deo normalne mikroflore zdravog čoveka, iako se nalaze u nešto manjem broju u odnosu na ostale bakterije. Različite studije su ukazale na veoma različit broj laktobacila između pojedinaca, pri čemu broj laktobacila može da se kreće u opsegu od 10^2 - 10^7 cfu/g uzorka mukoze. Isto tako, laktobacili mogu biti prisutni u različitom broju u pljuvački, tankom i debelom crevu, kao i u fecesu pojedinaca (Ahrne et al., 1998). Na različiti broj laktobacila prvenstveno utiče ishrana, spoljašnji stresovi,

kao i upotreba antibiotika, itd. Upotreba probiotika bi svakako trebalo da utiče na povećanje broj laktobacila u GI traktu, kao i na smanjenje broja nepoželjne mikroflore. Ispitivanje potencijalnih probiotskih karakteristika autohtonih bakterija mlečne kiseline izolovanih iz tradicionalnih sireva *in vitro* testovima uglavnom se koristi za procenu probiotskih karakteristika BMK. Kao što je već navedeno, u *in vitro* testove se ubrajaju sposobnost preživljavanja simuliranih želudačnih i intestinalnih uslova, antimikrobna aktivnost, ali i sposobnost adherencije, različiti imuno testovi, itd. Kao krajnji test probiotskih karakteristika koriste se različite kliničke ili *in vivo* studije. Ovim studijama može da se ispita i sposobnost preživljavanja GI uslova, ali i uticaj probiotskih bakterija na mikrofloru GI trakta, kao i različiti zdravstveni efekti.

Prilikom korišćenja životinja, najčešće miševa ili pacova, u *in vivo* studijama, uglavnom se ispituje efekat probiotskih bakterija na fekalnu mikrofloru. Međutim, postoje određene razlike između mikroflore životinja i čoveka, zbog čega su rezultati ovakvih studija uglavnom nepozdani (Guarner i Schaafsma, 1998; Collins et al., 1998). Prednost ovakvih studija jeste mogućnost ispitivanja mikroflore svakog pojedinačnog dela GI trakta, što kod humanih studija uglavnom nije moguće. Kod humanih studija mogu da se vrše biopsije pojedinih delova GI trakta, što samu studiju čini veoma skupom, pa se iz tog razloga uglavnom koristi feces za ispitivanje uticaja probiotika. Analiza fecesa s druge strane ima i određene nedostatke, kao što je prikaz mikroflore samo debelog creva i nemogućnost ispitivanja mikroflore gornjeg dela GI trakta (Johansson et al., 1993). Međutim, analizom fecesa može da se ispita sposobnost preživljavanja GI uslova potencijalnih probiotika, gde se različitim molekularnim metodama može ustanoviti prisustvo potencijalnog probiotika i samim tim potvrdi njegova sposobnost preživljavanja nepovoljnih uslova GI trakta. Takođe, moguće je ispitati i uticaj potencijalnog probiotika na mikrofloru GI trakta, odnosno da li dolazi do smanjenja nepoželjnih mikroorganizama, kao i povećanja broja pozitivnih bakterija.

Mikroflora fecesa pre i nakon konzumiranja određenog proizvoda sa probiotskim bakterijama ispitivana je radi određivanja uticaja potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 i komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v na pojedine grupe bakterija: aerobne mezofilne, anaerobne mezofilne, enterobakterije, enterokoke, laktobacile i sulfitoreducujuće klostridije, kao jedan od ciljeva doktorske disertacije. Kao što je već opisano u metodama, volonteri su konzumirali prah, jogurt, sir od UF

mleka i crnu čokoladu sa sprej sušenim probioticima, pri čemu su fecesi voloneta zasejavani na selektivne podloge za navedene grupe mikroorganizama.

Rezultati ispitivanja prosečnih vrednosti mikroorganizama prisutnih u fecesu pre i nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 prikazani su u tabeli 29, dok je u tabeli 30 prikazan broj mikroorganizama u fecesu voloneta koji su konzumirali proizvode sa *Lb. plantarum* 299v.

Tabela 29. Mikroflora fecesa (cfug^{-1}) pre i nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564

Mikroorganizmi	Inkapsulisani probiotik (prah)		Jogurt		Sir od UF mleka		Čokolada	
	Pre	Posle	Pre	Posle	Pre	Posle	Pre	Posle
Aerobni mezofilni m.o.	$2,8 \times 10^8$	$9,5 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$4,9 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$7,2 \times 10^7$
Anaerobni mezofilni m.o.	$1,0 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$5,3 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$8,1 \times 10^8$	1×10^9	$1,7 \times 10^9$	$3,45 \times 10^9$
Enterobakterije	$5,6 \times 10^7$	$8,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$7,2 \times 10^6$
Enterokoke	$7,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$9,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$3,4 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$
Sulfitoredukujuće klostridije	$2,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$7,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$
Laktobacili	$1,6 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$2,7 \times 10^7$	1×10^8	$1,9 \times 10^8$	5×10^8	$4,1 \times 10^8$	$2,3 \times 10^9$

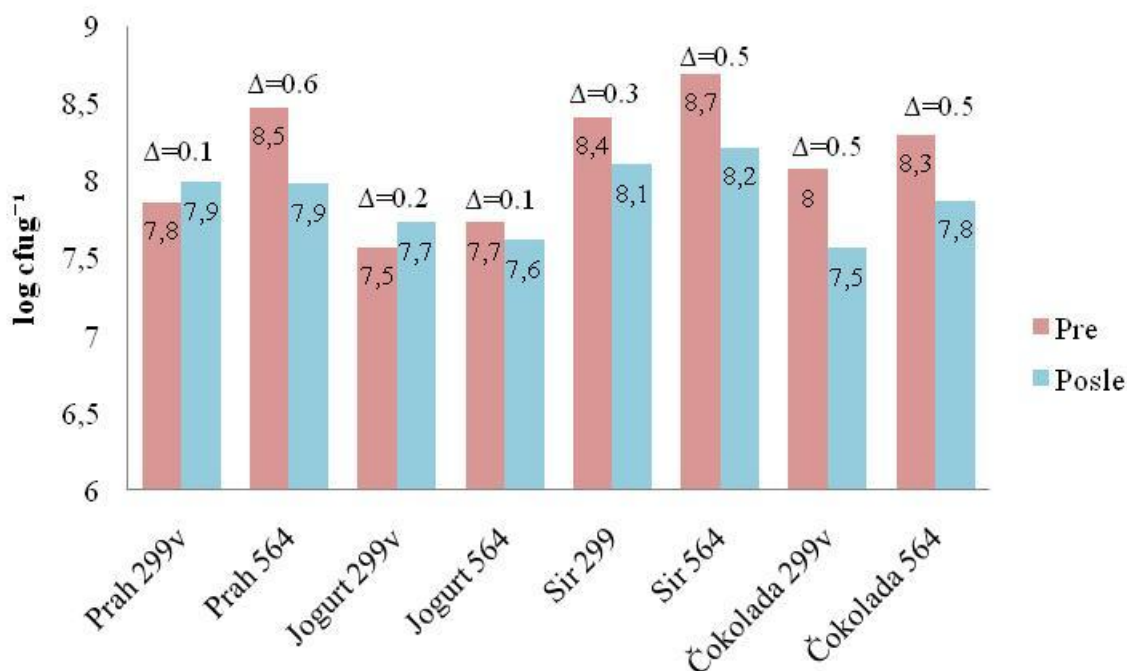
Tabela 30. Mikroflora fecesa (cfug^{-1}) volontera pre i nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v

Mikroorganizmi	Inkapsulisani probiotik (prah)		Jogurt		Sir od UF mleka		Čokolada	
	Pre	Posle	Pre	Posle	Pre	Posle	Pre	Posle
Aerobni mezofilni m.o.	$6,6 \times 10^7$	$9,8 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$3,7 \times 10^7$
Anaerobni mezofilni m.o.	$9,7 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$	$9,5 \times 10^7$	$6,1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$	$5,7 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$
Enterobakterije	$9,9 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^7$	$4,7 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$9,2 \times 10^6$	$3,6 \times 10^7$	$5,3 \times 10^6$
Enterokoke	$8,8 \times 10^6$	$8,5 \times 10^5$	$8,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
Sulfitoredujuće klostridije	$2,8 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	$3,8 \times 10^6$	$7,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$8,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
Laktobacili	2×10^8	1×10^9	$7,1 \times 10^7$	$4,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$	3×10^7	$3,5 \times 10^8$

Posmatrajuće rezultate prikazane u tabeli 29, može se primetiti da je nakon konzumiranja svakog proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 došlo do smanjenja broja enterobakterija, enterokoka i sulfitoredujućih klostridija. Sve u zavisnosti od proizvoda koji su volonteri konzumirali, primećen je veći ili manji pad broja ćelija nepoželjnih mikroorganizama. Pored toga, konzumiranje proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 dovelo je i do trenda povećanja ukupnog broja laktobacila, pri čemu je najveće povećanje broja zapaženo kod volontera koji su konzumirali jogurt sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 ($2,7 \times 10^7$ log cfug⁻¹ pre i 1×10^8 log cfug⁻¹ nakon konzumiranja).

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 30, primećuje se da je kod volontera koji su konzumirali proizvode sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v došlo je do trenda pada broja ćelija enterobakterija, enterokoka i sulfitoredujućih klostridija. Takođe, broj ćelija laktobacila se povećao nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v.

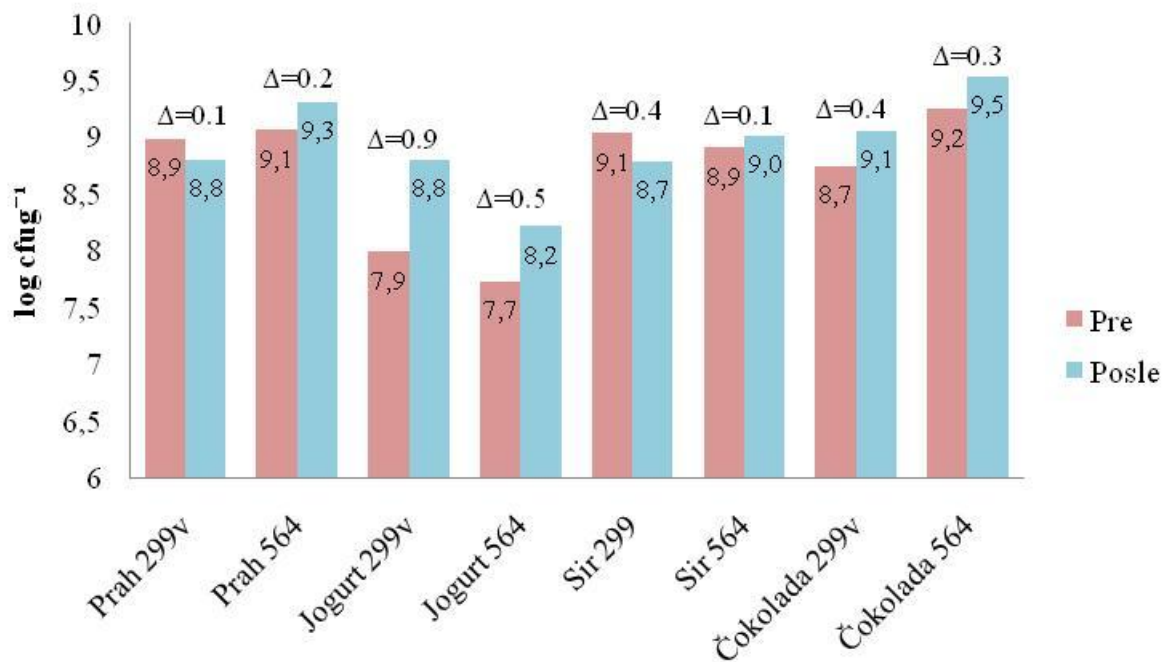
Logaritamske vrednosti ukupnog broja prethodno navedenih grupa mikroorganizama, kao i uporedna analiza logaritamskih vrednosti pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama su prikazane na graficima 13-18. Uporedna analiza prosečnih logaritamskih vrednosti pojedinih grupa mikroorganizama svake grupe volontera pre i nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim probiotskim bakterijama *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v, imala je za cilj da ustanovi smanjenje ili povećanje određenih grupa mikroorganizama. Na taj način, može da se uporedi efikasnost navedenih probiotskih bakterija primenjenih u različitim proizvodima. Na grafiku 13 prikazana je uporedna analiza ukupnog broja aerobnih bakterija po proizvodima sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 i sprej sušenim komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v.



Grafik 13. Promene logaritamskih jedinica ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija pre i nakon konzumiranja probiotskih proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu grafika, može se ustanoviti da je najniži broj aerobnih mezofilnih bakterija bio nakon konzumiranja obe varijante jogurta, dok je najveći broj ostvaren nakon konzumiranja obe varijante sireva. Nakon konzumiranja praha i jogurta sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v došlo je do manjeg trenda povećanja broja aerobnih mezofilnih bakterija, za razliku od sira od UF mleka i crne čokolade sa *Lb. plantarum* 299v i svih proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 gde je primećen trend pada broja ćelija aerobnih mezofilnih bakterija. Najveći trend pada broja ćelija aerobnih mezofilnih bakterija primećen je nakon konzumiranja praha sprej sušenog *Lb. plantarum* 564 (0,6 logaritamskih jedinica), sira od UF mleka i crne čokolade sa navedenim probiotikom i sa *Lb. plantarum* 299v (0,5 logaritamskih jedinica).

Na grafiku 14 prikazana je uporedna analiza ukupnog broja anaerobnih mezofilnih bakterija pre i nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v.

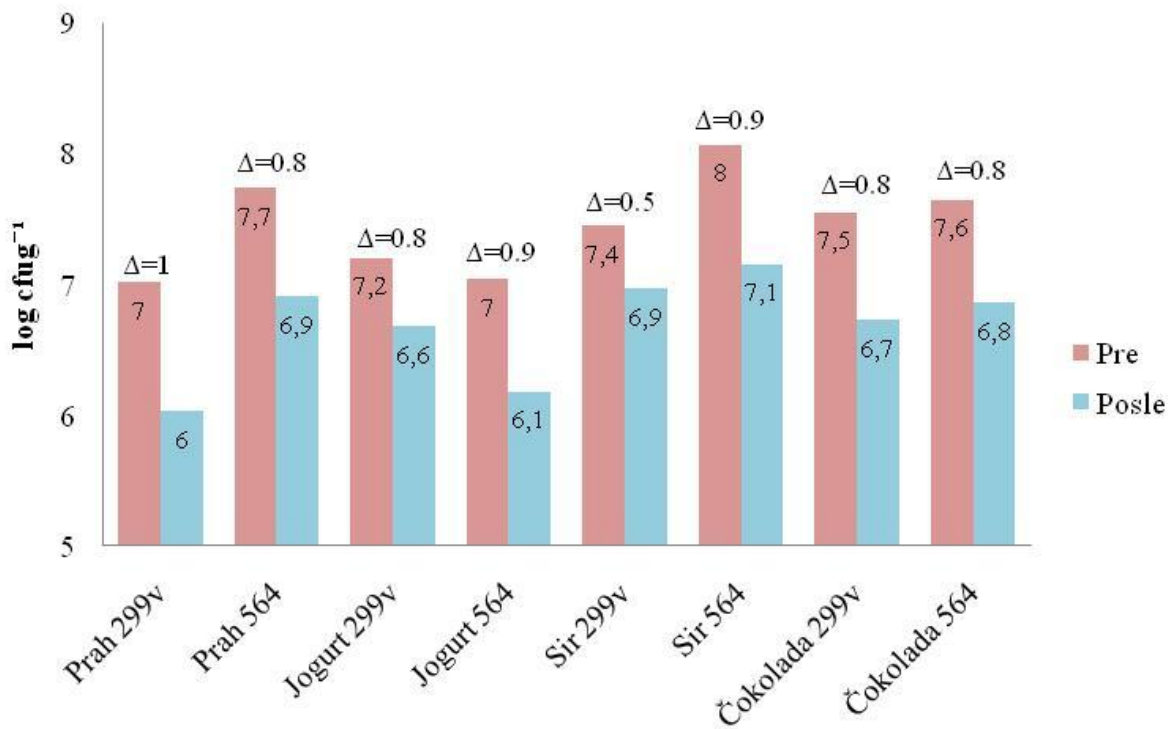


Grafik 14. Promena logaritamskih jedinica ukupnog broja anaerobnih mezofilnih bakterija pre i nakon konzumiranja probiotskih proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v

Primećuje se da je broj anaerobnih mezofilnih bakterija bio najniži u istim slučajevima kao i broj mezofilnih aerobnih bakterija, odnosno nakon konzumiranja obe varijante jogurta, dok je najveći broj anaerobnih mezofilnih bakterija detektovan kod crne čokolade sa *Lb. plantarum* 564. Nakon konzumiranja praha i sira od UF mleka sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v došlo je do neznatnog smanjenja broja ćelija anaerobnih mezofilnih bakterija, dok je nakon konzumiranja svih ostalih proizvoda i proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 došlo do trenda povećanja ukupnog broja anaerobnih mezofilnih bakterija. Poredeći sa brojem aerobnih mezofilnih bakterija, evidentno je da je u svim proizvodima detektovan znatno veći broj anaerobnih mezofilnih bakterija, čak i u varijantama kada se broj smanjivao. Ovi rezultati potvrđuju činjenicu da je anaerobna mikroflora dominantna u poslednjim delovima organa za varenje. Takođe, treba istaći da je dominantnost anaerobne mikroflore nakon konzumiranja sira od UF mleka i crne čokolade izraženija u odnosu na jogurt, što je i očekivano s obzirom na redoks-potencijal ovih proizvoda. Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima drugih autora, može se primetiti da je broj anaerobnih mezofilnih bakterija nešto niži u odnosu na rezultate Johansson et al. (1998), dok je prosečan broj aerobnih mikroorganizama

vrlo sličan. Pored toga, autori su naveli da nije došlo do statistički značajnih promena u broju aerobnih i anaerobnih bakterija nakon 3 nedelje konzumiranja ProViva napitka sa *Lb. plantarum* 299v.

Na grafiku 15 prikazana je promena logaritamskih vrednosti broja enterobakterija u fecesu volontera pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama.



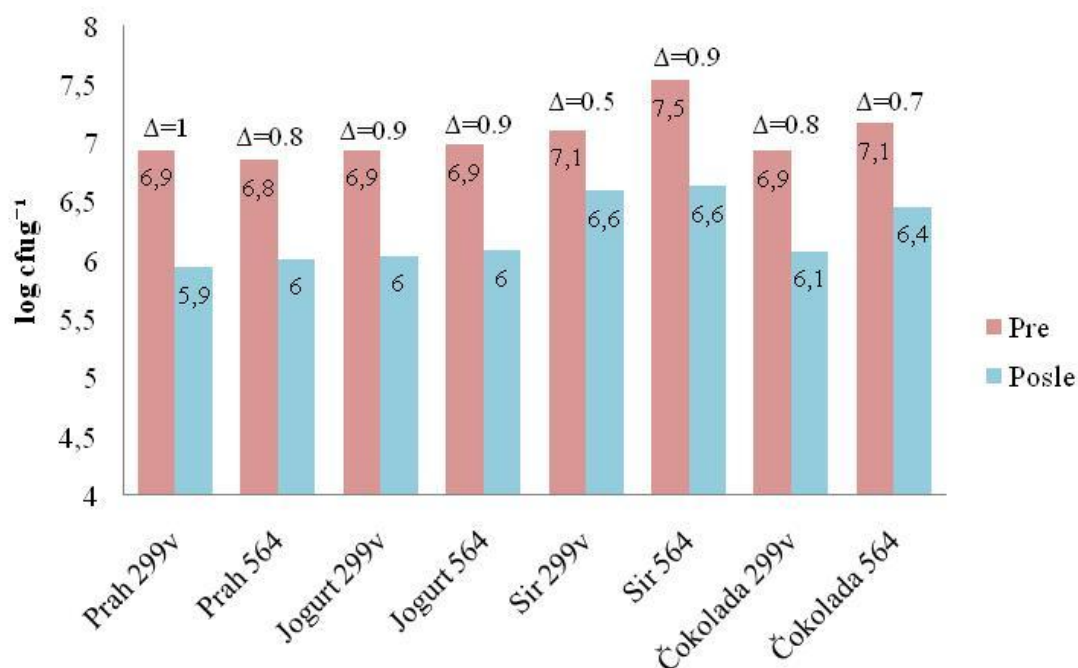
Grafik 15. Promena logaritamskih jedinica ukupnog broja enterobakterija pre i nakon konzumiranja probiotskih proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v

Prilikom ispitivanja broja enterobakterija, primećeno je da nakon konzumiranja praha sprej sušenog komercijalnog probiotika *Lb. plantarum* 299v došlo do trenda redukcije broja enterobakterija za 1 logaritamsku jedinicu, dok je nakon konzumiranja jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade sa navedenim probiotikom došlo do manjeg trenda smanjenja broja ćelija enterobakterija (0,8, 0,5 i 0,8 logaritamskih jedinica, redom). Takođe, nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 došlo je do trenda pada broja enterobakterija, pri čemu je najveći pad broja ćelija primećen nakon konzumiranja jogurta i sira od UF mleka sa *Lb. plantarum* 564 od 0,9 logaritamskih jedinica, a u prahu i crnoj čokoladi utvrđeno je smanjenje broja enterobakterija za po 0,8 log jedinica. Poređenjem uticaja *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v na broja ćelija

enterobakterija, zapaža se bolji inhibitorni efekat soja *Lb. plantarum* 299v na enterobakterije, ako se konzumira kao prah, odnosno farmaceutski preparat, dok je bolja efektivnost soja *Lb. plantarum* 564 postignuta nakon konzumiranja prehrambenih proizvoda sa navedenim probiotikom. Poređenjem pojedinačnih rezultata ukupnog broja enterobakterija pre i nakon konzumiranja proizvoda, kod pojedinih volontera je primećen pad broja enterobakterija veći od 1 logaritamske jedinice ($1,2 \log \text{ cfug}^{-1}$ kod volontera koji je konzumirao crnu čokoladu sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564). S obzirom na to da je *Lb. plantarum* 564 pokazao dobro antimikrobno delovanje prema nekim od patogenih mikroorganizama (na osnovu prethodno prikazanih rezultata), moglo bi se reći da je s trendom redukcije broja enterobakterija potvrđeno antimikrobno delovanje potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564.

Slični rezultati su dobijeni prilikom analiziranja uticaja *Lb. plantarum* 299v na funkcije GI trakta kod miševa različite starosti, gde nije došlo do statistički značajne redukcije broja *Enterobacteriaceae* sp. u cekumu životinja (Fak et al., 2008).

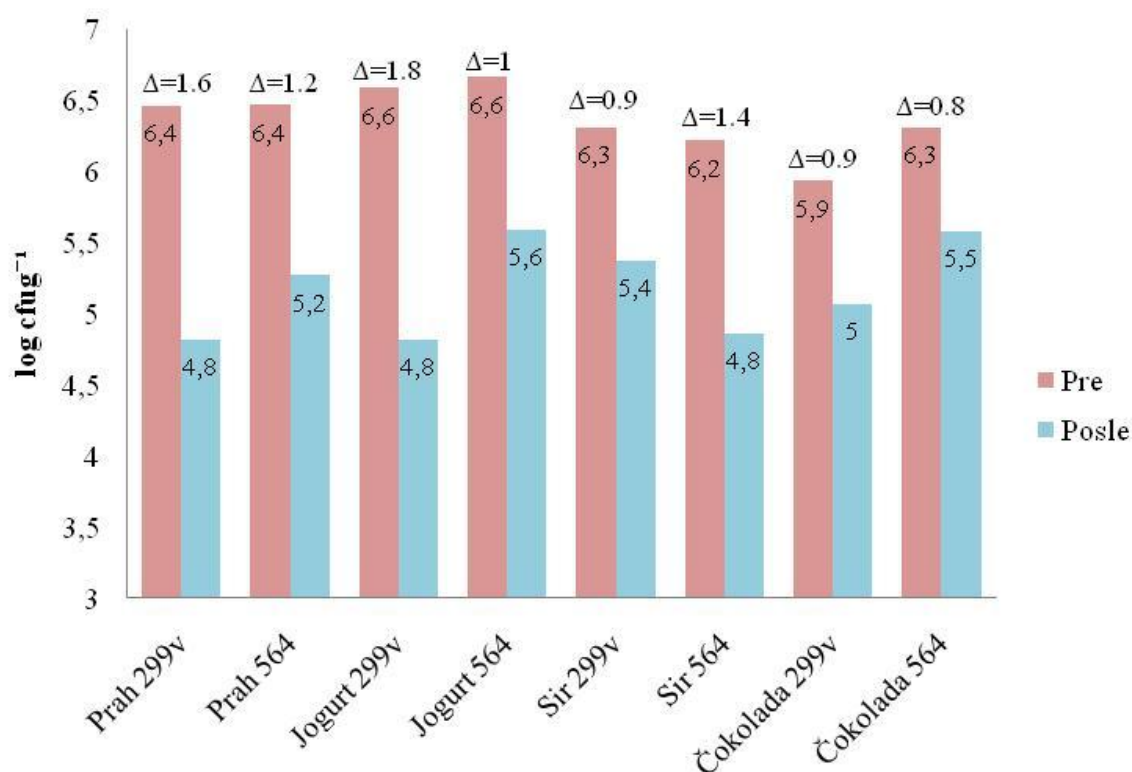
Promena broja enterokoka u fecesu volontera pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama prikazana je na grafiku 16.



Grafik 16. Promena logaritamskih jedinica ukupnog broja enterokoka pre i nakon konzumiranja probiotskih proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu prikazanih rezultata, može se primetiti da je nakon konzumiranja svih proizvoda sa navedenim probioticima došlo do trenda smanjenja broja enterokoka, pri čemu je najveći pad broja enterokoka primećen kod praha sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 299v (1 log jedinica). Kod ostalih proizvoda sa *Lb. plantarum* 299v, pad broja enterokoka se kretao u opsegu od 0,5-0,9 log jedinica, dok je kod proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 primećen trend pada broja enetrokoka koji se kretao u granicama od 0,7-0,9 log jedinica. Analizirajući pad broja enterokoka kod pojedinih volontera, najveći pad je primećen kod volontera koji je konzumirao crnu čokoladu sa *Lb. plantarum* 564 (2,27 log cfug⁻¹). U istraživanjima drugih autora, primećena je redukcija ukupnog broja enterokoka prilikom konzumiranja proizvoda sa dodatkom probiotskih bakterija (Johansson et al., 1993).

Na grafiku 17 prikazana je promena logaritamskih vrednosti sulfitoredujućih klostridija u fecesu volontera pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probioticima.

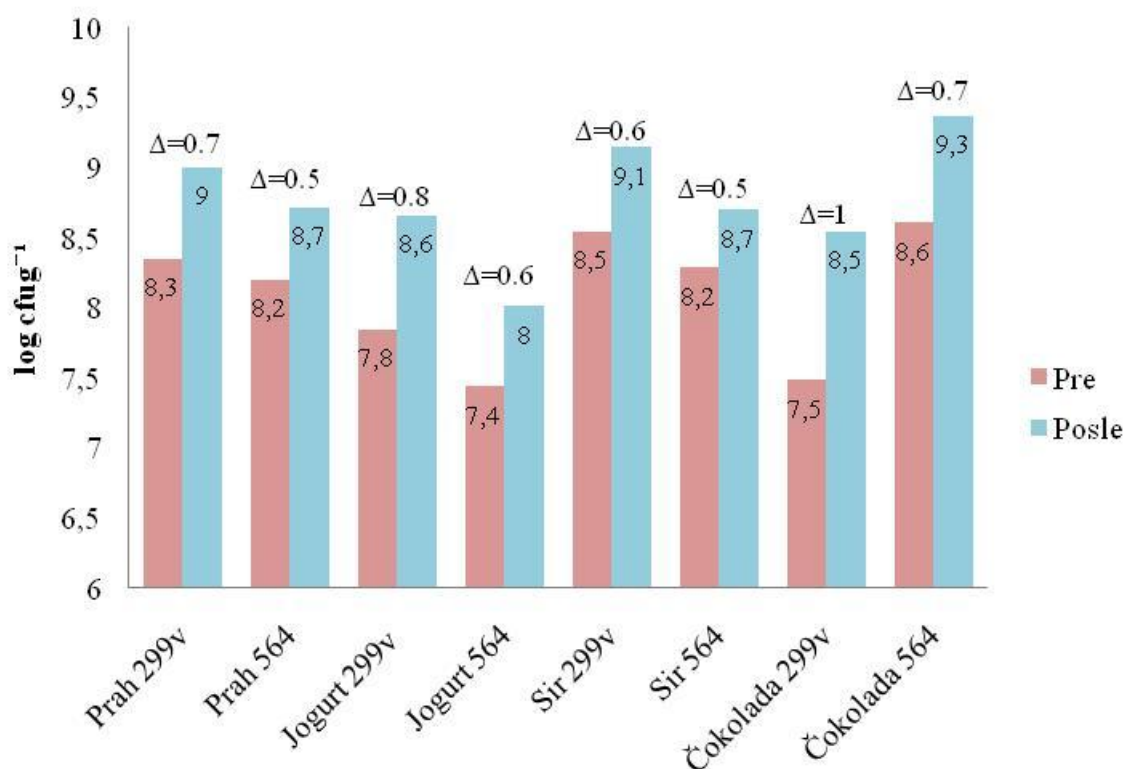


Grafik 17. Promena logaritamskih jedinica ukupnog broja sulfitoredukujućih klostridija pre i nakon konzumiranja probiotičkih proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu prikazanih rezultata, može se primetiti veoma veliki inhibitorski efekat primenjenih probiotika na prisustvo sulfitoredukujućih klostridija u poslednjem delu organa za varenje. Najveći trend pada broja sulfitoredukujućih klostridija je utvrđen nakon konzumiranja jogurta sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v za 1,8 logaritamskih jedinica, a nakon konzumiranja sira od UF mleka sa *Lb. plantarum* 564 došlo je do pada broja ćelija sulfitoredukujućih klostridija od 1,4 logaritamskih jedinica. Primećuje se da je trend pada logaritamskog broja sulfitoredukujućih klostridija veći nakon konzumiranja prehrambenih proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v (jogurt i sir od UF mleka), nego nakon konzumiranja praha navedenih probiotika, što navodi na zaključak da je inhibitorski efekat ovih sojeva na broj sulfitoredukujućih klostridija veći u slučaju konzumiranja prehrambenih proizvoda. Kod ostalih proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 primećen je pad broja sulfitoredukujućih klostridija za 0,8-1,2 log jedinica, dok je kod proizvoda sa *Lb. plantarum* 299v došlo do pada broja sulfitoredukujućih klostridija koji se kretao u granicama od 0,9-1,6 log jedinica.

Analiziranjem rezultata, primećeno je da je kod pojedinih volontera koji su konzumirali proizvode sa *Lb. plantarum* 564 došlo do pada broja sulfitoredujućih klostridija i za 2,2 log cfug⁻¹ (kod sira od UF mleka sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564), dok je kod volontera koji je konzumirao crnu čokoladu sa *Lb. plantarum* 299v primećen pad broja sulfitoredujućih klostridija za 2.6 log cfug⁻¹. *Lb. plantarum* 299v je prethodno primenjen u proizvodnji fermentisane ovsene kaše, gde je nakon konzumiranja došlo do redukcije broja sulfitoredujućih klostridija u uzorcima mukoze (Johansson et al., 1993), kao i kod volontera koji su konzumirali napitak ProViva (Johansson et al., 1998). Prilikom konzumiranja antibiotika može doći do promene mikroflore debelog creva, što može da dovede do infekcije, pri čemu je *C. difficile* glavni uzrok antibiotske dijareje. *Clostridium difficile* je sporogena anerobna bakterija koja je prisutna u manjem broju u debelom crevu, ali koja može da dovede do upale u slučaju prisustva većeg broja ćelija. Probiotska bakterija *Lb. casei* DN-114001, primenjena u probiotskom proizvodu Actimel (Danone), dovela je do redukcije broja *C. difficile* kod pacijenata koji su konzumirali antibiotike (Hickson et al., 2007). Pored ove probiotske bakterije, *Lb. plantarum* 299v takođe dovodi do redukcije broja *C. difficile* prilikom antibiotske terapije (Klarin et al., 2008; Lonnermark et al., 2010).

Na grafiku 18 prikazana je promena logaritamskih vrednosti laktobacila u fecesu volontera pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama.



Grafik 18. Promena logaritamskih jedinica ukupnog broja laktobacila pre i nakon konzumiranja probiotskih proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu rezultata ispitivanja ukupnog broja laktobacila pre i nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v koji su prikazani na grafiku 18, može se primetiti da je nakon konzumiranja svih proizvoda došlo do trenda povećanja broja laktobacila. Prilikom konzumiranja proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 primećen je porast broja laktobacila koji se kretao u granicama od 0,5-0,7 logaritamskih jedinica, dok je nakon konzumiranja proizvoda sa *Lb. plantarum* 299v primećen porast broja laktobacila koji se kretao u granicama od 0,6-1 log jedinica. Povećanje broja laktobacila u fecesu je očekivan rezultat, usled kolonizacije probiotskih bakterija u gastrointestinalnom traktu, kao i moguće interakcije sa autohtonim laktobacilima intestinalne mikroflore. Povećanje broja laktobacila nakon konzumiranja probiotskih bakterija je primećeno i u *in vivo* studiji gde su miševi 10 dana konzumirali *Lb. plantarum* 299v (Fak et al., 2008). Takođe, povećanje broja laktobacila je primećeno i u *in vivo* studiji gde su pacijenti oboleli od arteroskleroze konzumirali *Lb. plantarum* 299v (Karlsson et al., 2010).

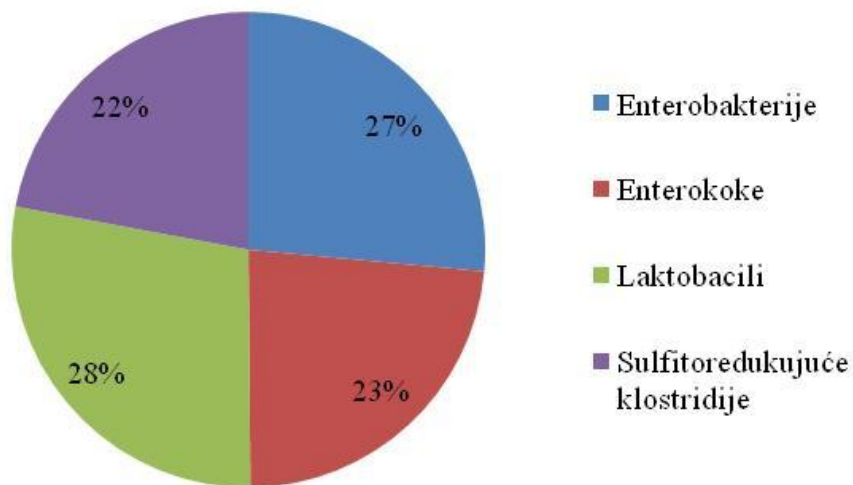
Generalno posmatrajući, potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 doveo je do trenda smanjenja broja nepoželjnih mikroorganizama, odnosno do smanjenja broja enterobakterija, enterokoka i sulfitoredujućih klostridija, kao i komercijalni probiotik *Lb. plantarum* 299v. Oba probiotika su uticala na trend smanjenja nepoželjne mikroflore GI trakta u veoma sličnom broju. Takođe, oba probiotika su ostvarila kolonizaciju GI trakta što je dovelo do povećanja broja laktobacila. Međutim, u budućim ispitivanjima potrebno je izvršiti biopsiju pojedinih delova GI trakta, kako bi se sa sigurnošću moglo reći da *Lb. plantarum* 564 deluje inhibitorno prema enterobakterijama, enterokokama i sulfitoredujućim klostridijama. Takođe, potrebno je ispitati i sastav fecesa (pH, prisustvo mlečne, propionske kiseline, itd.) kako bi se ustanovio uticaj *Lb. plantarum* 564 na sastav fecesa, što bi doprinelo kompletnijoj analizi dejstva ovog potencijalnog probiotika. S obzirom na to da je *Lb. plantarum* 299v proučavan prethodnih 25 godina, kao i da su objavljene mnogobrojne studije o ovom probiotiku (Adawi et al., 1997; Fak et al., 2008; Karlsson et al., 2010), moglo bi se reći da *Lb. plantarum* 564 ima dobru osnovu za dalja ispitivanja zdravstvenih efekata. Budući da su prikazani prosečni rezultati zasejavanja fecesa 10 volontera u grupi, može se reći da je kod većine volontera došlo do inhibicije nepoželjne mikroflore, s tim što kod pojedinaca nije došlo do promena u broju mikroorganizama. Različit uticaj probiotskih bakterija između volontera je sasvim opravdan, usled toga što je autohtona mikroflora ljudskog organizma jedinstvena i drugačija kod svakog čoveka. Samim tim, uticaj *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v na mikrofloru gastrointestinalnog trakta je različit.

U budućim ispitivanjima uticaja *Lb. plantarum* 564 na GI trakt, broj volontera bi trebalo da bude znato veći kako bi se rezultati bili reprezentativniji.

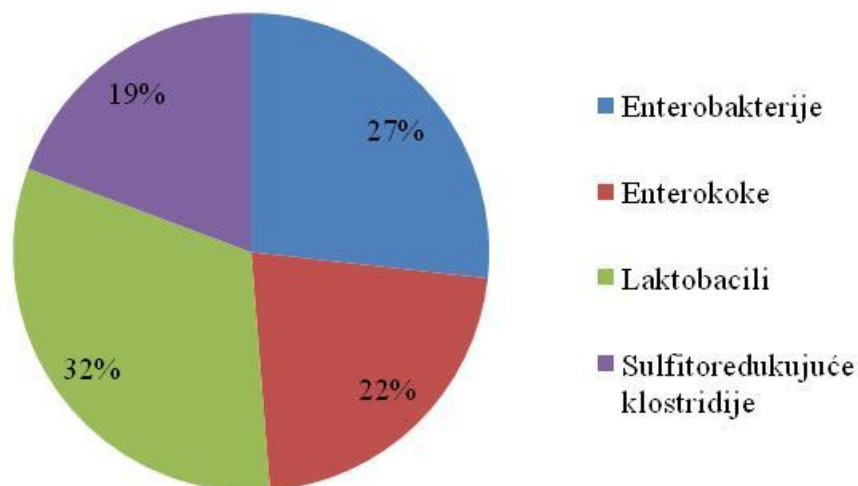
4.10.1.1. Odnos laktobacila, sulfitoredujućih klostridija, enterobakterija i enterokoka u fecesu volontera, pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama

Međusobni odnos probiotskih bakterija i sulfitoredujućih klostridija, enterobakterija i enterokoka, kao nepoželjnih mikroorganizama GI trakta, ispitivan je procentualnim udelom svake navedene grupe mikroorganizama pre i nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama. Na taj način, ispitivano je povećanje ili smanjenje

procentualnog udela navedenih grupa mikroorganizama, kao i promena njihovog međusobnog odnosa. Samim tim, ispitan je uticaj koloniziranih probiotskih bakterija i povećanje broja laktobacila na prisustvo nepoželjnih mikroorganizama u mikroflori fecesa. Procentualni udeo logaritamskih vrednosti sulfitoredujućih klostridija, enterobakterija, enterokoka i laktobacila pre i nakon konzumiranja određenog proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v je prikazan na graficima 19-34.



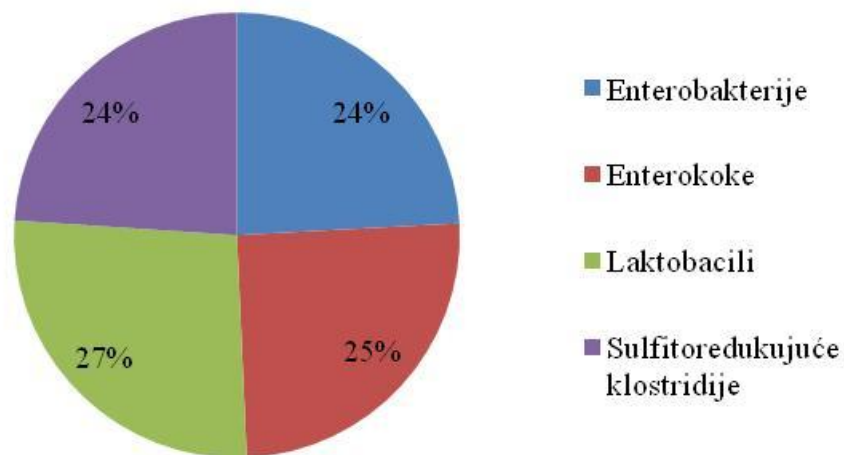
Grafik 19. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre konzumiranja praha sprej sušenog *Lb. plantarum* 564



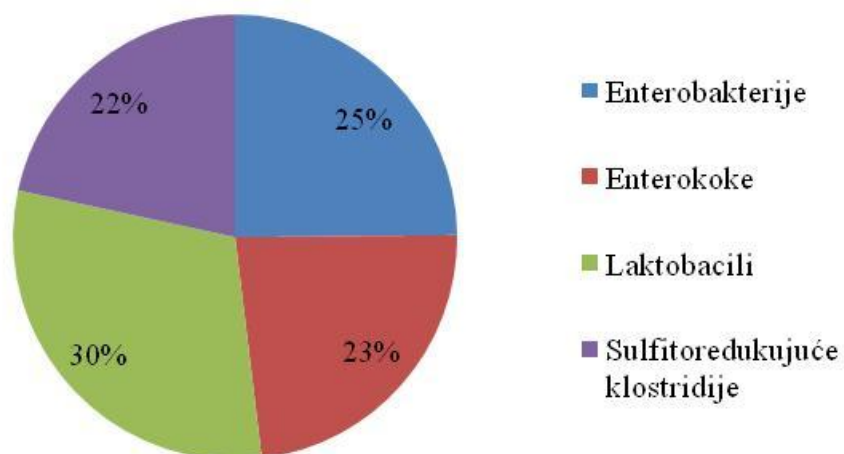
Grafik 20. Procentualni udeo grupa laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja praha sprej sušenog *Lb. plantarum* 564

Evidentno je da je procentualni udeo laktobacila povećan za 4%, nakon konzumiranja praha sprej sušenog *Lb. plantarum* 564. Kao posledica povećanja prisustva laktobacila, došlo je do smanjenja procentalnog udela enterokoka (1%) i sulfitoredujućih klostridija (3%) u odnosu na ukupan zbir laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama. Pored toga, udeo enterobakterija je ostao nepromenjen.

Na grafiku 21 i 22 prikazani su procentualni udeli laktobacila i sulfitoredujućih klostridija, enterobakterija i enterokoka kao nepoželjnih mikroorganizama u GI traktu pre i nakon konzumiranja jogurta sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564.



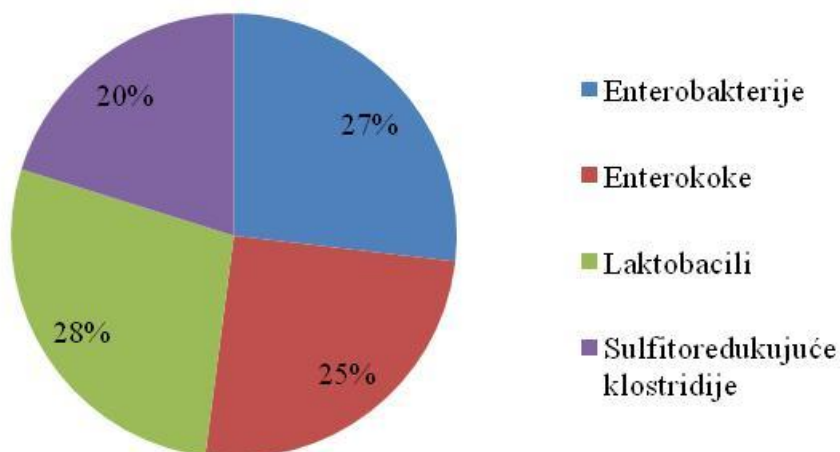
Grafik 21. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre konzumiranja jogurta sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564



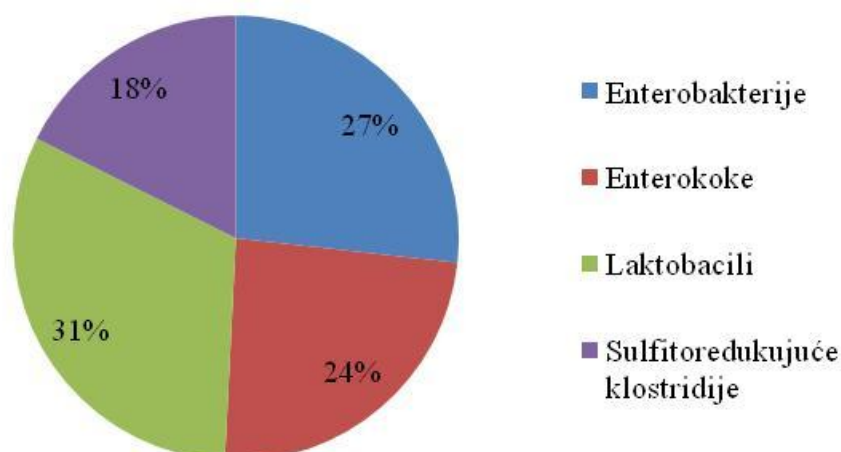
Grafik 22. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja jogurta sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564

Na osnovu dobijenih rezultata može se ustanoviti da je nakon konzumiranja jogurta sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 povećan udeo enterobakterija (1%) i laktobacila (3%), pri čemu je došlo do smanjenja udela sulfitoredukujućih klostridija i enterokoka za 2%. Iako je nakon konzumiranja jogurta sa *Lb. plantarum* 564 došlo do smanjenja broja enterobakterija za 0,9 logaritamskih jedinica (grafik 15), do povećanja udela enterobakterija u ukupnom zbiru navedenih grupa mikroorganizama je došlo usled znatno većeg smanjenja broja enterokoka i sulfitoredukujućih klostridija u odnosu na enterobakterije. Takođe, ukupan zbir svih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja jogurta sa *Lb. plantarum* 564 je smanjen, što je prouzrokovalo veći udeo enterobakterija nakon konzumiranja jogurta u odnosu na njegov udeo pre konzumiranja navedenog proizvoda.

Procentualni udeli navedenih grupa mikroorganizama u fecesu volontera pre i nakon konzumiranja sira od UF mleka sa *Lb. plantarum* 564 prikazani su na graficima 23 i 24.



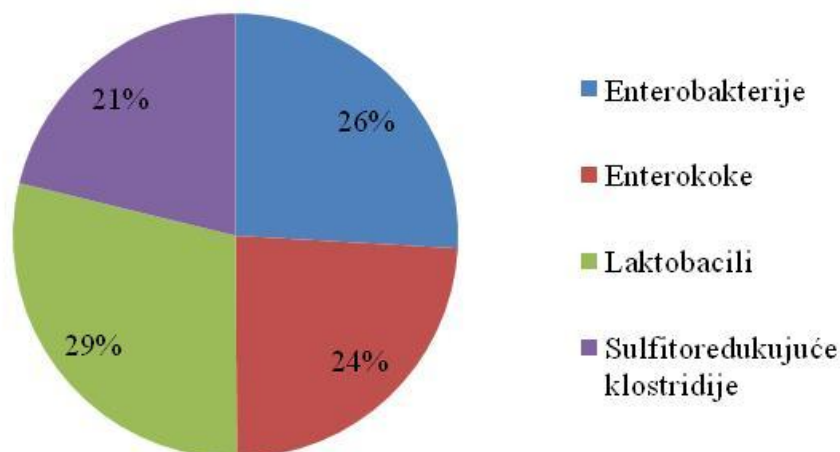
Grafik 23. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre konzumiranja sira od UF mleka sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564



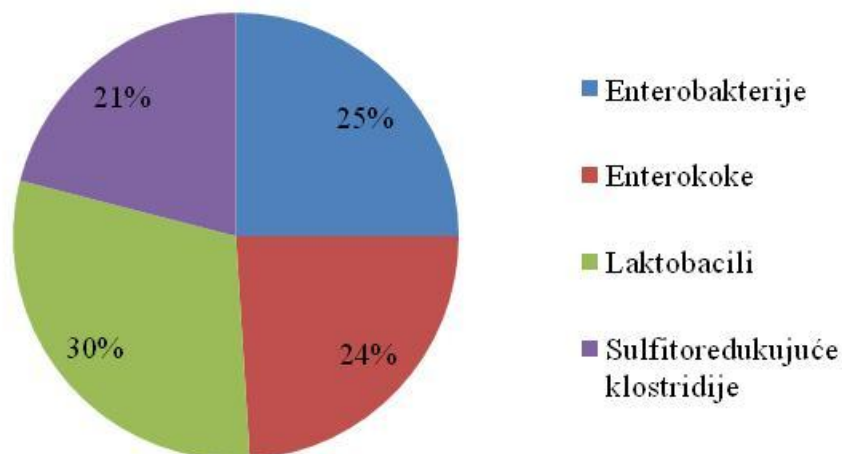
Grafik 24. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja sira od UF mleka sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564

Kao i kod jogurta sa *Lb. plantarum* 564, nakon konzumiranja sira od UF mleka sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564, udeo enterobakterija je ostao nepromenjen, iako je došlo do smanjenja ukupnog broja enterobakterija (grafik 15). Takođe, udeo enterokoka i sulfitoredukujućih klostridija je smanjen za 1%, odnosno 2%, a sve to je nastalo kao posledica kolonizacije GI trakta što se ogleda u povećanju udela laktobacila za 3%.

Na osnovu rezultata prikazanih na grafiku 25 i 26, odnosno upoređivanjem procentualnog udela laktobacila i sulfitoredukujućih klostridija, enterobakterija i enterokoka kao nepoželjnih mikroorganizama u GI traktu pre i nakon konzumiranja crne čokolade sa *Lb. plantarum* 564, može se primetiti da se udeo laktobacila povećao samo za 1%, što je imalo efekta samo na identično smanjenje enterobakterija, dok je udeo sulfitoredukujućih klostridija i enterokoka ostao nepromenjen.



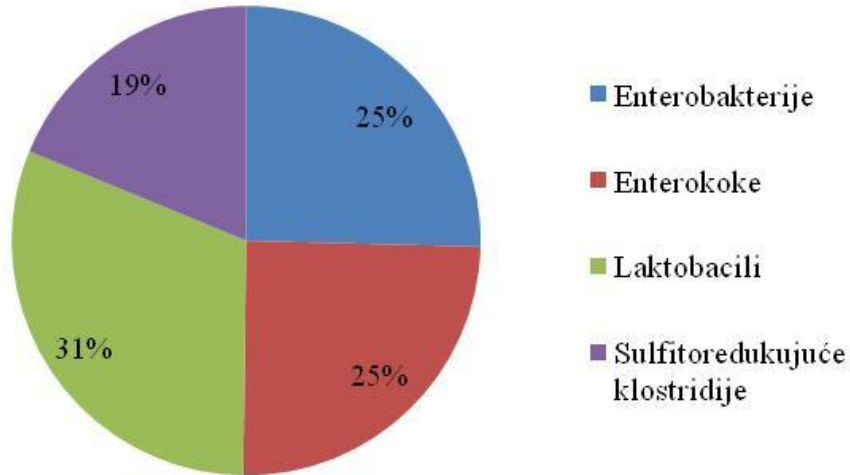
Grafik 25. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre konzumiranja crne čokolade sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564



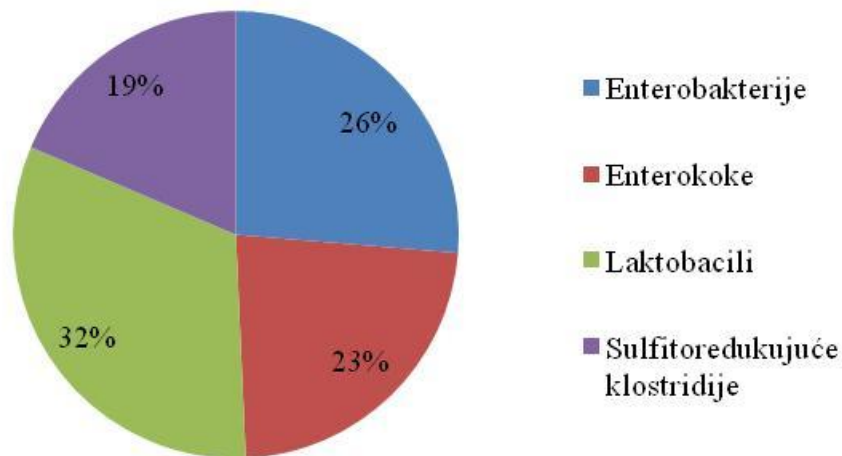
Grafik 26. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja crne čokolade sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564

Analizirajući dobijene rezultate može se ustanoviti da je nakon konzumiranja svakog proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 ostvareno povećanje udela laktobacila, odnosno da je povećanje broja laktobacila doprinelo smanjenju udela enterobakterija, enterokoka i sulfitoredukujućih klostridija. Shodno tome, u pojedinim slučajevima je došlo do značajnog povećanja udela laktobacila u odnosu na nepoželjne mikroorganizme, kao na primer nakon konzumiranja praha sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 (tabela 31).

Na grafiku 27 i 28 prikazan je procentulani udeo laktobacila i sulfitoredukujućih klostridija, enterobakterija i enterokoka u fecesu volontera, pre i nakon konzumiranja praha sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 299v.



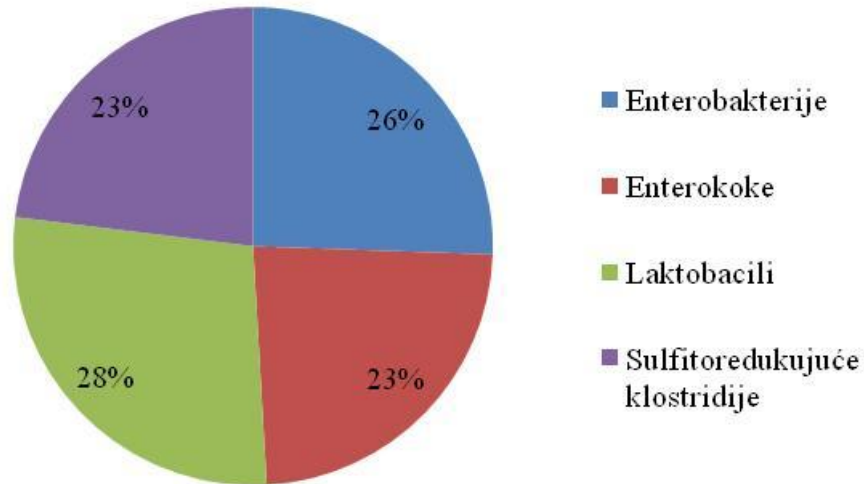
Grafik 27. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre konzumiranja praha sprej sušenog *Lb. plantarum* 299v



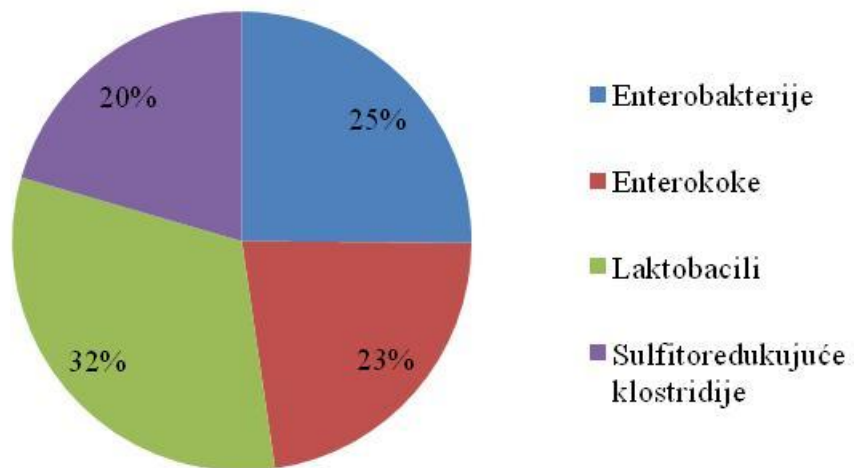
Grafik 28. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja praha sprej sušenog *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu dobijenih rezultata, udeo enterokoka se smanjio za 2%, dok je udeo sulfitoredukujućih klostridija ostao nepromenjen. Samim tim, udeo laktobacila i enterobakterija je povećan za 1%. Kao što je prethodno navedeno, povećanje udela

enterobakterija je prouzrokovano manjim padom broja ćelija u odnosu na ostale nepoželjne mikroorganizme, dok je ukupan broj mikroorganizama u fecesu smanjen u odnosu na ukupan broj mikroorganizama pre konzumiranja praha sprej sušenih ćelija.



Grafik 29. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre konzumiranja jogurta sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v

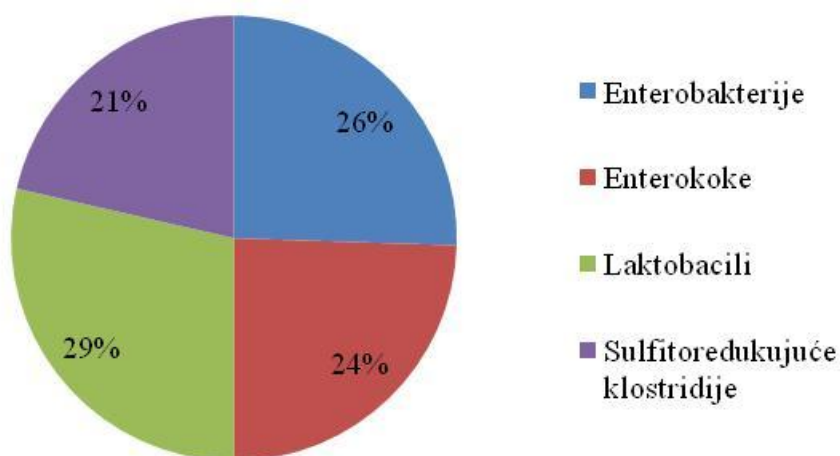


Grafik 30. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja jogurta sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v

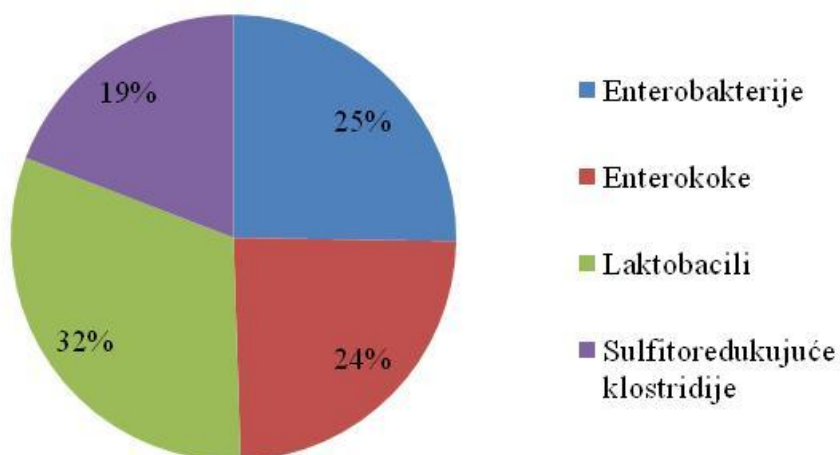
Na osnovu procentualnih udela laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre i nakon konzumiranja jogurta sa *Lb. plantarum* 299v, može se primetiti da je nakon konzumiranja navedenog proizvoda došlo do smanjenja udela

sulfitoredukujućih klostridija za 3%, dok je udeo enterobakterija smanjen za 1%. Udeo enterokoka je ostao nepromenjen, dok je udeo laktobacila povećan za 4%. Samim tim, može se izvesti zaključak da je nakon konzumiranja jogurta sa *Lb. plantarum* 299v ostvarena veoma dobra kolonizacija *Lb. plantarum* 299v u GI traktu, što je prouzrokovalo i smanjenje udela nepoželjnih mikroorganizama.

Na grafiku 31 i 32, prikazani su procentulani udeli laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama pre i nakon konzumiranja sira od UF mleka sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v.



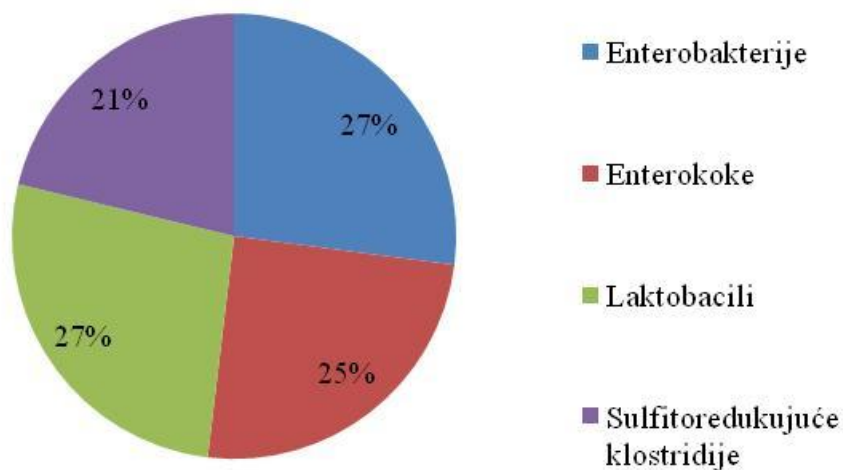
Grafik 31. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre konzumiranja sira od UF mleka sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v



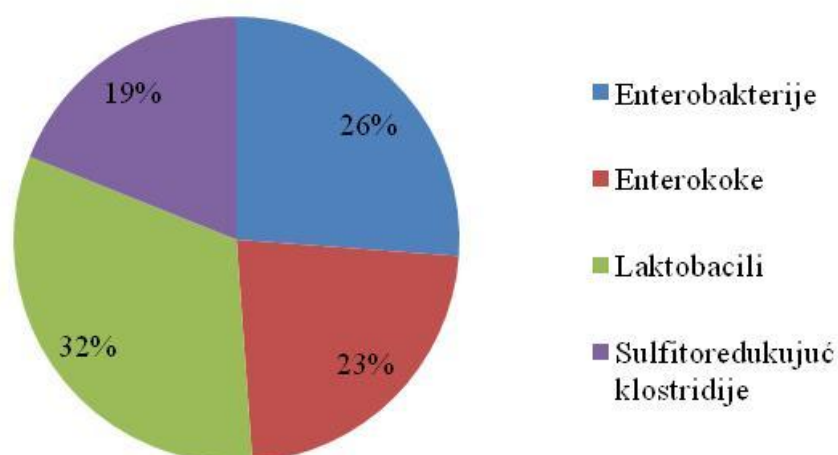
Grafik 32. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja sira od UF mleka sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v

Dobijeni rezultati ukazuju na povećanje laktobacila za 3%, što je imalo za posledicu smanjenje udela sulfitoredujućih klostridija za 2%, kao i enterobakterija za 1%, pri čemu je udeo enterokoka ostao nepromenjen nakon konzumiranja sira od UF mleka sa *Lb. plantarum* 299v.

Nakon konzumiranja crne čokolade sa *Lb. plantarum* 299v (grafik 33 i 34), ostvareno je najveće povećanje laktobacila (5%), a time i smanjenje procentulanog udela svih grupa nepoželjnih mikroorganizama: enterobakterije za 1%, enterokoke za 2% i sulfitoredujuće klostridije za 2%. U odnosu na crnu čokoladu sa 5% povećanja udela laktobacila, udeo laktobacila nakon konzumiranja ostalih proizvoda sa probiotskim bakterijama je bio manji (1-4%).



Grafik 33. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera pre konzumiranja crne čokolade sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v



Grafik 34. Procentualni udeo laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama u fecesu volontera nakon konzumiranja crne čokolade sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v

U tabeli 31 i 32, prikazano je smanjenja ili povećanje udela laktobacila, sulfitoredujućih klostridija, enterokoka i enterobakterija nakon konzumiranja proizvoda sa *Lb. plantarum* 564, odnosno *Lb. plantarum* 299v.

Tabela 31. Povećanje ili smanjenje udela laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama nakon konzumiranja proizvoda sa *Lb. plantarum* 564

Mikroorganizmi	Prah (%)		Jogurt (%)		Sir od UF mleka (%)		Crna čokolada (%)	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Laktobacili	4		3		3		1	
Sulf. klostridije		3		2		2		/
Enterokoke		1		2		1		/
Enterobakterije		/	1			/		1

+ povećanje udela; - smanjenje udela; / bez promena udela

Tabela 31. Povećanje ili smanjenje udela laktobacila i nepoželjnih mikroorganizama nakon konzumiranja proizvoda sa *Lb. plantarum* 564

Mikroorganizmi	Prah (%)		Jogurt (%)		Sir od UF mleka (%)		Crna čokolada (%)	
	+*	-	+	-	+	-	+	-
Laktobacili	1		4		3		5	
Sulf. klostridije		/		3		2		2
Enterokoke		2		/		/		1
Enterobakterije	1			1		1		2

*+ povećanje udela; - smanjenje udela; / bez promena udela

Generalno posmatrajući, može se izvesti zaključak da je konzumiranje proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v doprinelo povećanju udela laktobacila u GI traktu volontera, a samim tim došlo je do smanjenja udela nepoželjnih mikroorganizama.

4.10.2. Sposobnost preživljavanja probiotskih bakterija u gastrointestinalnim uslovima

Nakon ispitivanja sastava mikroflore fecesa pre i nakon konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 i komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v, vršena je izolacija i RAPD genotipizacija laktobacila u cilju dokazivanja sposobnosti kolonizacije i naseljavanja GI trakta. U slučaju da *Lb. plantarum* 564 preživljava GI uslove, među izolovanim laktobacilima bi trebalo da se identifikuje i navedeni soj. S obzirom na to da je u prethodnim istraživanjima dokazano da *Lb. plantarum* 299v preživljava GI uslove (Johansson et al., 1998; Goossens et al., 2005; Karlsson et al., 2011a), njegovo prisustvo među izolovanim laktobacilima bilo je očekivano.

S obzirom na to da je u studiji bilo uključeno 40 volontera podeljenih u dve grupe, a koji su konzumirali 4 različita proizvoda sa probiotskim bakterijama, izolovano je ukupno 800 izolata nakon konzumiranja proizvoda. Pored izolacije laktobacila nakon konzumiranja, vršena je i izolacija laktobacila i pre konzumiranja proizvoda sa probioticima, radi ispitivanja karakteristične autohtone mikroflore volontera. Međutim,

s obzirom na to da ispitivanje autohtone mikroflore volontera nije bio jedan od ciljeva doktorske disertacije, navedeno ispitivanje neće biti prikazano.

Nakon izolacije čistih kultura, vršeno je bojenje po Gramu i mikroskopiranje, pri čemu je 83 izolata koji nisu bili G pozitivni štapići eliminisano iz daljeg ispitivanja.

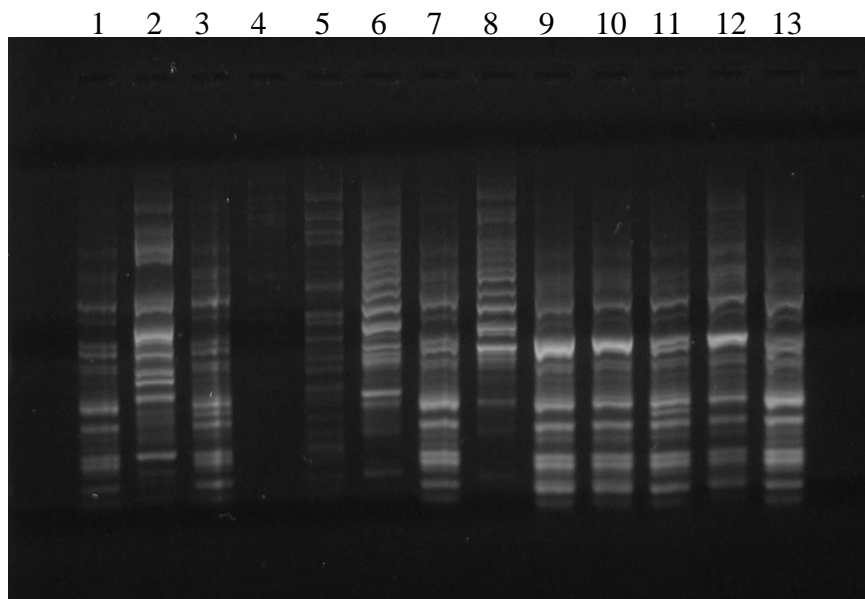
U tabeli 33 prikazan je broj volontera kod kojih je preživio potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 nakon konzumiranja praha, jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade sa navedenim probiotikom, kao i za *Lb. plantarum* 299v, od 10 volontera koliko se nalazilo u jednoj grupi.

Tabela 33. Broj volontera kod kojih je izolovan *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v nakon konzumiranja proizvoda sa probiotskim bakterijama

Probiotik	Ukupan broj volontera	Broj volontera			
		Prah	Jogurt	Sir od UF mleka	Crna čokolada
<i>Lb. plantarum</i> 564	10	3	4	4	7
<i>Lb. plantarum</i> 299v	10	2	4	8	8

Dobijeni rezultati ukazuju na to da potencijalna probiotska bakterija *Lb. plantarum* 564 preživljava GI uslove u svim proizvodima u kojima je primenjena. Takođe, prilikom poređenja uloge nosača, rezultati ispitivanja pokazali su da su prehrambeni proizvodi bolji nosači probiotskih bakterija, usled čega dolazi i do naseljavanja probiotika u GI traktu. Od prehrambenih proizvoda, crna čokolada je pružila veoma dobru zaštitu probiotskim bakterijama tokom prolaza kroz GI trakt, uzimajući u obzir da je *Lb. plantarum* 564 preživio kod 7 volontera, a *Lb. plantarum* 299v kod 8 volontera koji su konzumirali probiotsku crnu čokoladu. Sir od UF mleka se takođe pokazao kao veoma dobar nosač probiotika, s obzirom na to da je *Lb. plantarum* 299v izolovan iz fecesa 8 volontera koji su konzumirali sir od UF mleka, dok je *Lb. plantarum* 564 izolovan iz fecesa 4 volontera. Jogurt je pokazao istu ulogu nosača probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 tokom prolaza kroz GI trakt, jer je detektovan kod 4 volontera, a kod 3 volontera je nađeno prisustvo *Lb. plantarum* 299v. Probiotske bakterije su u manjem broju fecesa volontera izolovane nakon konzumiranja praha u odnosu na prehrambene proizvode, pri čemu je *Lb. plantarum* 564 izolovan iz fecesa 3 volontera, dok je *Lb. plantarum* 299v izolovan kod 2 volontera. Samim tim, dobijeni rezultati ukazuju na to

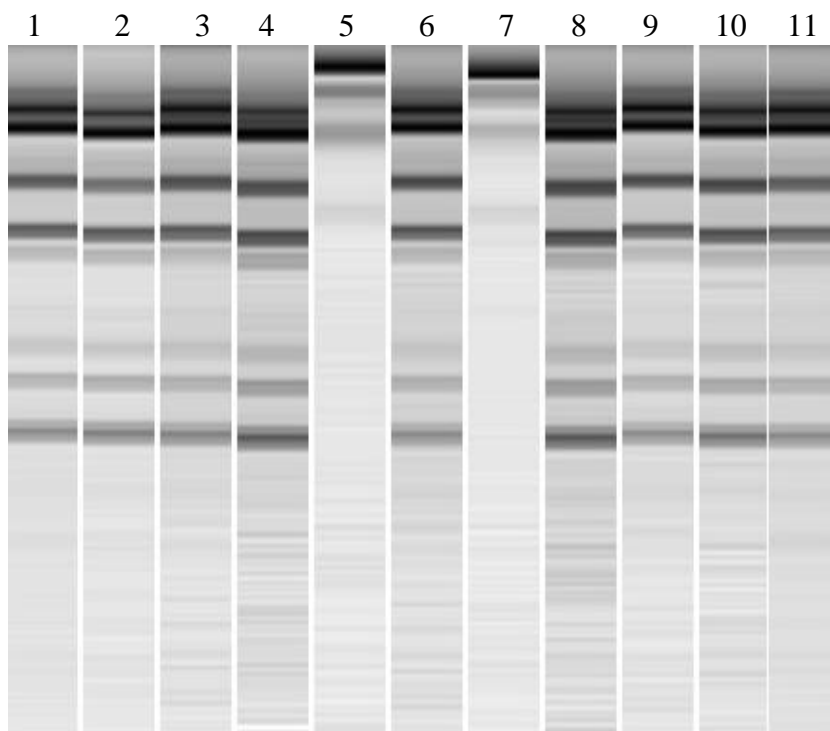
da je mikroinkapsulirani prah sprej sušenih probiotskih bakterija, koji je predstavljao farmaceutski preparat, bio slabija zaštita probiotskim bakterijama prilikom prolaza kroz GI trakt, u poređenju sa sva 3 prehrambena proizvoda. S obzirom na to da prilikom konzumiranja praha sprej sušenih probiotskih ćelija dolazi do unosa samo mikroinkapsuliranih probiotika, dobijeni rezultati su očekivani, uzimajući u obzir efekat komponenata prehrambenih proizvoda i zaštite koju pružaju probiotskim bakterijama. Nakon izolacije laktobacila iz fecesa volontera, za dalja ispitivanja prisustva probiotskih bakterija u fecesu odabrano je 717 izolata. U nastavku će biti prikazani samo pojedini rezultati agarozne gel ili kapilarne elektroforeze, zbog velikog broja gelova. Prilikom ispitivanja preživljavanja sprej sušenog potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 u vidu praha koji predstavlja farmaceutski preparat, od 10 volontera kod 3 volontera je pronađen *Lb. plantarum* 564. Na slici 8 prikazan je izgled agarozne gel elektroforeze volontera ZM kod koga je *Lb. plantarum* 564 izolovan iz fecesa.



Slika 8. Agarozni gel sa izolatima laktobacila iz fecesa volontera ZP nakon konzumiranja praha sprej sušenog *Lb. plantarum* 564. 1. *Lb. plantarum* 564, 2. Izolat ZPP51; 3. Izolat ZPP52; 4. Izolat ZPP53; 5. Izolat ZPP54; 6. Izolat ZPP55; 7. *Lb. plantarum* 564; 8. Izolat ZPP56; 9. Izolat ZPP57; 10. Izolat ZPP58; 11. Izolat ZPP59; 12. Izolat ZPP510; 13. *Lb. plantarum* 564

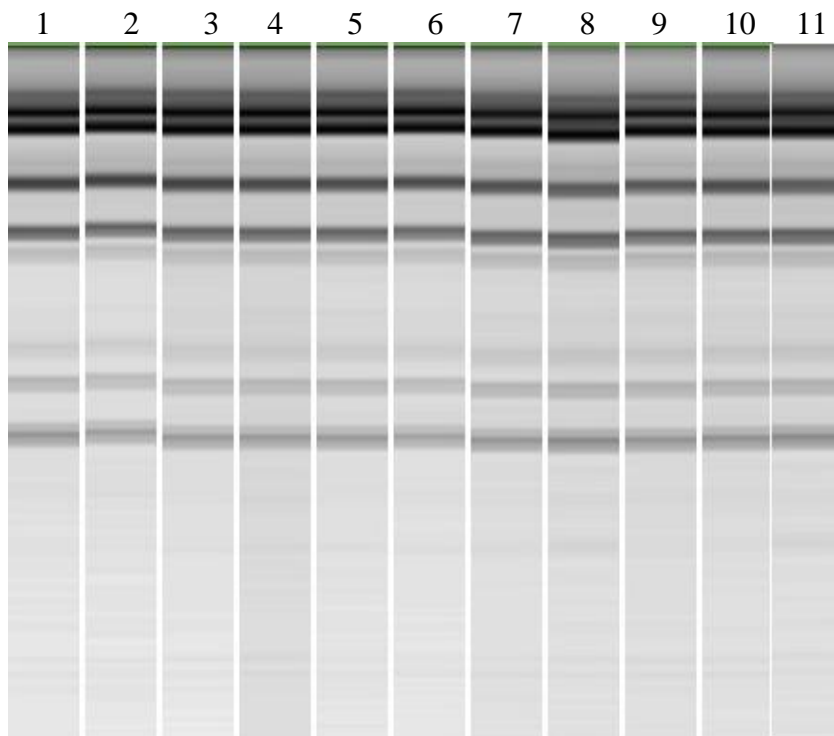
Posmatrajući karakterističan raspored bendova, može se videti (slika 8) da izolati ZPP57, ZPP58 i ZPP510 imaju identičan patern kao i *Lb. plantarum* 564.

Kod volontera koji su dnevno konzumirali jogurt sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564, navedeni probiotik je izolovan iz fecesa 4 volontera. PCR produkti ovih volontera su vizualizovani pomoću kapilarne elektroforeze. Karakterističan patern izolata volontera DM je prikazan na slici 9. Identičan patern izolata laktobacila iz fecesa volontera DM je primećen kod izolata DMJ51, DMJ52, DMJ53, DMJ56 i DMJ59.



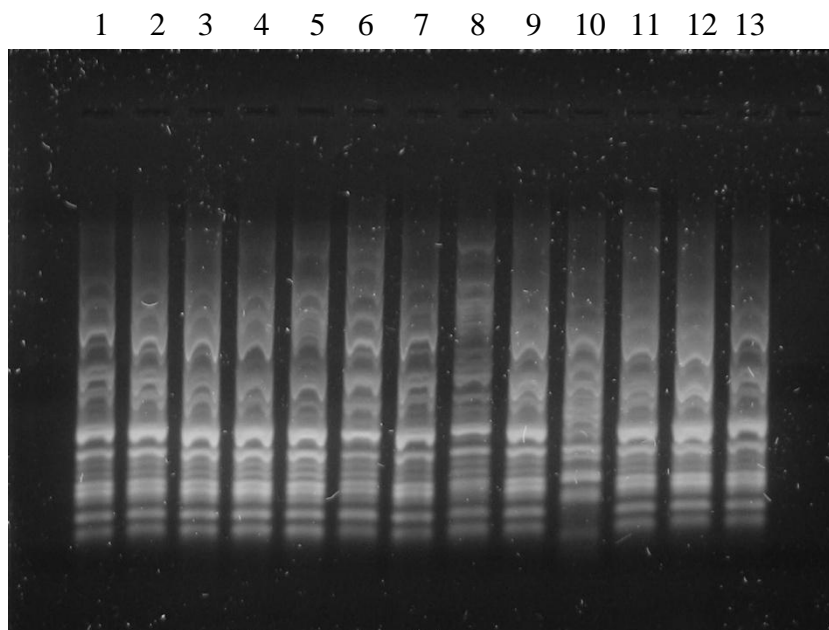
Slika 9. Kapilarna elektroforeza volontera DM nakon konzumiranja jogurta sa *Lb. plantarum* 564. 1. Izolat DMJ51; 2. Izolat DMJ52; 3. Izolat DMJ53; 4. Izolat DMJ54; 5. Izolat DMJ55; 6. Izolat DMJ56; 7. Izolat DMJ57; 8. Izolat DMJ58.; 9. Izolat DMJ59; 10. Izolat DMJ510; 11. *Lb. plantarum* 564

Kod volontera koji su konzumirali sir od UF mleka sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 dnevno, *Lb. plantarum* 564 je preživio kod 4 od 10 volontera. Izgled kapilarne elektrofore volontera FR je prikazan na slici 10, pri čemu se može primetiti da svi izolati laktobacila imaju identičan raspored bendova. Dobijeni rezultat ukazuje na kolonizaciju laktobacila u GI traktu, kao i na povećanje ukupnog broja laktobacila u fecesu, što je i primećeno prilikom analize mikroflore fecesa.



Slika 10. Kapilarna elektroforeza volontera FR nakon konzumiranja sira od UF mleka sa *Lb. plantarum* 564. 1. Izolat FRS51; 2. Izolat FRS52; 3. Izolat FRS53; 4. Izolat FRS54; 5. Izolat FRS55; 6. Izolat FRS56; 7. Izolat FRS57; 8. Izolat FRS58.; 9. Izolat FRS59; 10. Izolat FRS510; 11. *Lb. plantarum* 564

U grupi volontera koji su konzumirali crnu čokoladu sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564, nakon 14 dana konzumiranja crne čokolade dnevno, navedeni probiotik je izolovan iz fecesa 7 volontera, odnosno *Lb. plantarum* 564 je preživeo GI uslove 7 volontera koji su konzumirali crnu čokoladu. Kod pojedinih volontera *Lb. plantarum* 564 je kolonizovao GI trakt toliko da je svih 10 izolata laktobacila bio *Lb. plantarum* 564. Na slici 11 prikazan je agarozni gel volontera DM.

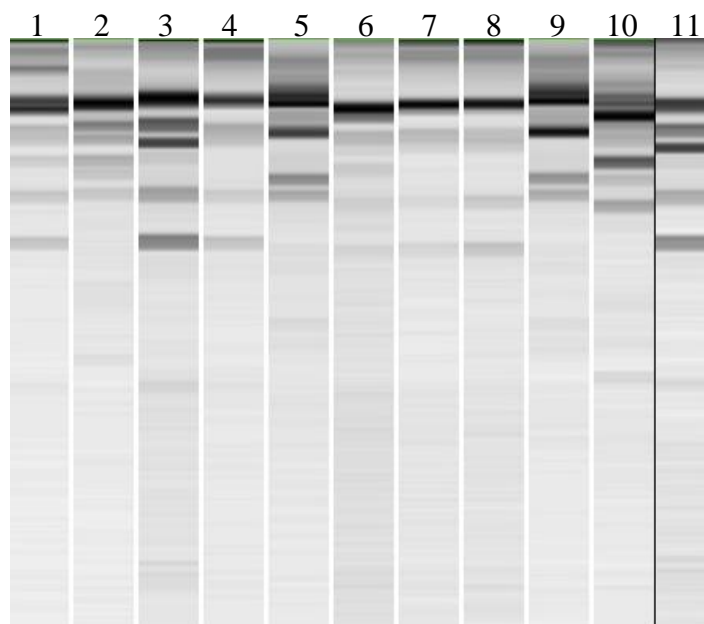


Slika 11. Agarozni gel volontera DM koji je konzumirao crnu čokoladu sa *Lb. plantarum* 564. 1. *Lb. plantarum* 564, 2. Izolat DMC51; 3. Izolat DMC52; 4. Izolat DMC53; 5. Izolat DMC54; 6. Izolat DMC55; 7. *Lb. plantarum* 564; 8. Izolat DMC56; 9. Izolat DMC57; 10. Izolat DMC58; 11. Izolat DMC59; 12. Izolat DMC510; 13. *Lb. plantarum* 564

Većina volontera koji su konzumirali proizvode sa *Lb. plantarum* 564 konzumirala je sva četiri proizvoda sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom, dok su pojedini volonteri zbog bolesti bili isključeni iz studije i zamenjeni s novim. Prilikom poređenja zaštitne uloge prehrambenih proizvoda kao matriksa i sprej sušenja kao inkapsulacione metode, na osnovu broja volontera kod kojih je *Lb. plantarum* 564 izolovan iz fecesa može se ustanoviti da crna čokolada predstavlja izuzetno dobar nosač navedenog probiotika. Razlika u broju volontera nije velika, ali dobijeni rezultati ukazuju da je *Lb. plantarum* 564 kod pojedinih volontera izolovan iz fecesa nakon konzumiranja crne čokolade, dok nakon konzumiranja drugog proizvoda kod istog volontera nije izolovan. Kao primer može da se uzme volonter DAR, kod kojeg je *Lb. plantarum* 564 izolovan nakon konzumiranja crne čokolade, ali na primer nije izolovan nakon konzumiranja jogurta ili praha. Isto tako, volonter DM je jedan od najboljih primera kolonizacije *Lb. plantarum* 564. Nakon konzumiranja crne čokolade, kod volontera DM, *Lb. plantarum* 564 je izolovan od svih 10 izolata. Prilikom izolacije laktobacila nakon konzumiranja sira od UF mleka, samo jedan izolat je imao isti patern kao *Lb. plantarum* 564, dok je kod praha bilo 4 izolata. Nakon konzumiranja jogurta sa *Lb. plantarum* 564, u fecesu

volontera su pronađena samo 3 izolata koja su predstavljala *Lb. plantarum* 564. Slične rezultate su dobili i autori Possemiers et al. (2010), koji su poredili zaštitnu ulogu crne i mlečne čokolade i mleka. Nakon prolaza navedenih proizvoda sa probiotikom *Lb. helveticus* CNCM I-1722 i *B. lactis* CNCM I-3470 kroz simulirane GI uslove u SHIME sistemu, dobili su da je najbolju ulogu nosača pokazala mlečna čokolada sa 91% preživelih ćelija. Crna čokolada je takođe pružila veoma dobru zaštitu probioticima, pri čemu je 80% probiotskih ćelija preživelo simulirane GI uslove. Što se tiče mleka kao nosača, nakon prolaza kroz simulirane GI uslove, 20% probiotskih bakterija je preživelo.

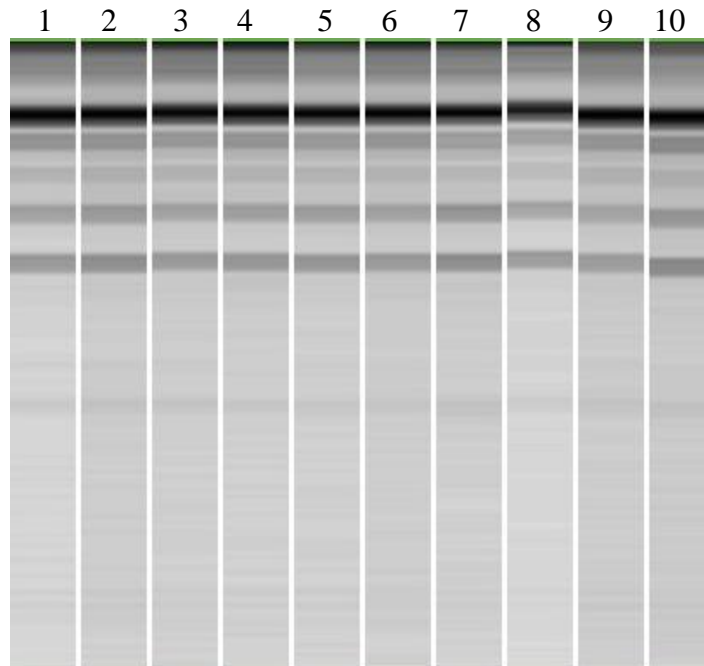
Kao što je već navedeno, *Lb. plantarum* 299v preživljava uslove GI trakta, tako da se ovaj deo ispitivanja sveo na poređenje uloge nosača prethodno navedenih proizvoda. Ispitivanjem izolovanih laktobacila fecesa volontera koji su konzumirali prah sprej sušenog *Lb. plantarum* 299v, ustanovljeno je da je *Lb. plantarum* 299v izolovan iz fecesa 2 volontera. Na slici 12 prikazana je kapilarna elektroforeza volontera PM nakon konzumiranja praha *Lb. plantarum* 299v.



Slika 12. Kapilarna elektroforeza volontera PM nakon konzumiranja praha sprej sušenog *Lb. plantarum* 299v. 1. Izolat PMP91; 2. Izolat PMP92; 3. Izolat PMP93; 4. Izolat v4; 5. Izolat PMP95; 6. Izolat PMP96; 7. Izolat PMP96; 8. Izolat PMP98; 9. Izolat PMP99; 10. Izolat PMP910; 11. *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu dobijenih rezultata, može se ustanoviti da izolat PMP93 ima isti patern kao i

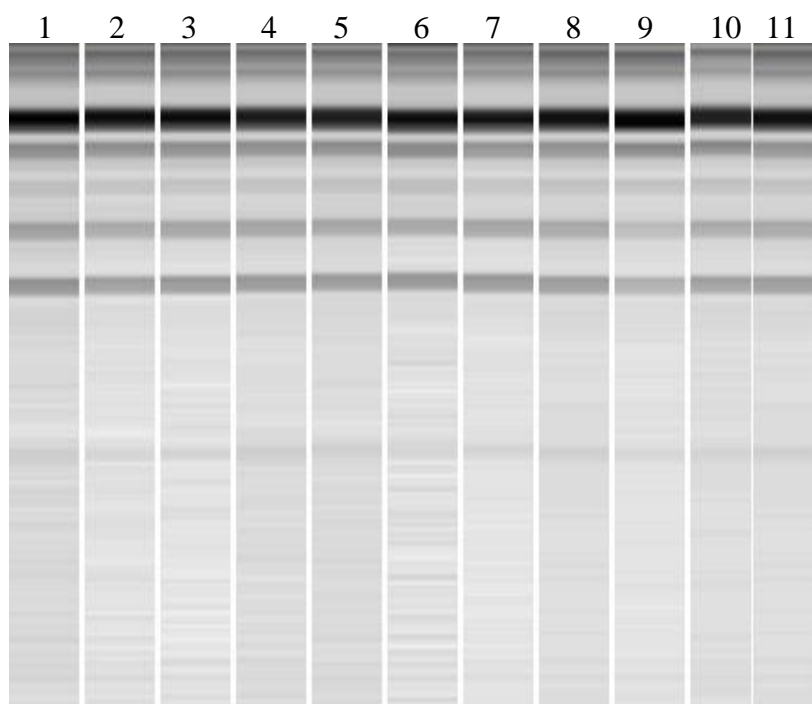
Lb. plantarum 299v. S obzirom na to da su volonteri konzumirali prah sprej sušenog probiotika, sasvim su opravdani dobijeni rezultati, imajući u vidu da sprej sušene probiotske bakterije nisu zaštićene dodatnim komponentama prehrambenih proizvoda. Sposobnost preživljavanja *Lb. plantarum* 299v inkorporiranog u jogurtu, takođe je bila dobra uzimajući u obzir da je probiotik preživeo kod 4 volontera. Kapilarna elektroforeza izolata laktobacila volontera LJP je prikazana na slici 13.



Slika 13. Kapilarna elektroforeza volontera LJP nakon konzumiranja jogurta sa *Lb. plantarum* 299v. 1. Izolat LJPJ91; 2. Izolat LJPJ92; 3. Izolat LJPJ93; 4. Izolat LJPJ94; 5. Izolat LJPJ95; 6. Izolat LJPJ96; 7. LJPJ96; 8. Izolat LJPJ98.; 9. Izolat LJPJ99; 10. *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu karakterističnog paterna *Lb. plantarum* 299v, može se primetiti da su svi izolati laktobacila volontera LJP imali identičan raspored bendova kao i *Lb. plantarum* 299v. Samim tim, došlo je do trenda povećanja ukupnog broja laktobacila nakon konzumiranja jogurta sa *Lb. plantarum* 299v, što je i prikazano u prethodnim rezultatima.

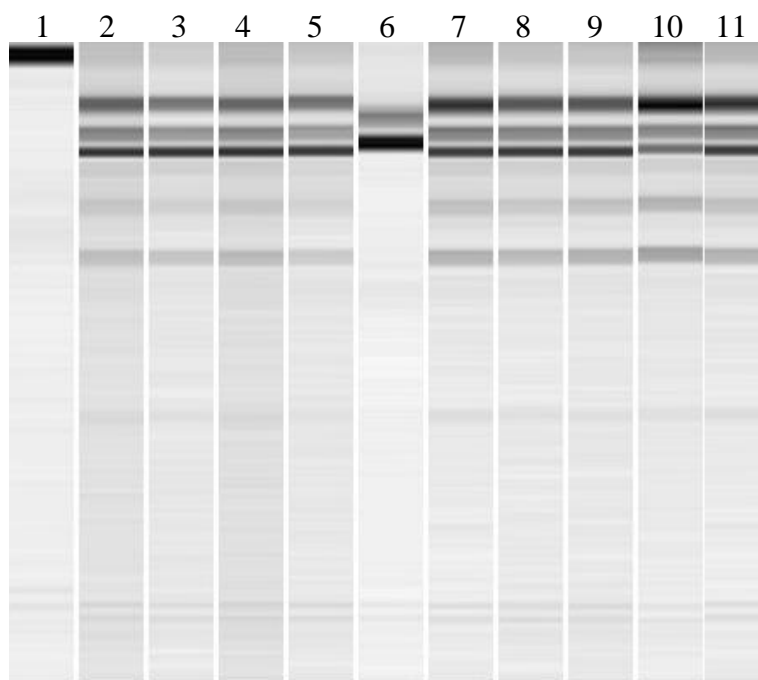
Nakon konzumiranja sira od UF mleka sa sprej sušenim komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v, navedeni probiotik je izolovan iz fecesa 8 volontera. Na slici 14 prikazana je kapilarna elektroforeza volontera BO nakon konzumiranja sira od UF mleka sa *Lb. plantarum* 299v.



Slika 14. Kapilarna elektroforeza volontera BO nakon konzumiranja sira od UF mleka sa *Lb. plantarum* 299v. 1. Izolat BOS91; 2. Izolat BOS92; 3. Izolat BOS93; 4. Izolat BOS94; 5. Izolat BOS95; 6. Izolat BOS96; 7. BOS96; 8. Izolat BOS98.; 9. Izolat BOS99; 10. Izolat BOS910; 11. *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu rasporeda bendova na slici 14 jasno se može videti da svi izolati imaju identičan patern kao i *Lb. plantarum* 299v.

Prilikom izolacije laktobacila iz fecesa volontera koji su konzumirali crnu čokoladu sa *Lb. plantarum* 299v, utvrđeno je da je kod 8 volontera pronađen navedeni probiotik. Na slici 15 prikazana je kapilarna elektroforeza volontera NE nakon konzumiranja crne čokolade. Raspored paternu ukazuje da izolati NEC92, NEC93, NEC94, NEC95, NEC97, NEC98, NEC99, NEC910 pokazuju identičan raspored bendova kao i *Lb. plantarum* 299v.



Slika 15. Kapilarna elektroforeza volontera NE nakon konzumiranja crne čokolade sa *Lb. plantarum* 299v. 1. Izolat NEC91; 2. Izolat NEC92; 3. Izolat NEC93; 4. Izolat NEC94; 5. Izolat NEC95; 6. Izolat NEC96; 7. NEC97; 8. Izolat NEC98.; 9. Izolat NEC99; 10. Izolat NEC910; 11. *Lb. plantarum* 299v

Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da su crna čokolada i sir od UF mleka obezbedili najbolju zaštitu probiotiku *Lb. plantarum* 299v, tako da je navedeni probiotik izolovan kod 8 volontera. Slabiju ulogu nosača je pokazao prah, dok je nešto bolju ulogu nosača „odigrao“ jogurt sa *Lb. plantarum* 299v.

Prilikom analize PCR produkta izolovanih laktobacila pomoću kapilarne elektroforeze korišćen je Aligment marker veličine 15 bp-1 kb. Posmatrajući dobijene rezultate, vrlo je verovatno da bi se u slučaju korišćenja većeg Aligment markera (npr. 15 bp-6 kb), dobilo više bendova za poređenje. Samim tim, dobili bi se bolji rezultati za poređenje, jer u pojedinim slučajevima, na primer u slučaju slabije amplifikacije ili zapušene kapilare, dobijeni patern se ne poklapa u potpunosti sa ispitivanim probiotskim bakterijama.

Prilikom poređenja uloge nosača sira, jogurta i kapsule probiotskih bakterija *Lb. rhamnosus* GG i LC705, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS i *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12, rezultati *in vivo* studije ukazuju da sva tri proizvoda predstavljaju veoma dobre nosače (Saxelin et al., 2010). Međutim, s obzirom na to da je pomoću qPCR praćen broj navedenih probiotika, ustanovljeno je da feces volontera koji su konzumirali

jogurt, sadrži najveći broj ispitivanih probiotskih ćelija. Iako qPCR može da amplifikuje i mrtve i žive ćelije, u pojedinim istraživanjima je dokazano da uspavane ili mrtve ćelije takođe mogu da ostvare pozitivne efekte na ljudsko zdravlje (Lopez et al., 2008). Isto tako, *Lb. paracasei* IMPC2.1 je izolovan iz fecesa volontera koji su konzumirali fermentisanu artičoku, što je potvrđeno REP-PCR analizom (Valerio et al., 2006). Takođe, istraživanja su dokazala da masline predstavljaju veoma dobre nosače probiotskih bakterija prilikom prolaza kroz GI trakt (Lavermicocca et al., 2005)

Rezultati doktorske disertacije, kao i drugih istraživanja, jasno ukazuju na značajnu ulogu crne čokolade kao nosača probiotskih bakterija. Takođe, sir od UF mleka i jogurt su pokazali da je unos probiotika kroz prehrambene proizvode efektivniji u odnosu na prah sprej sušenih probiotskih ćelija, odnosno farmaceutski preparat.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu izvršenih ispitivanja, dobijenih i prodiskutovanih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Iz 5 uzoraka Pirotskog kačkavalja i 2 uzorka Sjeničkog sira, koji su proizvedeni na tradicionalan način, ukupno je izolovan 61 izolat laktobacila, pri čemu je veći broj izolata izdvojen iz uzoraka sireva manjeg stepena zrelosti.
2. Na osnovu morfoloških i tehnoloških osobina, za dalja ispitivanja je odabrano 9 izolata, pri čemu je 5 izolata iz Pirotskog kačkavalja i 4 izolata iz Sjeničkog sira koji pripadaju kolekciji kultura Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.
3. Selektovani laktobacili su identifikovani molekularnim metodama, pri čemu su izolati iz kačkavalja identifikovani kao *Lb. plantarum* K16, K50 i *Lb. paracasei* K27, K71, K621, dok su izolati iz Sjeničkog sira identifikovani kao *Lb. plantarum* 564, Z5 i Z9, a Z8 kao *Lb. paracasei*.
4. Ispitivanjem sposobnosti preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova, selektovani laktobacili su pokazali veoma dobru sposobnost preživljavanja, pri čemu je kod svih laktobacila zapažen pad broja ćelija oko $1 \log \text{ cfug}^{-1}$.
5. Prilikom ispitivanja rezistencije na antibiotike, ustanovljeno je da selektovani laktobacili poseduju prirodnu rezistenciju za većinu antibiotika. Međutim, soj *Lb. plantarum* Z9 je pokazao rezistenciju na tetraciklin, što se smatra nepoželjnom karakteristikom, usled mogućeg prenosa rezistencije na druge bakterije GI trakta.
6. Određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika, utvrđeno je da su pojedini sojevi selektovanih laktobacila rezistentni i na mnogo veće koncentracije. Na osnovu rezultata za kanamicin, selektovani izolati bi mogli da poseduju stečenu rezistenciju, dok je potvrđeno da selektovani sojevi poseduju

- prirodnu rezistenciju na vankomicin i streptomycin. Takođe, sojevi su prirodno rezistentni na gentamicin.
7. Određivanjem antimikrobne aktivnosti prema patogenim mikroorganizmima, može se zaključiti da svi selektovani laktobacili vrše inhibiciju patogenih mikroorganizama u određenom stepenu.
 8. Na osnovu rezultata ispitivanja probiotskih karakteristika, dve potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 su odabrane za inkapsulaciju tehnikom sprej sušenja. Navedeni izolati su pokazali veoma dobru sposobnost preživljavanja u simuliranim gastrointestinalnim uslovima, rezistenciju na određene antibiotike, kao i dobru antimikrobnu aktivnost.
 9. Potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 su nakon ispitivanja termotolerantnosti na povišene temperature, pokazali veoma dobru rezistenciju na temperature od 55-61°C.
 10. Nakon sprej sušenja, na osnovu rezultata ispitivanja vijabilnosti potencijalnih probiotskih bakterija dobijenih metodom razređenja i real time PCR metodom uz primenu propidijum monoazida, ustanovljeno je da je 93% ćelija *Lb. plantarum* 564, kao i 95,3% ćelija *Lb. paracasei* Z8, preživelo proces sprej sušenja. Isto tako, može se zaključiti da nije postojala značajna razlika u broju živih ćelija između metode razređenja i real time PCR metode sa PMA. Samim tim, može se zaključiti da su tokom procesa sprej sušenja ostvareni optimalni uslovi.
 11. Sprej sušene potencijalne probiotske bakterije *Lb. plantarum* 564 i *Lb. paracasei* Z8 pokazale su veoma dobru sposobnost preživljavanja simuliranih želudačnih uslova, gde nije došlo do velikog pada broja ćelija u prisustvu niskih pH vrednosti i pepsina (0,8, odnosno 1,56 logaritamskih jedinica). Međutim, proces sprej sušenja nije pružio značajnu zaštitnu ulogu probiotskim bakterijama u prisustvu žučnih soli i pankreatina, gde je došlo do značajnog pada broja ćelija (2,53 log jedinica *Lb. plantarum* 564 i 3,54 log jedinica *Lb. paracasei* Z8).
 12. Nakon ispitivanja vijabilnosti i sposobnosti preživljavanja simuliranih gastrointestinalnih uslova sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija, na osnovu rezultata, *Lb. plantarum* 564 je selektovan za primenu u proizvodnji jogurta, sira od UF mleka i crne čokolade. Kao kontrolni probiotik korišćen je *Lb. plantarum* 299v.

13. Promene pH vrednosti svih varijanti jogurta su bile u očekivanim granicama. Tokom skladištenja nije došlo do značajnih promena pH vrednosti ispitivanih varijanti jogurta, tako da se pH vrednost kretala u rasponu od 4,4-4,6. pH vrednosti svih varijanti sireva od ultrafiltriranog mleka su se kretale u granicama odgovarajućim za ovu vrstu sira (4,21-4,8) i odgovarale su promenama broja starter kultura. Takođe, nije bilo razlika u pH vrednosti između kontrolne varijante sira od ultrafiltriranog mleka i sireva sa probiotskim bakterijama.
14. Vijabilnost jogurtnih starter kultura je bila na nivou većem od 10^7 cfuml⁻¹ tokom 21 dana skladištenja. Statistički značajna razlika nije ustanovljena u broju streptokoka i laktobacila između jogurta bez i sa slobodnim i sprej sušenim probiotskim ćelijama.
15. Broj starter kultura prilikom proizvodnje i skladištenja sireva od ultrafiltriranog mleka sa dodatkom slobodnih i sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v je bio na nivou većem od 10^8 cfug⁻¹. Takođe, nije bilo statistički značajnih razlika između kontrolnog sira od UF mleka i sira sa probiotskim bakterijama.
16. Ispitivanjem vijabilnosti slobodnih i sprej sušenih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v u jogurtu, utvrđeno je da je broj ćelija bio na nivou većem od 10^7 cfug⁻¹ tokom skladištenja. Sprej sušene ćelije *Lb. plantarum* 564 su bile u porastu i kretale su se u rasponu od 7-7,99 logaritamskih jedinica, za razliku od sprej sušenih ćelija *Lb. plantarum* 299 koje su tokom skladištenja pokazale blagi pad (7,89-7,6 log jedinica). Isto tako, nije bilo značajnih razlika u broju slobodnih i sprej sušenih probiotskih ćelija
17. Tokom proizvodnje i skladištenja sireva od ultrafiltriranog mleka, broj slobodnih i sprej sušenih probiotskih ćelija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v je bio na nivou većem od 10^8 cfug⁻¹ (8,4 log cfug⁻¹ *Lb. plantarum* 564 i 9 log cfug⁻¹ *Lb. plantarum* 299v nakon 56 dana skladištenja). Nisu postojale statistički značajne razlike u broju slobodnih i sprej sušenih probiotskih ćelija tokom skladištenja sireva.
18. Prilikom ispitivanja vijabilnosti sprej sušenih probiotskih bakterija *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v tokom skladištenja crne čokolade, primećeno je da je broj ćelija bio na nivou većem od 10^8 cfug⁻¹ tokom 60 dana

skladištenja. Nakon 90 dana skladištenja, broj probiotskih ćelija se smanjio za 1 logaritamsku jedinicu, da bi nakon 180 dana skladištenja broj probiotskih ćelija bio na nivou 10^6 cfug⁻¹. Taj broj se održao i nakon 270 dana skladištenja, da bi nakon toga došlo do pada broja probiotskih ćelija na nivo 10^5 cfug⁻¹. Na osnovu rezultata može se zaključiti da su probiotske bakterije opstale na potrebnom nivou za terapijski efekat tokom 9 meseci.

19. Na osnovu rezultata senzorne ocene jogurta, varijante jogurta sa slobodnim i sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 su okarakterisane kao proizvodi sa veoma dobrim senzornim kvalitetom, dok su varijante jogurta sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v ocenjene prihvatljivim senzornim kvalitetom. Najbolje je ocenjena varijanta jogurta sa slobodnim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 neposredno nakon proizvodnje, sa procentom od maksimalnog kvaliteta 99,71%, dok se procenat u ostalim danima kretao u granicama od 80,50-93,57%. Jogurt sa sprej sušenim potencijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 564 je dobio vrlo visoke ocene nakon 7 dana skladištenja, pri čemu je procenat od maksimalnog kvaliteta bio u granicama od 80,92-91%. Jogurt sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v dobio je nešto niže ocene usled pojave izraženog kiselog ukusa sa procentom od maksimalnog kvaliteta koji se kretao u granicama od 82,42-87,57%. Tokom skladištenja, jogurt sa sprej sušenim probiotikom *Lb. plantarum* 299v je bio prihvatljivog senzornog kvaliteta sa procentima od maksimalnog kvaliteta 74,64-86,57%. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između kontrolnog jogurta bez probiotika i jogurta sa probioticima.
20. Senzornom ocenom sireva od ultrafiltriranog mleka sa probiotskim bakterijama utvrđeno je da su sve varijante veoma dobrog senzornog kvaliteta. Probiotske bakterije nisu uticale na konzistenciju sira, kao ni na boju i izgled. Sir od UF mleka sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 564 je najbolje ocenjen 14. dana, pri čemu se procenat od maksimalnog kvaliteta kretao u granicama od 92,3-99,30% tokom skladištenja. Sir sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 je imao vrlo slične ocene, s vrlo ujednačenim procentom od maksimalnog kvaliteta tokom 56 dana skladištenja (80,81-98,65%). Sir od UF mleka sa *Lb. plantarum* 299v je dobio veoma dobre ocene do 35. dana skladištenja, nakon čega je dobio nešto niže

ocene, usled izraženog kiselog i oporog ukusa, pri čemu je procenat od maksimalnog kvaliteta bio 80,81-96,9%. Kod sira sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v procenat od maksimalnog kvaliteta se kretao u granicama od 80,52-95,5% tokom 56 dana skladištenja. Takođe, nisu postojale značajne razlike u senzornom kvalitetu između kontrolnog sira od ultrafiltriranog mleka i sireva sa probiotskim bakterijama.

21. Prilikom ocenjivanja senzornog kvaliteta crne čokolade sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v utvrđeno je da su obe varijante crne čokolade imale veoma dobar senzorni kvalitet. Prah sprej sušenih probiotika nije doveo do teksturalnih promena crne čokolade, kao ni do promena boje i površinskih svojstava. Takođe, primena probiotskih bakterija nije dovela do pojave stranog ukusa i mirisa. Generalno se može ustanoviti da sprej sušene probiotske bakterije nisu ostvarile značajan uticaj na senzorni kvalitet crne čokolade. Isto tako, nisu postojale statistički značajne razlike u kvalitetu kontrolne crne čokolade i crne čokolade sa dodatkom probiotskih bakterija.
22. Generalno se može zaključiti da slobodne i sprej sušene ćelije potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 nisu dovele do značajnih senzornih promena jogurta i sira od UF mleka, kao ni sprej sušene probiotske ćelije na senzorni kvalitet crne čokolade. Pored toga, jogurt i sir od UF mleka sa slobodnim i sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v su posedovali izražen kiseli ukus, zbog čega su navedeni proizvodi ocenjeni nešto nižim ocenama. Međutim, na osnovu procenta od maksimalnog kvaliteta, navedeni proizvodi pripadaju kategoriji prihvatljivog senzornog kvaliteta. Crna čokolada sa sprej sušenim komercijalnim probiotikom *Lb. plantarum* 299v je ocenjena odličnim senzornim kvalitetom.
23. Mikrobiološkom analizom fecesa volontera koji su konzumirali proizvode prah, jogurt, sir od UF mleka i crnu čokoladu sa sprej sušenim probioticima *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v tokom 14 dana, utvrđeno je da nakon konzumacije proizvoda sa *Lb. plantarum* 564 dolazi do trenda smanjenja broja sulfitoredukujućih klostridija, enterobakterija i enterokoka (0,7-1,4 logaritamskih jedinica). Takođe, *Lb. plantarum* 299v u navedenim proizvodima dovodi do smanjenja broja enterobakterija u fecesu volontera (0,5-1

- logaritamska jedinica). Takođe, obe probiotske bakterije su dovele do trenda povećanja broja laktobacila u fecesu (0,5-1 logaritamska jedinica).
24. Prilikom poređenja efikasnosti probiotskih bakterija na smanjenje procentualnog udela sulfitoredujućih klostridija, enterokoka i enterobakterija, utvrđeno je da su obe probiotske bakterije, *Lb. plantarum* 564 i *Lb. plantarum* 299v, uticale na povećanje procentualnog udela laktobacila nakon konzumiranja proizvoda (1-5%), što je doprinelo smanjenju ili nepromenjenom udelu navedenih nepoželjnih mikroorganizama (1-4%). Najveće smanjenje nepoželjnih mikroorganizama je ostvareno kod sulfitoredujućih klostridija (3%), dok je najveće povećanje udela laktobacila ostvareno nakon konzumiranja crne čokolade sa *Lb. plantarum* 299v (5%).
 25. Ispitivanjem sposobnosti preživljavanja gastrointestinalnih uslova u *in vivo* studiji, izolacijom laktobacila iz fecesa volontera nakon 14 dana konzumiranja proizvoda sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564, ustanovljeno je da potencijalni probiotik *Lb. plantarum* 564 preživljava nepovoljne uslove gastrointestinalnog trakta. Prilikom ispitivanja prisustva *Lb. plantarum* 564 u fecesu 10 volontera, nakon konzumiranja praha navedeni potencijalni probiotik je izolovan iz fecesa 3 volontera, kao i iz fecesa 4 volontera koji su konzumirali jogurt sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 564, dok je nakon konzumiranja sira od UF mleka izolovan iz fecesa 4 volontera. Najbolju sposobnost preživljavanja gastrointestinalnih uslova *Lb. plantarum* 564 je pokazao nakon konzumiranja crne čokolade, koji je izolovan iz fecesa 7 volontera.
 26. Komercijalna probiotska bakterija *Lb. plantarum* 299v je kod volontera koji su konzumirali prah sprej sušene bakterije preživela kod 2 volontera, dok je kod volontera koji su konzumirali jogurt preživela kod četvoro. Nakon konzumiranja sira od UF mleka sa sprej sušenim *Lb. plantarum* 299v, navedeni probiotik je izolovan iz fecesa 8 volontera, dok je sprej sušeni *Lb. planatrum* 299v preživeo kod istog broja volontera i nakon konzumiranja crne čokolade.
 27. Na osnovu dobijenih rezultata, može se izvesti zaključak da crna čokolada predstavlja izuzetno dobar nosač probiotskih bakterija, kao i sir od UF mleka koji je pokazao veoma dobru ulogu nosača. Jogurt je pružio probiotskim bakterijama nešto slabiju zaštitu probiotskim bakterijama tokom prolaza kroz

gastrointestinalni trakt, s obzirom na to da su probiotske bakterije preživele kod manjeg broja volontera. Prah sprej sušenih bakterija, koji je predstavljao farmaceutski preparat, obezbedio je veoma slabu zaštitu probiotskim bakterijama tokom prolaza kroz gastrointestinalni trakt, s obzirom na to da su probiotske bakterije izolovane iz veoma malog broja fecesa volontera. Dobijeni rezultati ukazuju na značajno bolju ulogu prehrambenih proizvoda kao nosača probiotskih bakterija, u poređenju sa farmaceutskim preparatom.

LITERATURA

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E. (2005): Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5721-5732.
- Adams, M. R. (1999): Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68: 171–178.
- Adawi, D., Kasravi, F. B., Molin, G., Jeppsson, B. (1997): Effect of *Lactobacillus* supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model. *Hepatology*, 25: 642–647.
- Adhikari, K., Mustapha, A., Grun, I. U., Fernando, L. (2000): Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83: 1946–1951.
- Ahola, A. J., Knuutila-Yli, H., Suomalainen, T., Poussa, T., Ahlsrom, A., Meurman, J. H., Korpela, H. (2002): Short-term consumption of probiotic containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Archives of Oral Biology*, 47: 799-804.
- Ahrne, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A., Molin, G. (1998): The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 88-94.
- Ahrne, S., Lonnemark, E., Wold, A. E., Aberg, N., Hasselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I.-L., Molin, G., Adlerberth, I. (2005): Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes and Infections*, 7: 1256-1262.
- Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., Savani, L. (2002): Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured

ice cream produced with different sugar and fat concentration. *International Dairy Journal*, 12: 201-208.

Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., Corti, S. (2005): Effects of *Lactobacillus rhamnosus* CG addition in ice-cream. *International Journal of Dairy Technology*, 58: 200–206.

Allander, M., De Smet, I., Nollet, L., Verstraete, W., von Wright, A., Mattila-Sandholm, T. (1999): The effect of probiotic strain in the microbiota of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *International Journal of Food Microbiology*, 46: 71-79.

Allegeyer, L. C., Miller, M. J., Lee, S. Y. (2010): Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *Journal of Dairy Science*, 93: 4471-4479.

Alm, L., Ryd-Kjellen, E., Setterberg, G., Blomquist, L. (1993): Effect of new fermented milk product „CULTURA“ on constipation in geriatric patients. In *Proceedings of 1st Lactic Acid Bacteria Computer Conference*. Norwolk, England, pp. 305.

Alonso, V. R., Guarner, F. (2013): Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition*, 109: 21-26.

Ammor, M. S., Florez, A. B., Mayo, B. (2007): Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24: 559-570.

Anal, A. K., Singh H. (2007): Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 240–251.

Andersen, L. (1998): Pre- and probiotics-sausage science. *Functional Foods*, 26–29.

- Andrews, J. M. (2001): BSAC Standardized Disc Susceptibility Testing Method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 43-57.
- Asada, M., Hatano, Y., Kamaguchi, R., Sunohara, H. (2003): Capsules containing vital cells or tissues. WO03001927 A1, US2005283849 AA, US6982095 BB, & EP1407678 A4
- Aragon-Alegro, L. C., Aragon-Alegro, J. H., Cardarelli, H. R., Chiu, M. C., Saad, S. M. (2007): Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT*, 40: 669-675.
- Awaishah, S. S. (2012): Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. In: Rigobelo, E. (Ed.), *Probiotics*. InTech, Rijeka, pp.551-582.
- Axelsson, L. (2004): Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Third Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 1-66.
- Balmer, S. E., Hanvey, L. S., Wharton, B. A. (1994): Diet and fecal flora in the newborn: nucleotides. *Achieves of Disease in Childhood*, 70: 137-140.
- Ballongue, J. (2004): Bifidobacteria and Probiotic Action. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Third Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 67-124.
- Batista, A. L. D. Silva, R., Cappato, L. P., Almada, C. N., Garcia, R. K. A., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Arellano, D. B., Santana, A. S., Conte Junior, C. A., Freitas, M. Q. Cruz, A. G. (2015): Quality parameters of probiotic yogurt added of glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical-chemical and metabolic activity analyses. *Food Research International*, 77: 1-10.

- Basygit, G., Kuleasan, H., Karahan, A. G. (2006). Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice-cream with sucrose and aspartame. *Journal of Industrial Microbiology and Technology*, 33: 796–800.
- Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Quiberoni, A., Suarez, V. B., Zalazar, C. A. (2005). Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*, 38: 597-604.
- Bergamini, C. V., Hynes, E., Zalazar, C. A. (2006): Influence of probiotic bacteria in the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal*, 16: 856–866.
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., Servin, A. L. (1993): Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4121–4128.
- Blanchette, L., Roy, D. Belanger, G. Gauthier, S F. (1996): Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 79: 8-15.
- Bogovič Matijašić, B., Obermajer, T., Rogelj, I. (2010): Quantification of *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecium* and *Bifidobacterium infantis* in a probiotic OTC drug by real-time PCR. *Food Control*, 21: 419-425.
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., Cesàro, A. (2010): Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122: 416–423.

- Breeuwer P., Abee T. (2000): Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 193–200.
- Bude-Ugarte, M., Guglielmotti, D., Giraffa, G., Reinheimer, J. A., Hynes, E. (2006): Non-starter lactobacilli from Argentinean cheese. *Journal of Food Protection*, 69: 2983-2991.
- Buriti, F. C. A., Rocha, J. S., Assis, E. G., Saad, S. M. I. (2005): Probiotic potential of Minas fresh chesse prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *LWT-Food Science and Technology*, 38: 173-180.
- Callon, C., Millet, L., Montel, M. C. (2004): Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research*, 71: 231-244.
- Carić, M. (2010): Uticaj probiotika i prebiotika na funkcionalna svojstva crne i mliječne čokolade. PhD thesis. University of Zagreb, Croatia.
- Carvalho, A. S., Silvia, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2002): Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnological Letter*, 24: 1587–1591.
- Celik, M., Wendel, S. (2006): Spray drying and pharmaceuticals applications. In: Parikh D. P (Ed.), *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. Taylor and Francis, New York, pp. 129-155.
- Centeno, J. A., Cepeda, A., Rodriguez-Otero, J. L. (1995): Lactic Acid Bacteria Isolated form Aruza Cows' Milk Cheese. *International Dairy Journal*, 6: 65-78.

- Champagne, C. P., Gardner, N., Brochu, E., Beaulieu, Y. (1991): The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24: 118–128.
- Champagne, C. P., Green-Johnson, J., Raymond, Y., Barrete, J., Buckley, N. (2009): Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International*, 42: 612–621.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998a): Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 759-768.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. (1998b): Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection*, 61: 1636-1643.
- Chen, K. N., Chen, M. J., Liu, J. R., Lin, C. W., Chiu, H. Y. (2005): Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70: 260-266.
- Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C. Loubiere, P., Lindley, D. N. (1996): Physiology of piruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 253-267.
- Collins, J. K., Thornton, G., Sullivan, G. D. (1998): Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8: 487–490.
- Coman, M. M., Cecchini, C., Verdenelli, M. C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A. (2012): Functional foods as carriers for SYN BIO[®], a probiotic bacteria combination. *International Journal of Food Microbiology*, 157: 346-352.

- Comunian R., Daga E., Dupre I., Paba A., Devirgiliis C., Piccioni V., Perozzi, G., Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, A., De Lorentiis, A., Giraffa, G. (2010): Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 151–156.
- Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., de Pablo, J. J. (2000): Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41: 17-24.
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2004): Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 1024-1039.
- Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N., Gueguen, M. (1998): An ecology study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4729-4735.
- Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Matto, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P. (2001): Adhesion of *Bifidobacteria* to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3469-3475.
- Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Sousa, A. L. O. P., Faria, J. A. F., Saad, S. M. I. (2009a): Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 42: 1233-1239.
- Cruz, A. G., Buriti, F. C. A., de Souza, C. H. B., Faria, J. A. F., Saad, S. M. I. (2009b): Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 344-354.

- Cummings, J. H., Macfarlane, G.T. (2002): Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87: 145-151.
- Cunningham-Rundles, S., Ahrne, S., Bengmark, S. (2000): Probiotics and immune response. *American Journal of Gastroenterology*, 22-25.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P., Hill, C. (2012): Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strain employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 58-65.
- Danielsen, M. (2002): Characterization of the Tetracycline Resistance Plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 Reveal a Composite Structure. *Plasmid*, 48: 98-103.
- Danielsen, M., Wind, A. A. (2003): Susceptibility of *Lactobacillus* ssp. to Antimicrobial Agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82: 1-11.
- De Castro, G. A., Bredholt, H., Strom, A.R., Tunnacliffe, A. (2000): Anhydrobiotic engineering of gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4142–4144.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., Sikkema, J., (2010): Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20: 292–302.
- De Vuyst, L, Vancanneyt, M. (2007): Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 24: 120-127.
- Desmond, C., Ross, R. P., O’Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C. (2002): Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 1003-1011.

- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004): New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14: 273-285.
- Dicksved, J. (2008): Exploring the Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. PhD dissertation. Swedish University of Agricultural Science, Sweden.
- Dimitrijević-Branković, S. (1998): Selekcija i karakterizacija prirodnih izolata BMK iz sjeničkog sira. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Doleyres, Y., Fliss, I., Lacroix, C. (2004): Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 527-539.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010): Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 107: 11971-11975.
- Dozet, N., Maćej, O. (2006): Autohtoni beli sirevi u salamuri. Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu, Beograd.
- Duangjitcharoen, Y., Kantachote, D., Ongsakul, M., Poosaran, N., Chaiyasut, C. (2008): Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Plant Beverages. *Pakistan Journal of Biological Science*, 11: 652-655.
- Dušková, M., Karpíšková, R. (2013): Antimicrobial resistance of lactobacilli isolated from food. *Czech Journal of Food Science*, 31: 27-32.
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015): Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering reviews*, 7: 452-490.

- Ekinci, F. Y., Okur, O. D., Ertekin, B., Guzel-Seydim, Z. (2008): Effects of probiotic bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110: 216-224.
- Elmer, G. W., Surawicz, C. M., McFarland, L. V. (1996): Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *Journal of American Medicine Associations*, 275: 870–876.
- Espirito Santo, A. P., Cartolano, N. S., Silva, T. F., Soares, F. A. S. M., Gioielli, L. A., Perego, P., Converti, A., Oliviera, M. N. (2012): Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International Journal of Food Microbiology*, 154: 135-144.
- European Food Safety Authority (2012): Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10: 2740.
- Fak, F., Ahrne, S., Linderöth, A., Molin, G., Jeppsson, B., Westrom, B. (2008): Age-related Effects of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus plantarum* 299v on Gastrointestinal Function in Suckling Rats. *Digestive Diseases and Science*, 53: 664-671.
- Fernandez Gonzales, M. J., Garcia, P.G., Fernandez, A.G., Quintana, M. C. D. (1993): Microflora of the aerobic preservation of indirectly brined green olives from Hojiblanca cultivar. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 226-233.
- Finegold, S. M., Sutter, V. L. (1978): Fecal flora in different populations, with special reference to diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31: 116-122.
- Food and Agriculture Organization of the United Nation/World Health Organization (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, Cordoba, Argentina.

Fric, P. (2002): Probiotics in gastroenterology. *Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 40: 197–201.

Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animal. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

Gardiner, G. E., O’Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A. E., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K., Ross, R.P., Stanton, C. (2000): Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L.salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2605-2612.

Gardiner, G. E., Bouchier, P., O’Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P., Stanton, C. (2002): A Spray-Dried Culture for Probiotic Cheddar Cheese Manufacture. *International Dairy Journal*, 12: 749–756.

Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2003): In vitro conjugal transfer of tetracyclin resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiological Letters*, 225: 125-130.

Gibson, G., Roberfroid, M. B. (1995): Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 1401-1412.

Gilliland, S. E., Kim, H. S. (1984): Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *Journal of Dairy Science*, 67: 1–6.

Gilliland, S. E., Nelson, C. R., Maxwell, C. (1985): Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 377–381.

- Gmeiner, M., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Wouters, R., De Boever, P., Nollet, L., Verstarete, W. (2000): Influence of a synbiotic mixture consisting of a *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 219-223.
- Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranska, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Šušković, J., Raspor, P., Topisirović, L. (2013): Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheese from mountain regions of Serbia and lowland region of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*, 166: 294-300.
- Goossens, D., Jonkers, D., Russel, M., Thijs, A., van den Bogaard, A., Stobberingh, E. Stockbrugger, R. (2005): Survival of the probiotic, *L. plantarum* 299v and its effect in the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition. *Digestive and Liver Disease*, 37: 44-50.
- Gorkiewicz, G. (2009): Nosocomial and antibiotic/associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 37-41.
- Granatao, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A., Faria, J. A. F. (2010): Functional Foods and Nondairy Probiotic Food: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 292-302.
- Green, J. D. i Klaenhammer, T. R. (1994): Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4487-4494.
- Guarner, F. (2006): Enteric flora in health and disease. *Digestion*, 73: 5-12.

- Guarner, F., Schaafsma, G. J. (1998): Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 237-238.
- Halpern, G.M., Prindville, T., Blankenburg, M., Hsia, T., Gershwin, M.E. (1996): Treatment of irritable bowel syndrome with Lacteol Fort: a randomized, doubleblind, cross-over trial. *American Journal of Gastroenterology*, 91: 1579–1585.
- Hamann, W. T., Marth, E. H. (1983): Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. *Journal of Food Protection*, 47: 781-786.
- Hatakka, K., Ahola, A. J., Yli-Knuutila, H., Richardson, M., Poussa, T., Meurman, J. H., Korpela, R. (2007): Probiotic reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly-a randomized controlled trial. *Journal of Dental Research*, 86: 125-130.
- Hayashi, H., Takahashi, R., Nishi, T., Sakamoto, M., Benno, Y. (2005): Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 1093-1101.
- Hermanns, G., Funck, G.D., Schmidt, J. T., Pereira, J. Q., Brandelli, A., Richards, N. S. P. D. S. (2014): Evaluation of Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Artisan Cheese. *Journal of Food Safety*, 34: 380–387.
- Herreros, A. M., Fresn, M. J., Gonzales, J. M., Tornadijo, E. M. (2003): Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armanda cheese (a Spanish goat's milk cheese). *International Dairy Journal*, 13: 469-479.
- Herreros, M. A., Sandoval, H., Gonzales, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E. (2005): Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria

isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22: 455-459.

Hickson, M., D'Souza, A. L., Muthu, N., Rogers, T. R., Want, S., Rajkumar, C., Bulpitt, C. J. (2007): Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhea associated with antibiotics: randomized double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*, 335: 80-80.

Holzapel, W. H., Geisen, R., Schillinger, G. U. (1995): Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 343-362.

Holzapel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365-373.

Honda, H., Kataoka, F., Nagaoka, S., Kamai, Y., Kitazama, H., Itoh, H., Kimura, K., Taketomo, N., Yamazaki, Y., Tatemo, Y., Saito, T. (2007): β -Galaktosidase, phospho- β -galaktosidase and phospho- β -glukosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 461-466.

Hummel, A., Hertel, C., Holzapel W. H., Franz, C. M. A. P. (2007): Antibiotic Resistance of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 730-739.

Huys, G., D'Haene, K., Swings, J. (2002): Influence of the Culture Medium on Antibiotic Susceptibility Testing of Food-Associated Lactic Acid Bacteria with the Agar Overlay Disc Diffusion Method. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 402-406.

Ishibashi, N., Shimamura, S. (1993): *Bifidobacteria*: Research and development in Japan. *Food Technology*, 47: 129-134.

- ISO 8586-1 (1993): Sensory analysis: General guidance for the selection, training and monitoring of assessors- Part 1. Selected assessors.
- ISO 8586-2 (1994): Sensory analysis: General guidance for the selection, training and monitoring of assessors-Part 2. Expert.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., Axelsson, L. (2012): In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 216-222.
- Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., Jansson, J. K. (2007): Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *ISME Journal*, 1: 56-66.
- Jiang, T., Mustapham, A., Savaiano, D. A. (1996): Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science*, 79: 750–757.
- Johansson, M. L. (1995): Systematics and starter culture selection of *Lactobacillus* from human intestine and Nigerian ogi, with special reference to *Lactobacillus plantarum*. PhD dissertation, Department for Food Technology, University of Lund, Sweden.
- Johansson, M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., Bengmark, S. (1993): Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 15-20.
- Johansson, M. L., Nobaek, S., Berggen, A., Nyman, M., Bjorck, I., Ahrne, S., Jeppsson, B., Molin, G. (1998): Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-

hip drink with fermented oats. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 29-38.

Joković, N., Nikolić, M., Begović, N., Jovčić, B., Savić, D., Topisirović, L. (2008): A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 305-311.

Jolly, L., Stingele, F. (2000): Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 733-745.

Kaila, M., Isolauri, E., Soppi, E., Virtanen, E., Laine, S., Arvilommi, H. (1992): Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatric Research*, 32: 141– 144.

Kailasapathy, K. (2006): Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT*, 39: 1221-1227.

Kailasapathy, K. (2009): Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4: 1-19.

Kandler, O., Weiss, N. (1986): Regular, non-sporing Gram-positive rods. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1208-1234.

Karlsson, C., Ahrne, S., Molin, G., Berggren, A., Palmquist, I., Fredrikson, G. N., Jeppsson, B. (2010): Probiotic therapy to men with arteriosclerosis initiates increased bacterial diversity in colon: A randomized controlled trial. *Atherosclerosis*, 208: 229-233.

- Karlsson, C. (2011a): The Gut Bacterial Flora-Focus on Early Life and Philological Traits. PhD thesis. Lund University, Sweden.
- Karlsson C. L. J., Molin G., Cilio C. M., Ahrné S. (2011b): The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term – a pilot study. *Pediatric Research*, 70: 282-286.
- Kasimoglu A., Göncüoğlu M., Akgün S. (2004): Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14: 1067-1073.
- Kasravi, F. B., Adawi, D., Molin, G., Bengmark, S., Jeppsson, B. (1997): Effect of oral supplementation of lactobacilli on bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Journal of Hepatology*, 26: 417–24.
- Kastner, S., Parreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., Meile, L. (2006): Antibiotic Susceptibility Patterns and Resistance Genes of Starter Culture and Probiotic bacteria Used in Food. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 145-55.
- Katellaris, P. H., Salam, I., Farthing, M. J. (1995): *Lactobacilli* to prevent traveler's diarrhea? *The New England Journal of Medicine*, 333: 1360–1361.
- Kearney, N., Meng, X. C., Stanton, C., Kelly, J., Fitzgerald, G. F., Ross, P. (2009): Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *International Dairy Journal*, 19: 684–689.
- Khanafari, A., Porgham, S. H., Ebrahimi, M. T. (2012): Investigation of Probiotic Chocolate Effect on *Streptococcus mutans* Growth Inhibition. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5: 590-597.
- Kilara, A., Shahani, K. M. (1975): Lactase activity of cultured and acidified dairy products. *Journal of Dairy Science*, 59: 2031–2035.

- Kilic, G. B, Kuleaşan, H., Eralp, I., Karahan, A. G. (2009): Manufacture of Turkish Beyaz Cheese Added with Probiotic Strains. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 1003–1008.
- Klarin, B., Wult, M., Palmquist, I., Molin, G., Larsson, A., Jeppsson B. (2008): *Lactobacillus plantarum* 299v reduces colonisation of *Clostridium difficile* in critically ill patients treated with antibiotics. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 52: 1096- 1102.
- Klaver, F. A. M., Kingma, F., Weerkamp, A. H. (1993): Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 47: 151–164.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 103-125.
- Kneifel, W., Jaros, D., Erhard, F. (1993): Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 18: 179–189.
- Kolars, J. C., Levitt, M. D., Aouji, M., Savaiano, D. A. (1984): Yogurt - an autodigesting source of lactose. *The New England Journal of Medicine*, 310: 1–3.
- Kontula, P., Jskari, J., Nollet, L., De Smet, I., von Wright, A., Poutanen, K., Mattila-Sandholm, T. (1998): The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effect on the gastrointestinal microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 246-252.
- Korhonen, J. (2010): Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. PhD dissertation. University of Eastern Finland, Finland.

- Kramer, M., Obermajer, N., Bogovič Matijašić, B., Rogelj, I., Kmetec, V. (2009): Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 1137-1147.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003): Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13: 3-13.
- Kushi, L. H., Lenart, E. B., Willett, W. C. (1995): Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. *Plant foods and dairy products. American Journal of Clinical Nutrition*, 61: 1407-1415.
- Laličić-Petronijević J. (2012). *Senzorna, antioksidativna i reološka svojstva različitih vrsta čokolade sa probioticima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.*
- Laličić-Petronijević, J., Popov-Raljić, J., Obradović, D., Radulović, Z., Paunović, D., Petrušić, M., Pezo, L. (2015): Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolate during storage for 180 days. *Journal of Functional Food*, 15: 541-550.
- Lavermicocca, P., F. Valerio, S. L. Lonigro, M. De Angelis, L. Morelli, M. L., Callegari, C. G., Rizzello, Visconti, A. (2005): Study of adhesion and survival of lactobacilli and bifidobacteria on table olives with the aim of formulating a new probiotic food. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4233-4240.
- Lee, J. L., Levin, R. E. (2006): Use of ethidium bromide mono-azide for quantification of viable and dead mixed bacterial flora from fish fillets by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 456-462.

- Lee, Y. K., Salminen, S. (1995): The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 241–245.
- Ley, R. E., Peterson, D.A., Gordon, J. I. (2006a): Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124: 837-848.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., Gordon, J. I. (2006b): Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444: 1022-1023.
- Lippi, G., Franchini, M., Montagnana, M., Favaloro, E. J., Guidi, G. C., Targher, G. (2009): Dark chocolate: consumption for pleasure or therapy? *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 28: 482-488.
- Lofmark, S., Jernberg, C., Jansson, J. K., Edlund, C. (2006): Clindamycin induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 1160-1167.
- Lonnermark, E., Friman, V., Lappas, G., Sandberg, T., Berggren, A., Ingegerd A. (2010): Intake of *Lactobacillus planatum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 44: 106-112.
- Lopez, M., Li, N., Kataria, J., Russell, M., Neu, J. (2008): Live and ultraviolet-inactivated *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease flagelin-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, 138: 2264-2268.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. (2001): Yogurt as Probiotic Carrier Food. *International Dairy Journal*, 11: 1–17.
- Luckow, T., Delahunty, C. (2004): Which juice is healthier? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference*, 15: 751–759.

- Luckow, T., Sheehan, V., Fitzgerald, G., Delahunty, C. (2006): Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite*, 47: 315–23.
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2005): Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, 15: 921-927.
- Maillard, M., Landyut, A. (2008): Chocolate: an ideal carrier for probiotics. *Teknosienze*, 19: 13-15.
- Malmo, C., La Stora, A., Mauriello, G. (2013): Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Cells Coated in Alginate Beds with Chitosan by Spray Drying to Use as a Probiotic Cell in Chocolate Soufflé. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 795-805.
- Mandal, S., Puniya, A. K., Singh, K. (2006): Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16: 1190–1195.
- Mandal, S., Hati, S., Puniya, A. K., Singh, R., Singh, K. (2013): Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *Journal of Food Processing and Preservation*, 5: 1031-1037.
- Manojlović, V., Nedović, V., Kailasapathy, K., Zuidam, N. (2010): Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. In: Zuidam, N. J., Nedović, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer Science+Business Media, London, pp. 269-302.

- Mao, Y., Nobaek, S., Kasravi, B., Adawi, D., Stenram, U., Molin, G., Jeppsson, B. (1996a): The effect of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology*, 111: 334–44.
- Mao, Y., Yu, J., Ljung, A., Molin, G., Jeppsson, B. (1996b): Intestinal immune response to oral administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC, *Lactobacillus plantarum* DSM 9843, pectin and oatbase on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Microbial Ecology of Health and Disease*, 1996: 261–270.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, Z., Christos, M., Kalantzopoulos, G. Pot, B., Tsakalidou, E. (2006): Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- Marshall, V. M., Rawson, H. L. (1999): Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 137-143.
- Marshall, R. T., Goff, H. D., Hartel, R. W. (2003): *Ice cream*. Springer-New York.
- Marteau, P., Pochart, P., Bouhnik, Y., Rambaud, J. C. (1993): Fate and effects of some transiting micro-organisms in the human gastrointestinal tract. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 74: 1–21.
- Marteau, P., Gerhardt, M. F., Myara, A., Bouvier, E., Trivin, F., Rambaud, J. C. (1995): Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in the human small intestine. *Microbial Ecology of Health and Disease*, 8: 151–157.
- Martin, R., Heilig, G. H., Zoetendal, E. G., Smidt, H., Rodriguez, J. M. (2007): Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2638-44.

- Martinović, A., Radulović, Z., Wind, A., Janzen, T., Obradović, D. (2005): Isolation and characterization of bacterial flora from farmhouse fermented milk products of Serbia and Montenegro. *Acta Veterinaria*, 55: 307-318.
- Masco, L., Vanhoutte, T., Temmerman, R., Swings, J., Huys, G. (2007): Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 351–357.
- Mauriello, G., Aponte, M., Andolfi, R., Moschetti, G., Villani, F. (1999): Spray-drying of bacteriocins-producing LAB. *Journal of Food Protection*, 62: 773-777.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, F. M. (2008): Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from massai traditional fermented milk products in Kenya. *Current Microbiology*, 56: 315-321.
- Mattila-Sandholm, T., Mättö, J., Saarela, M. (1999): Lactic acid bacteria with health claims—interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9: 25–35.
- Matto, J., Alakomi, H. L., Vaari, A., Virkajarvi, I., Saarela, M. (2006): Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, 16: 1029–1037.
- Matto, J., van Hoek, A. H. A. M., Domig, K. J., Saarela, M., Florez, A. B., Brockmann, E., Amtmann, E., Mayo, B., Aarts, H. J. M., Danielsen, M. (2007): Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium* spp. to selected antibiotics as determined by the Etest method. *International Dairy Journal*, 17: 1123-1131.

- McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Lucey, J. A., Jordan, K. N., Cogan, T. M. (1993): Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 3: 613–634.
- Medeiros, A. C. L., Thomazini, M., Urbano, A., Correia, R. T. P., Favaro-Trindade, C. S. (2014): Structural characterization and cell viability of a spray dried probiotic yoghurt produced with goats' milk and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BI-07). *International Dairy Journal*, 39: 71-77.
- Medici, M., Vinderola, C. G., Perdigon, G. (2004): Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal*, 14: 611-618.
- Milesi, M. M., Vinderola, G., Sabbag, N., Meinardi, C. A., Hynes, E. (2009): Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. *Food Research International*, 42: 1186-1196.
- Miočinović, J., Puđa, P., Radulović, Z., Pavlović, V., Miloradović, Z., Radovanović, M., Paunović, D. (2011): Development of low fat UF cheese technology. *Mljekarstvo*, 61: 33-44.
- Miocinovic, J., Radulovic, Z., Miloradovic, Z., Trpkovic, G., Pesic Mikulec, D., Pavlovic, V., Pudja, P. (2012): Influence of autochthonous lactic acid bacteria on the proteolysis, microstructure and sensory properties of low fat UF cheeses during ripening. *Mljekarstvo*, 62: 126–135.
- Mirković, N., Radulović, Z., Bogovič-Matijašić, B., Petrušić, M., Petrović, T., Đorđević, V., Nedović, V. (2012): Quantification of viable spray-dried *Lactobacillus plantarum* TA and 7A after two years of storage by using Real time PCR. In Proceedings of 6th Central European Congress on Food. Novi Sad, Serbia, pp. 1082-1087.

- Mirković, N., Petrušić, M., Lazarević, I., Paunović, D., Dimitrijevic-Branković, S., Rakin, M., Radulović, Z. (2014): Influence of freeze-drying on viability and biochemical properties of autochthonous lactic acid bacteria. In Proceedings of II International Congress Food technology, Quality and Safety. Novi Sad, Serbia, pp. 505-509.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A. M., Khosrokhavar, R., Da Cruz, A. G. (2011): Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology*, 61: 411–424.
- Mojgani, N., Hussani, F., Vaseji, N. (2015): Characterization of Indigenous *Lactobacillus* Strains for Probiotic Properties. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8: 17520-17523.
- Molin, G. (2001): Probiotics in food not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 380-385.
- Molin, G. (2012): *Lactobacillus plantarum* 299v, University of Lund, Sweden.
- Molin, G. (2013): Lectures in probiotics, physiologic & psychopathologic effect on the human microbiota. University of Lund, Sweden.
- Molin, G., Jeppsson, B., Ahrne, S., Johansson, M. L., Nobaek, S., Stahl, M., Bengmark, S. (1993): Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestine. *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 314-323.
- Molly, K., Vande Woestyne, M., De Smet, I., Verstraete, W. (1994): Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactors Using Microorganism-associated Activities. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 7: 191-200.

- Monteagudo-Mera, A., Rodriguez-Aparicio, L., Rua, J., Martinez-Blanco, H., Navasa, N., Garcia-Arместo, M. R., Ferrero, M. A. (2012): In vitro evaluation of psychological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Food*, 4: 531-541.
- Moore, W. E. C., Holdeman, L. V. (1974): Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, 27: 961-979.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens, R. A. (1999): Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39: 13-126.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2002): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twelfth informational supplement, M100-S12
- Nebesny, E., Zyzelewicz, D., Motyl, I. (2007): Dark chocolate supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food and Research Technology*, 225: 33-42.
- Nedović, V., Bugarski, B., Mantzouridou, F., Paraskevopoulou, A., Naziri, E., Koupantsis, T., Trifković, K., Drvenica, I., Balanč, B., Đorđević, V. (2016): Recent advances and applications of encapsulated microbial and non-microbial active agents in the manufacture of food and beverages, In: V. Ravishankar Rai (Ed.), *Advances in Food Biotechnology*. WILEY Blackwell, New Jersey, pp. 635-680.
- Nguyen, T. D. T., Khanh, J. H., Lee, M. S. (2007): Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effect. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 358-361.
- Nigatu, A. (1998): Systematics of *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolated from fermented tef (*Eragrostis tef*) and kocho (*Ensete ventricosum*) and microbiological status of baked products. PhD thesis. Addis Ababa University, Ethiopia.

- Nikolić, M., Terzić-Vidojević, A., Jovčić, B., Gegović, J., Golić, N., Topisirović, L. (2008): Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 162-170.
- Nocker, A., Cheung, C. Y., Camper, A. K. (2006): Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 310–320.
- Nocker, A., Sossa, K. E., Camper, A.K. (2007a): Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 252–260.
- Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M. D., Camper, A. K. (2007b): Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5111–5117.
- Nocker, A., Mazza, A., Masson, L., Camper, A. K., Brousseau, R. (2009): Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *Journal of Microbiological Methods*, 76: 253–261.
- O’Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., Conway, P. (2001): Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 1059-1066.
- O'Hara, A. M., Shanahan, F. (2006): The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7: 688-693.
- Oketič, K., Bogovič Matijašić, B., Obermajer, T., Radulović, Z., Lević, S., Mirković, N., Nedović, V. (2015): Evaluation of PMA real-time PCR for enumeration of

probiotic lactobacilli microencapsulated in calcium alginate beads. *Beneficial Microbes*, 573-581.

Ong, L., Henriksson, A., Shah, N. P. (2007): Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*, 17: 67–78.

Ouwehand, A. C., Tölkö, S., Kulmala, J., Salminen, E. (2000): Adhesion of inactivated probiotic strain to intestinal mucus. *Letters of Applied Microbiology*, 31: 82–86.

Ozer, B., Kirmaci, H. A., Senel, E., Atamer, M., Hayalogly, A. (2009): Improving the Viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in White-Brined Cheese by Microencapsulation. *International Dairy Journal*, 19: 22–29.

Paez, R., Lavari, L., Vinderola, G., Audero, G., Cuatrin, A., Zaritzky, N., Reinheimer, J. (2012): Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 48: 748–754.

Palmer, C., Bik, E. M., Di Giulio, D. B., Relman, D. A., Brown, P. O. (2007): Development of the human infant intestinal microbiota. *PLOS Biology*, 5: 1556-1573.

Pappas, G. (2011): An animal farm called extended-spectrum beta-lactamase: antimicrobial resistance as a zoonosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 797-798.

Patel, U., Dasgupta, P., Amoroso, P., Challacombe, B., Pilcher, J., Kirby, R. (2012): Infections after transrectal ultrasonography-guided prostate biopsy: increased

- relative risks after recent international travel or antibiotic use. *BJUI International*, 109: 1781-1785.
- Pei, Z., Bini, E. J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F, Blaser, M. J. (2004): Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101: 4250-4255.
- Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014): Novel bacteriocins from Lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. In: Villaverde, A. (Ed.) *Proceedings of the 11th International Symposium on Lactic Acid Bacteria*. Egmond aan Zee, Netherlands, pp. S3 1-13.
- Petrović, T. (2011): Mikroinkapsulacija potencijalnih probiotika sprej sušenjem i njihovo čuvanje u različitoj ambalaži. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Petrušić M., Mirković, N., Paunović, D., Obradović, D., Radulović, Z. (2010): Quality of yogurt with probiotic bacteria in the Serbian market. In: Volarić, V. (Ed.) *Abstract book of the 39th Croatiaan Dairy Experts Symposium*, Opatija, Croatia, pp. 71-72.
- Picot, A., Lacroix, C. (2003): Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. *International Dairy Journal*, 13: 455-462.
- Pimentel-Filho, N., Mantovani, H. C., Carvalho, A. F., Dias, R. S., Vanetti, M. C. D. (2014): Efficiency of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 416-422.
- Phillips, M., Kailasapathy, K., Tran, L. (2006): Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 276-280.

- Popov-Raljić, J. V., Laličić-Petronijević, J. G. (2009): Sensory Properties and Color Measurements of Dietary Chocolates with Different Compositions During Storage for Up to 360 Days. *Sensors*, 9: 1996-2016.
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., Van de Wiele, T. (2010): Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 97-103.
- Poveda, J. M., Sousa, M. J., Cabezas, L., McSweeney, P. L. H. (2003): Preliminary observations on proteolysis in Manchego cheese made with a defined-strain starter culture and adjunct starter (*Lactobacillus plantarum*) or a commercial starter. *International Dairy Journal*, 13: 169–178.
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., Soccolm, C. R. (2008): Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41: 111–123.
- Prajapati, J. B., Shah, R. K., Dave, J. M. (1987): Survival of *Lactobacillus acidophilus* in blended spray-dried acidophilus preparations. *Australian Journal of Dairy Technology*, 42: 17-21.
- Pravilnik o kvalitetu mleka i starter kultura (2014), Službeni glasnik Republike Srbije, br. 33/2010, 69/2010, 43/2013-dr. pravilnik i 34/2014
- Puda, P. (2009): Tehnologija mleka 1. Sirarstvo, opšti deo. Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu, Beograd.
- Pulido, R. P., Omar, N. B., Abriouel, H., Lopez, R. L., Canamero, M. M., Galvez (2005): Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture dependant methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7872-7879.

- Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2001): Senzorna analiza prehrambenih proizvoda. Poljoprivredni Fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Radulović, Z. (2007): Izolacija i selekcija autohtonih bakterija mlečne kiseline i njihova primena u standardizaciji sireva tipa sjeničkog. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Radulović, Z., Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević, S., Mirković, N., Petrušić, M., Paunović, D. (2010): Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains on potential probiotic ability. *Mljekarstvo*, 60: 86–93.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Petrušić, M., Mirković, N., Paunović, D., Petrović, T. (2011a): Application of autochthonous potential probiotic in the soft goat cheese production. In Proceedings of 22nd International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry. Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, pp. 345-348.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Mirković, N., Petrušić, M., Petrović, T., Bogović Matijašić, B., Nedović, V. (2011b): Effect of encapsulated potential and commercial probiotic bacteria on the soft goat cheese. In Proceedings of 22nd International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry. Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, pp. 349-353.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Puđa, P., Barać, M., Miloradović, Z., Paunović, D., Obradović, D. (2011c): The application of autochthonous lactic acid bacteria in white brined cheese production. *Mljekarstvo*, 61: 15-25.
- Radulović, Z., Petrović, T., Bulajić, S. (2012a): Antibiotic Susceptibility of Probiotic Bacteria. In: Pana, M. (Ed.), *Antibiotic Resistant Bacteria-A Continuous Challenge in the New Millennium*. InTech, Rijeka, pp. 549-576.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Petrušić, M., Mirković, N., Paunović, D., Petrović, T. (2012b): Effect of Commercial and Potential Probiotics on The Characteristics of

- Soft Goat Cheese. In Proceedings Special Issue od IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk. Athens, Greece, pp.108-111.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Mirković, N., Petrušić, M., Petrović, T., Bogovič-Matijašić, B., Nedović, V. (2012c): Effect of encapsulated autochthonous potential probiotic bacteria *Lactobacillus paracasei* 08 on the characteristic of the soft goat cheese. In Proceedings of 6th Central European Congress on Food. Novi Sad, Serbia, pp. 1029-1035.
- Radulović, Z., Mirković, N., Petrušić, M., Barać, M., Paunović, D., Obradović, D. (2012d): Lactic Acid Bacteria Isolated from Artisanal Sheep Kashkaval Cheese. In Proceedings Special Issue od IDF Interantional Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk. Athens, Greece, pp. 112-115.
- Radulović, Z., Mirković, N., Bogovič-Matijašić, B., Petrušić, M., Petrović, T., Nedović, V. (2012e): Quantification of viable spray-dried potential probiotic lactobacilli using real-time PCR. *Archive of Biological Science*, 64: 1465-1472.
- Radulović, Z., Paunović, D., Petrušić, M., Mirković, N., Miočinović, J., Kekuš, D, Obradović, D. (2014): The application of autochthonous potential of probiotic *Lactobacillus plantarum* 564 in fish oil fortified yoghurt production. *Archives of Biological Sciences*, 66: 15–22.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., Baines, S. K. (2012): Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. *Food Chemistry*, 135: 1411-1418.
- Rath, H. C. (2003): The role of endogenous bacterial flora: bystander or the necessary prerequisite? *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15: 615–620.

- Reid, G., Tieszer, C., Lam, D. (1995): Influence of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. *Journal Industrial Microbiology*, 15: 248–253.
- Reynolds, P. E. (1989): Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbial Infections and Disease*, 8: 943–950.
- Ricci, G., Borgo, F., Ferrario, C., Fortina, M. G. (2011): Cocoa Powder as Delivery Medium for Probiotic *Lactobacillus* strains. *Advances in Microbiology*, 1: 1-6.
- Ross, R. P., Fitzgerald, G., Collins, K., Stanton, C. (2002): Cheese delivering biocultures: probiotic cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57: 71-78.
- Saarela, M., Lahteenmakim L., Crittenden, R., Salminen S., Mattila-Sandholm, T. (2002): Gut bacteria and health foods—the European perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 78: 99–117.
- Saarela, M., Mongensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 3: 198-215.
- Saarela, M., Virkajarvi, I., Alakomi, H. L., Sigvart-Mattila, P., Matto, J. (2006): Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, 16: 1477–1482.
- Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A., Yolken, R. H. (1994): Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet*, 344: 1046–1049.
- Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., Gil, A. (2015): The Role of probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment

of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *BioMed Research International*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/505878>

Salminen, S., Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos W. M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., Mattila-Sandholm T. (1998): Demonstration of safety of probiotics, a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 93-106.

Sartor, R.B. (1995): Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 24: 475–507.

Savage, D. C. (1977): Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 31: 107-133.

Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., Jarvenpaa, S., Korpela, R., Mutanen, M., Hatakka, K. (2010): Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 144: 293-300.

Seki, M., Igarashi T., Fukuda, Y., Simamura, S., Kaswashima, T., Ogasa, K. (1978): The effect of *Bifidobacterium* cultured milk on the 'regularity' among, an aged group. *Nutrition Foodstuff*, 31: 379–387.

Selmer-Olsen, E., Sorhaug, T., Birkeland, S. E., Pehrson, R. (1999): Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 23: 79-85.

- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N. Shimoni, E. (2010): Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. Food Research International, 43: 193-202.
- Sen, S., Mullan, M. M., Parker, T. J., Woolner, J. T., Tarry, S. A., Hunter, J. O. (2002): Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. Digestive Diseases and Science, 47: 2615–2620.
- Seratlić, S. (2014): Uticaj pulsirajućih električnih polja na rast i aktivnost autohtonog soja *Lactobacillus plantarum* 564. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Settanni, L., Moschetti, G. (2010): Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. Food Microbiology, 27: 691-697.
- Shah, N.P. (2000): Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Journal of Dairy Science, 83: 894-907.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Sangwan, V., Goswami, P., Singh, R. (2015): Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* sp. Isolated from Commercial Probiotic Preparations. Journal of Food Safety, doi: 10.1111/jfs.12211
- Sharp, M. D., McMahon, D. J., Broadbent, J. R. (2008): Comparative evaluation of yogurt and low-fat Cheddar cheese as delivery media for probiotic *Lactobacillus casei*. Journal of Food Science, 73: 375-377.
- Shimura, S., Saeki, Y., Ito, Y., Suzuki, K., Shiro, G. (1991): Effects of galactooligosaccharides and fructooligosaccharides on mineral utilization in rats. Journal of Nutrition and Food Science, 44: 287-291.
- Shoji, A. S., Oliviera, J. C. C., Freitas, O., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., Okuro, P. K., Favaro-Trinidad, C. S. (2013): Viability of *L. acidophilus*

microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and Bioproducts Processing*, 91: 83-88.

Songjinda, P., Nakayama, J., Tateyama, A., Tanaka, S., Tsubouchi, M., Kiyohara, C., Shirakawa, T., Sonomoto, K. (2007): Differences in developing intestinal microbiota between allergic and nonallergic infants: a pilot study in Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 2338–2342.

Strahinic, I., Bursarcevic, M., Pavlica, D., Milasin, J., Golic, N., Topisirovic, L. (2007): Molecular and biochemical characterization of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiology Immunology*, 22: 111-117.

Stumbo, C. R. (1965): Death of bacteria subjected to moist heat. In: Anson, M. L., Chichester, C. O., Mraz, E. M., Stewart, G. F (Eds), *Thermobacteriology in food processing*. Academic Press Inc., New York, pp. 55–78.

Suarez-Solis, V., Cardoso, F., Nunez de Villavicencio, M., Fernandez, M, Fragoso, L. (2002): Probiotic fresh chesse. *Alimentaria*, 39: 83-86.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Aramugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K. (2000): Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 47-55.

Sun-Waterhouse, D., Zhou, J., Wadhwa, S. S. (2013): Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control*, 32: 450-460.

Sveje, M. (2007): Probiotic and prebiotics-improving consumer health through food consumption. *Nutracos*, 28-31.

Taboada, N., Van Nieuwenhove, C., Alzogaray, S. L., Medina, R. (2015): Influence of Autochthonous Cultures on Fatty Acid Composition, Esterase Activity and

- Sensory Profile of Argentinean Goat Cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40: 86–94.
- Tallon, R., Arias, S., Brelollier, P., Urdaci, M. C. (2007): Strain and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 442-451.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K. (2004): The Role of Oxygen in the Viability of Probiotic Bacteria with Reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5: 1-8.
- Tamime, A. Y., Božanić, R., Rogelj, I. (2003): Probiotički fermentirani mliječni proizvodi. *Mljekarstvo*, 53: 111-134.
- Teixiera, P., Castro, H., Kirby, R. (1994): Inducible termotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. *Letters of Applied Microbiology*, 18: 218-221.
- Teixeira, P., Castro H., Mohacsi-Farkas C., Kirby, R. (1997): Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology* 83: 219-226.
- Terzić-Vidojević, A., Vukašinović, M., Veljović, K., Ostojić, M., Topisirović, L. (2007): Characterization of microflora of homemade semi-hard Zlatar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 36-42.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F (1999): Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 115-137.
- Thage, B. V., Broe, M. L., Petersen, M. H., Petersen, M. A., Bennedsen, M., Ardö, Y. (2005): Aroma development in semi-hard reduced-fat cheese inoculated with *Lactobacillus paracasei* with different aminotransferase profiles. *International Dairy Journal*, 15: 795–805.

- Thies, F. L., König, W., König, B. (2007): Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *Journal of Medicine Microbiology*, 56: 755-761.
- Timmerman, H. M., Koning, C. J., M., Mulder, L., Rombouts, F. M., Beynen, A. C. (2004): Monostrain, multistrain and multispecies probiotics-A comparison of functional and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 3: 219-233.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 230-235.
- Truelstrup Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L., Paulson, A. T. (2002): Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal condition. *Food Microbiology*, 19: 35-45.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Salminen, S. (2001): Quality assurance criteria for probiotic bacteria 1-4. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 393-398.
- Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J. (1999): The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26: 137-142.
- Urbach, G. (1995): Contribution of Lactic Acid Bacteria to Flavour Compound Formation in Dairy Products. *International Dairy Journal*, 5: 877-903.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S. L., Morelli, L., Visconti, A., Lavermicocca, P. (2006): In Vitro and In Vivo and Transit Tolerance of Potentially Probiotic Strains Carried by Artichokes in the Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3042-3045.

- Vaquero, I., Marcobal, A., Munoz R. (2004): Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 199-204.
- Vasquez, A., Jakobsson, T., Ahrné, S., Forsum, U., Molin, G. (2002): Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2746-9.
- Veljović, K., Terzić-Vidojević, A., Vukašinović, M., Strahinić, I., Begović, J., Lozo, J., Ostojić, M., Topisirović, L. (2007): Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 2142-2152.
- Vinderola, G., Céspedes, M., Mateolli, D., Cárdenas, P., Lescano, M., Aimaretti, N., Reinheimer, J., (2011): Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during cold storage. *International Journal of Dairy Technology*, 64: 269–275.
- Walter, J., Tannock, G. W., Tilsala-Timisjavari, A., Rodtong, S., Loach, D. M., Mundro, K., Alatossava, T. (2000): Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* species by Using Denaturing Gradient gel Electrophoresis and Species-Specific Primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 297-303.
- Wang, M., Ahrne, S., Jeppsson, B., Molin, G. (2005): Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 54: 219-231.
- Wang, S., Levin, R.E. (2006): Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. *Journal of Microbiology Methods*, 64: 1–8.

- Wang, W., Chen, L., Zhou, R., Wang, X., Song, L., Huang, S., Wang, G., Xia, B. (2014): Increased Proportion of Bifidobacterium and Lactobacillus Group and Loss of Butyrate-Producing Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 52: 398-406.
- Ward, L. J. H., Timmins, M. J. (1999): Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain activity. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 90-92.
- Williams, A. G., Noble, J., Banks, J. M. (2001): Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 11: 203-215.
- World Gastroenterology Organisation (2015): WGO Global Guidelines Inflammatory Bowel Disease (IBD)
- World Health Organization (WHO) (2011): Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe, WHO Regional Office for Europe
- Yamamoto, T., Zhou, X., Williams, C. J., Hochwalt, A., Forney, L. J. (2009): Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 22: 11-18.
- Young, J. (1998): European market developments in prebiotic and probiotic containing foodstuffs. *British Journal of Nutrition*, 80: 231–233.
- Yu, J., Wang, W. H., Menghe, B. L. G., Jiri, W. J., Wang, H. M., Liu, W. J., Bao, Q. H., Lu, Q., Zhang, J. C., Wang, F., Xu, H. Y., Zhang, H. P. (2011): Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *Journal of Dairy Science*, 94: 3229-3241.

Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suarez, V., Vinderola G., Reinheimer, J., Giraffa, G. (2011): Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28: 1033–1040.

Zhang, L., Li, N., Caicedo, R., Neu, J. (2005): Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Tumor Necrosis Factor- α -Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells. *Nutritional Immunology*, 135: 1752-1756.

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., Akkermans-van Vliet, W. M., de Visser, J. A. G. M., De Vos, W. M. (2001): The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13: 129-134.

<http://www.jintanworld.com>

<http://www.euro.who.int/pubreques>

<http://www.nutraingredients.com/Markets-and-Trends/Global-probiotics-market-to-grow-6.8-annually-until-2018>

SPISAK SKRAĆENICA

BMK- Bakterije mlečne kiseline

DNK-dezoksiribonukleinska kiselina

GI-gastrointestinalni trakt

FAO/WHO- Food and Agriculture Organization of the United Nation/World Health Organization

GRAS- Generally Regarded as Safe

EPS- egzopolisaharidi

IBS-irritable bowel syndrome

IBD-inflammatory bowel disease

PCR-polymerase chain reaction

PMA-propidijum monoazid

UF-ultrafiltrirano

SHIME- Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem

KOH-kalijum hidroksid

KJ-kontrolni jogurt bez probiotskih bakterija

J564-jogurt sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 564

JSS 564- jogurt sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 564

J 299v- jogurt sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 299v

JSS 299v- jogurt sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v

KS- kontrolni sir od ultrafiltriranog mleka bez probiotskih bakterija

S 564- sir od ultrafiltriranog mleka sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 564

SSS 564- sir od ultrafiltriranog mleka sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 564

S 299v- sir od ultrafiltriranog mleka sa slobodnim ćelijama *Lb. plantarum* 299v

SSS 299v- sir od ultrafiltriranog mleka sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v

SS- sprej sušeni

SS 564-crna čokolada sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 564

SS 299v- crna čokolada sa sprej sušenim ćelijama *Lb. plantarum* 299v

RAPD- Randomly Amplified Polymorphic DNA

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana Milica Mirković

Broj indeksa ili prijava doktorske disertacije 16/09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Primena i vijabilnost autohtonih sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija mlečne kiseline u hrani i gastrointestinalnim uslovima

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske
disertacije**

Ime i prezime autora Milica Mirković

Broj indeksa ili prijava doktorske disertacije 16/09

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov doktorske disertacije Primena i vijabilnost autohtonih sprej sušenih
potencijalnih probiotskih bakterija mlečne kiseline u hrani i gastrointestinalnim
uslovima

Mentor Prof. dr Zorica Radulović

Potpisani/a Milica Mirković

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Primena i vijabilnost autohtonih sprej sušenih potencijalnih probiotskih bakterija mlečne kiseline u hrani i gastrointestinalnim uslovima

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo -nekomercijalno
3. Autorstvo –nekomercijalno-bez prerade
4. Autorstvo –nekomercijalno-deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo –bez prerade
6. Autorstvo –deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

BIOGRAFIJA AUTORA

Kandidat Milica M. Mirković rođena je 21.07.1985. godine u Beogradu, Republika Srbija. Poljoprivredni fakultet, Odsek za prehrambenu tehnologiju i biohemiju-grupa za tehnologiju animalnih proizvoda upisala je školske 2004/2005. godine, a diplomirala 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,26 i ocenom 10 (deset) na diplomskom radu.

Doktorske akademske studije na Odseku za prehrambenu tehnologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2009/2010. godine. Za saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Tehnološka mikrobiologija (Katedra za tehnološku mikrobiologiju) izabrana je 01.02.2010. godine. Ugovor o radu je produžen 01.02.2011. godine, a u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Tehnološka mikrobiologija izabrana je 29.12.2011. godine.

Kandidat Milica M. Mirković na Katedri za tehnološku mikrobiologiju izvodi laboratorijske vežbe na predmetima: Mikrobiologija za studente Zootehnike, Mikrobiologija animalnih proizvoda za studente Tehnologije animalnih proizvoda, Sanitacija pogona za studente svih modula Odseka za prehrambenu tehnologiju i biohemiju i Mikrobiološke metode analize hrane za studente Tehnologije animalnih proizvoda i Tehnologije konzervisanja i vrenja.

U okviru naučne delatnosti, kandidat je učesnik dva nacionalna projekta: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane, u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ Integralna i interdisciplinarna istraživanja 046010 (2011-2016) i „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“ Integralna i interdisciplinarna istraživanja 046009 (2011-2016). Takođe, učesnik je evropskog FP7 projekta AREA Advancing Research in Agricultural and Food Sciences at Faculty of Agriculture, FP7-REGPOT-0212-2013-I, 316004 (2013-2016), kao i Tempus projekta Building Capacity of Serbian Agricultural Education to link with Society-CaSa TEMPUS (2014-2016). Kandidat se stručno usavršavao na Biotehničkom fakultetu, Univerziteta u Ljubljani, Odsek za zootehniku, Institut za mlekarstvo i probiotike, u periodu od 07.-16.11.2010. i 27.11.-23.12.2011.

kao učesnik bilateralnog projekta između Srbije i Slovenije pod nazivom „Efficacy of encapsulation of lactic acid bacteria on their survival and performance in food and gastrointestinal conditions“ BI-SL/10-11-035 (2010-2011). Kao stipendista FEMS Research Fellowship, kandidat se stručno usavršavao na Univerzitetu u Lundu, Fakultet inženjerstva LTH, Odsek za tehnologiju hrane, inženjerstvo i ishranu u periodu od 18.08.-13.11.2013, gde je ujedino uradio deo eksperimenata doktorske disertacije.