

# Brojnost probiotskih bakterija u domaćim fermentiranim namirnicama

---

Grizelj, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:347231>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ana Grizelj

**Brojnost probiotskih bakterija u domaćim  
fermentiranim namirnicama**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Ana Grizelj

**Quantity of probiotic bacteria in  
home-made fermented food**

Master thesis

Zagreb, 2022

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za mikrobiologiju na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tomislava Ivankovića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se svom mentoru izv. prof. dr. sc. Tomislavu Ivankoviću na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovoga diplomskog rada.*

*Od sveg srca zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj moralnoj podršci, ljubavi i strpljenju tijekom studiranja.*

*Na kraju, posebnu zahvalu upućujem svojim prijateljima koji su me posljednjih pet godina bodrili i uvijek vjerovali u mene!*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek  
Diplomski rad

## Brojnost probiotskih bakterija u domaćim fermentiranim namirnicama

Ana Grizelj

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Probiotici su živi mikroorganizmi, najčešće bakterije mliječne kiseline, koji imaju blagotvorno djelovanje na zdravlje domaćina. Cilj rada je identificirati probiotičke bakterije u domaćem rasolu te usporediti brojnost probiotičkih bakterija između komercijalno dostupnih probiotika, domaćeg rasola te kupovnih i domaćih mliječnih proizvoda. U radu je korišteno 9 različitih uzoraka domaćeg rasola, 4 različita kupovna probiotika, 4 kupovna mliječna proizvoda te 4 domaća. Pripremljena su decimalna razrijeđenja svih uzoraka te su naciepljena na MRS hranjivu podlogu. Izolirane probiotičke bakterije domaćeg rasola fenotipski su karakterizirane metodom bojanja po Gramu te su identificirane tehnologijom MALDI-TOF, a utvrđeno je da su prisutne bakterijske vrste *Levilactobacillus brevis* i *Levilactobacillus buchneri* (gram-pozitivne bakterije štapićastog oblika) te *Pediococcus parvulus* (gram-pozitivna bakterija okruglog oblika). Ovim je radom utvrđeno da broj bakterija u uzorcima domaćeg rasola iznosi  $8,17 \pm 5,03 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>, uzorci kupovnih mliječnih proizvoda sadrže  $4,11 \pm 1,62 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>, domaći mliječni proizvodi sadrže  $3,20 \pm 1,91 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>, a komercijalno dostupni probiotici sadrže  $4,88 \pm 0,54 \times 10^{10}$  CFU g<sup>-1</sup>. Predlaže se daljnje istraživanje s više uzoraka domaćih namirnica kako bi se detaljnije usporedile prisutne bakterijske vrste te njihove brojnosti.

Ključne riječi: mliječni proizvodi, bakterije mliječne kiseline, rasol, jogurt, kiselo mlijeko, kefir  
(43 stranica, 17 slika, 3 tablica, 34 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Ocjenitelji:

izv.prof.dr.sc. Tomislav Ivanković

doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

izv.prof.dr.sc. Nenad Judaš

Rad prihvaćen: 8.9.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology  
Master thesis

### Quantity of probiotic bacteria in home-made fermented food

Ana Grizelj

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Probiotics are living microorganisms. They are most often lactic acid bacteria which have a beneficial effect on the host's health. This work aims to identify probiotic bacteria in homemade cabbage brine and compare the number of probiotic bacteria between commercially available probiotics, homemade brine, and store-bought and domestic dairy products. Various samples were used in the study: 9 of homemade cabbage brine, 4 of commercially available probiotics, 4 of store-bought dairy products, and 4 of homemade dairy products. Decimal dilutions of all samples were prepared and inoculated onto MRS nutrient medium. The isolated probiotic bacteria of homemade cabbage brine were phenotypically characterized by the Gram staining method. The bacteria were then identified by MALDI-TOF technology. Bacterial species observed are *Levilactobacillus brevis* and *Levilactobacillus buchneri* (gram-positive rod-shaped bacteria) and *Pediococcus parvulus* (round-shaped gram-positive bacteria). This work determined that the number of bacteria in samples of homemade cabbage brine is  $8.17 \pm 5.03 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>. Commercially available dairy products contain  $4.11 \pm 1.62 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>, while domestic dairy products showed  $3.20 \pm 1.91 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>. Commercially available probiotics have  $4.88 \pm 0.54 \times 10^{10}$  CFU g<sup>-1</sup>. It is suggested further research with more samples of homemade foods for a more detailed comparison of the bacterial species present and their quantity.

Keywords: dairy products, lactic acid bacteria, cabbage brine, yogurt, sour milk, kefir  
(43 pages, 17 figures, 3 tables, 34 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Reviewers:

Dr. Tomislav Ivanković, Associate Professor

Dr. Mirela Sertić Perić, Assistant Professor

Dr. Nenad Judaš, Associate Professor

Thesis accepted: 8.9.2022.

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1. Bakterije mliječne kiseline.....   | 2  |
| 1.1.1. Podjela bakterija mliječne kiseline .....  | 3  |
| 1.2. Definicija probiotika .....  | 4  |
| 1.3. Mehanizam djelovanja probiotika.....   | 5  |
| 1.4. Strategija izbora probiotskih sojeva .....   | 6  |
| 1.5. Primjena probiotika .....  | 8  |
| 1.6. Hrana kao izvor probiotika .....   | 9  |
| 1.6.1. Kiseli kupus .....   | 9  |
| 1.6.2. Kefir .....  | 10 |
| 1.6.3. Jogurt .....   | 11 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....  | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....   | 13 |
| 3.1. Materijali .....   | 13 |
| 3.1.1. Uzorci domaćeg rasola, mliječnih proizvoda te komercijalno dostupnih probiotika  | 13 |
| 3.1.2. Hranjiva podloga.....  | 15 |
| 3.1.3. Kemikalije .....   | 15 |
| 3.1.4. Aparatura i pribor .....   | 16 |
| 3.2. Metode rada .....  | 17 |
| 3.2.1. Priprava decimalnih razrijeđenja.....  | 17 |
| 3.2.2. Nacijepljivanje na hranjivu podlogu .....  | 18 |
| 3.2.3. Održavanje i čuvanje bakterijskih kultura .....  | 19 |
| 3.2.4. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....   | 20 |
| 3.2.5. Bojenje po gramu .....   | 21 |
| 3.2.6. Identifikacija mikroorganizama u uzorcima domaćeg rasola .....   | 21 |
| 4. REZULTATI.....   | 23 |
| 4.1. Brojnost probiotskih bakterijskih kultura u uzorcima domaćeg rasola nakon inkubacije 5 dana na 37°C.....                     | 23 |
| 4.2. Fenotipska karakterizacija i identifikacija bakterijskih vrsta domaćeg rasola.....   | 26 |
| 4.3. Brojnost probiotskih bakterijskih kultura u uzorcima kupovnih probiotika.....  | 29 |
| 4.4. Brojnost probiotskih bakterijskih kultura u uzorcima kupovnih i domaćih mliječnih proizvoda                                  | 30 |
| 4.5. Usporedba brojnosti probiotskih bakterija domaćeg rasola, kupovnih probiotika te kupovnih i domaćih mliječnih proizvoda..... | 32 |



|                          |    |
|--------------------------|----|
| 5. RASPRAVA.....         | 33 |
| 6. ZAKLJUČAK .....       | 37 |
| 7. POPIS LITERATURE..... | 38 |
| 8. ŽIVOTOPIS .....       | 43 |

## 1. UVOD

Tijekom dvadesetog stoljeća znanstvenici su svojim istraživanjima ukazali na važnost djelovanja mikroorganizama na očuvanje zdravlja. Henry Tissier 1906. godine otkrio je kako bakterije roda *Bifidobacterium* imaju važnu ulogu u ublažavanju probavnih tegoba. Nekoliko godina kasnije, 1910. godine, mikrobiolog Elie Metchnikoff svojim istraživanjima upućuje na povoljan učinak mikroorganizama, osobito roda *Lactobacillus*, u fermentiranim mliječnim proizvodima na produljenje života. Njihova su istraživanja pobudila veliki interes znanstvenika o korisnom djelovanju određenih mikroorganizama (Hauser i sur. 2017.). Upravo su bakterije roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* najčešće probiotičke bakterije. Probiotici su živi mikroorganizmi koji sudjeluju u održavanju mikrobiološke i imunološke ravnoteže organizma. Riječ "probiotik" potječe od grčkih riječi "pro bios" = za život, a prvi su je put upotrijebili Lilly i Stillwell 1965. godine kako bi opisali tvar koju je izlučivao jedan mikroorganizam, a imala je povoljan učinak na rast drugog mikroorganizma (Šušković i sur. 1997.). Probiotici imaju povoljan učinak kod probavnih tegoba, alergija, karcinoma, infekcija mokraćnog sustava te drugih stanja i bolesti. Na tržištu su probiotici dostupni kao lijekovi koji se mogu kupiti u ljekarnoj bez recepta. Kako bi se mogli koristiti kao lijekovi, moraju zadovoljiti opće, tehnološke i funkcionalne zahtjeve. Svaki je probiotik definiran svojim rodnom, vrstom i podvrstom te oznakom specifičnog soja (Hauser i sur. 2017.). Većina probiotičkih pripravaka sadrži otprilike  $10^9$  (=1 000 000 000) bakterija po gramu proizvoda, označeno kao  $10^9$  CFU / gr ili ml (Hauser i sur. 2017.). Osim u obliku lijekova, probiotici se mogu naći u hrani. Probiotičke se bakterije zbog svojih povoljnih učinaka na zdravlje koriste i u proizvodnji domaćih namirnica kao što su: kiseli kupus, jogurt, kefir, sir, ali navedene namirnice najčešće nemaju dokazani probiotički učinak. Kiseli je kupus izvrstan izvor vitamina C i K te sadrži probiotičke bakterije. Zahvaljujući njima, konzumiranje kiselog kupusa održava crijevnu floru zdravom, a time i sam tjelesni imunitet.

## 1.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Srodne bakterije koje u procesu mliječno-kiselog vrenja proizvode produkt mliječnu kiselinu nazivaju se bakterijama mliječne kiseline. Prvi su put izolirane iz mlijeka, a njihov naziv potječe iz 1884. godine kada je Hueppe upotrijebio naziv "Milchsauerbacillus" kako bi opisao bakterije odgovorne za kiseljenje mlijeka i mliječnih proizvoda (Stamer, 1979.). U povijesti se smatralo da imaju negativan utjecaj te su se nazivale bakterijama kiseljenja mlijeka, ali zahvaljujući mnogim istraživanjima dokazalo se da su te bakterije vrlo korisne u prehrambenoj industriji te da imaju pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi što i dokazuje njihov GRAS (Generally Recognized As Safe) status koji im je dodijeljen od strane Agencije za hranu i lijekove.

Veliku ulogu imaju u prehrambenoj industriji gdje se koriste zbog svoje sposobnosti zakiseljavanja određenih proizvoda. Navedene bakterije nalaze se u raznim prehrambenim proizvodima poput žitarica, čokolade i mlijeka, a osobito su zaslužne za aromu mliječnih proizvoda poput jogurta, sira i maslaca. S obzirom na to da su bakterije mliječne kiseline široko rasprostranjene te da imaju velik broj različitih staništa, mogu se nalaziti i u vodi, tlu, biljkama, kanalizaciji, ali i kao dio ljudske mikrobiote gastrointestinalnog trakta, kože, usne šupljine, urinarnog trakta i spolnih organa čovjeka (Zrinjan 2021.). Kao dio ljudskog gastrointestinalnog trakta navedene bakterije imaju niz funkcija poput sprječavanja rasta patogenih bakterija, sprječavanja konstipacije i dijareje, stimulacije imunosnog sustava i snižavanja razine kolesterola (Jurić 2020.).

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne, nesporogene, anaerobne ili mikroaerofilne bakterije koje nemaju katalaznu i oksidaznu aktivnost. Prema morfološkim obilježjima dijele se na štapiće i koke. Zbog pozitivnog utjecaja bakterija mliječne kiseline na zdravlje domaćina, sve više se koriste kao probiotici u prehrani, osobito u slučaju narušavanja ravnoteže crijevne mikroflore.

### 1.1.1. PODJELA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline pripadaju koljenima *Actinobacteria* i *Firmicutes*. U koljeno *Firmicutes* ubrajaju se rodovi *Weissella*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, a jedini rod bakterija mliječne kiseline koji pripada koljenu *Actinobacteria* jest *Bifidobacterium* (Mayo i sur., 2008.). Navedene se bakterije prema metabolizmu dijele na homofermentativne i heterofermentativne. Heterofermentativni rodovi su *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* i podgrupa iz roda *Lactobacillus* dok su ostali homofermentativni (von Wright i Axelsson, 2011.).

a) Homofermentativne bakterije mliječne kiseline – u procesu glikolize omogućuju prevođenje glukoze u piruvat koji se, pomoću enzima laktat-dehidrogenaze, reducira u mliječnu kiselinu (laktat). Navedene bakterije proizvode najvećim udjelom produkt mliječnu kiselinu, dok u manjem udjelu kao produkti mogu nastati etanol, diacetil, acetaldehid i drugi organski spojevi.

b) Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline – u pentoza-fosfatnom putu omogućuju prevođenje glukoze do mliječne kiseline, ali, uspoređujući s količinom produkata proizvedenim homofermentativnim bakterijama mliječne kiseline, proizvode manji udio mliječne kiseline, a veći udio ostalih spojeva poput etanola i ugljikova (IV) oksida.

## 1.2. DEFINICIJA PROBIOTIKA

Više od pola stoljeća znanstvenici intenzivno istražuju blagotvorno djelovanje probiotskih bakterija na organizam domaćina. Zahvaljujući Louisu Pasteuru, već krajem 19. stoljeća znanstveno je utvrđeno kako mikroorganizmi sudjeluju u procesu fermentacije. Fermentirane mliječne proizvode ljudi konzumiraju već više od tisuću godina te tako u svoj organizam unose određene bakterije koje se nalaze u sastavu tih namirnica, a za koje se smatra da imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina.

Ruski znanstvenik, Elie Metchnikoff, dobitnik Nobelove nagrade za otkriće procesa fagocitoze koji opisuje djelovanje specifičnih bijelih krvnih stanica na domaćina, 1907. godine u svojoj knjizi "Produljenje života: Optimistične studije" opisuje pozitivan utjecaj bakterija mliječne kiseline na ljudsko zdravlje. Elie je uočio kako bugarska seljačka populacija ima bolje zdravstveno stanje i dulji životni vijek jer su konzumirali fermentirani mliječni proizvod, jogurt, te je zaključio kako su za to odgovorne bakterije mliječne kiseline koje se nalaze u sastavu tih proizvoda. Utvrdio je štetnost određenih bakterija iz ljudskog debelog crijeva i kako one uzrokuju bolest i starenje te da će bakterije mliječne kiseline zamijeniti te štetne bakterije i tako doprinjeti normalnom funkcioniranju crijevne mikroflore. Elie je smatrao da bakterije mliječne kiseline pomažu pri probavnim smetnjama te da pozitivno djeluju na imunosti sustav domaćina. Kako bi testirao svoju pretpostavku, konzumirao je kiselo mlijeko svaki dan do svoje smrti u dobi od 71 godinu. Danas se Elie Metchnikoff naziva praocem modernih probiotika zato što su se daljnja istraživanja o probiotskom učinku temeljila na njegovim spoznajama (Šušković i sur. 1997.). Japanski liječnik Minoru Shiroza analizirao je dotadašnja znanstvena istraživanja te je proveo terapijsku primjenu bakterijskog soja *Lactobacillus*. Shiroza je, iz ljudskog fecesa, izolirao bakteriju roda *Lactobacillus* s obzirom na to da one imaju sposobnost preživljavanja u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Iz navedene bakterijske kulture dobiven je proizvod Yakult koji se i danas nalazi na tržištu, a ima probiotski učinak. Henry Tissier proučavao je najzastupljenije bakterijske vrste u fecesu dojenčadi koja su bila hranjena majčinim mlijekom te je izolirao bakteriju *Bacillus bifidus communis* koja je danas poznata kao *Bifidobacterium bifidum*. Henry je na temelju svoga istraživanja zaključio da navedeni bakterijski rod, *Bifidobacterium*, ima ključnu ulogu u očuvanju zdravlja, odnosno kako navedeni bakterijski rod sprječava dijareju u dojenčadi (Hauser i sur. 2017.).

Tijekom povijesti probiotici su imali različite definicije. 1965. godine Lilly i Stilwe definiraju probiotike kao tvari koje potiču rast drugih mikroorganizama, a 1974. godine Parker opisuje probiotike kao tvari koje doprinose ravnoteži crijevne mikroflore. Unatoč tome što je poznato nekoliko definicija probiotika, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization, WHO) 2001. godine definira probiotike kao „žive organizme koji kada su konzumirani u primijenjenim količinama uzrokuju zdravstvenu korist domaćina“ (Vanderpool i sur. 2008.).

### **1.3. MEHANIZAM DJELOVANJA PROBIOTIKA**

U posljednje vrijeme sve se više potiče konzumacija probiotika zbog njihovog pozitivnog učinka na održavanje ravnoteže crijevne mikroflore. Probiotske vrste sprječavaju rast i razmnožavanje određenih bakterija koje u gastrointestinalnom traktu čovjeka otpuštaju toksine. Održavanje ravnoteže ljudske crijevne mikroflore je iznimno važno za normalno funkcioniranje čitavog organizma domaćina, a njezino narušavanje može biti uzrokovano stresom, starenjem, raznim bolestima te ostalim faktorima. Iako probiotici ne mogu zamijeniti uništenu crijevnu mikrofloru, mogu doprinijeti njezinom obnavljanju te tako omogućiti ponovno normalno funkcioniranje crijeva. Kako bi probiotske bakterijske vrste mogle neometano obavljati svoju funkciju u gastrointestinalnom traktu čovjeka, moraju se natjecati s patogenim bakterijama za hranu i prostor. Mehanizam djelovanja probiotskih bakterijskih vrsta obuhvaća niz uloga poput proizvodnje vodikova peroksida, metabolita koji je toksičan za patogene bakterije, proizvodnje mliječne kiseline, čija je uloga snižavanje pH-vrijednosti crijeva što doprinosi stvaranju nepovoljnih uvjeta za preživljavanje patogenih bakterija te proizvodnje antimikrobnih tvari, bakteriocina, koji sprječavaju rast patogenih (Jurić 2020.).

Na temelju genetskih i molekularnih istraživanja, da bi bakterijski soj bio probiotski, mora zadovoljiti četiri mehanizma: kompeticija s patogenima za hranu i prostor na epitelnom tkivu, antagonizam proizvodnje antimikrobnih tvari, imunomodulacijski učinak u domaćinu te inhibicija proizvodnje bakterijskih toksina (Markowiak i Slizewska, 2017.). Kompeticija s patogenim bakterijama te antagonizam proizvodnje antimikrobnih tvari mehanizmi su važni za profilaksu, zaštitu od opasnosti.

Većina probiotskih bakterijskih vrsta udružuje se u agregate te tako stvaraju barijeru kako bi spriječili kolonizaciju patogenih mikroorganizama na epitelno tkivo. Bakterije roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* štite se od negativnog utjecaja patogenih bakterija tako što proizvode derivate žučnih kiselina, dok neke bakterije roda *Lactobacillus* iz istog razloga proizvode bakteriocine. Jedna od ključnih uloga probiotskih bakterijskih vrsta je što imaju sposobnost vezivanja na crijevni epitel te tako sprječavaju kolonizaciju patogenih bakterija i omogućavaju imunomodulacijski učinak na domaćina (Borchers i sur., 2009.). Ukoliko patogene bakterije izluče svoje toksine na probiotske bakterije koje su vezane na crijevni epitel, probiotske će bakterije aktivirati stanice imunskog sustava i tako spriječiti upalne procese i razne bolesti gastrointestinalnog trakta. Imunomodulacijski učinak probiotskih bakterijskih vrsta temelji se na 3 fenomena: indukciji i upravljanju imunskim reakcijama u borbi protiv patogenih bakterija, inhibiciji alergijskih reakcija te održavanju imunološke tolerancije na antigene iz okoliša (Borchers i sur., 2009.). Posljednji mehanizam djelovanja probiotskih bakterija, inhibicija proizvodnje bakterijskih toksina, objašnjava kako se domaćin štiti od bakterijskih toksina tako što se njihova proizvodnja sprječava zahvaljujući djelovanju probiotskih bakterija. Iz toga razloga iznimno je važno odabirati probiotske bakterije koje su sposobne vezivati bakterijske toksine na svoju staničnu stijenku kako bi se umanjila apsorpcija toksina u gastrointestinalnom traktu čovjeka. (Markowiak i Slizewska, 2017.).

#### **1.4. STRATEGIJA IZBORA PROBIOTSKIH SOJEVA**

Izraz "probiotik" obuhvaća proizvode koji: sadrže žive mikroorganizme, doprinose poboljšanju zdravstvenog stanja ljudi te djeluju u ustima ili probavnom sustavu, u gornjem respiratornom traktu ili u urogenitalnom traktu (Šušković i sur., 1997). Probiotske bakterije moraju biti točno taksonomski identificirane, odnosno svaki probiotik mora biti definiran svojim rodom, vrstom, podvrstom te oznakom koja karakterizira svaki specifičan sloj.

Kako bi se mogli koristiti kao živi lijekovi, probiotici moraju zadovoljiti određene zahtjeve koji su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1 Kriteriji za izbor probiotskih sojeva (Šušković i sur. 2001.)

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <p>OPĆI ZAHTJEVI</p>         | <p>1. točna taksonomska identifikacija</p> <p>2. netoksičnost i nepatogenost</p> <p>3. nema prijenosa plazmida (genetički stabilni)</p> <p>4. otpornost prema žučnim solima</p> <p>5. otpornost prema niskoj pH-vrijednosti</p>   |
| <p>TEHNOLOŠKI ZAHTJEVI</p>   | <p>6. zadržavanje poželjnih karakteristika tijekom pripreve, skladištenja i isporuke</p> <p>7. velik broj živih bakterija u probiotskom proizvodu</p> <p>8. brzo razmnožavanje, izdvajanje, smrzavanje i liofiliziranje probiotskih bakterija tijekom pripreve proizvoda</p> <p>9. dobivanje određenih organoleptičkih svojstava tijekom procesa fermentacije</p>   |
| <p>FUNKCIONALNI ZAHTJEVI</p> | <p>10. sposobnost preživljavanja, razmnožavanja te metaboličke aktivnosti u ciljanom području unutar organizma</p> <p>11. sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela</p> <p>12. proizvodnja antimikrobnih tvari, vodikovog peroksida i organskih kiselina</p> <p>13. antagonistička aktivnost prema patogenima</p> <p>14. mogućnost kompeticije s drugim mikroorganizmima u mikroflori te otpornost prema antimikrobnim tvarima</p> <p>15. imunomodulacijski učinak</p> <p>16. sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih povoljnih učinaka na zdravlje</p> |



## 1.5. PRIMJENA PROBIOTIKA

Prema načinu primjene probiotici se dijele na funkcionalne dodatke prehrani i bioterapeutike. Probiotici kao funkcionalni dodaci prehrani sudjeluju u održavanju ravnoteže crijevne mikroflore, dok su bioterapeutici probiotske bakterijske vrste koje se koriste za terapiju ili prevenciju bolesti što ih čini živim lijekovima (Šušković, 2009.). Probiotici se smatraju pouzdanim proizvodima za uporabu s obzirom na to da je velik dio probiotskih bakterija prirodno prisutno u probavnom traktu, a veliki dio njih je i izoliran iz ljudskih crijeva. Također, zabilježen je mali broj infekcija koje su uzrokovane korištenjem probiotika, stoga se oni smatraju sigurnim proizvodima.

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji probiotici imaju niz uloga u organizmu domaćina, a neke od njih su:

- poboljšavanje probave laktoze
- smanjenje i sprječavanje proljeva
- sniženje kolesterola
- sniženje krvnog tlaka
- poboljšavanje funkcije imunskog sustava
- smanjenje upale
- pozitivan utjecaj kod iritabilnog kolona
- prevencija razvoja štetnih bakterija kod stresa
- sprječavanje akni
- pomoć pri mršavljenju.

Na tržištu se mogu pronaći probiotici u obliku kapsula, praška, tableta te u tekućem obliku, a mogu se kupiti u ljekarnama bez liječničkog recepta. Preporučena dnevna doza korištenja probiotika naznačena je na svakom proizvodu, ali za sada nisu poznate informacije o slučajevima predoziranja probioticima. Kako bi probiotici imali povoljan učinak na crijevnu mikrofloru, potrebno ih je konzumirati barem pet puta tjedno.

## 1.6. HRANA KAO IZVOR PROBIOTIKA

Probiotska hrana sadrži probiotike u dovoljnoj koncentraciji da se njihovom konzumacijom postigne povoljan učinak probiotika na organizam domaćina. Već desetljećima ljudi konzumiraju fermentirane mliječne proizvode zbog ugodnog okusa, ali i pozitivnog učinka na zdravstveno stanje. Najčešći konzumirani mliječni proizvodi su kefir, jogurt, kiselo mlijeko, sir i drugi. Probiotska fermentirana mlijeka sadrže probiotske bakterije, a to su najčešće bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije. Takva fermentirana mlijeka proizvode se najčešće na način da se gotovom proizvodu dodaje probiotska kultura. Najzastupljeniji bakterijski rodovi u fermentiranim mliječnim proizvodima su *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*. Iako se kao probiotska hrana najčešće konzumiraju fermentirani mliječni proizvodi, probiotske bakterijske vrste prisutne su i u drugim fermentiranim namirnicama koje se svakodnevno upotrebljavaju poput kupusa, krastavaca, paprike, cikle i drugih. Osim fermentiranih mliječnih proizvoda, fermentiranog voća i povrća, mesni proizvodi u svom sastavu također imaju prisutne probiotske bakterije. U mesnoj su industriji najzastupljenije probiotske bakterije roda *Lactobacillus* i *Pediococcus*. (Jukić 2021.).

### 1.6.1. KISELI KUPUS

Tijekom povijesti rimski su vojnici konzumirali kiseli kupus jer su iz iskustva znali kako on doprinosi zaštiti od različitih probavnih tegoba. Stanovnici Nizozemske konzumirali su ga kako bi spriječili skorbut, bolest izazvanu nedostatkom vitamina C. Kiseli kupus, poznat od davnina, odličan je izvor vitamina C, ali i minerala kalija, kalcija, magnezija, fosfora i mangana (Bujan 2010.). Kiseli kupus proizvod je spontanog procesa mliječno-kiselog vrenja kojega omogućuju bakterije mliječne kiseline, a one se nalaze na površini listova kupusa. Tijekom procesa kiseljenja dodaje se sol kako bi se stvorili povoljni uvjeti za rast i razmnožavanje probiotskih bakterija, a istovremeno nepovoljni uvjeti za rast i razmnožavanje patogenih bakterija. Također, djelovanjem bakterija mliječne kiseline, u procesu mliječno-kiselog vrenja, stvara se mliječna kiselina koja dodatno sprječava rast i razmnožavanje patogenih bakterija. Probiotske bakterije, koje se nalaze u sastavu kiselog kupusa, pomažu pri liječenju probavnih smetnji, olakšavaju tegobe kod iritabilnog crijeva, snižavaju kolesterol, jačaju imunitet

i ostalo. Rasol je slana tekućina nastala kiseljenjem kupusa. Zahvaljujući procesu fermentacije u svom sastavu sadrži mliječnu kiselinu koja inhibira rast nepoželjnih bakterija, a potiče rast korisnih bakterija, također sadrži brojne vitamine te bakterije mliječne kiseline što uzrokuje pozitivan učinak konzumacije rasola na zdravlje (Bujan 2010.).



Slika 1 Kiseli kupus (tržnica Dubrava, Zagreb)

### **1.6.2. KEFIR**

Kefir je fermentirani mliječni proizvod koji se proizvodi korištenjem kefirnih zrna, a ljudi ga svakodnevno konzumiraju zbog njegovog blagotvornog djelovanja na zdravlje. Kefirna zrna u svome sastavu sadrže simbiozu bakterija mliječne kiseline i kvasaca koji omogućuju njegovo probiotsko djelovanje. Smatra se da je kefir porijeklom s Kavkaza i da je zaslužan za dobro zdravlje njegovih stanovnika. Kefir ima pozitivan utjecaj na razna zdravstvena stanja te se smatra da pomaže pri alergijama, poboljšava probavu, ojačava imunost i tako dalje (Kok i sur. 2018.).



Slika 2 Kefirna zrna (preuzeto s [https://www.kupindo.com/Preparati/45289881\\_KEFIR-GLJIVA](https://www.kupindo.com/Preparati/45289881_KEFIR-GLJIVA) datum pristupa 7. 7. 2022.)

### 1.6.3. JOGURT

Jogurt je mliječni proizvod dobiven procesom fermentacije mlijeka uz prisutnost specifičnih bakterijskih kultura. Izvrstan je izvor raznih vitamina poput vitamina B5 i B12 te kalija, fosfora i mnogih drugih biogenih elemenata. U svom sastavu sadrži probiotske bakterije koje blagotvorno djeluju na zdravlje te konzumacija jogurta uzrokuje pozitivan utjecaj na probavni sustav, ali i na jačanje imunskog sustava (Kok i sur. 2018.).



Slika 3 Tekući jogurt (preuzeto s <https://krenizdravo.dnevnik.hr/prehrana/kako-napraviti-domaci-jogurt> datum pristupa 7. 7. 2022.)

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Istraživačka je pretpostavka provedenog eksperimentalnog rada sličnost u bakterijskim vrstama te njihovoj brojnosti u domaćem rasolu, kupovnim i domaćim fermentiranim mliječnim namirnicama i kupovnim probioticima.

Koristeći različite uzorke domaćeg rasola, kupovnih i domaćih fermentiranih mliječnih proizvoda i kupovnih probiotika, cilj istraživanja je:

1. Identificirati probiotičke bakterije u domaćem rasolu klasičnim biokemijskim testovima i tehnologijom MALDI-TOF.
2. Odrediti brojnost identificiranih bakterija u domaćem rasolu metodom određivanja brojnosti bakterija (CFU metoda).
3. Usporediti bakterijske vrste i njihovu brojnost u domaćem rasolu, kupovnim probioticima te domaćim i kupovnim fermentiranim mliječnim proizvodima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorci domaćeg rasola, mliječnih proizvoda te komercijalno dostupnih probiotika

U radu je korišteno devet različitih uzoraka domaćeg rasola koji su prikupljeni na tržnicama grada Zagreba (tržnica Dolac, tržnica Dubrava te tržnica Kvatrić). Jedan je uzorak s tržnice Dubrava (oznaka DB), tri uzorka su s tržnice Kvatrić (oznake K1, K2 i K3), a pet uzoraka s tržnice Dolac (oznake D1, D2, D3, D4 i D5).

Osim uzoraka domaćeg rasola, korišteni su mliječni proizvodi: kefir (Pilos), kiselo mlijeko (Z'bregov, Vindija), tekući jogurt (Dukat) te tekući jogurt (Active zone). Navedeni mliječni proizvodi korišteni su kao starter kulture u svrhu dobivanja fermentiranih mliječnih proizvoda u laboratoriju. Fermentirani mliječni proizvodi u laboratoriju dobiveni su pipetiranjem 5 mL svakog uzorka mliječnog proizvoda u 100 mL trajnog mlijeka (Dukat) te su stavljeni u inkubator 28 sati na 25°C.



Slika 4 Kupovni kefir, Pilos, i dvije staklene boce od 200 mL s domaćim kefirom (lijevo) te kiselo mlijeko, Z'bregov Vindija, i dvije staklene boce od 200 mL s domaćim kiselim mlijekom.



Slika 5 Kupovni tekući jogurt, Active zone, i dvije staklene boce od 200 mL s domaćim tekućim jogurtom (lijevo) te tekući jogurt, Dukat, i dvije staklene boce od 200 mL s domaćim tekućim jogurtom.

Kao kontrola korišteni su probiotici kupljeni u ljekarnoi, a to su: LINEX FORTE, NORMIA, BIORELA te Bio-Kult.



Slika 6 Komercijalno dostupni probiotici LINEX FORTE, NORMIA, BIORELA i Bio-Kult (prema dolje).

### 3.1.2. Hranjiva podloga

U radu je korištena MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) hranjiva podloga koja je pripremljena otapanjem navedenih sastojaka u destiliranoj vodi prema uputama proizvođača. Hranjiva podloga sterilizirana je u autoklavu na 121°C dvadeset minuta, a nakon što se ohladila, izlivena je u sterilne Petrijeve zdjelice.

Tablica 2 Kemijski sastav MRS hranjive podloge naveden od proizvođača:

| Sastojak               | Koncentracija |
|------------------------|---------------|
| pepton                 | 10 g/L        |
| mesni ekstrakt         | 10 g/L        |
| kvašćev ekstrakt       | 4 g/L         |
| glukoza                | 20 g/L        |
| kalijev hidrogenfosfat | 2 g/L         |
| natrijev acetat        | 5 g/L         |
| amonijev citrat        | 2 g/L         |
| magnezijev sulfat      | 0,2 g/L       |
| manganov sulfat        | 0,05 g/L      |
| tween 80               | 1,08 g/L      |
| agar                   | 15 g/L        |

### 3.1.3. Kemikalije

- destilirana voda
- vodena otopina natrijeva klorida (0,3 %)
- vodena otopina natrijeva klorida (0,9 %)
- MRS AGAR ISO FORMULATION, *Biolife*, Italija
- etanol (96 %), *Gram mol*, Hrvatska
- etanol (70 %), *Gram mol*, Hrvatska



- Microbiology Anaerocult A , *Millipore, Njemačka*
- Gram Crystal violet 1 % otopina, *BIOGNOST, Hrvatska*
- Lugolova otopina, *BIOGNOST, Hrvatska*
- Gram Safranin otopina, *BIOGNOST, Hrvatska*
- imerzijsko ulje.

### **3.1.4. Aparatura i pribor**

- analitička vaga
- autoklav
- automatske pipete
- bakteriološka ušica
- brojač bakterijskih kolonija
- Erlenmeyerova tikvica od 1000 mL
- kadica
- kapalice
- laboratorijska čaša od 50 mL
- laboratorijske epruvete
- laboratorijska mješalica
- mikroskop
- papirnata lađica
- Petrijeve zdjelice
- plamenik
- predmetna stakalca
- predmetnica
- rešetka
- stalak za epruvete
- žlica.

## **3.2. METODE RADA**

### **3.2.1. Priprava decimalnih razrjeđenja**

Sterilna otopina natrijeva klorida (0,3%) pripravljena je otapanjem 3 grama čvrstog natrijevog klorida u 1000 mL destilirane vode. U svaku laboratorijsku epruvetu odpipetirano je 9 mL dobivene 0,3% otopine natrijeva klorida. Laboratorijske epruvete s otopinom sterilizirane su u autoklavu na 121°C dvadeset minuta.

Iz svih uzoraka domaćeg rasola uzme se 1 mL uzorka, prebaci se u epruvetu s 9 mL sterilne otopine NaCl te se naprave decimalna razrjeđenja.

Sterilna otopina natrijeva klorida (0,9%) pripravljena je otapanjem 9 grama čvrstog natrijevog klorida u 1000 mL destilirane vode. U svaku laboratorijsku epruvetu odpipetirano je 9 mL dobivene otopine natrijeva klorida. Laboratorijske epruvete s otopinom sterilizirale su se u autoklavu na 121°C dvadeset minuta.

Kupovni probiotici označeni su oznakama: NORMIA (oznaka Uzorak 1 KP), LINEX FORTE (oznaka Uzorak 2 KP), Bio-Kult (oznaka Uzorak 3 KP) te BIORELA (oznaka Uzorak 4 KP). Na analitičkog vagi zasebno su izvagane dvije kapsule svakog kupovnog probiotika. Sadržaj svake kapsule se pomiješan je s 9 mL 0,9% sterilne otopine NaCl u laboratorijskim epruvetama te su ostavljene 30 minuta kako bi se sadržaj kapsula otopio. Iz svih uzoraka kupovnih probiotika uzme se 1 mL uzorka, prebaci se u epruvetu s 9 mL sterilne otopine NaCl te se naprave decimalna razrjeđenja.

Kupovni mliječni proizvodi označeni su oznakama: kefir (oznaka Uzorak 1 KMP), kiselo mlijeko (oznaka Uzorak 2 KMP), tekući jogurt (oznaka Uzorak 3 KMP) te jogurt protein (oznaka Uzorak 4 KMP). Za svaki mliječni proizvod radilo se dva ponavljanja decimalnih razrjeđenja u svrhu što točnijih rezultata. Prvo ponavljanje su bila razrjeđenja  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-7}$ , a drugo ponavljanje su bila razrjeđenja  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  i  $10^{-6}$ . Iz svih uzoraka kupovnih mliječnih proizvoda uzme se 1 mL uzorka, prebaci se u epruvetu s 9 mL sterilne otopine NaCl te se naprave navedena decimalna razrjeđenja.

Za svaki fermentirani mliječni proizvod, pripremljen u laboratoriju, radila su se dva ponavljanja decimalnih razrjeđenja. Prvo ponavljanje su bila razrjeđenja  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-7}$ , a drugo ponavljanje su bila razrjeđenja  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  i  $10^{-8}$ . Iz svih uzoraka fermentiranih mliječnih proizvoda, pripremljenih u laboratoriju, uzme se 1 mL uzorka te se pomiješa s 9 mL sterilne otopine NaCl. Naprave se navedena decimalna razrijeđena. Uzorci domaćih mliječnih namirnica označene su brojem uzorka starter proizvoda te kraticom DMP - domaći mliječni proizvod.

### **3.2.2. Nacijepljivanje na hranjivu podlogu**

Uzorci domaćeg rasola nacijepljeni su na hranjivu podlogu dvjema metodama, a to su: metoda širenja razmaza (engl. Spread Plate Method) i metoda izlijevanja rastopljene hranjive podloge (enlg. Pour Plate Method).

Metoda širenja razmaza napravljena je pipetiranjem 0,1 mL svih uzoraka razrjeđenja  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  na krutu MRS hranjivu podlogu u Petrijevim zdjelicama. Uzorci su razmazivani na krutoj hranjivoj podlozi pomoću željeznog trokutastog štapića koji je, prije svakog razmazivanja uzorka, namakan u 96 % -tnom etanolu i opaljen na plamenu plameniku kako bi se sterilizirao. Hranjive podloge označene su oznakom uzorka te pripadnim razrjeđenjem.

Metoda izlijevanja rastopljene hranjive podloge napravljena je pipetiranjem 1 mL svih uzoraka domaćeg rasola decimalnog razrjeđenja  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$  u prazne Petrijeve zdjelice u koje je zatim ulivena rastopljena MRS hranjiva podloga. Sadržaj Petrijeve zdjelice je lagano promiješan te ostavljen da se skrutne. Hranjive podloge označene su oznakom uzorka, pripadnim razrjeđenjem te oznakom PP (Pour Plate).

Uzorci kupovnih probiotika nacijepljeni su na MRS hranjivu podlogu metodom širenja razmaza. Na krutu MRS hranjivu podlogu u Petrijevim zdjelicama odpipetirano je 0,1 mL svih uzoraka decimalnih razrjeđenja  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  i  $10^{-9}$ . Uzorci su razmazivani željeznom trokutastom štapićem koji je ,prije svakog razmazivanja, namakan u 96%-tnom etanolu te opaljen na plamenu plameniku. Hranjive podloge označene su oznakom kupovnih probiotika te pripadnim razrjeđenjem.

Uzorci mliječnih proizvoda naciepljeni su na MRS hranjivu podlogu metodom širenja razmaza. Na krutu MRS hranjivu podlogu u Petrijevim zdjelicama odpipetirano je 0,1 mL svih uzoraka navedenih razrjeđenja, a prije samog razmazivanja željezni trokutasti štapić, kojim su razmazivani uzorci, namakan je u 96 % -tnom etanolu i opaljen na plamenu plamenika. Hranjive podloge označene su oznakom mliječnog proizvoda te pripadnim razrjeđenjem.

Uzorci fermentiranih mliječnih proizvoda, pripremljenih u laboratoriju, naciepljeni su na MRS hranjivu podlogu metodom širenja razmaza. Na krutu MRS hranjivu podlogu u Petrijevim zdjelicama odpipetirano je 0,1 mL svih uzoraka navedenih razrjeđenja, a prije svakog razmazivanja štapić je namakan u 96%-tnom etanolu i opaljen na plamenu plamenika. Hranjive podloge označene su oznakom fermentiranog mliječnog proizvoda te pripadnim razrjeđenjem.

### **3.2.3. Održavanje i čuvanje bakterijskih kultura**

Ploče namazane uzorcima domaćeg rasola, napravljene metodom izlivanja rastopljene hranjive podloge (oznaka PP), inhibirane su u aerobnim uvjetima, a namazane ploče napravljene metodom širenja razmaza inkubirane su i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima. Za postizanje anaerobnih uvjeta koristila se posebna posuda u koju je stavljen komercijalni reagens, Microbiology Anaerocult, koji kemijski veže kisik te tako stvara anaerobne uvjete samo s ugljikovim (IV) oksidom. U posudu su stavljene inokulirane Petrijeve zdjelice, posuda je zaklopljena te stavljena u inkubator na temperaturu 37°C pet dana. Hranjive podloge s uzorcima, koji su uzgajani u aerobnim uvjetima, stavljene su u inkubator na temperaturu 37°C pet dana. Petrijeve zdjelice označene su prema uvjetu u kojem se nalaze (AER-aerobno i AN-anaerobno).

Bakterijske kulture uzoraka kupovnih probiotika uzgajane su u anaerobnim uvjetima, a za postizanje takvih uvjeta koristila se posebna posuda u koju je stavljen komercijalni reagens, Microbiology Anaerocult. U posebnu posudu stavljene su inokulirane Petrijeve zdjelice, posuda je zaklopljena te stavljena u inkubator na temperaturu 37°C pet dana.

Bakterijske kulture uzoraka mliječnih proizvoda uzgajane su u anaerobnim uvjetima, u posebnoj posudi s komercijalnim reagensom, te su inkubirane na temperaturi 37°C pet dana.

Bakterijske kulture uzoraka fermentiranih mliječnih proizvoda uzgajane su u anaerobnim uvjetima te ih se inkubiralo na temperaturi 37°C pet dana.



Slika 7 Posuda za anaerobnu inkubaciju

### **3.2.4. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom**

Nakon inkubacije inokuliranih hranjivih podloga za sve korištene uzorke, određena je brojnost bakterijskih kolonija pomoću aparata brojača kolonija. Broj bakterijskih kolonija izračunat je na osnovu broja naraslih bakterijskih kolonija u Petrijevim zdjelicama, volumena uzorka nacijepljenog na hranjivu podlogu te pripadnog decimalnog razrjeđenja, prema formuli:

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj naraslih bakterijskih kolonija}}{\text{volumen inokuluma}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja uzorka}$$

### **3.2.5. Bojenje po Gramu**

Bojenje po Gramu (Hans Christian Gram) jedna je od najčešćih metoda bojenja bakterija u svrhu diferencijacije pojedinih bakterijskih skupina. S obzirom na građu stanične stijenke bakterija i njihovom obojenju nakon bojenja po Gramu, one mogu biti gram-pozitivne ili gram-negativne bakterije. Gram-pozitivne bakterije imaju deblji mureinski sloj u staničnoj stijenci, stoga će se nastali kompleks lugola i kristal violeta teže isprati 96 % -tnim alkoholom etanolom te će gram-pozitivne bakterije biti obojene plavo. Gram-negativne bakterije imaju tanji mureinski sloj u staničnoj stijenci, stoga će se kompleks lugola i kristal violeta lakše isprati 96 % -tnim alkohol etanolom iz stanice, a bakterije će biti obojene crveno.

Za bojenje po Gramu i mikroskopiranje pripremljeni su preparati na način da se užarenom bakterijskom ušicom prenijela bakterijska kolonija u kap vode na predmetnom stakalcu te razmazala. Preparat se osušio na zraku te se fiksirao prolaskom preparata kroz plamen plinskog plamenika. Preparat se stavilo na rešetku ispod koje se nalazila kadica. Na sve preparate kapalicom je nanosena boja kristal violet te ostavljena dvije minute. Zatim je kapalicom na preparate nanosena Lugolova otopina (zasićena otopina joda u kalijevu jodidu) te je ostavljena jednu minutu. Sadržaj je odliven, a preparati su isprani alkoholom etanolom, a nakon toga vodovodnom vodom. Kapalicom su preparati preliveni safraninom. Nakon dvije minute safranin je ispran vodom. Na gotov mikroskopski preparat dodana je kap imerzijskog ulja te su promatrani na mikroskopu pod povećanjem od 1000 puta. Mikroskopske slike fotografirane su pomoću mobitela (mobilni uređaj Huawei Mate 20 lite).

### **3.2.6. Identifikacija mikroorganizama u uzorcima domaćeg rasola**

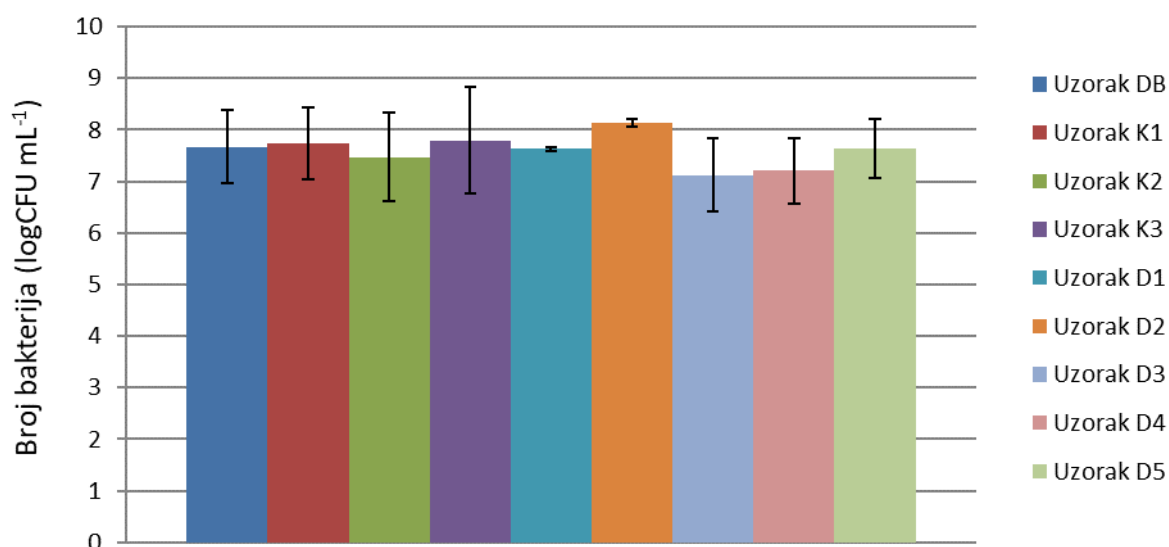
Bakteriološka ušica (eža) je užarena i ohlađena na dijelu hranjive podloge gdje nema bakterija. Ezom je zagrabljen dio bakterijskih kultura te prenesen u mikroepruvetu s 0,5 mL 70 % -tnim etanolom. Mikroepruveta je stavljena na laboratorijsku mješalicu kako bi se sadržaj što bolje promješao. Mikroepruvete s uzorcima odnesene su na Institut Ruđera Boškovića gdje su se identificirale bakterijske kulture tehnologijom MALDI-TOF. MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight; matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom

laserskog zračenja - analizator masa s vremenom leta) analitička je metoda koja omogućuje identifikaciju bioloških smjesa. Temelji se na ionizaciji čestica koje se odvajaju na temelju omjera njihove mase i naboja te se mjeri vrijeme potrebno ionima da dođu do detektora, a rezultira spektrima masa proteina svakog mikroorganizma. Dobiveni spektri uspoređuju se s referentnim spektrima koji su pohranjeni u bazi podataka.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Brojnost probiotskih bakterijskih kultura u uzorcima domaćeg rasola nakon inkubacije 5 dana na 37°C

Bakterije mliječne kiseline, izolirane iz uzoraka rasola, izrasle su na MRS hranjivoj podlozi. Brojnost bakterijskih kultura na svakoj hranjivoj podlozi određena je pomoću brojača kolonija. Prosječna brojnost bakterijskih kultura u 1 mL uzorka domaćeg rasola ( $\log\text{CFU mL}^{-1}$ ) prikazana je na Slici 8 za sve inokulirane MRS hranjive napravljene pour-plate metodom te uzgojenim u aerobnim uvjetima. Statističkom obradom podataka, testom ANOVA, dokazano je da ne postoje značajne razlike u brojnosti bakterija između navedenih uzoraka ( $p > 0.05$ ).

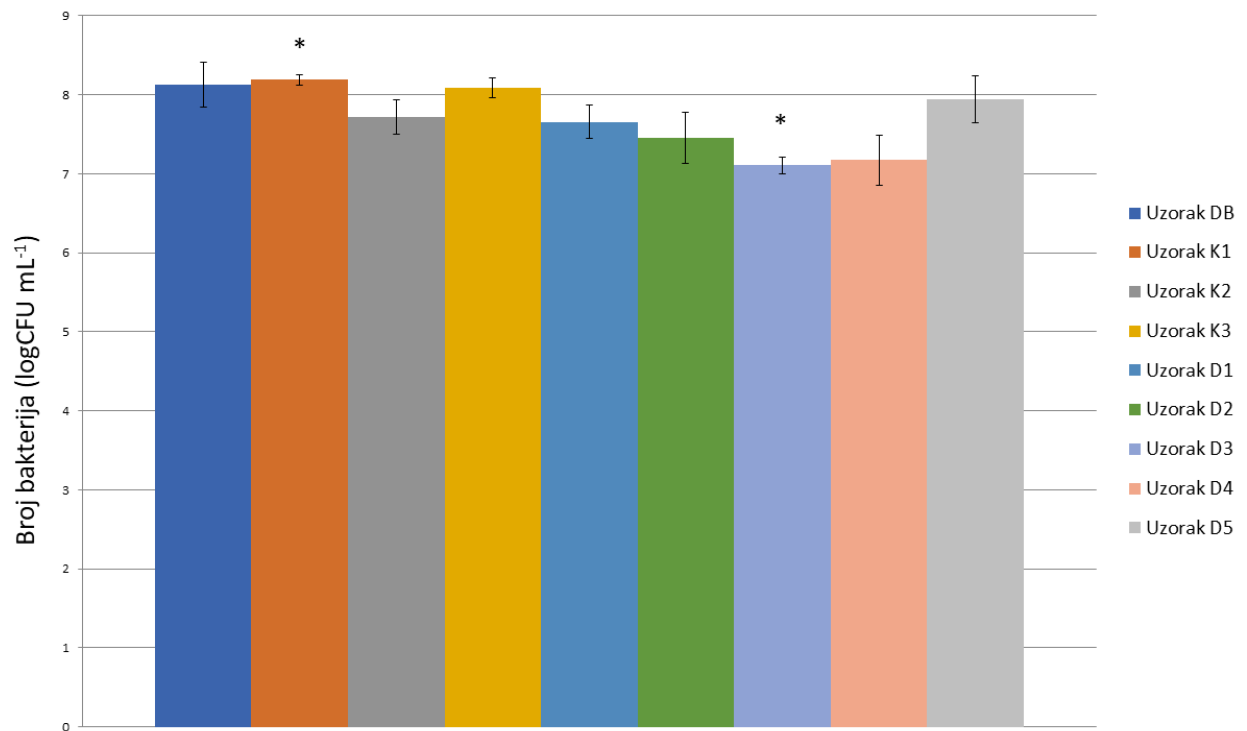


Slika 8 Brojnost bakterijskih kultura uzoraka domaćeg rasola, napravljenim pour-plate metodom te uzgojenim u aerobnim uvjetima, koje su izrasle na MRS hranjivoj podlozi nakon inkubacije pet dana na 37°C. Prikazane su prosječne vrijednosti broja bakterija za sve korištene uzorke te njihove standardne devijacije.

Prosječna brojnost bakterijskih kultura u 1 mL uzorka domaćeg rasola ( $\log\text{CFU mL}^{-1}$ ) prikazana je na Slici 9 za sve inokulirane MRS hranjive napravljene metodom širenja razmaza te uzgojenim u anerobnim uvjetima. ANOVA testom utvrđeno je da postoje značajne razlike u brojnosti bakterija između navedenih uzoraka uzgajanim u

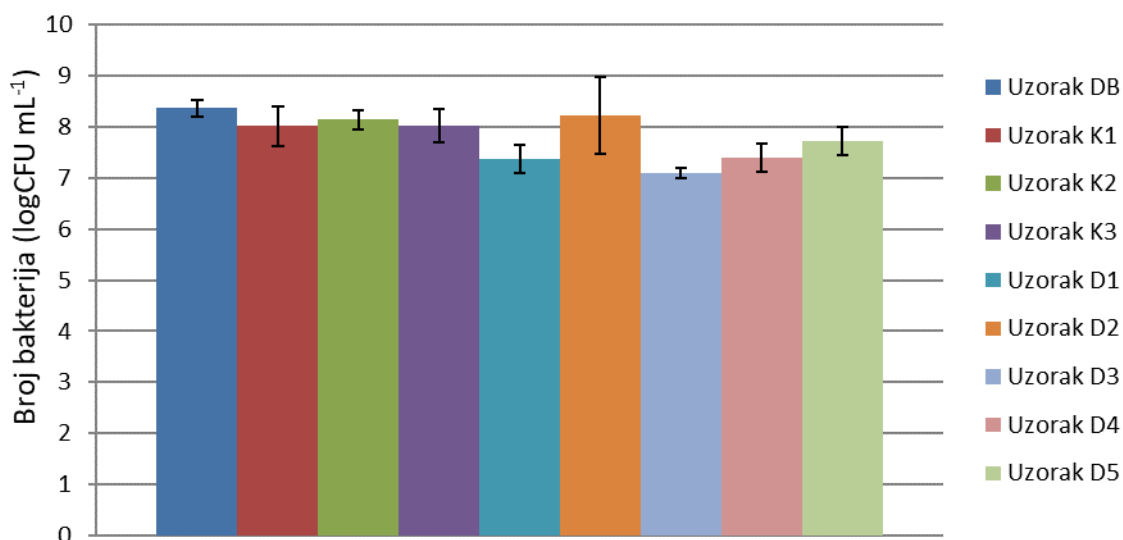


anaerobnim uvjetima ( $p < 0.05$ ). Statističkom analizom utvrđeno je da značajne razlike postoje između uzoraka K1 i D3.



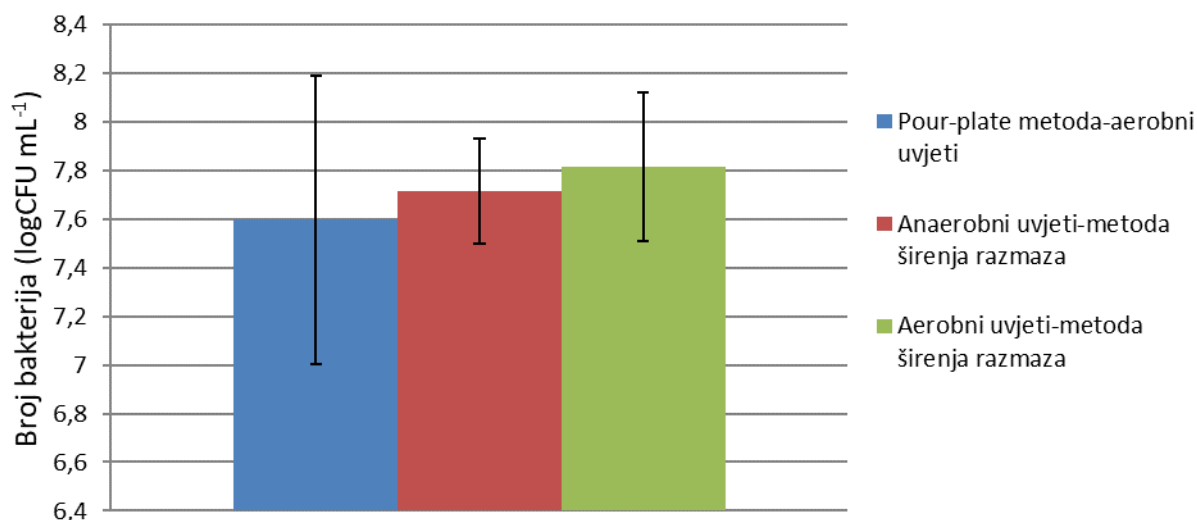
Slika 9 Brojnost bakterijskih kultura uzoraka domaćeg rasola, napravljenim metodom širenja razmaza te uzgojenim u anaerobnim uvjetima, koje su izrasle na MRS hranjivoj podlozi nakon inkubacije pet dana na 37°C. Prikazane su prosječne vrijednosti broja bakterija za sve korištene uzorke te njihove standardne devijacije. \* označava statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ).

Prosječna brojnost bakterijskih kultura u 1 mL uzorka domaćeg rasola (logCFU mL<sup>-1</sup>) prikazana je na Slici 10 za sve inokulirane MRS hranjive podloge napravljene metodom širenja razmaza te uzgojenim u aerobnim uvjetima. ANOVA testom dokazano je da nema značajnih razlika u brojnosti bakterija između navedenih uzoraka uzgajanim u aerobnim uvjetima ( $p > 0.05$ ).



Slika 10 Brojnost bakterijskih kultura uzoraka domaćeg rasola, napravljenim metodom širenja razmaza te uzgojenim u aerobnim uvjetima, koje su izrasle na MRS hranjivoj podlozi nakon inkubacije pet dana na 37°C. Prikazane su prosječne vrijednosti broja bakterija za sve korištene uzorke te njihove standardne devijacije.

Slika 11 prikazuje prosječne vrijednosti broja bakterija uzoraka domaćeg rasola izraslih na MRS hranjivoj podlozi u aerobnim i anaerobnim uvjetima, napravljene metodom širenja razmaza te metodom izlijevanja rastopljene hranjive podloge. Slika 11 prikazuje kako su prosječne vrijednosti probiotičkih bakterija domaćeg rasola u navedenim uvjetima slične, odnosno da bakterije rastu i razmnožavaju se i pri aerobnim i anaerobnim uvjetima. Metodom izlijevanja rastopljene hranjive podloge dobivena je najmanja brojnost, a uzrok tome može biti pogreška tijekom brojanja bakterijskih kolonija s obzirom na to da kolonije rastu i razmnožavaju se unutar hranjive podloge, a ne na njenoj površini kao kod metode širenja razmaza.



Slika 11 Prosječne vrijednosti broja bakterija izoliranih iz uzoraka domaćeg rasola izraslih na MRS hranjivoj podlozi metodom izlivanja rastopljene hranjive podloge(plavi stupac), metodom širenja razmaza u anaerobnim uvjetima (crveni stupac) te aerobnim uvjetima (zeleni stupac). Prikazane su standardne devijacije.

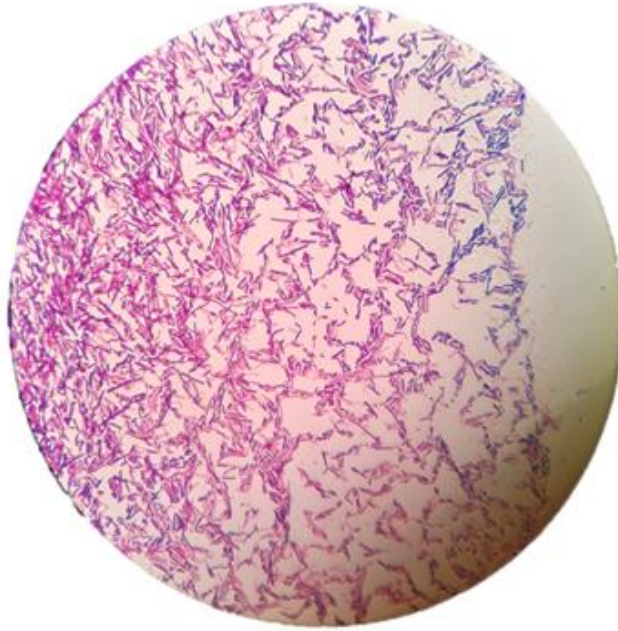
#### 4.2. Fenotipska karakterizacija i identifikacija bakterijskih vrsta domaćeg rasola

Napravljeni su mikroskopski preparati uzoraka domaćeg rasola. Promatranjem preparata na mikroskopu vidljive su velike i male kolonije bijele boje. Svi uzorci domaćeg rasola fenotipski su okarakterizirani metodom bojenja po Gramu. Bojenjem po Gramu dokazano je kako su sve narasle bakterijske vrste gram-pozitivne. U uzorcima K2 (u anaerobnim uvjetima), D2 (u aerobnim i anaerobnim uvjetima) velike bakterijske kulture su štapićastog oblika, a male bakterijske kulture su okruglog oblika. U ostalim uzorcima domaćeg rasola (DB, K1, K3, D1, D3, D4 i D5) bakterijske vrste su okruglog oblika.

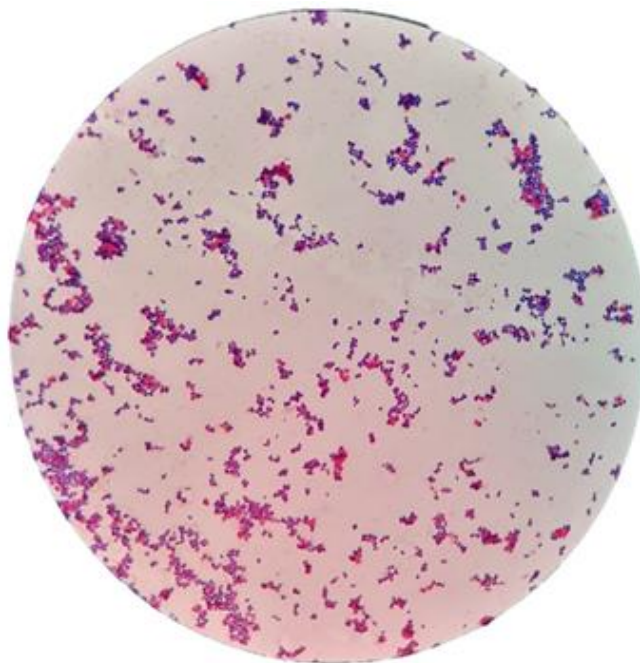
Tehnologijom MALDI-TOF utvrđeno je da su narasle bakterijske vrste *Levilactobacillus brevis*, *Lentilactobacillus buchneri* i *Pediococcus parvulus*.

Tablica 3 Prikaz rezultata metode bojanja po Gramu i identifikacije bakterijskih vrsta MALDI-TOF tehnologijom

| Naziv uzorka                         | Gram pozitivni (+) ili negativni (-) | Oblik      | Identifikacija MALDI-TOF tehnologijom |
|--------------------------------------|--------------------------------------|------------|---------------------------------------|
| DB-AN                                | +                                    | okrugli    | Nije provedena                        |
| K1-AN                                | +                                    | okrugli    | Nije provedena                        |
| K2-AN (male bakterijske kolonije)    | +                                    | okrugli    | Nije provedena                        |
| K2-AN (velike bakterijske kolonije)  | +                                    | štapićasti | <i>Levilactobacillus brevis</i>       |
| K3-AER                               | +                                    | okrugli    | <i>Pediococcus parvulus</i>           |
| D1-AN                                | +                                    | okrugli    | <i>Pediococcus parvulus</i>           |
| D2-AER (male bakterijske kolonije)   | +                                    | okrugli    | <i>Pediococcus parvulus</i>           |
| D2-AER (velike bakterijske kolonije) | +                                    | štapićasti | Nije provedena                        |
| D2-AN(male bakterijske kolonije)     | +                                    | okrugli    | <i>Pediococcus parvulus</i>           |
| D2-AN(velike bakterijske kolonije)   | +                                    | štapićasti | <i>Lentilactobacillus buchneri</i>    |
| D3-AN                                | +                                    | okrugli    | <i>Pediococcus parvulus</i>           |
| D4-AN                                | +                                    | okrugli    | Nije provedena                        |
| D5-AN                                | +                                    | okrugli    | Nije provedena                        |



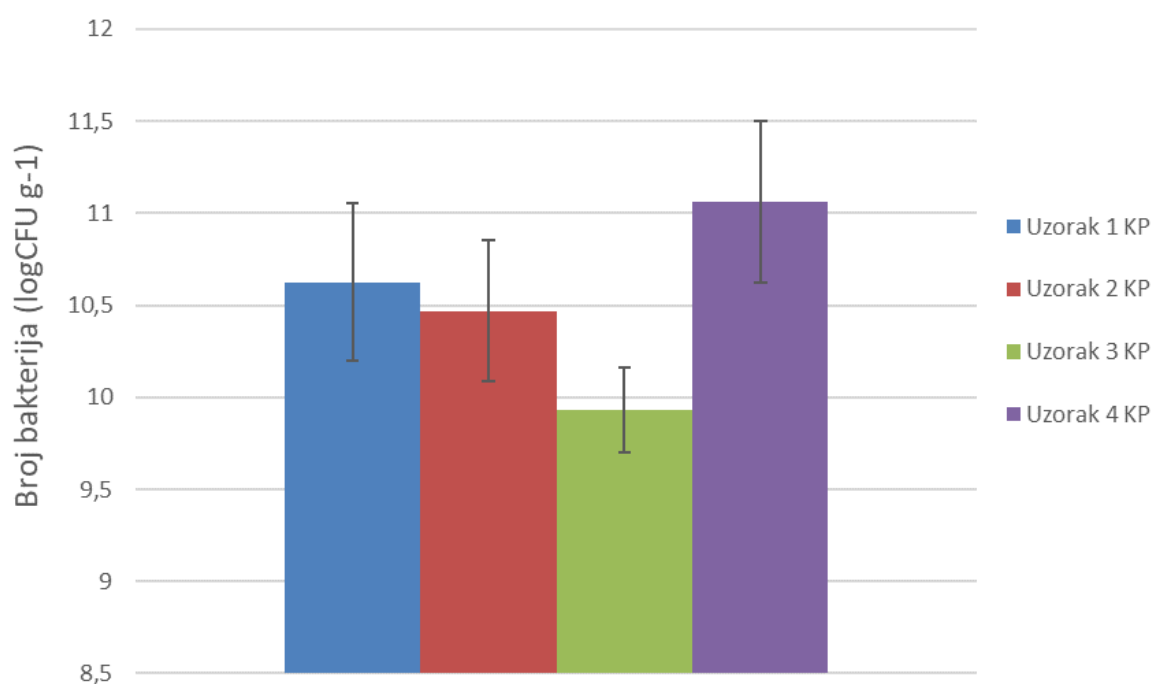
Slika 12 Gram pozitivna bakterija štapićastog oblika, uzorak K2-AN (velike bakterijske kulture). Povećanje 1000 x na svjetlosnom mikroskopu.



Slika 13 Gram pozitivna bakterija okruglog oblika, uzorak D4-AN. Povećanje 1000 x na svjetlosnom mikroskopu.

### 4.3. Brojnost probiotskih bakterijskih kultura u uzorcima kupovnih probiotika

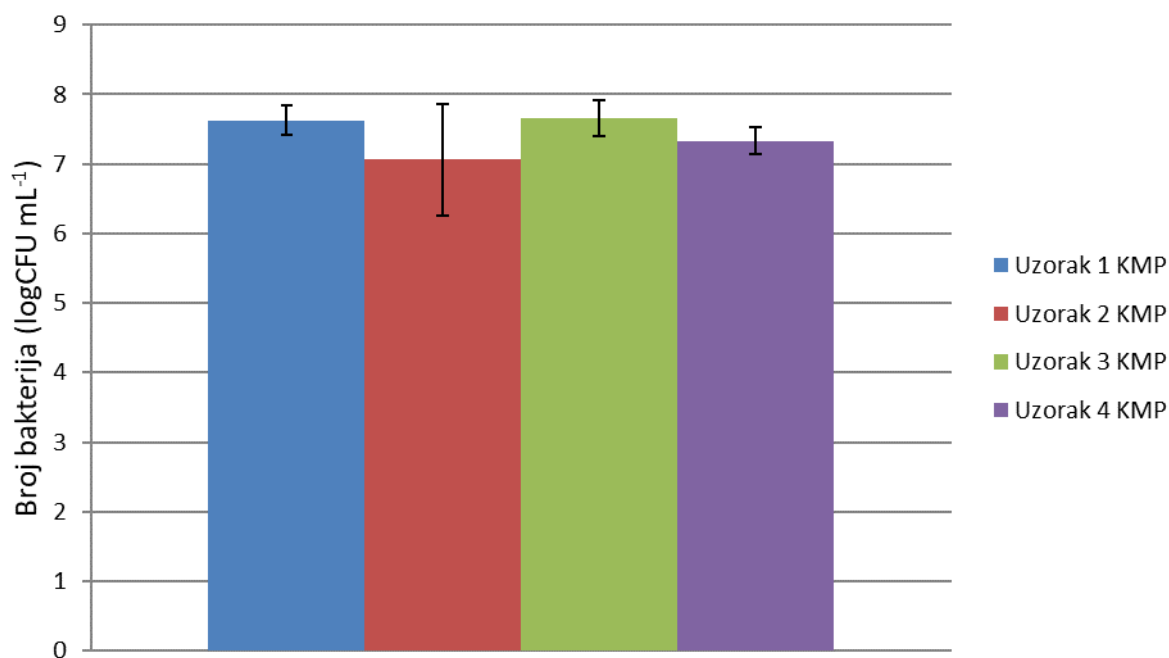
Bakterijske kulture kupovnih probiotika uzgajane su na MRS hranjivoj podlozi u anaerobnim uvjetima, a nakon pet dana inkubacije pri 37°C prebrojane su pomoću brojača kolonija. Brojnost probiotskih bakterija u 1 gramu uzorka ( $\log\text{CFU g}^{-1}$ ), za sve uzorke kupovnih probiotika, prikazane su na Slici 14. ANOVA testom dokazano je da nema značajnih razlika u brojnosti bakterija između uzoraka kupovnih probiotika. Iz Slike 14 može se vidjeti kako nema velikih razlika u brojnosti probiotskih bakterija između korištenih uzoraka. Kupovni probiotici imaju točno definiranu brojnost i bakterijske sojeve koje sadrže. Dobivene vrijednosti broja probiotskih bakterija u uzorcima približne su definiranim vrijednostima samih proizvođača (jedna kapsula sadrži 10 milijardi živih mikroorganizama u 1 gramu što je ekvivalentno broju živih mikroorganizama u 1 mililitru).



Slika 14 Brojnost probiotskih bakterijskih kultura uzoraka kupovnih probiotika, napravljenim metodom širenja razmaza te uzgojenim u anaerobnim uvjetima, koje su izrasle na MRS hranjivoj podlozi nakon inkubacije pet dana na 37°C. Prikazane su prosječne vrijednosti broja bakterija za sve korištene uzorke te njihove standardne devijacije.

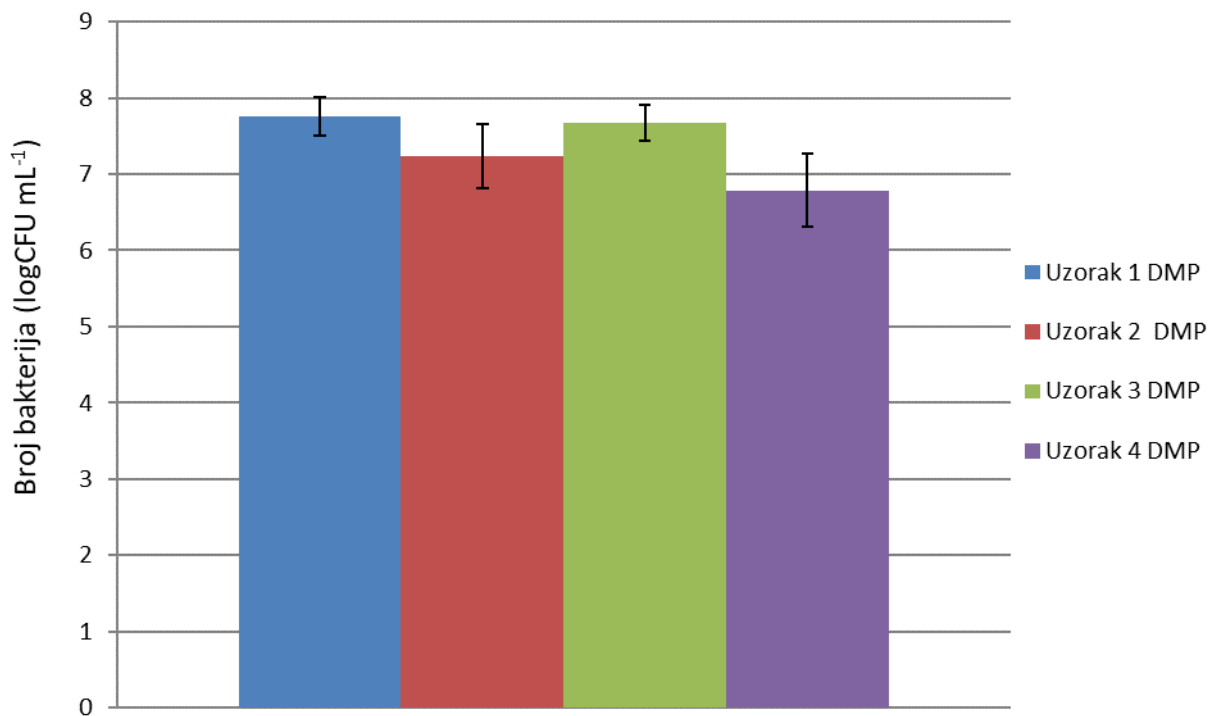
#### 4.4. Brojnost probiotskih bakterijskih kultura u uzorcima kupovnih i domaćih mliječnih proizvoda

Probiotske bakterije kupovnih mliječnih proizvoda uzgajane su na MRS hranjivoj podlozi u anaerobnim uvjetima, a broj izraslih bakterija određen je brojanjem pomoću brojača kolonija nakon pet dana inkubacije na 37°C. Brojnost probiotskih bakterija u 1 mL uzorka ( $\log\text{CFU mL}^{-1}$ ), za sve uzorke kupovnih mliječnih proizvoda, prikazane su na Slici 15. ANOVA testom dokazano je da nema značajnih razlika u brojnosti bakterija između navedenih uzoraka ( $p>0.05$ ).



Slika 15 Brojnost probiotskih bakterijskih kultura uzoraka kupovnih mliječnih proizvoda, napravljenim metodom širenja razmaza te uzgojenim u anaerobnim uvjetima, koje su izrasle na MRS hranjivoj podlozi nakon inkubacije pet dana na 37°C. Prikazane su prosječne vrijednosti broja bakterija za sve korištene uzorke te njihove standardne devijacije.

Domaći mliječni proizvodi napravljeni su miješanjem 5 mL uzorka određenog kupovnog mliječnog proizvoda u 100 mL trajnog mlijeka te su nakon 28 sati uzorci nacijepljeni na MRS hranjivu podlogu metodom širenja razmaza. Inokulirane ploče inkubirane su pet dana na 37°C u anaerobnim uvjetima. Slika 16 prikazuje brojnost probiotičkih bakterija u 1 mL uzorka ( $\log\text{CFU mL}^{-1}$ ) za sve uzorke domaćih mliječnih proizvoda. ANOVA testom utvrđeno je da nema značajnih razlika u brojnosti probiotičkih bakterija između navedenih uzoraka ( $p>0.05$ ).

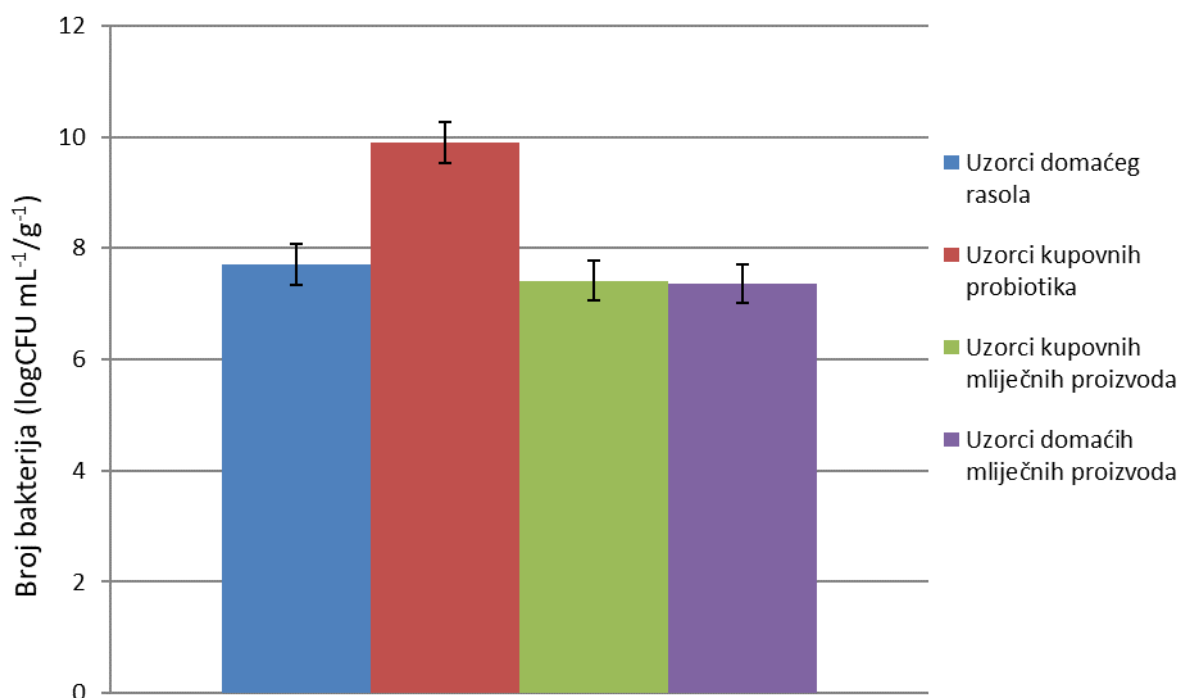


Slika 16 Brojnost probiotičkih bakterijskih kultura uzoraka domaćih mliječnih proizvoda, napravljenim metodom širenja razmaza te uzgojenim u anaerobnim uvjetima, koje su izrasle na MRS hranjivoj podlozi nakon inkubacije pet dana na 37°C. Prikazane su prosječne vrijednosti broja bakterija za sve korištene uzorke te njihove standardne devijacije.



#### 4.5. Usporedba brojnosti probiotskih bakterija domaćeg rasola, kupovnih probiotika te kupovnih i domaćih mliječnih proizvoda

Slika 17 prikazuje prosječnu brojnost probiotskih bakterija u domaćem rasolu, kupovnim probioticima te kupovnim i domaćim mliječnim namirnicama. Brojnosti probiotskih bakterija dobivene su kao prosječne vrijednosti brojnosti pojedinih uzoraka korištenih u radu. ANOVA testom utvrđeno je da postoje značajne razlike u brojnosti bakterija između navedenih uzoraka uzgajanim u anaerobnim uvjetima ( $p < 0.05$ ). Značajne razlike postoje između uzoraka kupovnih probiotika i svih ostalih uzoraka (domaćeg rasola te kupovnih i domaćih mliječnih proizvoda). Pretpostavka je da je uzrok značajnim razlikama to što su kupovni probiotici namijenjeni da se njihovom konzumacijom u organizam unese veliki broj probiotskih bakterija. Između uzoraka domaćeg rasola te kupovnih i domaćih mliječnih proizvoda nema značajnih razlika.



Slika 17 Prosječna brojnost probiotskih bakterija u domaćem rasolu, kupovnim probioticima te kupovnim i domaćim mliječnim proizvodima. Prikazane su i standardne devijacije.

## 5. RASPRAVA

Cilj ovoga diplomskoga rada bio je usporediti brojnost probiotskih bakterija između kupovnih probiotika te kupovnih i domaćih namirnica poput domaćeg rasola te kupovnih i domaćih mliječnih proizvoda. Postavljeno je nekoliko specifičnih podciljeva. Prvi specifični podcilj bio je identificirati probiotske bakterijske vrste u domaćem rasolu tehnologijom MALDI-TOF te ih fenotipski karakterizirati metodom bojanja po Gramu. Korčulanin (1984.) opisao je kiseli kupus kao proizvod spontane mliječno-kisele fermentacije kojoj su uzrok bakterije mliječne kiseline. Proces spontane fermentacije kiselog kupusa odvija se u anaerobnim uvjetima uz dodatak soli. Koncentracija soli utječe na brojnost mikroorganizama (Kwon i sur. 2014.). Dodatak soli ima dvije uloge. Prva je uloga da uzrokuje osmotsku neravnotežu koja izaziva oslobađanje vode i hranjivih tvari iz listova kupusa, a sama je voda medij za rast bakterija koje sudjeluju u procesu fermentacije. Druga je uloga dodatka soli sprečavanje rasta štetnih bakterija (Drašković Berger 2021.).

Tijekom prikupljanja uzoraka domaćeg rasola na tržnicama, prodavači su opisali svoj postupak kiseljenja kupusa. Između korištenih uzoraka nema značajnih razlika u pripremi. Prodavači su prvo očistili glavice kupusa te su dio kupusa ostavili u obliku cijelih glavica ili polovica glavice, a dio su narezali na trake. Na dno posude za fermentaciju su stavili manju količinu soli, zatim su u posudu stavili narezani kupus na trake i na kraju cijele glavice ili polovice glavica kupusa. Nakon svakog sloja kupusa, dodali su sol te kupus pritiskali kako bi otpustio svoj stanični sok. Ukupni postotak dodane soli u uzorcima je oko 2,5-3%. Posudu za fermentaciju su prekrili krpom na koju su stavili drvene daske i kamenje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti fermentacije te kako bi postojao stalni pritisak na kupus. Vrijeme trajanja fermentacije je bilo 4 tjedna. Prema drugim istraživanjima ako je ukupni postotak dodane soli manji od 1% proizvedeni kupus neće biti prihvatljiv za komercijalnu upotrebu, a ako je ukupni postotak dodane soli veći od 3,5% postoji mogućnost da bakterije mliječne kiseline neće rasti u tim uvjetima (Drašković Berger 2021.). S obzirom na ove podatke, ukupni postotak dodane soli u korištenim uzorcima je optimalan.

U samom procesu fermentacije kupusa sudjeluju brojne bakterije mliječne kiseline od kojih su najznačajniji rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus* (Kwon i sur. 2014.). *Pediococcus parvulus* je gram-pozitivna, homofermentativna bakterija mliječne

kiseline okruglog oblika. Razna istraživanja dokazuju probiotičku ulogu navedene bakterijske vrste. Immerstrand i suradnici (2010) proveli su istraživanje kojem je cilj bio procijeniti mogućnost preživljavanja navedene bakterijske vrste u uvjetima gastrointestinalnog trakta. Rezultati istraživanja su pokazali da *Pediococcus parvulus* ima sposobnost preživljavanja u uvjetima probavnog sustava što je važna spoznaja za procjenu probiotičkog potencijala same bakterijske vrste. *Levilactobacillus brevis* je gram-pozitivna, heterofermentativna bakterija mliječne kiseline štapićastog oblika. Provedena su brojna istraživanja o probiotičkom potencijalu navedene bakterijske vrste. Olekhnovich i suradnici (2021) proveli su istraživanje kojem je cilj bio procijeniti utjecaj bakterijske vrste *Levilactobacillus brevis* na ravnotežu crijevnog mikrobioma štakora. Rezultati istraživanja pokazali su kako je primjena navedene bakterijske vrste kod štakora, koji su bili izloženi 30 dana stalnom svjetlu ili stalnoj tami, pospješila ravnotežu crijevnog mikrobioma što se smatra probiotičkim svojstvom. *Lentilactobacillus buchneri* je gram-pozitivna heterofermentativna bakterija mliječne kiseline štapićastog oblika. Brojna istraživanja pokazuju probiotički potencijal ove bakterijske vrste. Cheon i suradnici (2020) proveli su istraživanje s ciljem procjene probiotičkih svojstava bakterijske vrste *Lentilactobacillus buchneri*. U svom radu izolirali su navedenu bakterijsku vrstu iz uzoraka kimchija. Rezultati istraživanja pokazuju probiotička svojstva izolirane bakterijske vrste poput sposobnosti preživljavanja u uvjetima probavnog sustava te uspješne adhezije na crijevne stanice domaćina. Navedena istraživanja pokazuju kako izolirane bakterijske vrste iz uzoraka domaćeg rasola imaju razna probiotička svojstva poput uspješne adhezije na crijevne stanice, sposobnosti preživljavanja u uvjetima gastrointestinalnog trakta te pozitivno djelovanje na ravnotežu crijevne mikroflore, a svojstva potvrđuju kako domaći rasol u svom sastavu sadrži probiotičke bakterije te se zbog toga smatra domaćom fermentiranom namirnicom koja je izvrstan izvor probiotika.

Drugi specifični podcilj ovog rada bio je utvrditi brojnost probiotičkih bakterija u domaćem rasolu metodom određivanja brojnosti bakterija (CFU metoda). Prema istraživanju (Kwon i sur. 2014.) brojnost bakterija mliječne kiseline u domaćem rasolu je između  $10^8$  i  $10^9$  bakterija po mililitru rasola ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ) na kraju samog procesa fermentacije. Beganović i suradnici (2013) proveli su istraživanje u kojem su izolirali i identificirali bakterije mliječne kiseline iz kiselog kupusa te su odredili njihovu brojnost. Izolirane bakterijske vrste su *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus plantarum*, a

brojnost bakterija mliječne kiseline je  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> što je manje od minimalne preporučene dnevne doze koja je potrebna za probiotički učinak. Prema našim rezultatima, prosječna brojnost probiotskih bakterija u domaćem rasolu je  $8,2 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>, a dobiveni broj probiotskih bakterija u ovom radu nalazi se u rasponu preporučene dnevne doze. Između korištenih uzoraka nema značajne razlike u brojnosti probiotskih bakterija. Prema Slici 11 može se utvrditi kako nema značajnih razlika u brojnosti bakterija na hranjivim podlogama naciopljenim metodom širenja razmaza ili pour-plate metodom. Prema rezultatima identifikacije bakterijskih vrsta MALDI-TOF tehnologijom pretpostavka je da su izolirane bakterijske vrste *Levilactobacillus brevis* i *Lentilactobacillus buchneri* rasle na MRS hranjivim podlogama u anaerobnim uvjetima, a da su bakterijske vrste *Pediococcus parvulus* rasle i u aerobnim i u anaerobnim uvjetima. Između uzoraka K1 i D3 uzgojenim u anaerobnim uvjetima postoji značajna razlika. Pretpostavka je da uzorak K1 ima veći broj bakterija roda *Lactobacillus*, koje rastu u anaerobnim uvjetima, pa je ukupna brojnost bakterija veća, a da uzorak D3 sadrži manji broj bakterija roda *Lactobacillus* pa mu je ukupna brojnost bakterija značajno manja u odnosu na uzorak K1.

Treći specifični podcilj ovog rada bio je usporediti bakterijske vrste i njihovu brojnost u domaćem rasolu, kupovnim probioticima te kupovnim i domaćim fermentiranim mliječnim proizvodima. Istraživanjem je utvrđeno da korišteni kupovni probiotici sadrže prosječno  $4,9 \times 10^{10}$  CFU g<sup>-1</sup>, a zastupljeni su bakterijski rodovi, prema uputama proizvođača, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Kefir, drevni fermentirani napitak, značajan je zbog svojih probiotskih svojstava za koja su zaslužne bakterije roda *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* (Surono & Hosono, 2011.). Kefir mora sadržavati najmanje  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> bakterija kako bi poštivao propisane standarde (Azara i sur. 2018.). U ovom radu utvrđeno je da korišteni kupovni i domaći kefir sadrže prosječno  $5,1 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> bakterijskih stanica. Kiselo mlijeko proizvod je fermentacije mlijeka uz prisutnost bakterija mliječne kiseline. U korištenom kupovnom i domaćem kiselom mlijeku utvrđena je brojnost probiotskih bakterija  $3,5 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>. Jogurt je mliječni proizvod koji se dobiva fermentacijom mlijeka uz prisutnost bakterije *Lactobacillus delbrueckii* sssp *bulgaricus*, a dodaju mu se i bakterije roda *Bifidobacterium* koje posjeduju probiotska svojstva (Kok i sur. 2018.). Brojnost probiotskih bakterija u jogurtu ne smije biti manja od  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> (Briceno & Martinez, 1995.). Ovim radom dokazano je da korišteni kupovni i domaći tekući jogurti sadrže

$3,4 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> bakterijskih stanica. Kupovni probiotici te kupovni i domaći mliječni proizvodi u svom sastavu sadrže bakterije roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* koja posjeduju probiotička svojstva.

Probiotičke bakterije prisutne su u brojnim drugim domaćim fermentiranim namirnicama poput kimchija, kombucha, kiselih krastavcima te u mesnim proizvodima poput kobasica. Kimchi je tradicionalno korejsko jelo koje se proizvodi fermentacijom raznog povrća. Brojna istraživanja pokazala su pozitivan utjecaj njegove konzumacije na zdravlje. Naime, konzumiranje ovog jela može uzrokovati smanjenje kolesterola, usporiti starenje te pozitivno djelovati na zdravlje kože. Brojnost probiotičkih bakterija u kimchiju iznosi između  $10^7$ - $10^9$  CFU g<sup>-1</sup>. Kombucha je piće koje se proizvodi fermentacijom čaja pomoću mješane kulture gljive *Kombuche*, a sadrži veliki broj probiotičkih bakterija rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Konzumacija kombuche ima pozitivan utjecaj na zdravlje s obzirom na to da pospješuje probavu, jača imunitet te smanjuje upalne procese. Brojnost probiotičkih bakterija mora iznositi najmanje  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> kako bi se kombucha smatrala izvorom probiotika. Konzumiranje kiselih krastavaca ima blagotvorno djelovanje na zdravlje (Nguyen i sur. 2015.). U fermentaciji krastavaca najzastupljenije bakterije mliječne kiseline pripadaju rodovima *Leuconostoc* i *Lactobacillus*. Prema istraživanjima, konzumacija kiselih krastavaca, kao izvora probiotika, može biti učinkovita u borbi protiv raka slezene, zaštiti jetre te jačanju imuniteta (Alan 2019.). Tijekom proizvodnje kobasica bakterije mliječne kiseline inhibiraju rast nepoželjnih bakterija, a najzastupljeniji bakterijski rodovi su *Lactobacillus* i *Pediococcus* koji inhibiraju rast mikroorganizama iz rodova *Salmonella* i *Escherichia* koje mogu negativno utjecati na zdravlje. Prema istraživanju, broj bakterija mliječne kiseline u fermentiranim kobasicama iznosi između  $10^7$ - $10^9$  CFU g<sup>-1</sup> (Posavec 2021.). Frece i suradnici (2010) proveli su istraživanje na miševima kojim su pokazali probiotički potencijal bakterije *Lactobacillus plantarum*, izolirane iz slavonskog kulena, jer pomaže u održavanju ravnoteže crijevne mikroflore. Konzumiranje domaćih fermentiranih namirnica ima blagotvorno djelovanje na zdravlje jer namirnice u svom sastavu sadrže bakterije mliječne kiseline koje pokazuju probiotička svojstva, zbog toga se domaće fermentirane namirnice smatraju izvrsnim izvorom probiotika.

## 6. ZAKLJUČAK

- Izolirane probiotičke bakterijske vrste domaćeg rasola su *Levilactobacillus brevis* i *Lentilactobacillus buchneri* (gram-pozitivne bakterije štapićastog oblika) te *Pediococcus parvulus* (gram-pozitivna bakterija okruglog oblika).
- Domaći rasol sadrži  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>, a utvrđeno je kako nema značajnih razlika između inokuliranih hranjivih podloga metodom širenja razmaza i metodom izlivanja rastopljene hranjive podloge.
- Kupovni probiotici sadrže značajno veći broj probiotičkih bakterija u odnosu na kupovne i domaće mliječne proizvode, a bakterije su uspješno rasle na MRS hranjivoj podlozi u anaerobnim uvjetima.
- Predlaže se daljnje istraživanje s većim brojem uzoraka domaćih fermentiranih namirnica kako bi se dokazao njihov pozitivan utjecaj na zdravlje te kao poticaj na veću konzumaciju domaćih fermentiranih proizvoda.

## 7. POPIS LITERATURE

A Von Wright and L. Axelsson. (2011.): Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, CRC Press, London.

Alan Y. (2019): Culture fermentation of *Lactobacillus* in traditional pickled gherkins: Microbial development, chemical, biogenic amine and metabolite analysis. National Library of Medicine. PMID: 31413418

Azara R., Saidi I. A, Giyanto (2018.): Yeast and lactic acid bacteria on kefir instant filled with flour of banana. Department of Food Technology, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

Bakić I. (2021.): Probiotici i prebiotici u hrani. Završni rad, Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Split.

Beganović J., Kos B., Leboš Pavunc A., Uroić K., Jokić M., Šušković J. (2013): Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. Microbiological Research, Volume 169, Issues 7–8, 623.-632.

Borchers A. T., Selmi C., Meyers F. R., Keen C. L., Gershwin M. E. (2009.): Probiotics and immunity. Journal of Gastroenterology , Volume 44, 26. – 46.

Božanić R., Matijević B. (2008.): Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, Vol. 58 No. 3, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, 243. - 255.

Briceño A. G., Martínez R. (1995.): Comparison of methods for the detection and enumeration of lactic acid bacteria in yogurt. PubMed PMID: 9382680, 207. – 212.

Bujan M. (2010.): Probiotička aktivnost bakterija mliječne kiseline izoliranih tijekom spontane fermentacije kupusa. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Cheon M-J., Lim S-M., Lee N-K., Paik H-D. (2020): Probiotic Properties and Neuroprotective Effects of *Lactobacillus buchneri* KU200793 Isolated from Korean Fermented Foods. International Journal of Molecular Sciences

Drašković Berger M. (2021): Uticaj soli, temperature i starter kulture na fizičko-hemijske i mikrobiološke promene u toku fermentacije kupusa u glavicama. Doktorska dizertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Džidara P. (2021.): Identifikacija i funkcionalnost bakterijskih sojeva u liofiliziranim probiotičkim pripravcima na hrvatskom tržištu. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Fontana L. , Bermudez-Brito M., Plaza-Diaz J., Muñoz-Quezada S., Gil A. (2013.): Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics, Cambridge University.

Frece J., Čvek D., Kovačević D., Gobin I., Krcivoj T., Markov K. (2010): Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz "slavonskog kulena" kao probiotičke funkcionalne starter kulture. Znanstveni rad, MESO Vol.XII, broj 4.

Fuller R. (1989.): Probiotics in man and animals., 66.

Goktepe I., K. Juneja V., Ahmedna M. (2006.): Probiotics in food safety and human health, 1. – 25.

Goldin B. R. (2019.): Health benefits of probiotics, Cambridge University.

Harvard Health Publishing, Harvard Medical School. (2020.): Health benefits of taking probiotics, preuzeto s <https://www.health.harvard.edu/vitamins-and-supplements/health-benefits-of-taking-probiotics> (datum pristupa 6. 7. 2022., 16:41)

Hauser G., Benjak Horvat I., Zelić M., Prusac M., Velkovski Škopić O. (2017.): Probiotici i prebiotici – koncept. Hepatologija danas-odabrane teme, 95. - 113.

Immerstand T., Paul C., Rosenquist A., Deraz S., Martensson O., Ljungh A., Blucher A., Oste R., Holst E., Karlsoon E. (2010): Characterization of the properties of *Pediococcus parvulus* for probiotic or protective culture use. National Library of Medicine, PubMed, PMID: 20501049

Janković I., Sybesma W., Phothirath P., Ananta E., Mercenier A. (2010.): Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. Current Opinion in Biotechnology, Volume 21, Issue 2, 175. - 181.

Jukić D. (2021): Učestalost korištenja probiotika u prehrani odraslih osoba s područja Splitsko-dalmatinske županije. Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split.

Jurić V. (2020): Razvoj liofiliziranog probiotičkog mikroinkapsulata s dodatkom L-askorbinske kiseline. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Kojundžić M. (2020.): Regulatorni zahtjevi za probiotike. Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Split.



Kok C. R., Hutkins R. (2018.): Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutrition Reviews*, Volume 76, 4. – 15.

Korčulanin, A. (1984.): Mliječno kisele fermentacije pri ukiseljavanju krastavaca, kupusa i maslina. U: *Industrijska mikrobiologija*, interna skripta, V. Johanides, S. Divjak, Z. Duvnjak, S. Grba, A. Korčulanin, V. Marić i S. Matošić (ured.), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 111. - 121.

Kwon D. Y., Nyakudya E., Jeong Y. S (2014.): Fermentation: Food Products. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 113. – 123.

Mayo B., Ventura M., Van Sinderen D. (2008.): *Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications*, 169. – 183.

Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017.): Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. 10. - 21.

Mezedi N. (2011.): Probiotici. Završni rad, / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek

Nguyen K., Dong N., Nguyen H., Le P. (2015): Lactic acid bacteria: promising supplements for enhancing the biological activities of kombucha. *National Library of Medicine*. PMID: 25763303

Olekhovich E., Batotsyrenova E., Yunes R., Kashuro V., Poluektova E., Veselovsky V., Ilina E., Danilenko V., Klimina K. (2021): The effects of *Levilactobacillus brevis* on the physiological parameters and gut microbiota composition of rats subjected to desynchronosis. *National Library of Medicine*, PMID: 34930242

Pandžić I. (2017.): Korištenje bakterija mliječne kiseline u poljoprivrednoj proizvodnji. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek

Parvez S. Malik k.a., Ah Kang S., H.-Y. Kim (2006.): Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* Volume 100, Issue 6, 1171. - 1185.

Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda J.F., Gil-Campos M., Gil A. (2019.): *Advances in Nutrition*, Volume 10.

Petrinović K. (2012.): Probiotici-živi lijekovi. Završni rad, / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek

- Posavec N. (2021): Proizvodnja trajnih kobasica primjenom bakterija mliječne kiseline. Završni rad, Sveučilište Sjever, Koprivnica.
- Radmanić L. (2014.): Mikroflora i zdravlje. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
- Rogelj I. (1994.): Lactic acid bacteria as probiotics. *Mljekarstvo* 44 (4) 277. – 284.
- Sanders M. E. (2008.): Probiotics: Definition, Sources, Selection, and Uses. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 46, Oxford
- Schachtsiek M., Hammes W. P., Hertel C. (2004.): Characterization of *Lactobacillus coryniformis*, Surface Protein Cpf Mediating Coaggregation with and Aggregation among Pathogens, PubMed Central PMID: 15574903.
- Slović A. (2011.): Probiotici – mit ili stvarnost?. Završni rad, / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
- Stamer, J. R. (1979.): The lactic acid bacteria: microbes of diversity., 60. - 65.
- Surono I. S., Hosono A. (2011.): FERMENTED MILKS, Types and Standards of Identity. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, 470. - 476
- Šušković J. (1998.): Mljekarstvo : časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, Vol. 48 No. 3. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska, str.165. - 176.
- Šušković J., Brkić B., Matošić S. (1997.): Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline, Zagreb, 57. - 73.
- Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001.) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* 39, 227. - 235.
- Šušković J. (2009.): Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, Vol. 4 No. 3-4, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 77. - 84.
- Tamime Y. A., Božanić R., Rogelj I. (2007.): Probiotički fermentirani mliječni proizvodi, *Hrčak ID*, 1675, 111. - 134.
- Toedter Williams N., Pharm.D., BCPS, BCNSP (2010.): *American Journal of Health-System Pharmacy*, Volume 67, Issue 6, 449. – 458.

Vanderpool C., Yan F., Polk D. B. (2008.): Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. National Library of Medicine, Pub Med PMID: 1862317.

Zrinjan A. (2021): Utjecaj S-proteina na potencijalna probiotička svojstva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. (2017.): Probiotics and prebiotics, preuzeto s <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-english-2017.pdf> (datum pristupa 7. 7. 2022., 10:25)

## 8. ŽIVOTOPIS

Ana Grizelj rođena je 18.4.1998. godine u Osijeku. Odrasla je u Đakovu gdje je pohađala Osnovnu školu Ivana Gorana Kovačića te Gimnaziju A. G. Matoša. Srednjoškolsko obrazovanje završila je 2017. godine, a iste godine je upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studijskog obrazovanja bila je aktivni član organizacije Znanstvene čarolije te je sudjelovala dva puta u izvedbi popularno-znanstvene manifestacije "Otvoreni dan Kemije". Tijekom završne godine studija odradila je metodičku praksu iz biologije u Prirodoslovnoj Školi Vladimira Preloga te metodičku praksu iz kemije u Osnovnoj školi Janka Draškovića gdje je stekla socijalne vještine i iskustvo rada s učenicima. Tijekom metodičke prakse iz kemije stekla je vještinu rada s učenicima s posebnim potrebama.

Diplomski rad u području mikrobiologije upisuje na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Tomislava Ivankovića.