

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Korištenje probiotičkog kvasca *Saccharomyces
boulardii* u proizvodnji mliječnih proizvoda**

DIPLOMSKI RAD

Lina Ille

Zagreb, lipanj, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

**Korištenje probiotičkog kvasca *Saccharomyces
boulardii* u proizvodnji mliječnih proizvoda**

DIPLOMSKI RAD

Lina Ille

Mentor: Prof.dr.sc. Dubravka Samaržija

Zagreb, lipanj, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Lina Ille**, JMBAG 0066212408, rođen/a dana 25.04.1992. u Varaždinu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Korištenje probiotičkog kvasca *Saccharomyces boulardii* u proizvodnji mliječnih proizvoda

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Line Ille**, JMBAG 0066212408, naslova

Korištenje probiotičkog kvasca *Saccharomyces boulardii* u proizvodnji mliječnih proizvoda
obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

1. Prof.dr.sc. Dubravka Samaržija mentor
2. Doc.dr.sc. Iva Dolenčić Špehar član
3. Prof.dr.sc. Sanja Sikora član

potpisi:

Sažetak

Probiotički mliječni proizvodi, posebice fermentirana mlijeka skupina su funkcionalne hrane koji osim nutritivne vrijednosti sadrže i specifične komponente koje se smatraju promotorima zdravlja. Na tržištu, najpoznatija fermentirana mlijeka iz skupine funkcionalne hrane su: acidofilno mlijeko, biojogurt, AB kultura kefir, Yakult, Mil-Mil, kumis, acidofilno-kvaščevo mlijeko, Miru-Miru i acidofilin. Za njihovu proizvodnju koriste se uglavnom bakterijski probiotički sojevi *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. Od kvasaca, u proizvodnji kefira i kumisa koristi se i kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

Bioterapijski učinak kvasca *Saccharomyces boulardii*, uz bakterijski probiotički soj *Lactobacillus rhamnosus* na humani organizam u tretiranju različitih probavnih poremećaja najviše je znanstveno istražen. Kvasac *Saccharomyces boulardii* smatra se i potencijalnim prirodnim konzervansom zbog svog antagonističkog djelovanja prema drugim mikroorganizmima poput na bakterije *Clostridium difficile* i *Escherichia coli*.

Sposobnost preživljavanja kvasca *Saccharomyces boulardii* i njegov učinak na organoleptička svojstva istraženi su u proizvodnji jogurta od kravljeg i kozjeg mlijeka, kefira, steriliziranog mlijeka, acidofilnog-kvaščevog mlijeka i sladoleda. Kvasac *Saccharomyces boulardii* u proizvodnji tih vrsta mliječnih proizvoda korišten je u formi dopunske kulture. Provedenim istraživanjima, utvrđeno je da kvasac *Saccharomyces boulardii*, osim u proizvodnji kozjeg jogurta, pokazuje s kompetitivnim mikrobnim vrstama iz sastava kultura dobru sposobnost preživljavanja. Osim u kozjem jogurtu, njegova brojnost na kraju vijeka održivosti u tim istraživanim mliječnim proizvodima bila je veća od 10^6 cfu/mL/g. Zbog toga i znanstveno potvrđenog bioterapijskog učinka kvasca *Saccharomyces boulardii* na humani organizam ti se proizvodi mogu smatrati i novim funkcionalnim mliječnim proizvodima. Unatoč tome, korištenje kvasca *S. boulardii* u mljekarskoj industriji još uvijek nije u širokoj primjeni.

Ključne riječi: probiotički mikroorganizmi, preventivni i terapijski učinak, mliječni proizvodi, antagonističko djelovanje, *Saccharomyces boulardii*

Summary

Probiotic dairy products, particularly, fermented milks, are a part of a group of foods with specific health promoting components added to its nutritional value, known as Functional food. The most recognizable, marketed functional probiotic dairy products are Acidophilus milk, Bioyogurt, AB Culture (*L. acidophilus* + bifidobacteria), Kefyr, Yakult, Mil-Mil, Koumiss, Acidophilus – Yeast milk, Miru – Miru and Acidophilin. These products are mostly produced with bacterial fermentation by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. In the production of Kefyr and Koumiss the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is used.

The *Saccharomyces boulardii* yeast and the probiotic strain of the *Lactobacillus rhamnosus* bacteria bio-therapeutic effect on the human organism and its digestive disorders is the most widely, scientifically researched area of application. The *Saccharomyces boulardii* yeast is also considered as a potential natural food preservative due to its antagonistic behaviour towards other microorganisms such as the *Clostridium difficile* and *Escherichia coli* bacteria.

The survival rate of *Saccharomyces boulardii* and its effect on organoleptic quality has been tested in the production of Cow and Goat Milk Yogurt, Kefyr, sterilised milk, Acidophilus- Yeast Milk and Ice Cream. The yeast has been used in the form of a complementary culture for the production of these products. It was shown that the yeast *Saccharomyces boulardii* has good survival rates competitive microorganism species in specific product cultures, excluding survival in Goat Milk Yogurt. With the exception of Goat Milk Yogurt, the number of surviving microorganisms at the end of the dairy products shelf-life was exceeding 10^6 cfu/mL/g. Given this research and *Saccharomyces boulardii* scientifically proven bio-therapeutic effect on the human organism, these products can be considered as new functional dairy products. Despite these facts, *Saccharomyces boulardii* is still not widely used in the dairy industry.

Keywords: probiotic microorganisms, preventive and therapeutic effect, dairy products, antagonistic behaviour, *Saccharomyces boulardii*

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Pregled dosadašnjih istraživanja	2
2. 1. Probiotički koncept.....	2
2. 2. Utjecaj probiotika na humani organizam	3
2. 3. Humana crijevna mikrobiota	5
3. Probiotički mliječni proizvodi	8
3. 1. Probiotičke kulture	8
4. Kvasci	11
5. <i>Saccharomyces boulardii</i>	13
5. 1. <i>Saccharomyces boulardii</i> u medicinskim istraživanjima.....	14
5. 1. 1. Dijareja.....	14
5. 1. 2. Gastrointestinalni sustav	16
5. 2. Potencijalna primjena <i>S. boulardii</i> u prehrambenoj industriji	17
6. <i>Saccharomyces boulardii</i> u mliječnim proizvodima	21
6. 1. Jogurt	21
6. 2. Kefir	23
6. 3. Acidofilno- kvaščevo mlijeko	24
6. 4. UHT mlijeko	24
6. 5. Sladoled	25
7. Zaključak	26
8. Literatura:.....	27
Životopis	31

1. Uvod

Suvremeni način života i prehrambene navike imaju značajan utjecaj na zdravlje svake pojedine osobe. Stres, brzi način života te neizbalansirana i nepravilna prehrana smatraju se direktnom posljedicom modernog načina življenja današnjeg čovjeka. Posljedično tome, u porastu je i broj bolesti primarno povezanih s probavnim sustavom i povećanom tjelesnom težinom. Prehrambena industrija prva je prepoznala potrebu za rješavanje i prevenciju tih problema kroz kreiranje i ponudu nove vrste hrane s dodanom vrijednosti. Odnosno, vrsta hrane koja uz prehrambenu za humani organizam ima i funkcionalnu vrijednost. Funkcionalna vrijednost hrane odnosi se na sastojke ili njene komponente koje se smatraju promotorima zdravlja, ili opće dobrobiti, ili smanjenja rizika za nastanak bolesti, djelovanjem na jednu ili više funkcija u tijelu (Samaržija, 2015c). Mliječna industrija prva je u prehrambenom sektoru prepoznala proizvodnju funkcionalnih proizvoda kao veliki marketinški potencijal. U tu svrhu, mliječni se proizvodi često obogaćuju mikrobnim probiotički sojevi koji povoljno djeluju na zdravlje. Od mikrobnih skupina koji imaju probiotički potencijal, mljekarska industrija najčešće koristi sojeve bakterijskih vrsta rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Propionibacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, te u manjoj mjeri gljivice i kvasce.

Saccharomyces boulardii jedinstveni je probiotički i bioterapijski kvasac koji se kao oralni nadomjesni pripravak uspješno koristi za tretiranje različitih probavnih smetnji. Međutim, korištenje kvasca *S. boulardii* u proizvodnji mliječnih proizvoda započelo je tek nedavno te je relativno malo raspoloživih podataka o njegovom potencijalu u mliječnim proizvodima kao i u prevenciji probavnih i drugih bolesti.

Cilj ovog rada je komparativno i kritički objediniti saznanja o probiotičkom kvascu *S. boulardii* i njegovom učinku na mliječne proizvode te prikazati njegov potencijal u prevenciji i terapiji različitih poremećaja u funkcioniranju humanog organizma. Također, na temelju novih spoznaja cilj je rada opisati i njegove fiziološke karakteristike.

2. Pregled dosadašnjih istraživanja

2. 1. Probiotički koncept

Riječ „probiotik“ osmislio je njemački znanstvenik Werner Kollath 1953. godine, a potječe iz grčkog jezika što znači „za život“ (Hamilton-Miller, 2004). Početak korištenja probiotika u prehrani, iako nesvjesno, veže se uz konzumaciju fermentirane hrane poput mlijeka, povrća i slično (Rolfe, 2000). Theodor Escherich, njemačko-austrijski pedijatar, zaslužan za otkriće bakterije *Escherichia coli* 1885. godine, prvi je pretpostavio da uravnoteženost crijevne mikrobne populacije utječe na ljudsko zdravlje. Nakon tog otkrića, započela su i nastavljaju se brojna istraživanja na tom polju.

Svijest o probioticima odnosno njihova konceptualizacija kao poželjnih sastojaka hrane započinje krajem 19. i početkom 20. stoljeća, zaslugom ruskog znanstvenika Ilje Iliča Mečnikova (Tomičić i sur., 2016). Ilja Ilič Mečnikov 1907. godine je postavio hipotezu o prirodnoj intoksikaciji humanog organizma metabolitima crijevne mikrobne populacije (Kumar i sur., 2015). Također, smatrao je da su bakterije *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* sadržane u fermentiranom mlijeku važne za humano zdravlje i dugovječnost. Neovisno o tome što se Mečnikova hipoteza kasnije ispostavila netočnom zbog nemogućnosti tih bakterija za prihvatanje za sluznicu crijeva ta početna istraživanja temelj su današnjeg općeprihvaćenog probiotičkog koncepta (Kumar i sur. 2015). Henry Tissier, izolirao je iz stolice dojenčadi hranjene majčinim mlijekom bakteriju *Bifidobacterium bifidum*. On je poput Mečnikova pretpostavio da se u crijevima zamjenom proteolitičkih bakterijskih vrsta s bifidiobakterijama, može liječiti dijareja. Japanski znanstvenik Minoru Shirota 1935. godine, uveo je prvu stabilnu kulturu s probiotičkim učinkom u proizvodnju fermentiranog mlijeka – yakult. Iz humanog probavnog trakta on je izolirao bakteriju koja se pokazala otpornom na djelovanje želučane kiseline i žučnih soli. Njemu u čast ta je bakterija nazvana *Lactobacillus casei* Shirota. Kasnije su i brojna druga istraživanja potvrdila njen visoki probiotički potencijal u prevenciji različitih vrsta bolesti (Samaržija, 2015c).

Pozitivno djelovanje probiotika temelji se na saznanju da je disbalans u crijevnoj mikrobioti glavni uzrok nastanku bolesti povezanih s probavnim sustavom. Crijevna mikrobiota čovjeka obuhvaća više od 100 trilijuna simbioznih mikroorganizama koji imaju važnu ulogu u očuvanju zdravlja i sprječavanju nastanka bolesti (Wang i sur., 2017).

Još iz antički vremena znalo se da je mikrobiota crijeva ključ zdravlja, „Sve bolesti kreću od crijeva“ davno je zapisao Hipokrat. Danas se zna da su bakterije prisutne u gastrointestinalnom sustavu čovjeka puno više od njegovih pasivnih stanovnika. One moduliraju učinak potencijalno patogenih bakterija, imaju utjecaj na ritam i učinkovitost probave i metabolizma, sudjeluju u radu imunološkog sustava, a djeluju i na funkcije izvan

crijeva (Binns, 2013). *In vivo* i *in vitro* pokusima dokazano je da crijevna mikrobiota predstavlja učinkovitu barijeru patogenim i oportunističkim mikroorganizmima za njihovu kolonizaciju u crijevima domaćina (Fuller, 1991). Upravo je jedna od karakteristika probiotičkih mikrobnih sojeva njihova sposobnost privremene kolonizacije gastrointestinalnog sustava i sudjelovanje u sastavu crijevne mikrobiote, te u odnosu na patogene mikroorganizme boljem iskorištavanju raspoloživih hranjiva (Samaržija, 2015b).

Znanstvenici Lilly i Stillwell prvi su upotrijebili riječ probiotik u vrlo bliskom smislu današnje definicije 1965. godine kako bi imenovali tvari koje luče mikroorganizmi i kojima potiču rast drugih organizama. Prema preporukama Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda i Svjetske zdravstvene organizacije (2001), probiotici se definiraju kao: „živi mikroorganizmi koji konzumirani u adekvatnoj količini potvrđuju zdravstvene učinke na domaćina“ (Tomičić i sur., 2016).

2. 2. Utjecaj probiotika na humani organizam

Narušena crijevna mikrobiota direktno i indirektno dovodi do različitih poremećaja i razvoja bolesti. Uravnotežena mikrobiota proksimalnog kolona primarno razgrađuje ne razgradljive biljne polisaharide do topljivih poli i oligosaharida. Daljnjom razgradnjom tih spojeva do kratkolančanih masnih kiselina (octena kiselina, propionska kiselina, maslačna kiselina) i drugih metaboličkih spojeva nastaju ključni supstrati za razne metaboličke funkcije ljudskog organizma (jetrena glukoneogeneza, stanična oksidacija). Istovremeno se u lumenu crijeva stvaraju nepovoljni uvjeti za rast patogenih bakterija.

Laktobacili i bifidobakterije prirodni su stanovnici crijevne mikrobne populacije i upravo se smanjenje njihova ukupnog broja smatra glavnim uzročnikom disbalansa crijevne mikrobiote. Disbalans crijevne mikrobiote ima negativan utjecaj na odvijanje fizioloških procesa probavnog sustava, te crijevni okoliš postaje pogodan za rast patogenim mikroorganizmima.

Uneseni hranom probiotički mikrobnj sojevi svoj povoljni učinak ostvaruju stimulacijom saharolitičke i limitiranjem proteolitičke aktivnosti razgradnjom nutrijenata iz hrane koji su dostupni za fermentaciju u debelom crijevu (Samaržija, 2015b). Upravo zbog toga, probiotici su se pokazali učinkovitima u prevenciji i terapiji različitih bolesnih stanja u humanom organizmu (tablica 2.1).

Tablica 2.1. Preventivno i terapijsko djelovanje probiotika

Zdravstveni učinci probiotika
Jačanje prirodne stanične aktivnosti
Poboljšanje imunskog sustava kroz sintezu i biodostupnost nutrijenata
Smanjenje ili prevencija upalnih reakcija
Smanjenje simptoma intolerancije na laktozu
Prevencija alergijskih simptoma
Ublažavanje simptoma iritabilnog crijeva (SIC)
Smanjenje simptoma upalnih bolesti crijeva (UBC)
Prevencija razvitka tumora debelog crijeva
Smanjenje simptoma urogenitalnih infekcija
Smanjenje želučanih infekcija bakterijom <i>Helicobacter pylori</i>
Prevencija nastanka zubnog karijesa
Prevencija kardiovaskularnih bolesti – utjecaj na razinu kolesterola u krvi
Poboljšanje mentalnog zdravlja

Probavni sustav je izrazito kompleksan ekosustav u kojem su prisutni brojni bakterijski sojevi potencijalnog probiotičkog djelovanja. Oni se često unutar iste vrste razlikuju prema svom djelovanju, a mnogi od njih uzgojem u kulturi gube svoja probiotička svojstva. Ipak, unatoč poteškoćama i nedoumicama vezanim uz istraživanja probiotičkog koncepta (Samaržija, 2015b) probiotičko djelovanje može se djelomično objasniti s tri različite teorije:

- inhibicijom rasta nepoželjnih mikroorganizama
- modifikacijom metaboličkih procesa u probavnom sustavu
- stimulacijom imunskog sustava domaćina.

2. 3. Humana crijevna mikrobiota

Crijevna mikrobiota je određena rođenjem i specifična je za svaki organizam ali se tijekom života mijenja omjer i broj mikrobnih vrsta. Specifičnost humane mikrobiote određena je njegovim razvojem koji je pod utjecajem više čimbenika. Prvo, ovisna je o prvotnoj kolonizaciji mikroorganizmima pri rođenju, zatim o okolišnim uvjetima te ranim prehrambenim navikama.

Kolonizacija gastrointestinalnog trakta novorođenčeta započinje pri porodu, traje za vrijeme dojenja i perioda prelaska na krutu hranu te završava s relativno stabilnom mikrobiotom u odrasloj dobi (Salminen i sur., 2006). Humana mikrobiota u prvim danima života ali i kasnije tijekom života uvelike je određena načinom poroda (vaginalni porod ili carski rez) i načinom hranjenja (majčino mlijeko ili adaptirana mliječna formula). Tijekom prvog tjedna života dolazi do kolonizacije crijeva koliformnim bakterijama, laktokokima,

enterokokima, klostridijama i laktobacilima, za čiji je rast odgovoran način prehrane. U novorođenčadi hranjene isključivo majčinim mlijekom, primjerice pet dana nakon rođenja, broj bifidobakterija je $10^9 - 10^{10}$ cfu po gramu i čine više od 25% ukupne crijevne mikrobiote dok se broj ostalih za organizam potencijalno štetnih vrsta smanjuje ispod 1%. Broj bifidobakterija u novorođenčadi hranjene adaptiranim mliječnim formulama pet dana nakon rođenja je nešto niži i iznosi $10^9 - 10^{10}$ cfu po gramu, a broj ostalih, potencijalno štetnih organizama je iznad 1%. Bifidobakterije i laktobacili prvi su dominantni kolonizatori crijeva novorođenčeta koji znatno utječu na ekspresiju gena domaćina, čime se već u najranijoj dobi stvaraju povoljni uvjeti za rast i razvoj stabilne crijevne mikrobiote, a onemogućava rast patogenim bakterijama (Samaržija, 2015b). Crijevna mikrobiota, rana i zrela, jedinstvene su za svakog čovjeka te se nalaze u dinamičnoj ravnoteži (mijenja se) tijekom života (Salminen i sur., 2006). Zrela, potpuno formirana mikrobiota humanog gastrointestinalnog sustava sastoji se od otprilike 100 trilijuna mikroba, od kojih skoro 10^{14} čine bakterije, a manje od 0,1% čine kvasci (Czerucka i sur., 2007). Struktura i sastav mikrobiote crijeva određena je prirodnom dvosmjernom selekcijom na razini domaćina i mikrobiote. Domaćin na hijerarhijski višoj razini utječe na organizaciju niže razine, njezinu stabilnost i visoku funkcionalnost, a niža razina svoj razvoj selektivno usmjerava prema funkcionalno specijaliziranim mikrobnim stanicama, razvitku različitih mikrobnih vrsta međusobno sličnog genoma (Samaržija, 2015b).

Dvosmjerni selekcijski pritisak stvara uravnoteženu mikrobiotu koja potiče ekspresiju različitih gena domaćina s utjecajem na apsorpciju nutrijenata i metabolizam, angiogenezu, zaštitnu ulogu crijevne sluznice i razvoj gastrointestinalnog živčanog sustava. Za provođenje svoje osnovne funkcije, zaštite crijevne sluznice od kolonizacije patogenim i potencijalno patogenim vrstama, crijevna mikrobiota raspolaže mehanizmima direktne kompeticije za limitirane nutrijente i mehanizmom moduliranja imunološkog odgovora domaćina. Složena metabolička aktivnost „poželjnih“ bakterija osigurava energiju za vlastiti rast i razmnožavanje, a apsorbira supstrate i obnavlja energiju i za domaćina (Samaržija, 2015b).

Uzduž probavnog trakta, mikrobiota se razlikuje brojem, vrstom i položajem unutar probavnih organa, a naseljenost je primarno određena varijacijama pH vrijednosti. Najgušće naseljen dio probavnog sustava su distalni dijelovi, terminalni ileus i kolon, dok su želudac i proksimalni dio tankog crijeva najslabije naseljeni zbog vrlo niske pH vrijednosti od 2,5 do 3,5, koji je smrtonosan za većinu mikroba (Czerucka i sur., 2007). Na sluznici crijeva prevladavaju bakterijske vrste koje pripadaju aerobnim rodovima poput *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, i *Klebsiella*, a u lumenu crijeva nalaze se anaerobne vrste rodova *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides*, i *Eubacterium* (Samaržija, 2015b). Od kvasaca prirodno sadržanih u sastavu crijevne mikrobiote, najzastupljeniji je kvasac *Candida albicans*, dok se *Torulopsis glabrata* i *Candida tropicalis* javljaju povremeno. Kvasci se u gastrointestinalnom sustavu nastanjuju u području želuca i kolona, a sposobnost njihovog naseljavanja u toliko različitim uvjetima, želucu niskog pH i kolonu višeg pH, objašnjava se njihovom tolerancijom prema širokom rasponu pH vrijednosti. Naime, kvasci kao skupina

mikroorganizama mogu rasti pri pH vrijednostima od 3 do 8 (optimalan pH 4,5 – 6,5), a neke vrste rastu i pri ekstremno niskoj pH vrijednosti od 1,5 (Czerucka i sur., 2007).

3. Probiotički mliječni proizvodi

Definicijom probiotika propisano je da se adekvatnim unosom tih mikroorganizama potvrđuje zdravstveni učinak na domaćina. Primarno je riječ o blagotvornom, pozitivnom djelovanju na normalne funkcije organizma domaćina, a s obzirom da je jedino specificiran adekvatan unos, putevi i mediji kojima se ti mikroorganizmi unose ostavljeni su na izbor ljudskoj domišljatosti i vlastitom izboru. Jedan od medija unosa probiotičkih mikroorganizama su mliječni proizvodi, prvenstveno fermentirana mlijeka, koja uz direktne suplemente u obliku inkapsuliranih mikroorganizama čine i najzastupljeniji oblik dostupnosti probiotika (Yerlikaya, 2014).

Probiotička fermentirana mlijeka nalaze se u skupini prehrambenih proizvoda koji se nazivaju funkcionalnom hranom. Funkcionalna hrana mora uvijek ostati hrana, ne smije biti u obliku kapsula ili tableta i mora povoljno djelovati u količini koja je normalna u redovitoj prehrani (Bhat, i Bhat, 2011). Probiotička fermentirana mlijeka u potpunosti udovoljavaju tim zahtjevima.

Probiotička skupina fermentiranih mlijeka od standardnih fermentiranih mlijeka razlikuje se prema mikrobnim sojevima koje sadrži. Osim što zadovoljavaju nutritivne i dijetetske potreba djeluje blagotvorno na ljudsko zdravlje, a posebnim funkcionalnim mehanizmima probiotičkih bakterija moguće je postići preventivni te ponekad i čak terapijski učinak na ljudsko zdravlje (Samaržija, 2015c).

Na svjetskom tržištu, najpoznatija su probiotička fermentirana mlijeka: acidofilno mlijeko, biojogurt, AB kultura, kefir, Yakult, Mil-Mil, kumis, acidofilno-kvaščevo mlijeko, Miru-Miru i acidofilin (Yerlikaya, 2014; Samaržija, 2015b).

3. 1. Probiotičke kulture

Probiotičke kulture uključuju probiotičke sojeve mikroorganizama (bakterije i neke kvasce) čija je zadaća uspostava ravnoteže mikrobiote probavnog sustava domaćina te povoljan učinak na cjelokupno zdravlje i stanje organizma.

Danas postoji veliki broj mikroorganizama koji se smatraju probiotičkim vrstama i koji se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda (tablica 3.1), a najčešće su to sojevi bakterijskih vrsta *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Propionibacterium* te neki kvasci (Samaržija, 2015a).

Tablica 3.1. Probiotički sojevi mikrobnih vrsta u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. cellebiosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. gasseri</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. lactis</i>
<i>Streptococcus/Lactococcus</i> spp.	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. diacetylactis</i>
<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. coagulans</i>
<i>Pediococcus</i> spp.	<i>P. cervisiae</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Bacteriodes</i> spp.	<i>B. capillus</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. ruminicola</i> , <i>B. amylophilus</i>
<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>Propionibacterium freundenreichii</i> spp. <i>shermanii</i>
<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Lc. mesenteroides</i>
Gljivice	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Kvasci	<i>Saccharomyces cervisiae</i> , <i>Candida torulopsis</i>

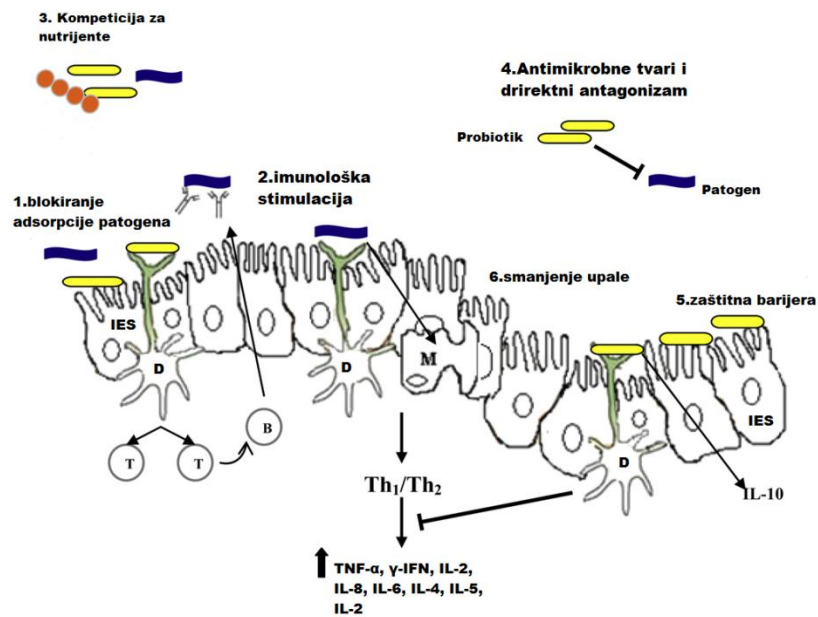
Izvor: Granato i sur. 2010.

Probiotičkim se mikrobnim sojem smatra onaj koji udovoljava kriterijima propisanim od strane Organizacije za hranu i poljoprivredu i Svjetske zdravstvene organizacije (Samaržija, 2015b):

- humano podrijetlo za humanu upotrebu
- dobra karakterizacija do razine soja
- nepatogenost soja (sigurnost)
- sposobnost aktivnosti u proizvodu
- sposobnost preživljavanja u proizvodu
- sposobnost preživljavanja u proizvodnim uvjetima
- rezistentnost na niski pH
- rezistentnost na želučanu kiselinu
- rezistentnost na žučne soli
- sposobnost apsorpcije za sluznicu crijeva
- sposobnost barem privremene kolonizacije gastrointestinalnog sustava (GIT)
- sposobnost inhibitornog djelovanja prema patogenim bakterijama.

Također, probiotici moraju imati sposobnost povoljnog djelovanja na narušenu mikrobnu populaciju crijeva. Njihova sposobnost vraćanja crijevne mikrobne populacije u ravnotežu jedna je od njihovih ključnih karakteristika. Svojim direktnim ili indirektnim utjecajem, probiotički mikroorganizmi moraju sudjelovati u održavanju zdravlja ili povoljno djelovati na zdravlje domaćina.

Glavni mehanizmi kojim probiotički mikroorganizmi djeluju na organizam domaćina i osiguravaju pozitivan učinak su: kompeticija za nutrijentima, kompeticija za površinu (apsorpcija), proizvodnja antimikrobnih i baktericidnih supstanci, modifikacija okolišnih uvjeta (modifikacija crijevne sluznice) i modifikacija imunološkog odgovora specifičnom regulacijom (slika 3.1).



Slika 3.1. Shematski prikaz mehanizma djelovanja probiotičkih bakterijskih sojeva

IES- intestinalne epitelne stanice, D-dendritičke stanice, M-intestinalne M stanice, T-T limfociti, B- B limfociti, IL-interleukini (Izvor: Saad i sur.,2013).

4. Kvasci

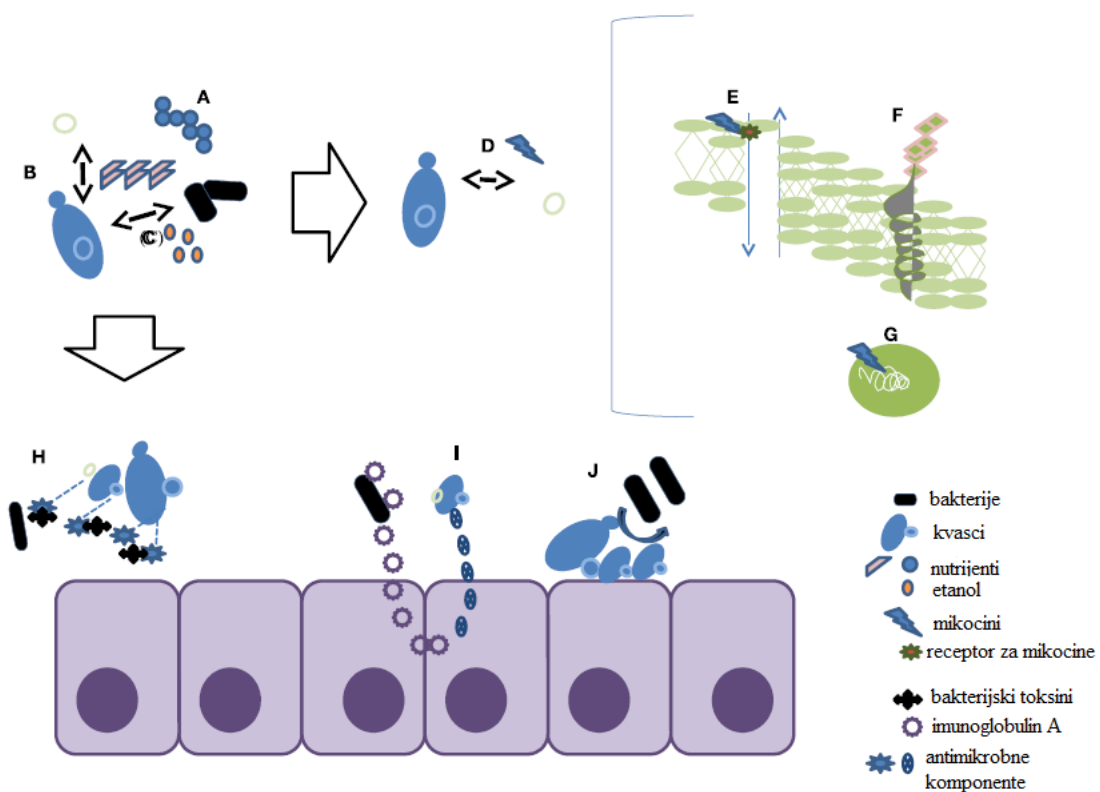
Kvasci su velika, heterogena skupina mikroorganizama, a zbog različitog biološkog djelovanja danas su vrlo interesantni prehrambenoj industriji. U prehrambenoj industriji najviše se koriste kvasci koji pripadaju skupini *Ascomycota*. Unutar te skupine vrste roda *Saccharomyces* znanstveno su najviše istražene. Približno 20 vrsta kvasaca ovog roda iznimno su važne u biotehnologiji. Koriste se za fermentacije, u proizvodnji proteina i vitamina, te za biološku kontrolu. *Saccharomyces cerevisiae* ili pekarski kvasac najpoznatija je vrsta kvasca (Webster i Weber, 2007). Općenito, kvasci su prirodno široko rasprostranjeni eukariotski mikroorganizmi koji nastanjuju razne ekološke niše poput vode, hrane, biljaka, čestica u zraku, ali i mikrobiotu humanog organizma. Važni su u mnogim kompleksni ekosustavima, a vrlo su često i prvi kolonizatori raznih supstrata (Kurtzman i sur., 2011). Osim toga, u interakciji su i s drugim mikroorganizmima bilo simbiozom, mutualizmom, parazitizmom ili kompeticijom za isti izvor hranjivih tvari.

Kvasci su heterotrofni organizmi, a metabolizam energije i ugljika im je usko povezan. Oksidacijom organskih supstrata namiruju potrebe za energijom u obliku adenozin trifosfata (ATP), ugljik koriste za vlastitu biosintezu i skoro sve stanične aktivnosti (Rodrigues i sur., 2006; Hatoum i sur., 2012). Prema potrebama za nutrijentima su skromni, potpuno zadovoljavajuće hranilište sastoji se od izvora ugljika, dušika, fosfata, sulfata, nižih koncentracija kalija, magnezija, kalcija, željeza, cinka i vitamina biotina, tiamina i pantotenske kiseline. Glavni izvor ugljika uglavnom su im heksozni šećeri, a prilagodljivi su prema promijenjenim aerobnim uvjetima (Deak, 2006; Hatoum i sur., 2012). Kvasci mogu biti ne-fermentativni, fakultativno fermentativni i obligatno fermentativni, većinom aerobnog metabolizma. U slučaju anaerobnog metabolizma nastaje alkoholna fermentacija. Također, mogu biti kompetitivni prema nutrijentima, tolerantni su prema visokim koncentracijama etanola i širokom rasponu pH vrijednosti. Imaju sposobnost zakiseljavanja medija u kojem rastu, stvaranja i lučenja antimikrobnih supstanci poput antifungalnih toksina „mikocina“ i antibakterijskih komponenti. Lučenje mikocina i antibakterijskih komponenti smatra se inhibitornom antagonističkom sposobnošću kvasaca. Sve metaboličke karakteristike kvasaca smatraju se osnovom za njihov probiotički učinak.

Mikocini su ekstracelularni proteini ili glikoproteini koji narušavaju funkcije stanične membrane kvasaca koji su podložni njihovom djelovanju preko receptora za te komponente što ih čini toksičnima. Mikocini primarno djeluju na druge kvasce koji su im blisko srodni i imaju zaštitnu ulogu za soj-stvaratelj. Mogućnost tvorbe mikocina imaju mnog vrste rodova *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* i *Zygosaccharomyces* (Golubev, 2006; Hatoum i sur., 2012). Najistraženiji mehanizam djelovanja mikocina na stanične funkcije je mehanizam pri kojem se zaustavlja dioba stanica blokiranjem DNA sinteze, inhibicijom sinteze komponente staničnog zida β -1,3-glukana što dovodi do istjecanja iona iz stanice stvaranjem kanala u citoplazmatskoj membrani (Izgu i Altinbay, 2004; Hatoum i sur., 2012).

Antibakterijsko djelovanje kvasaca još nije u potpunosti razjašnjeno, no kvasci imaju sposobnost stvaranja određenih ekstracelularnih i intracelularnih komponenti inhibitorynog djelovanja prema bakterijama. Pretpostavlja se različitih amina koji mogu biti toksični za bakterijsku stanicu (Viljoen, 2006).

Antagonističke karakteristike kvasaca (slika 4.1) značajne su u biotehnologiji, medicini, veterini i drugim djelatnostima. One doprinose i sigurnosti hrane zbog inhibitorynog djelovanja na patogene mikroorganizme. Također ta svojstva kvasaca mogu utjecati i na senzornu kvalitetu proizvoda te njihov rok trajanja.

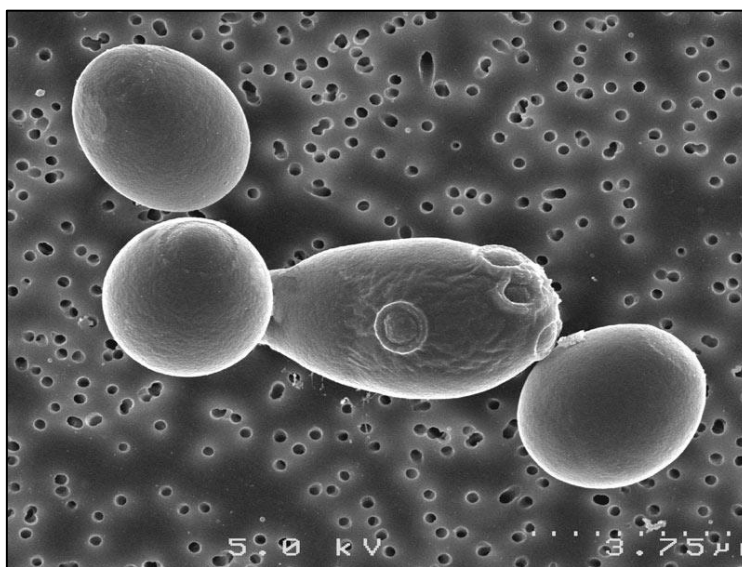


Slika 4.1. Sažeti prikaz antagonističkih svojstava kvasaca.

(A) kompeticija za nutrijentima; (B) izmijene pH; (C) stvaranje visokih koncentracija etanola; (D) mikocini; (E) curenje iona; (F) inhibicija sinteze β -1,3-glukana; (G) blokiranje DNA sinteze; (H) degradacija bakterijskih toksina uz pomoć proteaza; (I) stimulacija imunološkog odgovora; (J) kvasci inhibiraju prihvaćanje bakterija na intestinalne stanice (Izvor: Hatoum i sur., 2012.)

5. *Saccharomyces boulardii*

Kvasac *Saccharomyces boulardii* iz tropskog voća liči (*Litchi chinensis*) u Indokini izolirao je 1923. godine francuski znanstvenik Henri Boulard. Naime, on je uočio da tamošnje stanovništvo liječi dijareju upravo ličijem i mangosteenom (*Garcinia mangostana*) (Liu i sur., 2016). Kvasac *S. boulardii* pripada porodici *Saccharomycetaceae*, koljenu *Ascomycota*, veličine je između 4 i 8 μm , okruglog je ili eliptičnog oblika i tvori askospore (slika 5.1) Raste na standardnom hranilištu za kvasce, sposoban je asimilirati i fermentirati ugljikohidrate i prirodno je rezistentan na antibiotike. Optimalna temperatura rasta kvasaca *S. boulardii* je 37°C što je i fiziološka temperatura čovjekova tijela. Također, dobro podnosi uvjete niske pH vrijednosti od 2 do 4 i otporan je na žučne soli i sokove gušterače. Upravo zbog toga, kvasac *S. boulardii* ima mogućnost primjene u svojstvu probiotika. Osim toga, nema patogena svojstva, a produktima vlastitog metabolizma iskazuje i antipatogeno djelovanje (Czerucka i sur., 2007 Yerlikaya, 2014; Liu i sur., 2016).



Slika 5.1. *Saccharomyces boulardii* snimljena elektronskim mikroskopom

Izvor: <http://probioticsdb.com/wp-content/uploads/2011/03/Saccharomyces-boulardii.jpg>

Identifikacija kvasca *S. boulardii* kao zasebne vrste ili varijeteta vrste *S. cerevisiae* i dalje je predmetom brojnih znanstvenih istraživanja. U literaturi za tu vrstu kvasca često se koristi ravnopravno naziv *S. boulardii* ili *S. cerevisiae* var. *boulardii*.

Kvasac *Saccharomyces boulardii* se najčešće koristi u liofiliziranom obliku u kapsulama ili granulama (slika 5.2) od 1962. godine kada je prvi puta predstavljen na francuskom tržištu kao terapeutik za dijareju. Od 60-ih godina prošlog stoljeća mnogim se

eksperimentalnim i pred kliničkim studijama dokazao njegov protuupalni, antimikrobni, enzimatski, metabolički i antitoksični učinak. Istraživanja korisnosti kvasca *S. boulardii* za organizam domaćina sustavno se provode od 1980 godine. Tako danas postoje mnogobrojni klinički dokazi o njegovoj učinkovitosti (Czerucka i sur., 2007., Yerlikaya, 2014; Liu i sur., 2016). Nadalje, *S. boulardii* je jedini probiotički kvasac znanstveno dokazanog djelovanja dvostrukim slijepim istraživanjima te se danas smatra jednim od najvrjednijih i najučinkovitijih probiotičkih mikroorganizama (Liu i sur., 2016). Osim toga, postoje mnogobrojne pouzdane kliničke studije koje opisuju njegovo terapijsko djelovanje na različite probavne smetnje kod ljudi.



Slika 5.2. Kvasac *S. boulardii* u inkapsuliranom obliku

Izvor: <https://www.amazon.com/Bronson-Saccharomyces-Boulardii-Clinically-Vegetarian/dp/B018YIDZK6>

5. 1. *Saccharomyces boulardii* u medicinskim istraživanjima

5. 1. 1. Dijareja

Dijareja je jedna od najčešćih nuspojava antimikrobne terapije od koje pati gotovo 20% pacijenata. Patogeneza dijareje uzrokovane korištenjem antibiotika nije poznata. No bez sumnje se javlja kao posljedica kvantitativnih i kvalitativnih promjena crijevne mikrobiote. Posljedično tome, olakšana je i kolonizacija crijevne sluznice patogenim mikroorganizmima (Nord i sur., 1986; Bartlett, 1992; Rolfe, 2000).

U više placebo-kontroliranih kliničkih studija meta-analizom kvasac *S. boulardii* je testiran na sposobnost profilaktičkog djelovanja u smanjenju pojavnosti dijareje uzrokovane korištenjem antibiotika. Adam i suradnici (1976) proveli su dvostruko slijepu studiju s

oralnim pripravkom kvasca *S. boulardii* (10^9 cfu/dan) na 388 pacijenata s dijarejom uzrokovanom sedmodnevnom terapijom β -laktamom. Od ukupnog broja pacijenata u pokusnoj skupini dijareja je potvrđena u svega 4,5% pacijenata. Suprotno, u placebo skupini dijareja je potvrđena u 18% slučajeva. Kotowska i suradnici (2005) ispitivali su utjecaj kvasca *S. boulardii* na pojavnost dijareje uzrokovane antibioticima u djece. Istraživanjem je obuhvaćeno 246 djece (132 pokusna skupina i 137 kontrolna skupina) na antibiotskoj terapiji koju su primala dva puta na dan, uz dodatak 250 mg *S. boulardii* oralnog pripravka. Rezultati istraživanja potvrdili su da je pojavnost dijareje bila manja (8%) u djece koja su primala oralni pripravak *S. boulardii* u odnosu na djecu koja su primala placebo (23%). Can i suradnici (2006) također su utvrdili da korištenje oralnog pripravka kvasca *S. boulardii* smanjuje pojavnost dijareje prilikom antibiotske terapije u odnosu na placebo grupu, u omjeru 1,4% : 9% (Czerucka, 2007; Hatoum i sur., 2012).

Bakterija *Clostridium difficile* smatra se uzročnikom dijareje u 20-25% slučajeva tijekom terapije antibioticima. Također ta je bakterija i uzročnik pseudomembranoznog kolitisa u 95% slučajeva. Provedenim istraživanjima utvrđeno je da kvasac *S. boulardii* učinkovito djeluje na smanjenje pojavnosti dijareje uzrokovane bakterijom *C. difficile* (McFarland i sur., 2006). Nadalje, kvasac *S. boulardii* luči enzime, poput peptidaze koja ima sposobnost razgraditi toksine bakterije *C. difficile* ili fosfataze koja inaktivira endotoksine bakterije *E. coli* (Tomičić i sur., 2016). Dvije placebo-kontrolirane studije potvrdile su znatno smanjenje infekcija bakterijom *C. difficile* korištenjem kvasca *S. boulardii*. U nasumičnom placebo-kontroliranom istraživanjima provedenim na 124 pacijenta u kojima su uz standardnu terapiju antibioticima kombinirani oralni pripravci *S. boulardii* (500 mg dnevno/28 dana) utvrđena pojavnost dijareje u odnosu na kontrolnu skupinu je bila 34,6% i 64,7% (McFarland i sur., 1994; Czerucka, 2007). U istraživanjem na 170 pacijenata koju su proveli Surawicz i suradnici (2000) pojavnost dijareje u pacijenata koji su uzimali pripravak *S. boulardii* bila je 16,7% a u placebo skupini 50 %.

Osim dijareje uzrokovane korištenjem antibiotika, vrlo je česta i putnička dijareja, te infektivna dijareja uzrokovana mikroorganizmima svojstvena za zemlje Afrike i istočne Azije. Inače, pojavnost dijareje u tim zemljama pogađa preko milijun ljudi godišnje.

Za pojavu putničke dijareje u 80 % slučajeva uzrok su bakterije *Escherichia coli*, *Shigella* spp. i *Salmonella* spp. Upravo zbog toga, mnoga su istraživanja usmjerena prevenciju pojave putničke dijareje korištenjem probiotičkih sojeva mikrobnih vrsta rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Saccharomyces* (Rolfe, 2000). Kollaritsch i suradnici (1993) ispitivali su učinkovitost *S. boulardii* u prevenciji putničke dijareje na 1016 putnika iz različitih zemalja. Pojavnost dijareje u putnika koji su primali placebo bila je 40%, a u putnika koji su primali pripravak *S. boulardii* (250 mg/dan) bila je 34% odnosno 29% (1 g pripravka/dan). Analizom 12 zasebnih studija McFarland i suradnici (2007) utvrdili su da kombinacija pripravka *S. boulardii*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum* pokazuje najvišu učinkovitost u sprječavanju putničke dijareje (Czerucka, 2007; Hatoum i sur., 2012).

Na pojavu dijareje u pacijenata koji boluju od stečenog sindroma imunodeficijencije (AIDS) ili su HIV pozitivni, kvasac *S. boulardii* se pokazao kao jedini učinkoviti probiotik. Kronična dijareja u slučaju AIDS-a može biti vrlo ozbiljna nuspojava nepoznate etiologije. Učinkovita medicinska terapija za sprečavanje te vrste dijareje ne postoji. No, istraživanjima korištenja kvasca *S. boulardii* u tih pacijenata potvrđeno da je obim i učestalost dijareje manji (Rolfe, 2000). U dvostruko slijepom ispitivanju provedenom na 35 pacijenata s AIDS-vezanom dijarejom, Saint-Marc i suradnici (1995) utvrdili su znatno smanjenu pojavnost dijareje. Naime, u pacijenata koji su primali pripravak u količini od 3 g *S. boulardii* kroz 7 dana, njih 61 % nije razvilo dijareju kao simptom bolesti u usporedbi s 12 % pacijenata iz placebo skupine (Hatoum i sur., 2012). Učinkovitost kvasca *S. boulardii* u liječenju dijareje, ovisi o dozi pripravaka i vrsti dijareje (Kelesidis i Pothoulakis, 2011). Primjerice, za HIV/AIDS uzrokovanu dijareju potrebna je viša doza pripravka *S. boulardii* (3g/dan) od standardnih pripravaka (250mg/dan).

5. 1. 2. Gastrointestinalni sustav

Oralni nadomjesni pripravci kvasca *S. boulardii* koriste se i u terapiji nekih kroničnih upalnih procesa gastrointestinalnog sustava. Primjerice, Chronove bolesti, sindroma iritabilnog kolona (IBS) i ulceroznog kolitisa. U slučaju Chronove bolesti provedena je pilot studija na 31 pacijentu u remisiji svrstanih u pokusnu i placebo skupinu. Istraživanja je trajalo 3 mjeseca tijekom kojeg su pacijenti nastavili primati propisanu terapiju. Pokusna skupina pacijenata pokazala je značajno smanjenje u permeabilnosti kolona čime se znatno smanjio rizik od bakterijskih translokacija unutar gastrointestinalnog sustava (Garcia i sur., 2008). U dvostruko slijepom istraživanju provedenom na 20 pacijenata u trajanju 7 tjedana, pokretljivost crijeva i učestalost stolice znatno se smanjila uzimanjem oralnog pripravka *S. boulardii* (Plein i Hotz, 1993). Jednostruko slijepo istraživanje provedeno na 32 pacijenta u remisiji pokazalo je pogoršanje bolesti u 6 % pacijenata pokusne i u 38 % pacijenata placebo skupine (Guslandi i sur., 2000).

Učinkovitost pripravaka *S. boulardii* na IBS primarno je vezana uz poboljšanje kvalitete života ljudi oboljelih od te bolesti. Postoje naznake da se zbog specifičnog mehanizma izmjene kretanja T stanica koje se akumuliraju u mezenteričkim limfnim čvorovima može limitirati infiltracija T stanica pomoćnica tipa 1. Zbog toga se smanjuje proinflammatorno djelovanje citokina na sluznicu kolona (Hatoum i sur., 2012). Također, dvostruko slijepo studije koje su provedene na 1404 pacijenata potvrdile su smanjenje općih simptoma IBS-a (McFarland i Dublin, 2008; Kelesidis i Pothoulakis, 2011).

Općenito, probiotici se također već neko vrijeme koriste kao dodatak terapiji ulceroznog kolitisa s ciljem produženja vremena remisije. Za potrebe pilot istraživanja, korištena je

kombinacija lijeka mesalazin (3 g/dan) i pripravka *S. boulardii* (250 mg/3 x/ dan) u trajanju od 4 tjedna u liječenju 25 pacijenata sa slabijim do umjerenim ulceroznim kolitisom. Poboljšanje općeg stanja utvrđeno je u 68% pacijenata (Guslandi i sur., 2003; Kelesedis i Pothoulakis, 2011).

Prema istraživanjima Marcia, (2009) i Tomičić i sur. (2016), učinkovitost probiotičkog djelovanja *S. boulardii* kao terapeutika može se pripisati sljedećim mehanizmima djelovanja:

- interakcije s patogenim kolonizatorima sluznice gastrointestinalnog sustava bez vlastite kolonizacije
- sposobnosti modulacije imunskog odgovora domaćina stimulacijom proizvodnje imunoglobulina A
- reguliranju ravnoteže unutar crijevne mikrobiote
- stabilizaciji zaštitne uloge sluznice crijeva i induciranju enzimske aktivnosti u korist apsorpcije hranjiva promoviranjem proizvodnje saharida poput laktaze, sukroze, maltaze i N-aminopeptidaze koje poboljšavaju apsorpciju na četkastoj prevlaci sluznice crijeva
- vraćaju u ravnotežu koncentracije kratkolančanih masnih kiselina u kolonu neophodnih za pravilnu apsorpciju vode i elektrolita

5. 2. Potencijalna primjena *S. boulardii* u prehrambenoj industriji

Interakcija kvasca *S. boulardii* s patogenim kolonizatorima gastrointestinalnog sustava testirana je utvrđivanjem njegovog inhibitornog djelovanja na različite vrste bakterije (Niamah i sur., 2017). Istraživanja su provedena za 26 bakterijska izolata izoliranih iz mlijeka, ribe, zemlje, mesa, zubi, opekline te uzoraka tonzilitisa. Inhibicijsko djelovanje kvasca na te izolate uspoređivano je mjerenjem njihovog rasta u tekućem i na čvrstom bakteriološkom hranilištu. Inhibitorni učinak kvasca *S. boulardii* na pojedinačne bakterijske vrste prikazan je tablicom 5.1. i slikom 5.3.).

Mjerenje stupnja inhibicije na krutom mediju izvršeno je nasađivanjem bakterijskih izolata u tri odvojena područja po agar hranilištu (područja promjera 6 mm) te dodavanjem ekstrakta metabolita kvasca u svako područje (50, 75 i 100 μ L) koji su zajedno hlađeni u uvjetima običnog hladnjaka kroz 2 sata a zatim inkubirani na 37 °C na 24 sata nakon čega su mjerene zone inhibicije. Kontrolni uzorak za oba medija bili su čisti bakterijski izolati na hranjivim medijima. Stupanj inhibicije u tekućem mediju mjerio se miješanjem po 3 ml bakterijskog izolata i ekstrakta metabolita kvasca, omjer 1:1, 10^6 – 10^8 cfu/ml, u hranjivoj juhi koja je također inkubirana na 37 °C kroz 24 sata. Gustoća rasta mjerena je pomoću optičkog spektrometra pri 600 nm, a postotak inhibicije izračunat je prema formuli: % inhibicije = (uzorak bez ekstrakta metabolita kvasca – kontrolni uzorak čistog bakterijskog

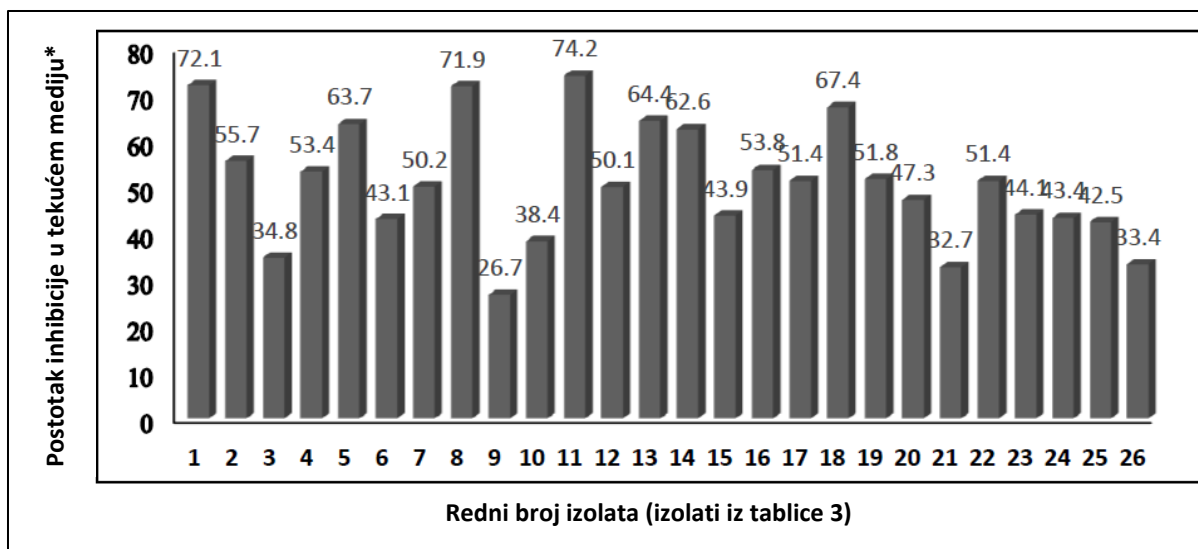
izolata) / uzorak bez ekstrakta metabolita kvasca X 100. Razlike u učinkovitosti inhibicijskog djelovanja na pojedinačne bakterijske vrste pripisuju se strukturnim razlikama u građi receptora sadržanih u bakterijskoj staničnoj stijenci (Niamah, 2010). Metaboliti *S. boulardii* učinkovito inhibiraju bakterijske vrste uzročnike kvarenja hrane kao i patogene bakterije prisutne u hrani. Stupanj inhibicije kvasca *S. boulardii* na te izolate bio je veći povećanjem koncentracije inhibitornih metabolita. Posljedično tome, kvasac *S. boulardii* može se koristiti i u svojstvu prirodnog konzervansa u određenim vrstama hrane (Niamah i sur., 2017).

Tablica 5.1. Inhibitorno djelovanja metabolita kvasca *S. boulardii* na bakterijske izolate izolirane iz različitih izvora na čvrstoj hranjivoj podlozi.

Redni broj	Bakterijski izolat	Zona inhibicije (dijametar) u milimetrima*		
		100 μ L \pm SD	75 μ L \pm SD	50 μ L \pm SD
1	<i>Bacillus cereus</i>	35 \pm 0,03	29 \pm 0,03	27 \pm 0,04
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	24 \pm 0,06	22 \pm 0,05	17 \pm 0,01
3	<i>Citrobacter</i> spp.	23 \pm 0,02	21 \pm 0,02	17 \pm 0,09
4	<i>Escherichia coli</i> ^a	29 \pm 0,03	26 \pm 0,01	24 \pm 0,08
5	<i>Escherichia coli</i> ^b	27 \pm 0,02	24 \pm 0,08	22 \pm 0,02
6	<i>Escherichia coli</i> ^c	23 \pm 0,07	20 \pm 0,00	17 \pm 0,02
7	<i>Escherichia coli</i> ^d	23 \pm 0,09	20 \pm 0,02	17 \pm 0,06
8	<i>Escherichia coli</i> ^e	34 \pm 0,01	29 \pm 0,07	25 \pm 0,04
9	<i>Escherichia coli</i> ^f	18 \pm 0,05	15 \pm 0,01	12 \pm 0,03
10	<i>E. coli</i> O ₁₅₇ : H ₇	22 \pm 0,02	18 \pm 0,08	15 \pm 0,09
11	<i>Enterobacter</i> spp.	37 \pm 0,02	34 \pm 0,03	30 \pm 0,08
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^a	28 \pm 0,05	25 \pm 0,05	23 \pm 0,05
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	27 \pm 0,07	25 \pm 0,07	22 \pm 0,05
14	<i>Kocuria kristinae</i>	28 \pm 0,03	25 \pm 0,04	22 \pm 0,07
15	<i>Micrococcus</i> spp.	22 \pm 0,04	20 \pm 0,01	18 \pm 0,04
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a	24 \pm 0,04	22 \pm 0,09	19 \pm 0,00
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^b	24 \pm 0,01	22 \pm 0,04	18 \pm 0,05
18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^c	30 \pm 0,09	27 \pm 0,02	25 \pm 0,04
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^d	28 \pm 0,10	25 \pm 0,09	22 \pm 0,06
20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^e	21 \pm 0,08	19 \pm 0,06	16 \pm 0,02
21	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	25 \pm 0,03	22 \pm 0,02	20 \pm 0,09
22	<i>Staphylococcus aureus</i> ^b	27 \pm 0,02	24 \pm 0,05	21 \pm 0,04
23	<i>Staphylococcus aureus</i> ^c	23 \pm 0,01	19 \pm 0,06	15 \pm 0,07
24	<i>Staphylococcus aureus</i> ^d	24 \pm 0,03	20 \pm 0,03	18 \pm 0,05
25	<i>Staphylococcus aureus</i> ^e	24 \pm 0,06	21 \pm 0,02	19 \pm 0,09
26	<i>Vibrio cholerae</i>	21 \pm 0,02	19 \pm 0,05	16 \pm 0,02
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^d	28 \pm 0,10	25 \pm 0,09	22 \pm 0,06
20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^e	21 \pm 0,08	19 \pm 0,06	16 \pm 0,02
21	<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	25 \pm 0,03	22 \pm 0,02	20 \pm 0,09
22	<i>Staphylococcus aureus</i> ^b	27 \pm 0,02	24 \pm 0,05	21 \pm 0,04
23	<i>Staphylococcus aureus</i> ^c	23 \pm 0,01	19 \pm 0,06	15 \pm 0,07
24	<i>Staphylococcus aureus</i> ^d	24 \pm 0,03	20 \pm 0,03	18 \pm 0,05
25	<i>Staphylococcus aureus</i> ^e	24 \pm 0,06	21 \pm 0,02	19 \pm 0,09
26	<i>Vibrio cholerae</i>	21 \pm 0,02	19 \pm 0,05	16 \pm 0,02

Izvor: Niamah i sur., 2017.

– srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; * broj ponavljanja= 3; a-f označavaju različite izolate



Slika 5.3. Inhibitorno djelovanja metabolita kvasca *S. boulardii* na bakterijske izolate izolirane iz različitih izvora na tekućoj hranjivoj podlozi.

* Postotak inhibicije izračunat prema formuli: % inhibicije = (uzorak bez ekstrakta metabolita kvasca – kontrolni uzorak čistog bakterijskog izolata) / uzorak bez ekstrakta metabolita kvasca X 100 ; broj ponavljanja = 3. (Izvor: Niamah i sur., 2017).

6. *Saccharomyces boulardii* u mliječnim proizvodima

Najzastupljeniji oblik dostupnosti probiotika u ljudskoj prehrani su mliječni proizvodi a osobito fermentirana mlijeka te inkapsulirani probiotički mikrobnj sojevi dostupni u dodatcima prehrani.

Mljekarska industrija, u usporedbi s ostalom prehrambenom industrijom najbrže na tržište isporučuje nove funkcionalne prehrambene proizvode. Najčešće za tu se svrhu koriste probiotički bakterijski sojevi koji se u formi kultura koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Rjeđe se u sastavu kultura koriste određene vrste probiotičkih kvasca, a mogućnost korištenje i kvasca *S. boulardii* je u eksperimentalnoj fazi. Između ostalog, poznato je da kvasac *S. boulardii* ima sposobnost jakog proteolitičkog djelovanja i da stvara više različitih peptidaza koje mogu razgrađivati i proteine mlijeka. Također, ta vrsta kvasca ima i sposobnost stvaranja visokih koncentracija vitamina B kompleksa. Zbog tih sposobnosti utemeljena je pretpostavka da korištenje kvasca *S. boulardii* u mljekarskoj industriji može služiti za poboljšanje rasta bakterija iz sastava kultura u mlijeku (Niamah, 2017). Međutim za njegovo korištenje u svojstvu probiotičke kulture provode se brojna vrlo kompleksna istraživanja (Yerlikaya, 2014). U svojstvu probiotičkog kvasca *S. boulardii* je testiran u proizvodnji jogurta, kefira, acidofilno-kvašćevog mlijeka, toplinski obrađenog mlijeka na >135°C (UHT¹ mlijeka) i sladoleda.

6. 1. Jogurt

Hattingh i Viljoen (2001) za proizvodnju jogurta koristili su tekući (YNB broth²) pripravak probiotičkoj soja *S. boulardii* ATCC 74012. Kvasac je najprije uzgojen na modificiranoj hranjivoj podlozi za kvasce, a potom je pomiješan sa sterilnom vodom da se dobije minimalna koncentracija kvasca u inokulumu od 10⁶ cfu/ml. Tako pripremljeni inokulum u količini od 2,5% korišten je za proizvodnju standardnog i jogurta proizvedenog od steriliziranog mlijeka (UHT postupak) te voćnog jogurta. Nakon proizvodnje jogurta su u kontroliranim uvjetima pohranjeni na temperaturi od 5°C tijekom 29 dana. Analizom je utvrđen nepromijenjen broj kvasca sadržanih u inokulumu od 7,6 log₁₀ cfu/ml u standardnom i UHT jogurtu dok se u voćnom jogurtu početna populacija kvasca povećala na 8,1 log₁₀ cfu/ml. Porast broja kvasca *S. boulardii* u voćnom jogurtu može se pripisati većoj dostupnosti fermentiranih šećera, i derivata saharoze i fruktoze sadržanih u voćnom dodatku. Neovisno što *S. boulardii* ne metabolizira laktozu, on ima sposobnost u mlijeku

¹ Ultra High Temperature (UHT)- toplinska obrada mlijeka na > 135°C (Izvor: <https://www.tetrapak.com/processing/uht-treatment>)

² Yeast Nitrogen Base Broth- tekuća dušična suspenzija za kvasce (Izvor: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q30007>)

koristi dostupne organske kiseline, galaktozu i glukozu derivirane bakterijskim metabolizmom laktoze iz sastava jogurtne kulture. Navedeno istraživanje potvrdilo je sposobnost preživljavanja probiotičkog soja *S. boulardii* ATCC 74012 u jogurtu 29 dana u broje većem od 10^6 cfu/ml (Pandiyan i Kumaresan, 2013. Pema usvojenim kriterijima da bi bilo koji mikrobnj soj imao status probiotičkog soja, između ostalog, mora imati u bilo kojem prehrambenom proizvodu sposobnost preživljavanja u broju većem od 10^6 cfu/ml do kraja njegova vijeka održivosti.

Slično istraživanje provedeno je za standardni (klasični) jogurtu koji je uz jogurtnu kulturu inokuliran s pripravkom *S. boulardii* (43×10^6 cfu/ml), u količinama od 1%, 2% i 3%. Potom je jogurt inkubiran na 37°C do kompletne koagulacije i pohranjen na 4°C kroz 21 dan. Kontrolna skupina jogurta inokulirana je s 5 % klasične jogurtne kulture (92×10^8 cfu/ml). Brzina snižavanja pH vrijednosti odnosno brzina zakiseljavanja mlijeka bila je manja za jogurte s dodatkom *S. boulardii* inokuluma u odnosu na kontrolni jogurt. Utvrđene pH vrijednosti nakon završene fermentacije za jogurte s dodatkom 1%, 2% i 3% inokuluma bile su 4,18; 4,12 i 4,05 a pH vrijednost kontrolnog jogurta bila je 4,22. Koncentracija slobodnih aminokiselina (SAK) kao posljedica proteolitičke aktivnosti povećala se kod svih jogurta inokuliranih kvascem *S. boulardii*, ovisno o dužini trajanja fermentacije. Za jogurte s dodatkom 1%, 2% i 3% inokuluma kod kojih je fermentacija trajala manje od 6 sati, vrijednosti SAK bile su 70, 85, i 95 µg/ml, a za kontrolni jogurt 50 µg/ml. Fermentacija duža od 6 sati utjecala je na daljnje povećanje koncentracije SAK na 215, 230 i 250 µg/ml za jogurte s dodatkom 1%, 2% i 3% inokuluma dok je u kontrolnom jogurtu koncentracija SAK bila 200 µg/ml.

Dodatak *S. boulardii* inokuluma ima značajan ($p \leq 0,05$) utjecaj na kapacitet zadržavanja vode u jogurtu. U jogurtu s dodatkom 3% inokuluma kapacitet za zadržavanje vode bio je 50%, a kontrolnog jogurta 40%. Tako, inokulacija kvascem *S. boulardii* od 1% smanjuje mogućnost sinereze za 88%, od 2% za 86% a od 3% za 85%). Za usporedbu, sinereza kontrolne skupine jogurta bila je 90%. Osim toga, *S. boulardii* inokulum djeluje sinergistički na klasičnu kulturu jogurta i pospješuje njeno preživljavanje. Utvrđeno je da nakon 21 dan pohrane klasična jogurtna kultura u svom sastavu ima $7,53 \log_{10}$ cfu/g *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, $7,55 \log$ cfu/g *Streptococcus thermophilus* i $6,31 \log$ cfu/g *S. boulardii*. Također, inokulumi s dodatkom 2% i 3% kvasca *S. boulardii* imaju pozitivan učinak na reološka i kemijska svojstva jogurta. Populacija živih kvasca veća od 10^6 cfu/g prisutna u jogurtu 21 dan pohrane zadovoljava kriterije za njegovo svrstavanje u skupinu probiotičkih jogurta (Niamah, 2017).

Provedeno je i istraživanje primjene *S. boulardii* pripravka u jogurtu od kozjeg mlijeka. Proizvedena su 3 jogurta, jogurt 1- kontrolni jogurt s dodanom jogurtnom kulturom), jogurt 2 - jogurt s dodanom jogurtnom kulturom i *S. boulardii* pripravkom, jogurt 3 – jogurt u koji je *S. boulardii* dodan nakon inkubacije jogurtnom kulturom. Za proizvodnju jogurta korištena je klasična jogurtna kultura (10^7 cfu/ml) dok je u jogurt 2 još dodan *S. boulardii* kvasac (10^7 cfu/ml). Uzorci su pohranjeni na 6°C kroz 28 dana. Mjerenjem brojnosti populacije utvrđene

su najviše vrijednosti, nakon 3 dana pohrane za jogurt 3 ($5,6 \log_{10}$ cfu/g) i nakon 10 dana za jogurt 2 ($6,4 \log_{10}$ cfu/g). Nakon 28 dana pohrane, brojnost je bila $4,9 \log_{10}$ cfu/g za jogurt 2 i $4,7 \log_{10}$ cfu/g za jogurt 3. U usporedbi s jogurtom od kravljeg mlijeka gdje broj *S. boulardii* od 10^7 cfu/g ostaje stabilan do 29 dana pohrane (Hattingh i Viljoen, 2001; Karaolis i sur., 2013) kompatibilnost kozjeg mlijeka za izradu probiotičkog jogurta s kvascem *S. boulardii* je značajno niža. Međutim, temperatura inkubacije u navedenom istraživanju bila je viša od optimalne za *S. boulardii* što može biti uzrokom slabijeg rasta. Ipak, kao i u prethodnom istraživanju, utvrđeno je da *S. boulardii* poboljšava preživljavanje bakterija iz sastava klasične jogurtne kulture kroz 28 dana i u kozjem mlijeku.

Senzorno ocjenjivanje kozjih jogurta provodilo se svaka 3 dana. Utvrđen je jaki „kozji“ okus i miris u jogurtu 1 za razliku od jogurta 2 i 3 koji su bili blažeg okusa i mirisa. Nadalje, promjene u okusu jogurta utvrđene su u sredini na kraju njihove pohrane. Sredinom pohrane u jogurtima 2 i 3 bio je nešto izraženiji okus po etanolu uz pojavu intenzivnije sinereze, a pri samom kraju pohrane jogurt 1 razvio je nepoželjan izrazito kiseli okus uz pojavu grudica, dok je jogurt 3 imao jaki okus po etanolu i intenzivnu sinerezu. Jogurt 2 imao je najbolja senzorna svojstva i ocijenjen je kao najbolji, a jogurt 3 kao najlošiji zbog prejakog okusa etanola. Iako je etanol očekivan kao metabolit kvasaca, njegove previsoke koncentracije odbojne su potrošačima. Skupnim ocjenjivanjem poželjnosti takvih proizvoda, 13 od ukupno 16 ocjenitelja (81, 3%), potencijalnih potrošača, iskazalo je zainteresiranost za kupovinu takvih proizvoda koje su ocijenili kao ugodne, zadovoljavajuće teksture i okusa, a samo je jedan ocjenitelj istaknuo jaki „kozji“ okus. Kako bi se kozji jogurt s kvascem *S. boulardii* mogao plasirati kao nutraceutik potrebno je provoditi daljnja istraživanja.

6. 2. Kefir

Kefir je tradicionalno fermentirano mlijeko koje se proizvodi na području istočne Europe sve do Mongolije. Popularan je zato što je prirodan probiotik i ljudi od početka njegove proizvodnje znaju za dobrobit koju donosi zdravlju ljudskog organizma. Kefir, kao i druga probiotička fermentirana mlijeka sadrži žive mikroorganizme. Ti mikroorganizmi sposobni su kompetitivno djelovati na patogene mikroorganizme i sudjelovati u uspostavi ravnoteže poželjne mikrobiote crijeva. S obzirom da kefirna kultura standardno ne sadrži kvasac *S. boulardii* provedeno je istraživanje njegovog djelovanja i funkcionalnosti u uvjetima kefira.

Ivanova i suradnici (2012) proveli su ispitivanje fermentacija 7 uzoraka 0,400 l obranog kravljeg mlijeka s dodanom kefirnom kulturom (6 g kefirnih zrna) i *S. boulardii* kvascem (0,08 mg) u nizu od prve do sedme fermentacije, a uzorak bez dodanog kvasca služio je kao kontrolni. Svaka fermentacija provedena je u istim uvjetima, na temperaturi od

30°C kroz 16 sati i s hlađenjem od 4 sata do temperature od 4 °C. Uzorci su potom liofilizirani na – 50 °C u vakuumu korištenjem laboratorijskog liofilizatora Martin Christ. Tijekom trajanja fermentacija mjerena je kiselost kefir. Kiselost klasično proizvedenog kefir je oko 4,4 (pH), no na početku fermentacija zamijećeno je snižavanje pH vrijednosti zbog čega su u 3. i 5. fermentaciji dodani sojevi *S. thermophilus* s pojačanim proteolitičkim djelovanje (veće nastajanje diacetila – okusne komponente) kako se pH ne bi previše snizio. Ukupan broj kvasaca sadržanih u kefirnim zrnima dodatkom *S. boulardii* soja se udvostručio, dok se broj bakterija iz dodane kefirne kulture nije mijenjao. Sveukupno, rezultati su pokazali da se pokusni kefir sa *S. boulardii* dodatkom ne razlikuje od kefir proizvedenog na klasičan način, štoviše zamijećeno je poboljšanje okusa te ne postoje prepreke za industrijsko korištenje ovakvih kultura za proizvodnju kefir (Ivanova i sur., 2012).

6. 3. Acidofilno- kvaščevo mlijeko

Kalpna (2008) je pokusno pripremio acidofilno-kvaščevo mlijeko iz steriliziranog, obranog mlijeka koje je hladio do 30°C te mu dodao 2 % *S. boulardii* kulture (5 različitih izolata), a uzorci su inkubirani na 37°C kroz 24 sata. Po završetku inkubacije dodan je *Lactobacillus acidophilus* (NDC 15) u količini 1 % inokuluma te je uzorak dodatno inkubiran još 12 sati. Fermentacija je zatim prekinuta i uzorci su pohranjeni na 4°C. *S. boulardii* iskorištava mliječnu kiselinu za svoj rast i razmnožavanje te je uspješno održavao razinu populacije iznad 6 log jedinica. Kako bi se potvrdilo preživljavanje *S. boulardii* u hladnim uvjetim pohrane duljeg trajanja usporedila se brojnost mikroorganizama u svježem uzorku u kojem je brojnost *L. acidophilus* iznosila 5,263 log cfu/ml i *S. boulardii* 7,105 log cfu/ml te ona uzorka nakon 10 dana hladne pohrane gdje je brojnost *L. acidophilus* iznosila je 5,938 log cfu/ml i *S. boulardii* 7,195 log cfu/ml. Osim toga utvrđeno je sinergističko ponašanje između kvasaca i *L. acidophilus* kulture čiji je rast poboljšán, a nisu zamijećene negativne senzorne ili organoleptičke promjene.

6. 4. UHT mlijeko

UHT mlijeko pripremljeno je s inokulumom od 2,5 % *S. boulardii* kulture. Zamijećeno je preživljavanje i povećanje *S. boulardii* populacije s 8,15 log₁₀ cfu/ml na 8,5 log₁₀ cfu/ml unutar 29 dana pohrane UHT mlijeka na 5°C. Također pH mlijeka prvi dan je bio 6,55, a kroz 29 dana kontinuirano 6,59. S obzirom na sterilizaciju mlijeka samo je mala količina hidrolizirane laktoze bila dostupna kvascima. Svojim rastom i razmnožavanjem *S. boulardii* je proizveo male, 1,04 %, količine mliječne kiseline i etanola, 0,5%, što dokazuje da postoji funkcionalan metabolizam ugljikohidrata. Zaključak tog pokusa je da se kvasci poput *S.*

boulardii probiotičkog soja uspješno mogu koristiti u proizvodnji mlijeka s obzirom da dobro opstaju u tim uvjetima, a količine alkohola i plinova su nezamjetne (Hattingh i Viljoen, 2001).

6. 5. Sladoled

Pokusna proizvodnja sladoleda (Pandiyan, 2010) uključivala je dodatak prebiotika poput oligofruktoze i inulina sladoledu u količinama od 3 %, a sve zajedno je homogenizirano i toplinski obrađeno na 80 °C, 30 sekundi. Sladoled je potom ohlađen na 5 °C i ostavljen da odstoji preko noći na istoj temperaturi. Potom je ponovno tretiran na 80 °C, 30 sekundi i ohlađen na 37 °C kada su dodani inokulumi *L. acidophilus* i *S. boulardii*, svaki zasebno i u kombinaciji, u količini od 4 % te dalje inkubirani na istoj temperaturi do pH 5,5. Sladoled je potom zamrznut i prepakiran u papirnate posudice od 50 ml te pohranjen na -18 °C i -23 °C.

Senzornim ocjenjivanjem, svi su se sladoledi (s pojedinačnim kulturama i mješovitim kulturama) pokazali ispravnima i željenih organoleptičkih karakteristika bez narušenog okusa te s zadržavanjem potrebne brojčane populacije za klasifikaciju u probiotike, 10^6 cfu/ml. Također, zamijećeno je da *S. boulardii* bolje raste u kombinaciji s *L. acidophilus*, nego kao monokultura (Pandiyan, 2010).

Zbog velike popularnosti sladoleda, primjena *S. boulardii* u proizvodnji sladoleda mogla bi se pokazati vrlo uspješno jer na taj način ukusan desert postaje i funkcionalnom hranom povoljnog djelovanja za ljudski organizam (Pandiyan i Kumaresan, 2013).

7. Zaključak

Kvasac *Saccharomyces boulardii* jedinstveni je probiotički i bioterapijski kvasac koji se kao oralni nadomjesni pripravak uspješno koristi za tretiranje različitih probavnih poremećaja u ljudi. Kliničke studije potvrdile su učinkovitost kvasca *S. boulardii* u tretiranju različitih oblika dijareja i kod nekih kroničnih upalnih stanja gastrointestinalnog sustava, primjerice Chronove bolesti, sindroma iritabilnog kolona (IBS) i ulceroznog kolitisa.

Korištenje kvasca *S. boulardii* u prehrambenoj industriji i proizvodnji mliječnih proizvoda započelo je tek nedavno te je relativno malo istraživanja o potencijalu kvasca *S. boulardii* sadržanog u mliječnim proizvodima. Međutim, na temelju dostupnih podataka znanstvenih istraživanja može se zaključiti da kvasac *S. boulardii* ima pozitivan utjecaj na: senzornu kvalitetu mliječnih proizvoda i rast bakterijskih vrsta iz sastava kultura. Također, kvasac *Saccharomyces boulardii* u jogurtu od kravljeg mlijeka i u kefiru ima dobru sposobnost preživljavanja u broju većem od 10^6 cfu/ml koji je dovoljan za njegov probiotički učinak.

8. Literatura:

1. Adam, J., Barret-Bellet, C. (1976). Essai clinique controle en double issu l'ultra levure lyophilisee. *Frontiers in Microbiology, Medico- Chirurgical Digest.* 5, 401-406.
2. Bartlett, J. G. (1992). Antibiotic-associated diarrhea. *Clinical Infectious Disease.* 15, 573-581.
3. Bhat, Z. F., Bhat, H. (2011). Milk and Dairy Products as Functional Foods: A Review. *International Journal of Dairy Science.* 6, 1-12.
4. Binns, N. (2013). Probiotics, Prebiotics and the gut Microbiota. ILSI Europe a.i.s.b.l., Brussels. 2-10.
5. Can, M., Besirbellioglu, B. A., Avci, I. Y., Beker, C. M., Pahsa, A. (2006). Prophylactic *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective study. *Medical Science Monitor.* 12, 110-122.
6. Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics-*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.* 26, 767-778.
7. Deak, T. (2006). „Environmental factors influencing yeasts“, *Biodeversity and Ecophysiology of Yeasts*, u knjizi: *The Yeast Handbook* (Péter, G., Rosa, C., eds), Springer, Berlin. 155-174.
8. Fuller, M. (1991). Probiotics in human medicine. *Journal of the British Society of Gastroenterology.* 32, 439-442.
9. Garcia, V. E., De Lourdes De Abreu, F., Oswaldo Da Gama, T. H., Guerra, P. A., Carolina Carneiro, A. A., Paiva, M. F., Marcos Andrade Goulart, E., Sales Da Cunha, A. (2008). Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Chron's disease in remission. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 43, 842-848.
10. Golubev, W. I. (2006). „ Antagonistic interactions among yeasts“ u knjizi: *Biodiveristy and Ecophysiology of Yeasts* (Péter, G., Rosa, C., eds), Springer, Berlin. 197-219.
11. Granato, D., Branco, G. F., Cruz, G., Faria, J. F., Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews, Food Science and Food Saftey.* 9, 455-470.
12. Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., Testoni, P. A. (2000). *Saccharomyces boulardii* in maintainence treatment of Chron's disease. *Digestive Diseases and Sciences.* 45, 1462-1464.
13. Guslandi, M., Giollo, P., Testoni, P.A. (2003). A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 15, 697-698.
14. Hamilton-Miller, J. M. T. (2004). Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgraduate Medical Journal.* 80, 447-451.
15. Hatoum, R., Labrie, S., Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology.* 3, 421.

16. Hattingh, A. L., Viljoen, B. C. (2001). Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*. 34, 791-796.
17. Ivanova, G., Momchilova, M., Rumyan, N., Atanasova, A., Georgieva, N. (2012). Effect of *Saccharomyces Boulardii* yeasts addition on the taste and aromatic properties of Kefir. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 47, 59-62.
18. Izgu, F., Altinbay, D. (2004). Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exobeta-1,3-glucanase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 68, 685-693.
19. Kalpana, D (2008). Biotherapeutic properties of probiotic *Saccharomyces* species and its survival in acidophilus milk. Karnal, Haryana, India: National Dairy Research Institute, doktorska disertacija.
20. Karaolis, C., Botsaris, G., Pantelides, I., Tsaltas, D. (2013). Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt: survival and organoleptic effects. *International Journal of Food Science and Technology*. 48, 1445-1452.
21. Kelesidis, T., Pothoulakis, C. (2011). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 5, 111-125.
22. Kollaritsch, H., Holst, H., Grobara, P., Wiedermann, G. (1993). Prophylaxis of traveller's diarrhoea with *Saccharomyces boulardii*: results of a placebo controlled double-blind study. *Fortschritte der Medizin*. 111, 152-156.
23. Kotowska, M., Albrecht, P., Szajewska, H. (2005). *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: randomized double-blind placebo controlled trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 21, 583-590.
24. Kumar, B. V., Vijayendra, S. V., Reddy, O. V. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of Food Science and Technology*. 52, 6112-6124.
25. Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. (2011). Definition, classification and nomenclature of the yeasts, u knjizi: *The Yeasts, a Taxonomic Study 5th Edition* (Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., eds), Elsevier Science, Amsterdam. 3-9.
26. Liu, J-J., Kong, I. I., Zhang, G-C., Jayakody, L. N., Kim, H., Xia, P-F., Kwak, S., Sung, B. H., Sohn, J-H., Walukiewicz, H. E., Rao, C. V., Jin, Y-S. (2016). Metabolic Engineering of Probiotic *Saccharomyces boulardii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 82, 2280-2287.
27. Marcia, L. B. (2009). *Saccharomyces boulardii* as a probiotic for children. *Pediatric Pharmacotherapy*. 15, 1-5.
28. McFarland, L. V., Surawicz, C. M., Greenberg, R. N., Fekete, R., Elmer, G. W., Moyer, K. A., Melcher, S. A., Bowen, K. E., Cox, J. L., Noorani, Z., Harrington, G., Rubin, M., Greenwald, D. (1994). A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *The Journal of American Medical Association*. 271, 1913-1918.

29. McFarland, L. V., Elmer, G. W., McFarland, M. (2006). Meta-analysis of probiotics for the prevention and treatment of acute pediatric diarrhea. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 1, 63-76.
30. McFarland, L. (2007). Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 5, 97-105.
31. McFarland, L. V., Dublin, S. (2008). Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*. 14, 2650-2661.
32. Niamah, A. K. (2010). Production of pediocin like bacteriocin from local isolate of *Pediococcus acidilactici* and using it as foods preservative. University of Basrah, College of Agriculture, doktorska disertacija. 177.
33. Niamah, A. K., Abd Al-Manhel, A. J., Al-Shawi, M. J. (2017). Study of inhibitory spectrum of metabolic extract from *Saccharomyces boulardii* yeast against some food related bacteria. *Pakistan Journal of Food Sciences*. 27, 26-32.
34. Niamah, A.K. (2017). Physicochemical and Microbial Characteristics of Yogurt with Added *Saccharomyces Boulardii*. *Current research in Nutrition and Food Science Journal*. 5, 300-307.
35. Nord, C. E., Heimdal, A., Kager, L. (1986). Antimicrobial induced alterations of the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*. 49, 64-72.
36. Pandiyan, C. (2010). Development of synbiotic ice cream enriched whey protein concentrate. Chennai, Tamil Nadu, India: Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University, doktorska disertacija.
37. Pandiyan, C., Kumaresan, G. (2013). Utilization of Probiotic Yeast *Saccharomyces Boulardii* in Dairy Products- A Overview. *Probiotics in Sustainable Food Production: Current Status and Future Prospects- Probiotic Foods*. 57-60.
38. Plein, K., Hotz, J. (1993). Therapeutic effects of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea—a pilot study. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 31, 129–134.
39. Rodrigues, F., Ludovico, P., Leão, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism, u knjizi: *The Yeast Handbook* (Péter, G., Rosa, C., eds), Springer, Berlin. 101-121.
40. Rolfe, R. D. (2000). The Role of probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *The Journal of Nutrition*. 130, 396-402S.
41. Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M. C., Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Journal of Food Science and Technology*. 50, 1-16.
42. Saint-Marc, T., Blehaut, H., Musial, C., Touraine, T. (1995). Aids-related diarrhea: a double-blind trial of *Saccharomyces boulardii*. *Le Semaine Des Hopitaux De Paris*. 71, 735-741.
43. Salminen, S., Benno, Y., de Vos, W. (2006). Intestinal colonisation, microbiota and future probiotics? *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 15, 558-562.

44. Samaržija, D. (2015a). Mikrobne kulture. U knjizi: Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. 85-119.
45. Samaržija, D. (2015b). Probiotička, prebiotička i simbiotička fermentirana mlijeka. U knjizi: Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. 297-328.
46. Samaržija, D. (2015c). Značenje fermentiranih mlijeka u proizvodnji i prehrani. U knjizi: Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. 2-25.
47. Surawicz, C. M., McFarland, L. V., Greenberg, R. N., Rubin, M., Fekete, R., Mulligan, M. E., Garcia, R. J., Brandmarker, S., Bowen, K. E., Borjal, D., Elmer, G. W., (2000). The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clinical Infectious Disease: an official publication of the Infectious Disease Society of America*. 31, 1012-1017.
48. Tomičić, Z. M., Čolović, R. R., Čabarkapa, I. S., Vukmirović, Đ. M., Đuragić, O. M., Tomičić, R. M. (2016). Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*. 43, 103-110.
49. Viljoen, B. (2006). Yeast ecological interactions. Yeast'yeast, yeast'bacteria, yeast'fungi and yeasts as biocontrol agents, u knjizi: *Yeasts in Food and Beverages* (Querol, A. i Fleet, G., eds.), Springer, Berlin. 83-110.
50. Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., Li, L. (2017). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*. 3, 71–82.
51. Webster, J., Weber, R. (2007). *Ascomycota*. U knjizi: *Introduction to Fungi*, Cambridge University Press. 226-249.
52. Yerlikaya, O. (2014). Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks, *Food Science and Technology (Campinas)*. 34, 221-229.

Elektronički izvori:

<<https://www.amazon.com/Bronson-Saccharomyces-Boulardii-Clinically-Vegetarian/dp/B018YIDZK6>, Pristupljeno 12. travnja 2018

<<https://www.idea.rs/Odeljenja/IDEA-voce-i-povrce/Korisno-je-znati3/Lici>, Pristupljeno 4. svibnja 2018

<<http://probioticsdb.com/wp-content/uploads/2011/03/Saccharomyces-boulardii.jpg>, Pristupljeno 10. svibnja 2018

< <https://www.tetrapak.com/processing/uht-treatment>, Pristupljeno 10. svibnja 2018

< <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q30007>, Pristupljeno 15. svibnja 2018

Životopis

Lina Ille rođena je 25. travnja 1992. godine u Varaždinu gdje je završila osnovnu školu i I. gimnaziju općeg-dvojezičnog smjera 2011. godine. Prvostupničku diplomu iz Animalnih znanosti stekla je 2016. godine na Agronomskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu s magna cum laude pohvalom nakon čega nastavlja obrazovanje diplomskim studijem „Proizvodnja i prerada mlijeka“ na istoj instituciji. Za vrijeme preddiplomskog studija obnašala je dužnost predstavnika studenata u Vijeću studija Animalnih znanosti, a u sklopu diplomskog studija sudjelovala je u radnoj skupini studenata-prevodioca stranih udžbenika.

Od ostalog obrazovanja ima položene međunarodne ispite iz engleskog (C1/C2) i njemačkog (B2/C1) jezika, aktivno govori talijanski jezik te se služi japanskim i slovenskim jezikom. Završila je „Akademiju regionalnog razvoja i fondova EU“ Ministarstva regionalnog razvoja i fondova Europske unije te edukacijski seminar za volontere „Tete i stričeki pričalice“ udruge „Smiješak za sve“ čiji je volonter od listopada 2017. godine.

Aktivno se koristi računalom i Microsoft Office alatima, poznaje rad u programima za statističke analize i obradu podataka (SAS) te rad s kamerom.

U slobodno vrijeme bavi se rekreativnim jahanjem, trčanjem te redovito pohađa kvizove općeg znanja (Pub kvizovi).