

Istraživanje biopotencijala mikroorganizama izoliranih iz maginje (*Arbutus Unedo L.*)

Glavina, Duje

Master's thesis / Diplomski rad

2025

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:770752>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2025.

Duje Glavina

**ISTRAŽIVANJE BIOPOTENCIJALA
MIKROORGANIZAMA IZOLIRANIH IZ
MAGINJE (*Arbutus Unedo* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo i Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević te uz pomoć dr. sc. Denija Kostelca.

PRIMA Projekt „From Edible Sprouts to Healthy Food – Feed“ (Prima Call 2022, Prima Section 2 – Multi Topic 2022, Topic 2.3.1 (RIA) Enabling the transition to healthy and sustainable dietary behaviour)

Voditeljica projekta: prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević



Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević, na stručnom vodstvu, strpljenju i nesebičnom dijeljenju znanja tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, posebno zahvaljujem dr. sc. Deniju Kostelcu na pruženoj pomoći i korisnim savjetima koji su značajno pridonijeli kvaliteti ovog rada. Najdublju zahvalnost upućujem svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i ohrabrenju koje su mi pružali tijekom mog obrazovanja i života. Bez njihove ljubavi i motivacije, ostvarenje ovog cilja ne bi bilo moguće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

ISTRAŽIVANJE BIOPOTENCIJALA MIKROORGANIZAMA IZOLIRANIH IZ MAGINJE (*Arbutus Unedo* L.)

Duje Glavina, univ. bacc. nutr. 0058215612

Sažetak: Unatoč iznimnim senzorskim i nutritivnim karakteristikama, maginja (*Arbutus unedo* L.) još uvijek nije popularna širokom spektru potrošača. S ciljem iskorištavanja potencijala ovog ploda, napravljen je ovaj rad. U radu su izolirani autohtoni mikroorganizmi sa zrelog ploda maginje i istražen je njihov potencijal evaluirajući niz funkcionalnih svojstava važnih za potencijalnu primjenu u razvoju novih funkcionalnih proizvoda na bazi maginje. Izolirani mikroorganizmi s najvećom specifičnom brzinom rasta su kvasac roda *Kloeckera* i bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. *L. paracasei* pokazuje iznimno antimikrobno djelovanje (90%) prema svim analiziranim patogenima, dok *Kloeckera* dobro inhibira rast *L. monocytogenes* (54%). Ciljanom fermentacijom maginje izoliranim kvascem i bakterijom mliječne kiseline te mjerenjem antioksidacijske aktivnosti fermentata utvrđena je izuzetna sposobnost uklanjanja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil slobodnih radikala (iznad 70%) nakon 48-satne fermentacije od strane većine uzoraka. Maginja i maginja fermentirana kvascem *Kloeckera* pokazale su visoke razine inhibicije rasta svih patogenih mikroorganizama (oko 80%), osim inhibicije rasta *L. monocytogenes* od strane maginje fermentirane kvascem. Također se može zaključiti antimikrobna specifičnost oba uzorka prema bakterijama naspram kvasaca.

Glavne riječi: fermentacija, maginja, kvasac, bakterija mliječne kiseline

Rad sadrži: 47 stranica, 18 slika, 3 tablice, 79 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

Pomoć pri izradi: dr.sc. Deni Kostelac

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Jadranka Frece (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Markov (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjenski član)

Datum obrane: 15. siječnja 2025.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

RESEARCH ON THE BIOPOTENTIAL OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM STRAWBERRY TREE FRUIT (*Arbutus unedo* L.)

Duje Glavina, univ. bacc. nutr. 0058215612

Abstract: Despite its exceptional sensory and nutritional characteristics, the strawberry tree fruit (*Arbutus unedo* L.) is still not popular among a wide range of consumers. To harness the potential of this fruit, this study was conducted. Indigenous microorganisms were isolated from the ripe fruit of the strawberry tree, and their potential was investigated by evaluating a series of functional properties important for potential application in the development of new functional products based on the strawberry tree fruit. The isolated microorganisms with the highest specific growth rate were yeast of the genus *Kloeckera* and lactic acid bacteria *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. *L. paracasei* exhibited exceptional antimicrobial activity (90%) against all analyzed pathogens, while *Kloeckera* effectively inhibited the growth of *L. monocytogenes* (54%). Targeted fermentation of strawberry tree fruit with the isolated yeast and lactic acid bacteria and the measurement of the antioxidant activity of the ferments revealed an exceptional ability to scavenge 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radicals (above 70%) after 48 hours of fermentation in most samples. The strawberry tree fruit and the fruit fermented with *Kloeckera* yeast showed high levels of inhibition of all pathogenic microorganisms (approximately 80%), except for the inhibition of *L. monocytogenes* by the yeast-fermented fruit. It can also be concluded that both samples showed antimicrobial specificity towards bacteria compared to yeasts.

Keywords: fermentation, strawberry tree fruit, yeast, lactic acid bacteria

Thesis contains: 47 pages, 18 figures, 3 tables, 79 references, 00 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Danijela Bursać Kovačević, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Deni Kostelac, PhD

Reviewers:

1. Jadranka Frece, Full professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, Full professor (mentor)
3. Ksenija Markov, Full professor (member)
4. Jasna Novak, Full professor (substitute)

Thesis defended: January 15th, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>Arbutus unedo</i> L.....	2
2.1.1. Svojstva plodova maginje	3
2.2. FERMENTACIJA	4
2.3. PROBIOTICI	6
2.3.1. Kriteriji za izbor probiotika.....	6
2.3.2. Kvasci kao probiotici	7
2.4. PREBIOTICI.....	8
2.4.1. Mehanizam djelovanja prebiotika.....	9
2.5. <i>Kloeckera apiculata</i>.....	9
2.6. <i>Lactobacillus paracasei</i>	10
2.7. FUNKCIONALNA HRANA.....	11
2.7.1. Klasifikacija funkcionalne hrane.....	12
2.8. ANTIOKSIDANSI I SLOBODNI RADIKALI.....	13
2.8.1. Slobodni radikali	13
2.8.2. Oksidativni stres	13
2.8.3. Uloga antioksidansa u borbi protiv oksidativnog stresa.....	14
2.8.4. Antioksidansi u maginji	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. Biljni uzorci i radni mikroorganizmi.....	16
3.1.2. Hranjive podloge.....	16
3.1.3. Uređaji.....	17
3.1.4. Pribor.....	17
3.1.5. Kemikalije	18
3.2. METODE.....	19
3.2.1. Priprema vodenog ekstrakta ploda maginje za izolaciju.....	19
3.2.2. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz vodenog ekstrakta maginje.....	19
3.2.3. Izolacija kvasaca iz vodenog ekstrakta maginje.....	20
3.2.4. Određivanje optičke gustoće i specifične brzine rasta.....	20
3.2.5. Antimikrobna aktivnost bakterija i kvasaca izoliranih iz maginje prema odabranim patogenima	21
3.2.6. API 50 CHL metoda.....	22
3.2.7. Fermentacija maginje izoliranim kvascem i bakterijom mliječne kiseline	22
3.2.8. Sposobnost eliminacije DPPH slobodnih radikala.....	23

3.2.9. Antimikrobna aktivnost maginje fermentirane kvascem prema odabranim patogenima	23
3.2.10. Obrada podataka.....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. OPTIČKA GUSTOĆA RASTA	25
4.2. SPECIFIČNA BRZINA RASTA IZOLATA.....	26
4.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST IZOLATA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE I KVASCA.....	29
4.4. IDENTIFIKACIJA IZOLATA IZ MAGINJE.....	33
4.5. SPOSOBNOST UKLANJANJA DPPH SLOBODNIH RADIKALA.....	36
4.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST UZORKA MK I M NAKON 48-SATNE FERMENTACIJE	37
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Obična planika (*Arbutus unedo* L.), u narodu poznata i kao maginja, zimzelena je biljka mediteranskog područja koja se od davnina koristi u tradicionalnoj medicini zbog svojih potencijalno ljekovitih svojstava. Bogata je bioaktivnim spojevima poput polifenola i tanina, koji posjeduju antioksidacijska i antimikrobna svojstva. Ovi spojevi mogu pomoći u borbi protiv oksidativnog stresa i spriječiti razvoj različitih patogenih mikroorganizama (Pallauf i sur., 2008).

U novije vrijeme, istraživači su pokazali zanimanje za fermentacijske procese koji uključuju ovu biljku, a sve s ciljem dobivanja proizvoda s pojačanim bioaktivnim svojstvima. Fermentacija može, putem djelovanja specifičnih mikroorganizama, značajno utjecati na sastav i učinkovitost biljnih spojeva, čineći ih učinkovitijima ili lakše iskoristivima u ljudskom organizmu (Tamang i Kailasapathy, 2010). Unatoč znatnom napretku u poznavanju fermentacijskih procesa, još uvijek postoje nedovoljno istraženi aspekti fermentacije maginje te utjecaja fermentacije na različite biološke aktivnosti.

Cilj ovog rada bio je izolirati autohtone mikroorganizme iz ploda maginje, odrediti specifične brzine rasta tih mikroorganizama te istražiti njihovu antimikrobnu aktivnost. Nadalje, fermentacijom ploda maginje pomoću izoliranih mikroorganizama pratila se sposobnost eliminacije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) slobodnih radikala i antimikrobna aktivnost dobivenog fermenta. Rezultati ovog istraživanja mogu doprinijeti razvoju novih bioaktivnih proizvoda s potencijalom za primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Arbutus unedo* L.

Arbutus unedo L. (obična planika) zimzeleni je grm (Slika 1) rasprostranjen u Sredozemlju, sjeveroistočnoj Africi te na Kanarskim otocima i zapadnoj Aziji. Također se može prilagoditi uvjetima jugozapadne obale Irske (Slika 2) (Almeida i sur., 2022). Danas u Hrvatskoj imamo više naziva za ovu biljku, a neki od njih su: maginja, manjiga, magunja, planika, prpak, jagodica (Franjić, 2006).

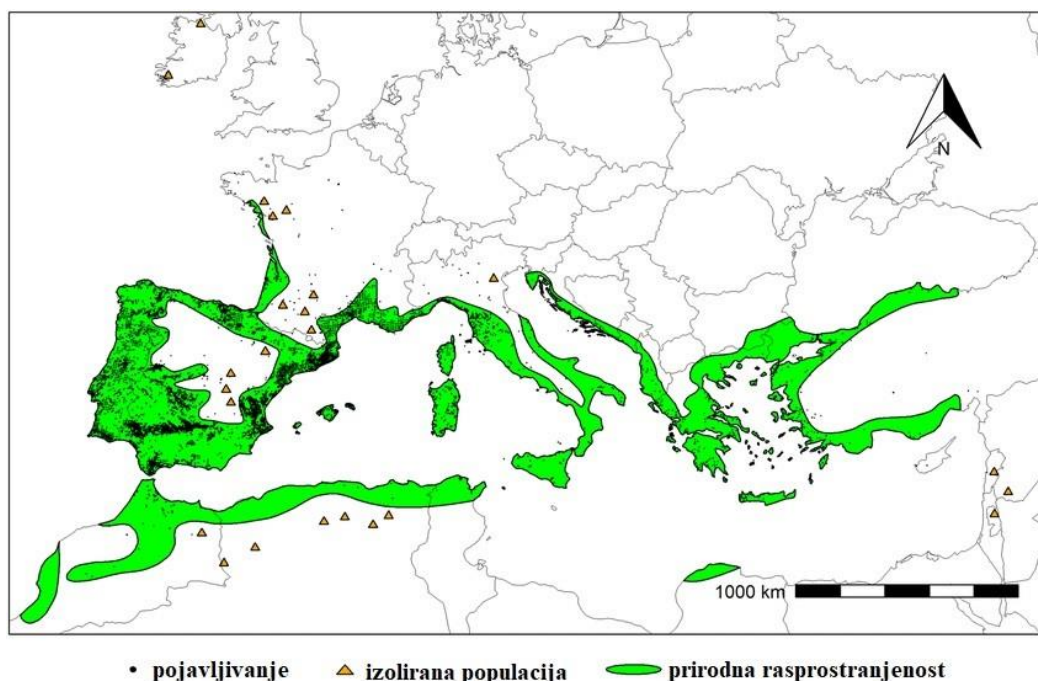
Obična planika je zanemarena voćna vrsta u Hrvatskoj te njen potencijal za uzgojem i konzumacijom još uvijek nije dovoljno iskorišten. Naime, plod i list obične planike od velike su funkcionalne važnosti, a mnoga istraživanja su dokazala visok sadržaj minerala, lako probavljivih šećera, dijetalnih vlakana, vitamina (osobito vitamina C), ali i mnogih drugih bioaktivnih spojeva sa značajnim antioksidacijskim potencijalom (Žlabur i sur., 2020).

Zbog bogatog kemijskog sastava plodovi planike su u posljednje vrijeme sve popularniji za konzumaciju, prvenstveno zbog povoljnog nutritivnog sastava, a time i korisnih učinaka na zdravlje: antiseptičko, diuretičko, laksativno, protuupalno djelovanje, prevencija dijabetesa i dr. (Ruiz-Rodriguez i sur., 2011).

Plodovi obične planike nazivaju se maginje, a uglavnom se koriste za pripremu alkoholnih pića (vina, likera i rakija), džemova, želea i marmelada, a rjeđe se jedu kao svježe voće, unatoč lijepom izgledu (Miguel i sur., 2014).



Slika 1. Obična planika s područja otoka Pelješca (*vlastita fotografija*)



Slika 2. Rasprostranjenost *Arbutus unedo* L. (prema Almeida i sur., 2022)

2.1.1. Svojstva plodova maginje

Maginja je jestivi okrugao plod, promjera oko 2 cm (Slika 3). Kemijski najzastupljeniji sastojci su ugljikohidrati, s 40 % ukupne mase svježih plodova. Konkretno, saharoza je mnogo zastupljenija u nezrelom voću, dok je fruktoza glavni slobodni šećer u konzumnoj fazi zrelosti (Lhaj i sur., 2021). Vezano uz sastav masnih kiselina, višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acids*, PUFA) čine gotovo 60 % ukupne količine masnih kiselina, osiguravajući visok i povoljan omjer omega-3 i omega-6 masnih kiselina, zbog značajne razine α -linolenske kiseline. Zabilježeno je da se plodovi odlikuju dobrim organoleptičkim svojstvima u podmakloj fazi sazrijevanja i senzorskim karakteristikama koje proizlaze iz kombinacije masnih kiselina i šećera. Kao rezultat toga, plodovi se tradicionalno koriste za proizvodnju alkoholnih pića (Nunes, 2017.). Nadalje, plodovi su izvrstan izvor vitamina C, dijetalnih vlakana, fenolnih spojeva (kininske kiseline, ferulinske kiseline, elaginske kiseline, galne kiseline, kafeinske kiseline, cimetne kiseline, kvercetina i miricetina), askorbinske kiseline i drugih u mastima topljivih antioksidansa (lutein, α -tokoferol, β -karoten) (Pallauf i sur., 2008).

Iako se pokazalo da konzumacija samoniklog voća poboljšava apsorpciju hranjivih tvari i razinu prirodnih antioksidansa, ova voćka se rijetko konzumira svježa, primarno zbog visokog udjela sjemenki, što moderni potrošači ne cijene, unatoč ugodnom okusu u konzumnoj zrelosti. Međutim, u narodnoj medicini od davnina se koriste u različite svrhe zbog svojih ljekovitih svojstava. Iz tog razloga Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture*

Organization, FAO) ima za cilj povećati korištenje ove dragocjene divlje vrste kako bi se očuvala biološka raznolikost (Macchioni i sur., 2020).



Slika 3. Maginjice s područja Makarske rivijere (*vlastita fotografija*)

2.2. FERMENTACIJA

Tradicionalna fermentacija se stoljećima koristila kao sredstvo za očuvanje i povećanje nutritivne vrijednosti hrane. Izvorne sirovine za fermentaciju u svrhu konzerviranja hrane bile su riba, meso, mlijeko, povrće, mahunarke, žitarice i voće.

Fermentirana hrana nastaje kontroliranim rastom mikroorganizama i pretvorbom komponenata u hrani djelovanjem mikrobnih enzima. Primjeri fermentirane hrane i pića su jogurt, kimchi, kiseli kupus, kefir, sir, tempeh, vino, pivo, natto i dr. (Bourdichon i sur., 2021).

Mikroorganizmi prirodno prisutni u hrani mogu provoditi spontanu fermentaciju (npr. tradicionalna proizvodnja kiselog kupusa, kimchija i kruha od kiselog tijesta) ili se hrani mogu dodati starter kulture za pokretanje fermentacije kako bi se dobio sastavom ujednačeniji fermentirani proizvod (npr. *Rhizopus oligoporus* za tempeh, *Bacillus subtilis* natto za natto, *Aspergillus oryzae* za miso, kefirna zrnca koja sadrže kvasce kao što su *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus* uz bakterije koje proizvode mliječnu i octenu kiselinu za kefir) (Augustin i sur., 2023).

Fermentacija se također koristi za poboljšanje organoleptičkih svojstava (npr. okusa i teksture), dok neke namirnice, poput maslina, mogu biti nejestive bez fermentacije koja uklanja gorke fenolne spojeve.

Dvije su glavne metode fermentacije hrane. Prvo, hrana se može fermentirati prirodno, a takvi fermenti često se nazivaju "divlji fermenti" ili "spontani fermenti", pri čemu su mikroorganizmi prirodno prisutni u sirovoj hrani, a primjer za to su kiseli kupus, kimchi i određeni fermentirani proizvodi od soje. Drugo, hrana se može fermentirati dodavanjem starter kultura, čime se mogu postići standardna senzorska svojstva proizvoda (aroma, boja, tekstura), a primjer za to su kefir, kombucha i natto. Jedna od metoda izvođenja fermentacije ovisne o kulturi je "*backslopping*", u kojem se mala količina iz prethodno fermentirane šarže dodaje sirovoj hrani, na primjer kruhu s kiselim tijestom. Starteri koji se koriste za pokretanje fermentacije mogu biti prirodni ili komercijalni starteri s kojima bi bili sigurniji u organoleptička svojstva krajnjeg proizvoda (Frece i sur., 2020; Yann i Pauline, 2014,).

Fermentirana hrana može pozitivno utjecati na zdravlje putem nekoliko mehanizama:

- a) Sadrži potencijalno probiotičke mikroorganizme, poput bakterija mliječne kiseline i kvasaca. Utvrđeno je da većina fermentiranih proizvoda sadrži najmanje 10^6 mikrobnih stanica po gramu, a ovi mikroorganizmi mogu biti iznimno korisni u crijevima, kroz kompeticiju s patogenim bakterijama i proizvodnju imuno-regulacijskih i neurogenih nusproizvoda fermentacije (Derrien i Hylckama, 2015).
- b) Metaboliti dobiveni fermentacijom mogu imati zdravstvene prednosti. Na primjer, bakterije mliječne kiseline stvaraju bioaktivne peptide i poliamine s potencijalnim pozitivnim djelovanjem na kardiovaskularni sustav, imunitet i cjelokupni metabolizam. Među ovim peptidima, konjugirana linolna kiselina (*Conjugated linoleic acid*, CLA) ima učinak snižavanja krvnog tlaka, egzopolisaharidi pokazuju prebiotička svojstva, bakteriocini djeluju antimikrobno, sfingolipidi imaju antikancerogena i antimikrobna svojstva, a bioaktivni peptidi iskazuju antioksidativne, antimikrobne, antialergijske efekte i snižavaju krvni tlak (Sanlier i sur., 2019).
- c) Komponente hrane koje se nalaze u fermentiranoj hrani, poput prebiotika i vitamina, također mogu imati zdravstvene dobrobiti.
- d) Na kraju, fermentacija može smanjiti toksine i antinutrijente. Na primjer, fermentacija soje može smanjiti koncentraciju fitinske kiseline, a fermentacija kiselog tijesta može smanjiti sadržaj fermentabilnih ugljikohidrata (npr. fermentabilnih oligosaharida, disaharida, monosaharida i poliola), pa tako mogu povećati toleranciju ovih proizvoda u bolesnika s funkcionalnim poremećajima crijeva kao što je sindrom iritabilnog crijeva (Dimidi i sur., 2019).

2.3. PROBIOTICI

Probiotici se definiraju kao jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene na životinjama ili ljudima, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore (FAO/WHO, 2002). Ti se mikroorganizmi mogu natjecati sa štetnim mikrobima i kolonizirati crijeva. Štoviše, probiotici mogu pružiti zdravstvene prednosti kada se konzumiraju, poboljšavajući ili obnavljajući sastav te aktivnost crijevne mikroflore (Damián i sur., 2022). Probiotici su uglavnom gram-pozitivne bakterije koje pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. *Enterococcus*, *Pediococcus* i vrste kvasca, uključujući *Saccharomyces boulardii*, primjeri su drugih nepatogenih vrsta s probiotičkim svojstvima. Zabilježeno je nekoliko korisnih učinaka probiotika na intestinalnu homeostazu, kao što su poboljšanje urođenih i adaptivnih imunoloških odgovora i povezanih antipatogenih/antiupalnih aktivnosti, povećanje bioraspoloživosti određenih prirodnih ili metaboličkih komponenti i esencijalnih nutrijenata i smanjenje intolerancije na hranu među osjetljivim subjektima. Drugim riječima, konzumirani probiotici dokazano pozitivno utječu na cijeli organizam poboljšavajući probavu i imunitet (Mazziotta i sur., 2023).

Korisna svojstva konzumiranih probiotika na poboljšanje imunološkog sustava domaćina dokazana su u liječenju nekoliko stanja i bolesti, uključujući alergije, proljev, upalnu bolest crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease*, IBD), sindrom iritabilnog crijeva (engl. *Irritable bowel syndrome*, IBS), infekcije, kao i neke oblike raka. Sve veći broj probiotika identificiran je kao pomoć prilikom terapije antibioticima smanjenjem nuspojava, dok u isto vrijeme jačaju imunitet sluznice crijeva (Cristofori i sur., 2021). Zbog svog potencijala da prežive u neprijateljskom okruženju crijeva i da proizvode antimikrobne tvari koriste se u prehrambenoj i zdravstvenoj industriji.

2.3.1. Kriteriji za izbor probiotika

Probir obećavajućih kandidata za probiotike mogao bi biti dugotrajan i skup, ali određena su se svojstva pokazala korisnima i omogućuju provođenje početnog *in vitro* probira. Ova svojstva spadaju u tri skupine- opće, funkcionalne i tehnološke značajke.

Neki od općih zahtjeva za izbor probiotika mogu biti humano podrijetlo za humane probiotike, genetička stabilnost, netoksičnost i nepatogenost, otpornost prema žučnim kiselinama i niskim pH vrijednostima, točna taksonomska identifikacija (Frece, 2003).

U funkcionalnim značajkama razlikuju se sljedeća svojstva:

- i. sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metaboličke aktivnosti u „ciljanom“ području primjene u organizmu
- ii. sposobnost kolonizacije i adhezije epitela crijeva

- iii. pozitivna interakcija sa imunostimulativnim sustavom domaćina
- iv. sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih pozitivnih učinaka na zdravlje
- v. antipatogena svojstva
- vi. proizvodnja antimikrobnih spojeva, kao što su bakteriocini i organske kiseline (Frece i sur., 2020, Frece, 2003, Šušković i sur., 2010, Kos, 2001, Sanders i Huis in't Veld, 1999).

Većina probiotika se uzima oralno kako bi došli do crijeva kao ciljnog organa. Stoga moraju preživjeti prijenos od usta do crijeva. To podrazumijeva probir potencijalnih probiotičkih sojeva na otpornost na uvjete okoliša unutar gastrointestinalnog (GI) trakta (probavni enzimi, želučane i žučne soli, pH i tjelesna temperatura domaćina), sposobnost koloniziranja površina sluznice i sposobnost izdržavanja mikrobiote crijeva (sposobnost auto- i ko-agregacije, hidrofobnost površine i otpornost na antibiotike) (McFarland, 2015). Odabrani soj također mora biti identificiran po vrsti, tipu soja i testiran na sigurnost (soj ne smije proizvoditi toksine, biti patogen ili imati opasne metaboličke aktivnosti) i mora biti u stanju preživjeti proces proizvodnje. Tehnološki zahtjevi uključuju:

- i. stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke
- ii. brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije
- iii. visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu (10^6 - 10^8 /ml ili /g), npr. 100 g proizvoda osigurava 10^8 - 10^{10} živih stanica
- vii. dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese (Frece i sur., 2020, Frece i sur., 2003, Šušković i sur., 2010, Kos, 2001, Sanders i Huis in't Veld, 1999).

2.3.2. Kvasci kao probiotici

Iako su najistraživaniji i najpopularniji probiotici bakterije roda *Bifidobacter* i *Lactobacillus*, novija istraživanja pokazuju mnoge zdravstvene prednosti kvasaca kao probiotičkih mikroorganizama (Sen i Mansell, 2020). Tema probiotičkih i potencijalno probiotičkih kvasaca je u razvoju i postoji potencijal za nove probiotičke proizvode s novim svojstvima, koji nisu bazirani na bakterijama (Staniszewski i Kordowska-Wiater, 2021).

Kvasci se dosta koriste u biotehnološkim i industrijskim primjenama za proizvodnju fermentiranih prehrambenih proizvoda, uključujući enzime, kiseline i vitamine.

To su jednostanične eukariotske gljive i pripadaju odjeljku *Ascomycota* (npr. rodovi *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida* itd.) i odjeljku *Basidiomycota* (npr. rodovi *Cryptococcus*, *Rhodotorula*) i mogu se razmnožavati i nespolno i spolno. Da bi uspješno

djelovali, probiotici bi trebali biti živi kako bi stvorili simbiotičku stabilnost u probavnom traktu domaćina.

Antibiotička rezistencija veliki je problem današnjice te je osjetljivost na antibiotike jedan od iznimno važnih kriterija prilikom probiotičke karakterizacije bakterijskih sojeva zbog opasnosti od prijenosa gena za antibiotičku rezistenciju. Međutim, budući da većina kvasaca zbog građe svoje stanične stijenke sadrži prirodnu otpornost na antibiotike, a ne postoji izražena opasnost od prijenosa gena rezistencije, ta osjetljivost na antibiotike nije primarni kriterij kod probiotičke karakterizacije kvasaca kao što je kod bakterija. (Shruthi i sur., 2022).

Međutim, među svim rodovima kvasaca, samo je nekoliko sojeva *Saccharomyces cerevisiae* prepoznato i komercijalno dostupno kao probiotici za ljudsku prehranu. Prevalencija sojeva *Saccharomyces* u ljudskom gastrointestinalnom (GI) traktu nije iznenađujuća jer se *S. cerevisiae* i srodne vrste tisućama godina konzumiraju u kruhu, pivu i drugim fermentiranim proizvodima (Fernandez-Pacheco i sur., 2018).

Godine 1920. Henri Boulard, francuski znanstvenik, primijetio je da određeni broj ljudi u Francuskoj Indokini nisu bili pogođeni epidemijom kolere. Ispostavilo se da je tamošnje stanovništvo konzumiralo specifičnu vrstu čaja napravljenog od ekstrakta ličija (azijska trešnja) i mangostina. On je izolirao kvasac iz kore ovog voća, dajući mu ime *Saccharomyces boulardii*. Ova vrsta je trenutno dostupna u svijetu kao probiotički dodatak bez recepta (Sen i Mansell, 2020).

2.4. PREBIOTICI

Definicija prebiotika kao neprobavljive komponente u tijelu prvi put je uvedena 1995. godine. Tada se znalo da je to sastojak koji ljudsko tijelo ne može probaviti, koji je otporan na djelovanje želučane kiseline i ne razgrađuju ga enzimi sisavaca i ne apsorbiraju u gastrointestinalnom traktu. Danas se zna da se rast i reprodukcija probiotika može poboljšati postojanjem prebiotika. Prebiotici su sastojci, uglavnom polisaharidi, koje ljudsko tijelo ne može probaviti i apsorbirati, a koji povoljno djeluju na organizam domaćina selektivno potičući rast i/ili aktivnost bakterija s probiotičkim značajkama u debelom crijevu, čime unapređuju zdravlje domaćina (Pineiro i sur., 2008). Prethodne studije smatrale su prebiotike oligosaharidnim ugljikohidratima, koji uglavnom uključuju ksilooligosaharide (engl. *Xylooligosaccharides*, XOS), galakto-oligosaharide (engl. *galacto-oligosaccharides*, GOS), laktulozu i inulin te fruktozo-oligosaharide (engl. *fructose-oligosaccharides*, FOS) izvedene iz njih.

Međutim, nedavne studije su otkrile da prebiotici uključuju ne samo ugljikohidrate, već i

druge ne-ugljikohidrate koji zadovoljavaju kriterije prebiotika, kao što su polifenoli izolirani iz voća poput crne maline i borovnice. Uz stalnu optimizaciju procesa pripreme prebiotika, kontinuirano se razvijaju nove vrste prebiotika, uglavnom uključujući polisaharide, polifenole i polipeptidne polimere, koji imaju široku istraživačku perspektivu (Jiao i sur., 2019).

Prebiotici se mogu pronaći u raznoj hrani biljnog podrijetla, uključujući voće, povrće, leguminoze, orašaste plodove, sjemenke te žitarice poput pšenice, ječma, lana, zobi i sl. Osim što imaju funkciju poboljšanja regulacije imuniteta te otpornosti na patogene, utječu na metabolizam, povećavaju apsorpciju minerala i jačaju zdravlje (Peredo-Lovillo i sur., 2020). Takozvani „moderni“ prebiotici uglavnom se nalaze u algama, voćnim sokovima, korama, sjemenkama, tradicionalnoj kineskoj medicini i mikroorganizmima koji uključuju polisaharide, polifenole i polipeptidne polimere (You i sur., 2022).

2.4.1. Mehanizam djelovanja prebiotika

Općenito, u ljudskom crijevu nedostatak enzima koji hidroliziraju polimerne veze prebiotika omogućuje im da ostanu u GI traktu kako bi se oduprli probavi u tankom crijevu. Ljudsko tijelo zatim prenosi te prebiotike netaknute u debelo crijevo, gdje ih crijevna flora razgrađuje i selektivno fermentira kako bi proizvela određene sekundarne metabolite, koji su apsorbirani u crijevnom epitelu ili transportirani u jetru kroz portalnu venu te tada mogu imati korisne učinke, kao što su reguliranje imuniteta, otpornost na patogene, poboljšanje funkcije crijevne barijere, povećanje apsorpcije minerala i snižavanje razine lipida u krvi (Guarino i sur., 2020). Najzastupljenije kratkolančane masne kiseline u crijevima, uključujući acetat, butirat i propionat, koje su korisne za održavanje zdravlja crijeva i cijelog organizma, proizvedene su od strane korisnih bakterija (David i sur., 2016). Štoviše, posebna prednost prebiotika odnosi se na njihovo poticanje rasta ciljanih mikroorganizama. Nakon konzumiranja specifičnih prebiotika (npr. inulina, frukto-oligosaharida i galakto-oligosaharida-a), oni mogu potaknuti rast korisne flore kako bi se natjecala s drugim vrstama štitelci ili promičući proizvodnju korisnih proizvoda fermentacije (Ashaolu, 2020).

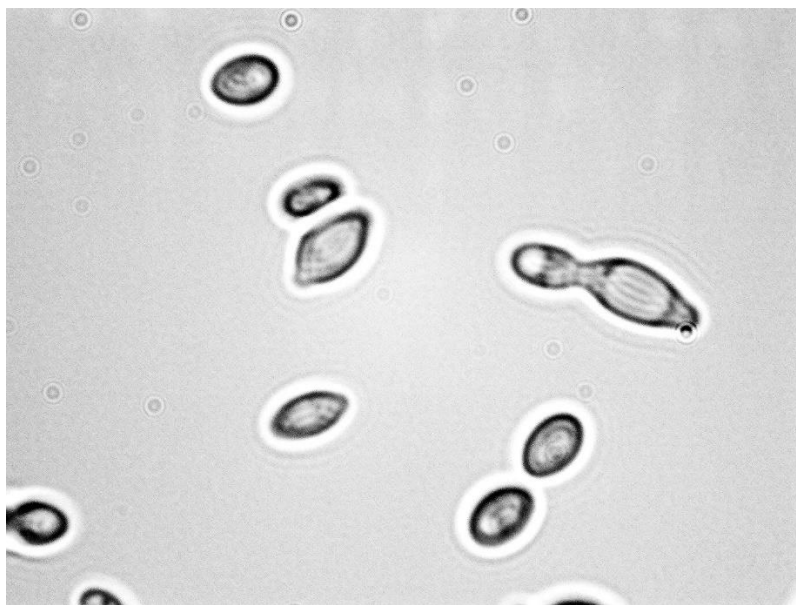
2.5. *Kloeckera apiculata*

Hanseniaspora uvarum (Slika 3), u anamorfnom stanju poznat kao *Kloeckera apiculata*, kvasac je iz odjeljka gljiva mješinariki (*Ascomycota*) koji pripada razredu *Hemiascomycetes*, redu *Endomycetales*, porodici *Saccharomycetaceae*. Postoji šest priznatih vrsta u rodu *Hanseniaspora*: *H. guilliermondii*, (*K. apis*); *H. occidentalis* (*K. javanica*); *H. osmophila* (*K. korticis*); *H. uvarum* (*K. apiculata*); *H. valbyensis* (*K. japonica*); i *H. vineae* (*K. africana*) (García-

Martos i sur., 1998).

Kvasci *Hanseniaspora* nadaleko su poznati po svojoj rasprostranjenosti na zrelom voću. Iako je većina studija izolacije provedena u vinskom okruženju, *Hanseniaspora* spp. također se obično izoliraju iz soka jabuke i kruške, kao i iz raznih drugih vrsta voća. Ne samo njihova prevalencija, već i njihova opća brojnost prilično je vrijedna pažnje, budući da se najmanje 50-75 % opće populacije kvasca na početku fermentacije mošta može svrstati rodu *Hanseniaspora*. Posebno jedna vrsta, *H. uvarum*, koja se općenito smatra najčešće izoliranim kvascem iz grožđa (van Wyk i sur., 2024)

K. apiculata je prisutna u ranom soku od grožđa, kakaovcu, fermentaciji kave, pivskom ječmu, fermentaciji jabukovače, pokvarenim smokvama, rajčicama, konzerviranim crnim trešnjama, može se izolirati iz svježih jagoda, crnog ribiza, vinskog grožđa i raznog drugog voća, voćnih sokova i voćnih sirupa. Nadalje, može se izolirati iz tla, vinskih mušica, gusjenica pa čak i iz morske vode (Kurtzman i sur., 2011). Među vrstama kvasca za vrenje, *apiculata* su najčešće korišteni kvasci koji se izoliraju iz prirodnog voća. Osim njihove izrazite morfologije (oblik limuna), ovi kvasci za fermentaciju koriste relativno malo izvora ugljika, uglavnom glukozu i celobiozu, i imaju neobično visoke potrebe za vitaminima, uključujući inozitol (vitamin B8, kolin). Dakle, zrelo ili propadajuće voće i voćni sokovi koji fermentiraju, poput onih napravljenih s tropskim voćem, koje je posebno bogato inozitolom, predstavljaju pogodan medij za rast i aktivnost kvasaca *apiculata* (Romano i Marchese, 1998).



Slika 3. *Kloeckera apiculata* (Anonymus)

2.6. *Lactobacillus paracasei*

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine značajan dio normalne mikrobne flore ljudskog

probavnog sustava i često se koriste, bilo samostalno ili u kombinaciji, kod fermentacije prehrambenih proizvoda. Najčešće korišteni rodovi su *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium* (Frece i sur., 2020; Fooks i sur., 1999). Rod *Lactobacillus* su gram-pozitivne, nesporogene, štapičaste, anaerobne bakterije. Mnogi sojevi roda *Lactobacillus* koriste se u fermentaciji hrane, a posebno su prisutni u mliječnoj industriji za proizvodnju sira, jogurta i drugih fermentiranih mliječnih proizvoda. Imaju složene prehrambene zahtjeve i nalaze se u raznim staništima, poput sluznica ljudi i životinja, na biljnim materijalima, u otpadnim vodama, kao i u pokvarenoj hrani. Važni su za jačanje imuniteta, održavanje ravnoteže crijevne mikroflore i sprječavanje gastrointestinalnih infekcija (Chiang i Pan, 2011). Također, pomažu u jačanju funkcije kožne barijere, smanjuju osjetljivost kože i moduliraju imunološki sustav kože, što pridonosi očuvanju njene homeostaze (Benyacoub i sur., 2014).

U ispitivanjima antimikrobne aktivnosti, soj *Lactobacillus paracasei* IMC 502 je pokazao inhibicijska svojstva prema odabranim potencijalno štetnim mikroorganizmima, posebno protiv vrste *Candida albicans*. Preživio je u uvjetima niske pH vrijednosti tijekom 5 sati i dobro podnio žučne kiseline u *in vitro* uvjetima, čak i pri koncentracijama višim od očekivanih (Verdenelli i sur., 2009). Otpornost probiotičkih mikroorganizama na uvjete niskog pH važan je faktor jer osigurava njihovu sposobnost preživljavanja želučanih stresova, što je ključno za njihovu primjenu u kiselim prehrambenim proizvodima poput jogurta.

2.7. FUNKCIONALNA HRANA

Pojam funkcionalne hrane prvi je put korišten u Japanu 1980-ih, no njegova definicija često se pogrešno tumači jer, iako su regulirane, većina zemalja ih pravno ne priznaje, što znači da nema zakonski jasne definicije. Međutim, Granato i sur. (2017) definirali su funkcionalnu hranu kao industrijski prerađene ili prirodne namirnice koje, kada se redovito konzumiraju u raznolikoj prehrani u učinkovitim količinama, mogu imati pozitivne učinke na zdravlje iznad osnovne prehrane. Uz svoju nutritivnu vrijednost kao konvencionalna hrana, funkcionalna hrana pomaže u promicanju optimalnog zdravlja i može smanjiti rizik od jedne ili više nezaraznih bolesti, poput dislipidemije, raka, dijabetesa tipa 2, moždanog udara i kardiovaskularnih bolesti.

Uz definiciju funkcionalne hrane, glavni kriteriji za odobravanje zdravstvenih tvrdnji o nekom sastojku ili hrani na deklaraciji su sigurnost hrane, slobodan pristup bez potrebe za medicinskim receptom te dokazi o zdravstvenim koristima pri redovitoj konzumaciji u uravnoteženoj prehrani (Lenssen i sur., 2018). Iako su definicija i osnovni kriteriji razumljivi i obuhvatni, mnogi istraživači i dalje imaju pogrešna shvaćanja u vezi s terminologijom povezanom s funkcionalnom hranom. Neki autori proglašavaju hranu ili sastojke funkcionalnima kada se proizvode pomoću potencijalno funkcionalnih tvari dobivenih iz industrijskih

nusproizvoda ili primjenom određenih tehnoloških procesa (Gutiérrez, 2018), dok drugi iznose tvrdnje o funkcionalnosti hrane na temelju obogaćivanja esencijalnim mineralima (Adadi i sur., 2019). Nadalje, neki autori i dalje koriste izraz "prevencija bolesti", iako funkcionalna hrana ne sprječava niti liječi bolesti, budući da drugi unutarnji i vanjski čimbenici (npr. genetski čimbenici, fizička neaktivnost, kalorijska gustoća i raznolikost, hormoni, dob) imaju važnu ulogu u etiologiji nezaraznih bolesti. Slično tome, mnogi autori proglašavaju hranu ili sastojke funkcionalnima na temelju *in vitro* ili istraživanja na životinjama, dok drugi miješaju razliku između konvencionalne i funkcionalne hrane. Stoga je važno naglasiti da funkcionalna hrana nije lijek, jer ne liječi i ne sprječava bolesti (Granato i sur., 2020).

2.7.1. Klasifikacija funkcionalne hrane

Prema Essa i suradnici (2023) funkcionalna hrana se može podijeliti u 3 kategorije:

- i. konvencionalna hrana
- ii. modificirana hrana i
- iii. sastojci hrane.

Konvencionalna hrana nije prošla nikakve promjene i dolazi u izvornom obliku, poput povrća, voća, ribe, mliječnih proizvoda, mahunarki i žitarica, koje imaju značajne zdravstvene prednosti. Modificirana hrana odnosi se na hranu koja je obogaćena ili fortificirana specifičnim nutrijentima kako bi se promicali zdravstveni učinci. Primjeri modificirane funkcionalne hrane uključuju napitke obogaćene kalcijem, antioksidansima i vitaminima, kruh obogaćen kalcijem i folatom, te proizvode obogaćene biljnim vlaknima, sterolima i omega-3 masnim kiselinama. Fortifikacija je uobičajen pojam koji opisuje praksu povećanja količine određenog mikronutrijenta u hrani. To je održivo i isplativo rješenje za prevladavanje nedostatka mikronutrijenata (Hasler i sur., 2009).

Treća kategorija funkcionalne hrane su prebiotici. Crijevna mikrobiota fermentira ove oligofruktoze, proizvodeći kratkolančane masne kiseline, poput maslačne kiseline, octene kiseline i propionske kiseline, koje imaju potencijalne zdravstvene koristi. Glavne koristi uključuju poboljšanje kognicije, imuniteta, apsorpcije kalcija (Ca^{2+}) te smanjenje učestalosti sindroma iritabilnog crijeva i kolorektalnog karcinoma. Bakterije koje aerobno fermentiraju dijetalna vlakna stvaraju kratkolančane masne kiseline koje poboljšavaju integritet crijevnog epitela, jačajući crijevno-krvnu barijeru. Kratkolančane masne kiseline također lako ulaze u krvotok i prelaze krvno-moždanu barijeru, potičući osjećaj sitosti. Također epigenetski poboljšavaju proizvodnju regulatornih limfocita koji djeluju protuupalno (Blaak i sur., 2020).

2.8. ANTIOKSIDANSI I SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali, reaktivne kisikove vrste i reaktivne dušikove vrste, stvaraju se u našem tijelu kroz različite endogene sustave, izlaganjem različitim fizikalno-kemijskim uvjetima ili patološkim stanjima. Ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa nužna je za pravilnu fiziološku funkciju. Ako slobodni radikali nadvladaju sposobnost tijela da ih kontrolira, dolazi do stanja poznatog kao oksidativni stres. Slobodni radikali tada negativno mijenjaju lipide, proteine i DNK te pokreću razvoj niza bolesti kod ljudi (Lobo i sur., 2010).

2.8.1. Slobodni radikali

Slobodni radikal može se definirati kao svaka molekularna vrsta sposobna za samostalno postojanje koja sadrži nesporeni elektron u atomskoj orbitali. Prisutnost nesporenog elektrona uzrokuje određena svojstva koja su zajednička većini radikala. Mnogi radikali su nestabilni i vrlo reaktivni. Mogu donirati ili prihvatiti elektron od drugih molekula, zbog čega djeluju kao oksidansi ili reducensi. Najvažniji slobodni radikali koji sadrže kisik u mnogim bolestima su hidroksilni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid, singletni kisik, hipoklorit, radikal dušikovog oksida i radikal peroksinitrita. Ove visoko reaktivne vrste sposobne su oštetiti biološki važne molekule poput DNK, proteina, ugljikohidrata i lipida unutar jezgre i staničnih membrana. Slobodni radikali napadaju ključne makromolekule, što dovodi do oštećenja stanica i narušavanja homeostaze (Young i Woodside, 2001).

2.8.2. Oksidativni stres

Ovaj pojam se koristi za opisivanje stanja oksidativnog oštećenja koje nastaje kada je kritična ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i obrane antioksidansa nepovoljna. Kratkotrajni oksidativni stres može se pojaviti u tkivima ozlijeđenim traumom, infekcijom, toplinskim ozljedama, hiperoksijom, toksinima ili prekomjernom tjelesnom aktivnošću. Oštećena tkiva proizvode povećanu količinu enzima koji generiraju slobodne radikale (npr. ksantin oksidaza, lipoksigenaza, ciklooksigenaza), aktiviraju fagocite, oslobađaju slobodno željezo i bakrove ione ili dolazi do poremećaja u lancima prijenosa elektrona tijekom oksidativne fosforilacije, što stvara višak reaktivnih kisikovih spojeva (engl. „*Reactive oxygen species*“, ROS) (Lobo i sur., 2010). Oksidativni stres se smatra glavnim čimbenikom u mnogim stanjima, uključujući aterosklerozu, upalne bolesti, određene vrste raka te proces starenja. Danas se vjeruje da oksidativni stres značajno doprinosi svim upalnim bolestima (arthritis, vaskulitis, glomerulonefritis, lupus eritematosus, sindrom akutnog respiratornog distresa), ishemijskim

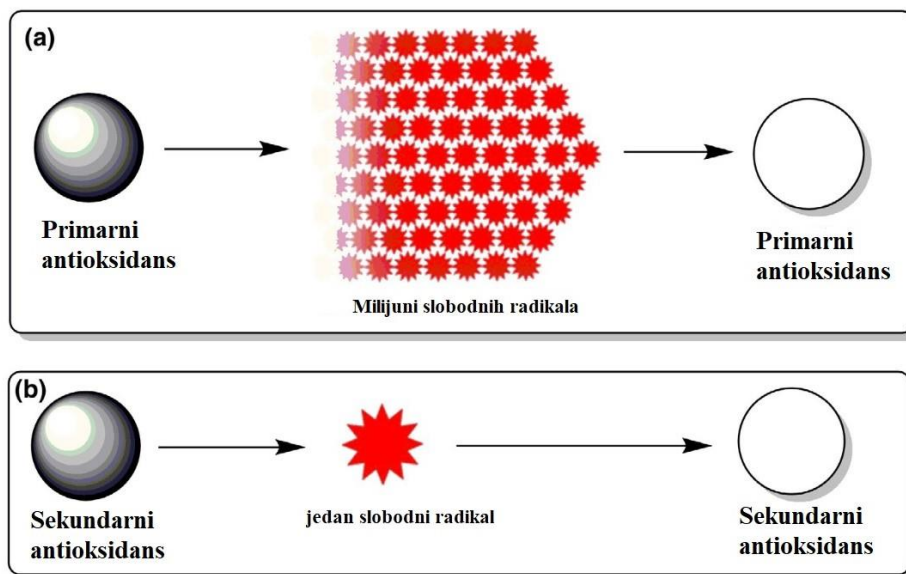
bolestima (bolesti srca, moždani udar, crijevna ishemija), hemokromatozi, sindromu stečene imunodeficijencije (AIDS), emfizemu, transplantaciji organa, želučanim ulkusima, hipertenziji i preeklampsiji, neurološkim poremećajima (Alzheimerova i Parkinsonova bolest, mišićna distrofija), alkoholizmu, bolestima povezanim s pušenjem i mnogim drugim stanjima (Stefanis i sur., 1997).

2.8.3. Uloga antioksidansa u borbi protiv oksidativnog stresa

Antioksidans je molekula dovoljno stabilna da donira elektron slobodnom radikalu i neutralizira ga, čime smanjuje njegovu sposobnost nanošenja štete. Ove molekule male molekularne mase sigurno reagiraju sa slobodnim radikalima i prekidaju lančanu reakciju prije nego što dođe do oštećenja vitalnih molekula. Neki od tih antioksidansa, uključujući glutation, ubikinol i mokraćnu kiselinu, nastaju tijekom normalnog metabolizma u tijelu. Drugi antioksidansi prisutni su u prehrani. Iako tijelo posjeduje nekoliko enzimskih sustava za hvatanje slobodnih radikala, glavni antioksidansi su mikronutrijenti vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (askorbinska kiselina) i beta-karoten (Levine i sur., 1991).

Antioksidansi djeluju kao hvatači radikala, donori vodika, donori elektrona, razgrađivači peroksida, neutralizatori singletnog kisika, inhibitori enzima, sinergisti i agensi za keliranje metala. Enzimatski i neenzimatski antioksidansi prisutni su u unutarstaničnom i izvanstaničnom okruženju kako bi detoksificirali reaktivne kisikove spojeve (ROS) (Frie i sur., 1988).

Postoje dva glavna mehanizma djelovanja antioksidansa (Slika 4). Prvi je mehanizam prekidanja lančane reakcije, pri kojem primarni antioksidans (neenzimatski) donira elektron slobodnom radikalu prisutnom u sustavu. Enzimski antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale kroz niz reakcija (sekundarni mehanizam) u kojima se ti reaktivni spojevi postupno pretvaraju u vodikov peroksid, a potom u vodu, uz pomoć kofaktora poput željeza, cinka, bakra i mangana. Ovi antioksidansi su prirodno prisutni u našem organizmu, a uključuju enzime poput katalaze, superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i glutation reduktaze. U novije vrijeme dodana je i treća klasa antioksidansa, nazvana tercijarni antioksidansi. Oni popravljaju oštećene biomolekule poput DNK ili proteina. (Lobo i sur., 2010).



Slika 4. Reakcije primarnih i sekundarnih antioksidansa (prema Zeb, 2010)

2.8.4. Antioksidansi u maginji

Plodovi maginje dobar su izvor minerala, a posebno su bogati kalcijem. Mliječna, jabučna, suberična i fumarna kiselina su identificirane, kao i galna, protokatehuinska, gentisična, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska i *m*-anizinska fenolna kiselina. Tanini zajedno s drugim fenolnim spojevima doprinose karakterističnom gorkom okusu ploda. Unutar antocijana, cijanidin je identificiran kao glavni nositelj karakteristične crvene boje ploda. Ostali flavonoidi uključuju antocijanin delfinidin-galaktozid te flavonole kvercetin i kempferol (Pallauf i sur., 2008).

U istraživanju Guemmaz i sur. (2020) ukupni sadržaj polifenola i flavonoida određen je spektrofotometrijski. Antioksidativna aktivnost procijenjena je korištenjem DPPH[•], OH[•], H₂O₂, O^{•-}₂, metode izbjeljivanja β-karotena te ispitivanja oksidativne hemolize eritrocita izazvane 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidrokloridom (AAPH-om). Fitokemijska analiza pokazala je prisutnost polifenola i flavonoida u oba ekstrakta. Pokazano je da ekstrakti listova *A. unedo* L. imaju snažan antioksidacijski potencijal, što se može pripisati visokom udjelu polifenolnih spojeva. Stoga bi ova biljka mogla biti iskorištena kao potencijalan izvor prirodnih antioksidacijskih agenasa za farmaceutske i prehrambene primjene. Također, u istraživanju Moualek i sur. (2016) *A. unedo* pokazala je *in vitro* protuupalno djelovanje inhibicijom denaturacije albumina izazvane toplinom i stabilizacijom membrane crvenih krvnih stanica. Rezultati su pokazali da vodeni ekstrakt listova *A. unedo* ima dobru antioksidativnu aktivnost i zanimljiva protuupalna svojstva.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni uzorci i radni mikroorganizmi

Plodovi maginje ubrani su u Makarskoj i na Pelješcu te unutar par dana dopremljeni u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje su, kao i tijekom transporta, skladišteni na +4 °C.

Test-mikroorganizmi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti dobavljeni su iz komercijalnih zbirki mikroorganizama DSMZ (engl. The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) i ATCC (engl. American Type Culture Collection), a korišteni sljedeći test-mikroorganizmi: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™ i *Candida albicans* ATCC®10231™ dio su zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

3.1.2. Hranjive podloge

Tijekom izrade ovog rada korištene su sljedeće hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama:

a) Hranjive podloge za izolaciju, održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava: pepton 10,0 g/L; goveđi ekstrakt 10,0 g/L; ekstrakt kvasca 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g/L; natrijev acetat 5,0 g/L; amonijev citrat 2,0 g/L; magnezijev sulfat 0,2 g/L; manganov sulfat 0,05 g/L; agar 15,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija pri 121 °C/15 min. Gore navedene kemikalije su odvagane, otopljene u destiliranoj vodi, dobro promiješane i nakon sterilizacije razlivene u petrijeve zdjelice.

- MRS bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodanog agara.

Sterilizacija se provela pri 121 °C/15 min.

b) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj test mikroorganizama

- HA (hranjivi agar) (Biolife, Italija) sastava: pepton 15,0 g/L; mesni ekstrakt 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; K₃PO₄ 0,3 g/L; agar 18,0 g/L; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min.

- HB (hranjivi bujon) (Biolife, Italija) - istog sastava kao i hranjivi agar, ali bez dodanog agara.

c) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj kvasca

- Sladni agar - sladni ekstrakt (praškasti) 20 g/L; pepton 6 g/L; glukoza 20 g/L; agar 15 g/L; voda (destilirana) 1 L; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min.
- Sladni bujon - sladni ekstrakt (praškasti) 20 g/L; pepton 6 g/L; glukoza 20 g/L; voda(destilirana) 1 L; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.

3.1.3. Uređaji

- Analitička vaga, Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Autoklav (Sutjeska, Beograd, Srbija)
- Centrifuga, Centric 150 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik gmbh, Wehingen, Njemačka)
- Čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- Hladnjak sa zamrzivačem, cuef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- Inkubator, MEMMERT BE 600 (Memmert gmbh + Co.KG, Schwabach, Njemačka)
- pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Spektrofotometar, Helios β UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- Štapni mikser
- Tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Vibracijska miješalica, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)

3.1.4. Pribor

- Automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Eppendorf tubice (2ml)
- Erlenmeyerove tikvice
- Filteri za šprice „minisart“, ptfе, 0,22 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Kivete (50 ml)
- Kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Laboratorijske čaše
- Laboratorijske epruvete
- Laboratorijski stalci
- Lijevak za odjeljivanje
- Menzure (10, 50, 100 i 1000 ml)

- Mikrobiološka ušica
- Mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- Mikrotitarske pločice (12 jažica, 96 jažica)
- Petrijeve zdjelice (ø 10 cm)
- Plamenik
- Plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- Štapići po drigalskom

3.1.5. Kemikalije

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Alginat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Deionizirana sterilna voda (Zagreb, Hrvatska)
- Etanol, 70 %, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Fetalni teleći serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Fiziološka otopina 0,5 % NaCl (Zagreb, Hrvatska)
- Glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Kalcijev klorid (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)
- Kalijev klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Koncentrirana kloridna kiselina (Carlo Erba Reagents, Španjolska)
- Metanol (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- Mononatrijev fosfat, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Natrijev alginat (Sigma, St. Louis, SAD)
- Natrijev citrat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Octena kiselina (Honeywell, Offenbach, Njemačka)
- Pankreatin, (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)
- Pepsin, (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)
- Urea (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)

- Žučne soli (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema vodenog ekstrakta ploda maginje za izolaciju

Postupak ekstrakcije provodi se na način da se plodovi maginje u aseptičnim uvjetima usitnjavaju štapnim mikserom do homogene pulpe (Slika 5). Odvažuje se 5 g uzorka pulpe od maginje u Erlenmeyerovu tikvicu od 50 ml te se nadoda 50 ml destilirane vode. Potom se sa špatulom dodatno usitni kaša maginje na čestice promjera manjeg od cca. 0,3 mm.



Slika 5. Homogena pulpa maginje dobivena usitnjavanjem štapnim mikserom (vlastita fotografija)

3.2.2. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz vodenog ekstrakta maginje

Pripremljeni uzorak u Erlenmeyerovoj tikvici prenesen je na tresilicu i homogeniziran 10 min pri 150 okretaja min^{-1} i 25 °C. Nakon homogenizacije uzorka, napravljena su 3 decimalna razrjeđenja. Iz svakog razrjeđenja prebačeno je po 100 μl suspenzije uzorka razmazivanjem štapićem po Drygalskom na MRS agar. Pripremljeni uzorci stavljeni su na inkubaciju u termostat na 37 °C tijekom 24 h, aerobno i anaerobno. Nakon inkubacije, porasle pojedinačne kolonije prebačene su mikrobiološkom ušicom s MRS agara u zasebne MRS bujone, kako bi se dobile čiste kulture, te inkubirane 24 h na 37 °C u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Nakon inkubacije i porasta, izolati su pročišćeni nacjepljivanjem na MRS agar te ukoliko se radilo o morfološki ujednačenim kulturama, spremljene su pod oznakom izolata na -20 °C u 30 % glicerolu do daljnje upotrebe.

3.2.3. Izolacija kvasaca iz vodenog ekstrakta maginje

Pripremljeni uzorak u Erlenmeyerovoj tikvici prenesen je na tresilicu i homogeniziran 10 min pri 150 okretaja min^{-1} i 25 °C. Nakon homogenizacije uzorka, napravljena su 3 decimalna razrjeđenja. Iz svakog razrjeđenja prebačeno je po 100 μl suspenzije uzorka razmazivanjem štapićem po Drygalskom na sladni agar. Pripremljeni uzorci stavljeni su na inkubaciju u termostat na 28 °C tijekom 24 h, aerobno i anaerobno. Nakon inkubacije, porasle pojedinačne kolonije prebačene su mikrobiološkom ušicom sa sladnog agara u zasebne sladne bujone, kako bi se dobile čiste kulture, te inkubirane 24 h na 28 °C u aerobnim uvjetima. Nakon inkubacije i porasta, izolati su pročišćeni nacjepljivanjem na sladni agar te ukoliko se radilo o morfološki ujednačenim kulturama, spremljene su pod oznakom izolata na -20 °C u 30 % glicerolu do daljnje upotrebe.

3.2.4. Određivanje optičke gustoće i specifične brzine rasta

U Erlenmeyerove tikvice od 100 ml otpipetirano je 50 ml sterilne hranjive Man–Rogosa–Sharpe (MRS) podloge za bakterije mliječne kiseline, odnosno 50 ml sladnog bujona za kvasce. Podloge su nacijepljene s 5 ml prekonoćne suspenzije mikroorganizama. Uzorci su stavljeni u tresilicu na 150 okretaja min^{-1} u aerobnim uvjetima.

Pročišćene čiste kulture morfološki su okarakterizirane te je izuzeto 12 različitih kolonija bakterija mliječne kiseline i 8 različitih kolonija kvasaca.

Kako bi se odredila specifična brzina rasta navedenih bakterija mliječne kiseline i kvasaca, praćena je optička gustoća na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Optička gustoća mjerena je svakih sat vremena prvih 10 sati te točno 24 sata od početka mjerenja.

Tipične vrijednosti za OD_{620} su između 0,1 i 1,0, gdje $\text{OD}_{620} = 1,0$ odgovara gustoći od oko 10^8 bakterijskih stanica/ml (ovisno o vrsti bakterija ili kvasaca).

Mikrobni rast obično prolazi kroz nekoliko uzastopnih faza, uključujući: fazu prilagodbe (lag faza), eksponencijalnu fazu (log faza), stacionarnu fazu i fazu odumiranja (slika 5).

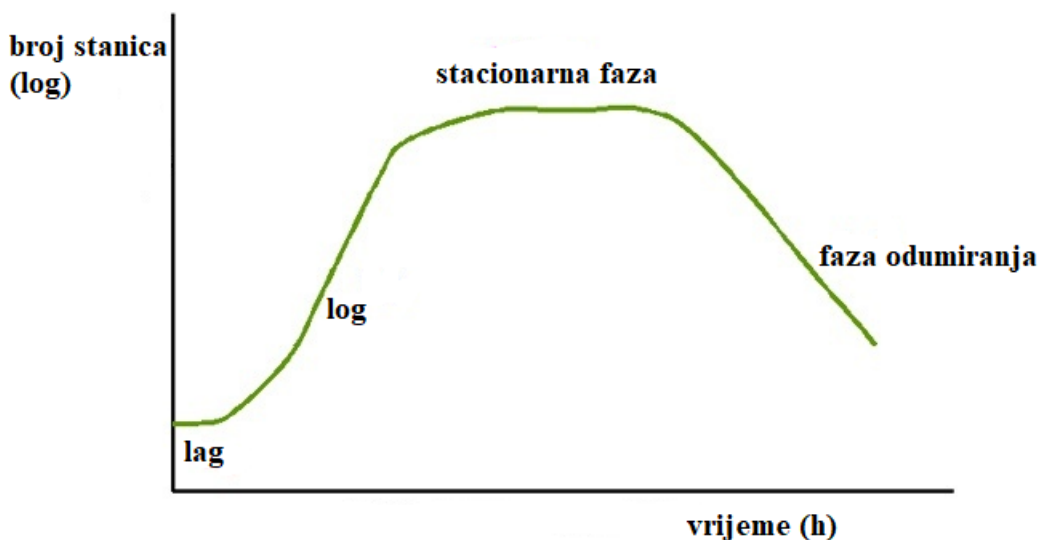
Uobičajeno je da se stanice uzgajaju dok apsorbancija pri 620 nm ne dostigne približno 0,4.

Na osnovu dobivenih očitavanja optičke gustoće, iscrtana je krivulja rasta mikroorganizama i točke u logaritamskoj fazi rasta su korištene za izračunavanje specifične brzine rasta prema jednadžbi.

Specifična brzina rasta određena je kao funkcija log broja stanica:

$$\mu = (1/N) \times (dN/dt) \quad (\text{h}^{-1}) \quad [1]$$

gdje je μ specifična brzina rasta (h^{-1}), N je broj stanica (stanica/ml), a dN/dt promjena koncentracije stanica u vremenu (stanica/ml/h).



Slika 6. Mikrobni rast (prema Madigan i sur., 2012)

3.2.5. Antimikrobna aktivnost bakterija i kvasaca izoliranih iz maginje prema odabranim patogenima

Nakon prekonocnog uzgoja stanica bakterija mliječne kiseline u MRS bujonu te stanica kvasca u sladnom bujonu, stanice su odvojene od medija centrifugiranjem na 6000 okretaja min^{-1} tijekom 10 min. Supernatanti kvasca i bakterija su odvojeni te sterilizirani kroz filtere veličine 0,22 μm . Nakon toga, bakterijski supernatant je raspodijeljen na tri dijela: netretiran (označen slovom „a“), neutraliziran pomoću NaOH do pH 6,6 (označen slovom „b“) te treći koji je zagrijavan na 100 °C tijekom 20 min (označen slovom „c“). Supernatant kvasca nije dalje tretiran. Antimikrobna aktivnost supernatanta određena je na polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica prilagođenim postupkom prema Frece i sur. (2011) i Ratsep (2014). Određena je antimikrobna aktivnost prema test-mikroorganizmima: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ i *Candida albicans* ATCC®10231™.

U svaku jažicu mikrotitarske pločice dodano je 150 μl analiziranog supernatanta kvasca, odnosno bakterija, 120 μl medija za patogene (hranjivi bujon za bakterije ili sladni bujon ako je u pitanju *Candida albicans*) te 10 μl prethodno uzgojenih testnih mikroorganizma. Inkubacija se odvijala na 37 °C (28 °C za *Candidu albicans*) tijekom 24 sata u aerobnim uvjetima. U određenim razmacima mjerena je apsorbancija na 620 nm koristeći čitač mikrotitarskih pločica. Praćen je rast te je izračunata inhibicija prema sljedećem izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100$$

[2]

gdje je:

A_t = apsorbancija u vremenu t

A_0 = apsorbancija u vremenu 0

Za kontrolne uzorke korišten je neinokulirani, tj. sterilni MRS ili sladni bujon koji je podvrgnut istom tretmanu kao i ostali uzorci, dok su u slučaju slijepih proba korišteni uzorci koji nisu sadržavali dodane patogene mikroorganizme.

3.2.6. API 50 CHL metoda

Nakon porasta bakterijskih kultura na MRS agaru, biomasa je resuspendirana pomoću mikrobiološke ušice u API 50 CHL mediju. Postignuta gustoća suspenzije je mjerena na denzitometru te je konačna gustoća suspenzija iznosila 2 McF (eng. McFarland units). Suspenzijom su napunjene ampule API 50 CHL stripa te je dodano mineralno ulje. Nakon inkubacije (48 h, 37 °C), očitani su rezultati na način da promjena boje u ampuli iz žute u plavu znači da je došlo do fermentacije šećera što je rezultiralo zakiseljavanjem i promjenom boje bromkrezol-purpurnog indikatora. Iznimka je ampula 25 gdje se pozitivnim rezultatom smatra promjena boje iz ljubičaste u crnu. Rezultati su očitani pomoću identifikacijskog softvera Api-web™ (BioMerieux, Francuska).

3.2.7. Fermentacija maginje izoliranim kvascem i bakterijom mliječne kiseline

Nakon provedene antimikrobne aktivnosti prema odabranim patogenima odlučeno je krenuti u fermentaciju s izoliranim kvascem i bakterijom mliječne kiseline.

Izolati su centrifugirani 15 minuta na 8000 okretaja min^{-1} te je pripremljeno ukupno 8 uzoraka u 8 Erlenmeyerovih tikvica od 100 ml.

Tablica 1. Fermentacija maginje

Uzorak	Sastav	Pasterizacija	Temperatura Fermentacije (°C)
M	60 ml fiziološke otopine + 20 g usitnjene maginje	Ne	32,5
MP	Isto kao M	Da	32,5
MK	5 ml otopine stanica kvasca + 20 g usitnjene maginje + 55 ml fiziološke otopine	Ne	28
MKP	Isto kao MK	Da	28
MB	5 ml otopine stanica BMK + 20 g usitnjene maginje + 55 ml fiziološke otopine	Ne	37
MBP	Isto kao MB	Da	37
MKB	2,5 ml otopine stanica kvasca + 2,5 ml otopine stanica BMK + 20 g usitnjene maginje + 55 ml fiziološke otopine	Ne	32,5
MKBP	Isto kao uzorak MKB	Da	32,5

Prvo je dodano 15 ml fiziološke otopine u centrifugirane stanice kako bi se osiguralo da se u svaku tikvicu stavi jednaka koncentracija stanica ($10^6 - 10^9$ stanica/g).

Pasterizirani uzorci obrađeni su metodom kratkotrajne obrade na visokoj temperaturi (engl. High Temperature Short Time, HTST) u vodenoj kupelji pri 72 °C tijekom 15 sekundi, nakon čega su ohlađeni na 10 °C.

Svi uzorci fermentiraju u anaerobnim uvjetima tijekom 72 sata. Nakon 24 i 48 sati izuzima se po 10 ml uzorka za analize.

3.2.8. Sposobnost eliminacije DPPH slobodnih radikala

Ukupna antioksidacijska aktivnost, određena kroz sposobnost eliminacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnih radikala, izmjerena je prema metodologiji prilagođenoj prema Son i Lewis (2002).

U 2 ml etanolne otopine DPPH dodano je 10 µl uzoraka iz postupka 3.2.7. te su uzorci homogenizirani. Nakon inkubacije uzoraka u mraku kroz 30 minuta, mjerenja je apsorbancija pri 517 nm. Kontrolni uzorci sadržavali su 2 ml etanolne otopine DPPH i 10 µl fiziološke otopine. Na temelju provedenih mjerenja izračunat je postotak eliminacije DPPH slobodnih radikala, prema izrazu:

$$\text{Uklanjanje radikala (\%)} = [1 - (A - A_{bl}) / A_c] \cdot 100 \quad [3]$$

gdje je:

A - apsorbancija uzorka

A_{bl} - apsorbancija slijepe probe

A_c - apsorbancija kontrolnog uzorka.

3.2.9. Antimikrobna aktivnost maginje fermentirane kvascem prema odabranim patogenima

Određena je antimikrobna aktivnost uzorka MK i uzorka M iz poglavlja 3.2.7. Test mikroorganizmi za određivanje antimikrobne aktivnosti bili su: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ i *Candida albicans* ATCC®10231™.

U svaku jažicu mikrotitarske pločice dodano je 150 µl analiziranog fermenta, 120 µl medija za patogene (hranjivi bujon za bakterije ili sladni bujon ako je u pitanju *Candida albicans*) te 10 µl prethodno uzgojenih testnih mikroorganizma. Inkubacija se odvijala na 37 i 28°C u trajanju od 24 sata. U određenim razmacima mjerena je apsorbancija na 620 nm

koristeći čitač mikrotitarskih pločica. Praćen je rast te je izračunata inhibicija prema sljedećem izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100 \quad [4]$$

gdje je:

A_t = apsorbancija u vremenu t

A_0 = apsorbancija u vremenu 0

Za kontrolne uzorke korištena je neinokulirana, odnosno sterilna fiziološka otopina (0,9 %) koja je podvrgnuta istom tretmanu kao i ostali uzorci, dok su u slučaju slijepih proba korišteni uzorci koji nisu sadržavali dodane patogene mikroorganizme.

3.2.10. Obrada podataka

Rezultati dobiveni u istraživanju pripremljeni su i uređeni pomoću programa Microsoft Office Excel 2016. Statistička obrada podataka provedena je u programu STATISTICA v.7.1. za Windows 10 (Stat-Soft, Tulsa, OK, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Maginja, manje popularan plod s područja obale Jadranskog mora, ima značajku da se fermentacija događa već na stablu. Shodno tome, cilj ovog rada bio je izolirati autohtone mikroorganizme iz uzoraka maginje te istražiti fermentacijsku sposobnost istih i funkcionalna svojstva dobivenih proizvoda.

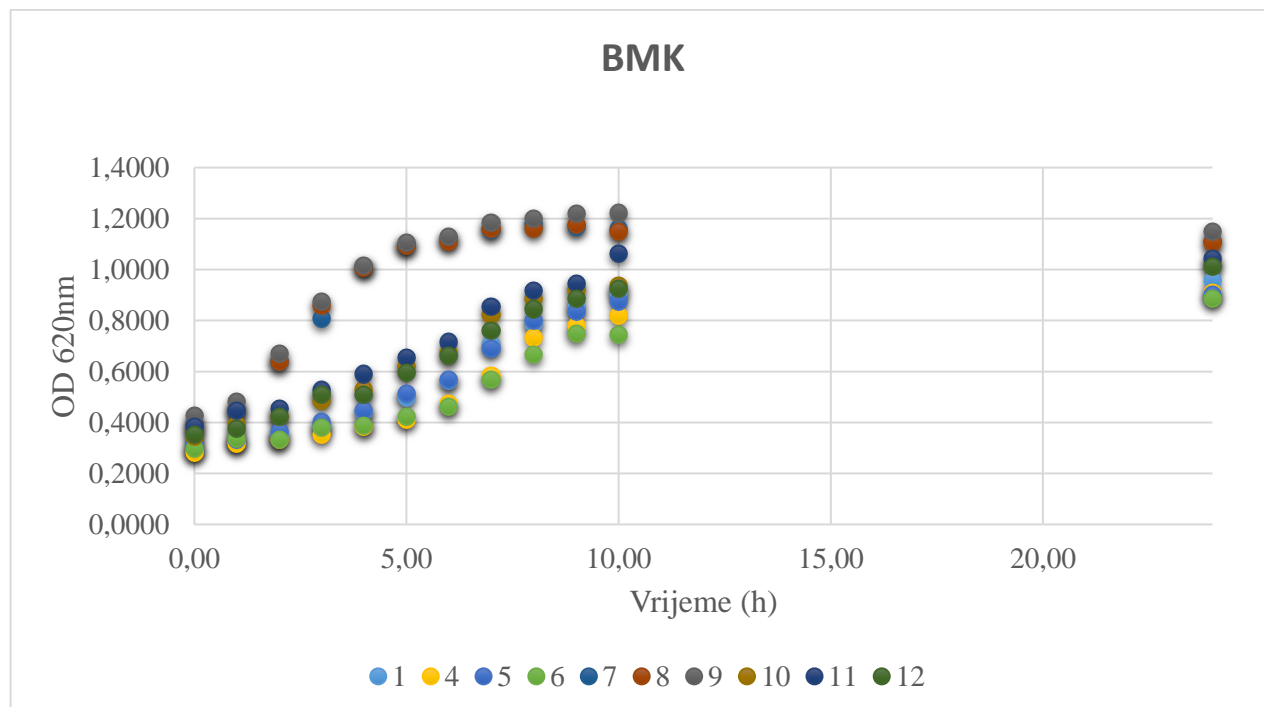
S obzirom na 20 izoliranih mikroorganizama, od čega 12 bakterija mliječne kiseline i 8 kvasaca, cilj je bio izdvojiti one s najvećim fermentacijskim potencijalom, a to je napravljeno mjerenjem specifične brzine rasta.

Prvo je određena optička gustoća rasta (engl. *optical density*, OD) svih izolata pri valnoj duljini od 620 nm i rezultati se nalaze na slikama 7 i 8.

OD se mjerila svakih sat vremena prvih 10 sati te 24. sat.

Specifična brzina rasta zatim je izračunata na temelju jednadžbe pravca i rezultati se nalaze na slikama 9 i 10.

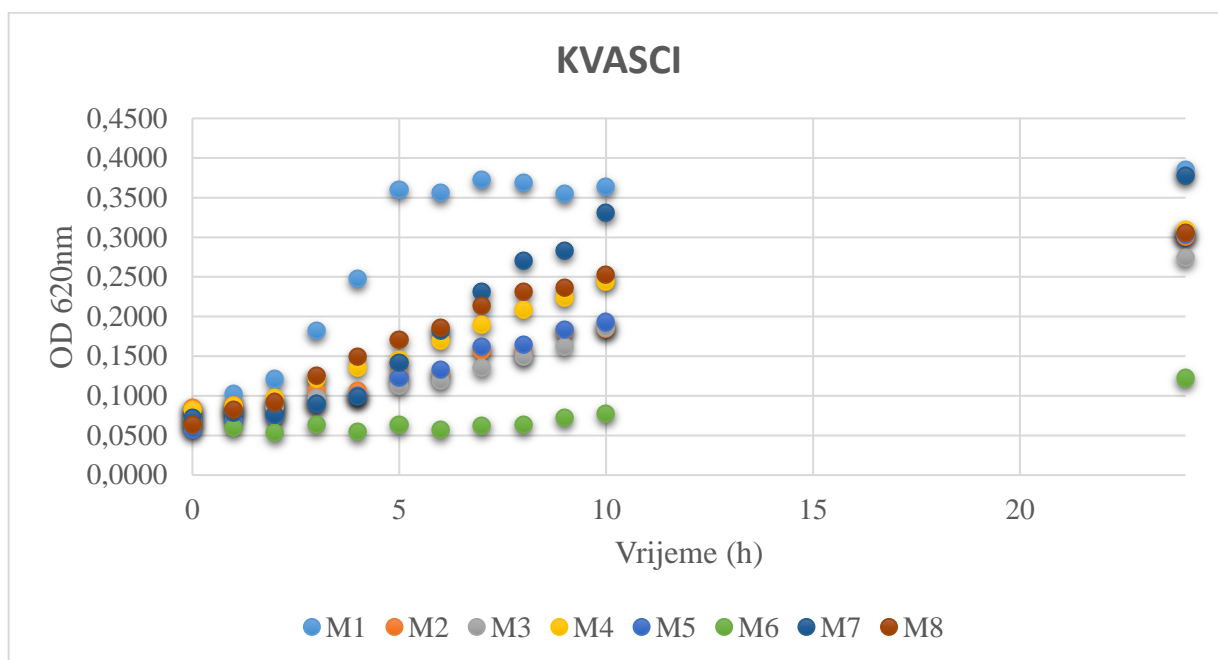
4.1. OPTIČKA GUSTOĆA RASTA



Slika 7. Optička gustoća rasta pri 620 nm 12 izolata bakterija mliječne kiseline u periodu od 24 sata

Bakterijski izolati 7, 8 i 9 izdvojili su se najvećom i gotovo podjednakom optičkom gustoćom

nakon svakog sata rasta. Najveća optička gustoća (1,2210) postignuta je u 10. satu rasta izolata 9.

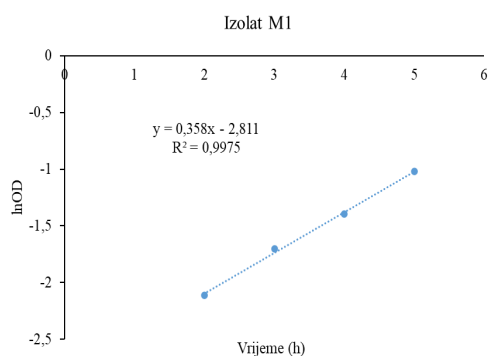


Slika 8. Optička gustoća rasta pri 620 nm 8 izolata kvasaca u periodu od 24 sata

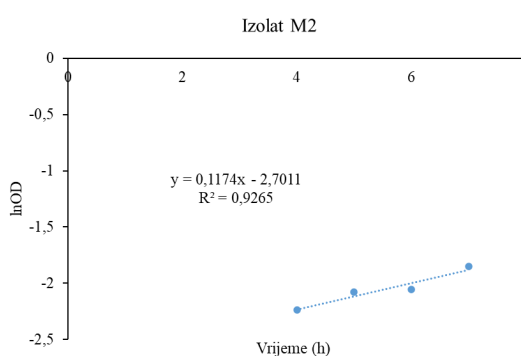
Nakon brze i nagle eksponencijalne faze rasta, kvasac M1 dostiže stacionarnu fazu rasta u 7. satu uzgoja. Ostali izolati nisu pokazali tako nagli, eksponencijalni porast optičke gustoće.

Na temelju rezultata sa slika 7 i 8 optičke gustoće rasta, odabrane su točke iz eksponencijalne faze rasta za svaki izolat te je izračunata specifična brzina rasta prema već navedenoj formuli.

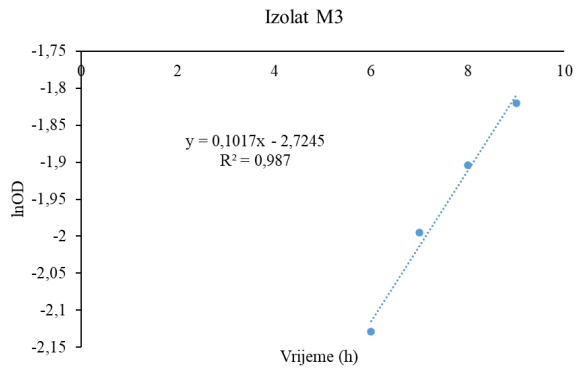
4.2. SPECIFIČNA BRZINA RASTA IZOLATA



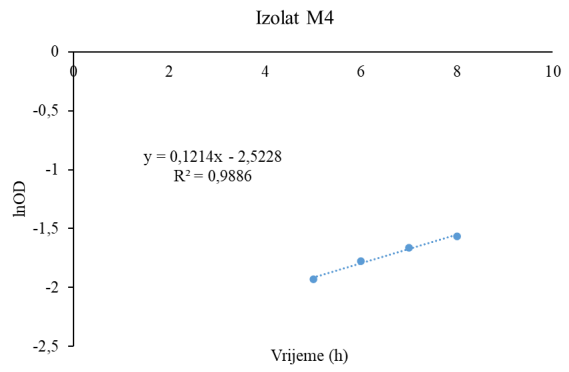
a)



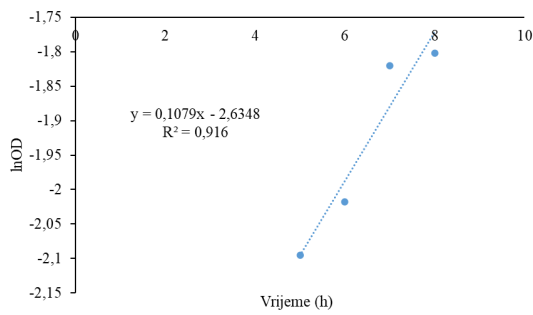
b)



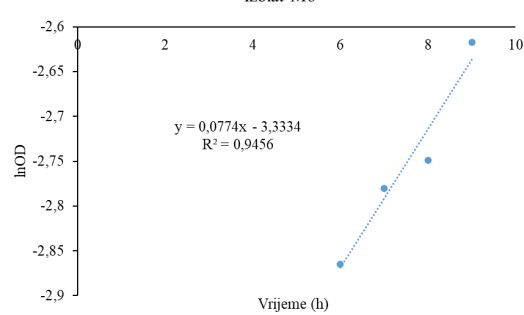
c)



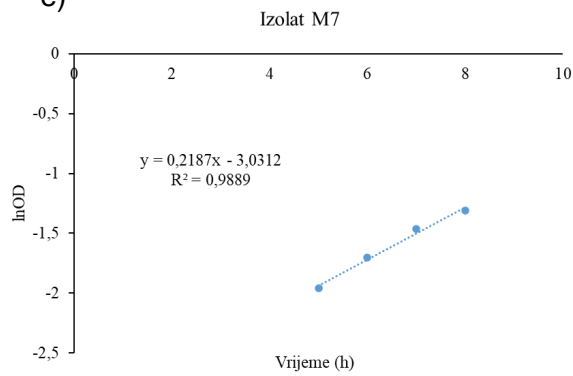
d)



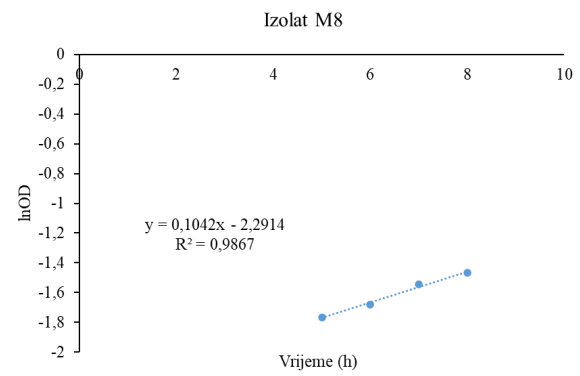
e)



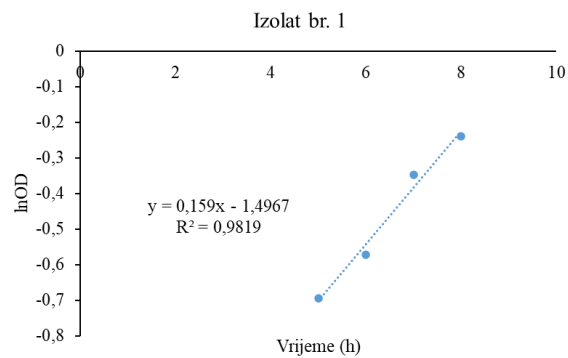
f)



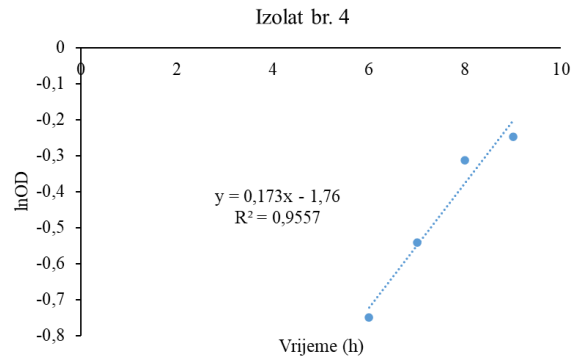
g)



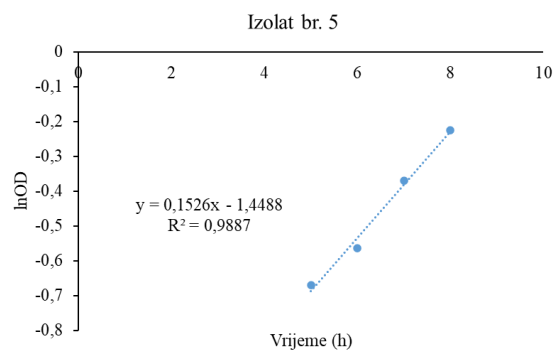
h)



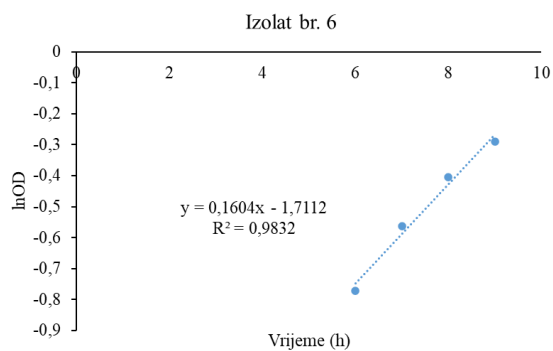
i)



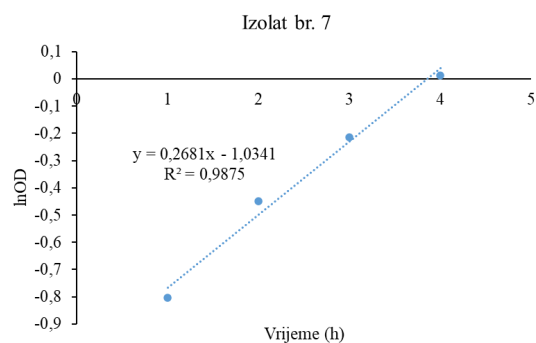
j)



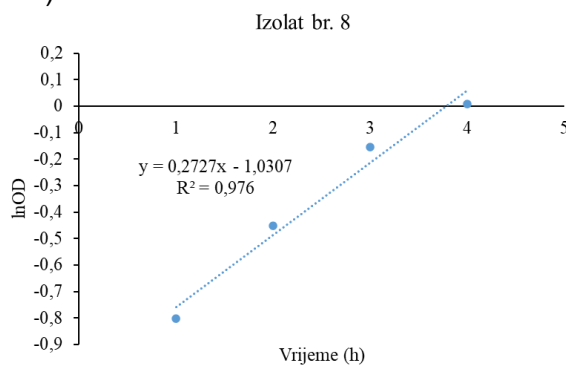
k)



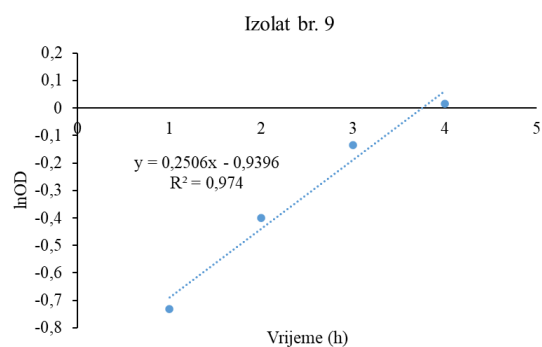
l)



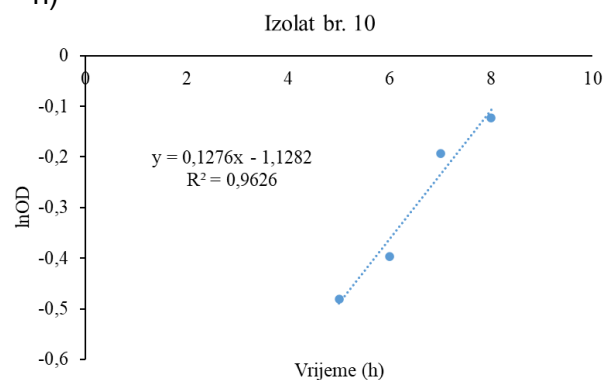
m)



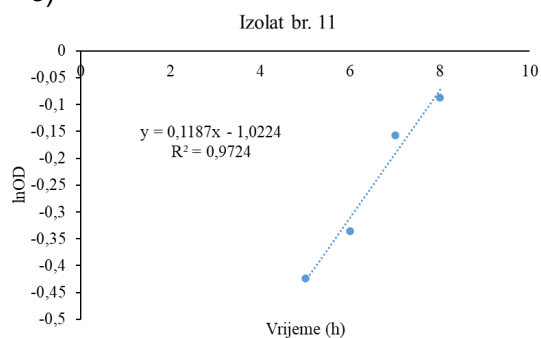
n)



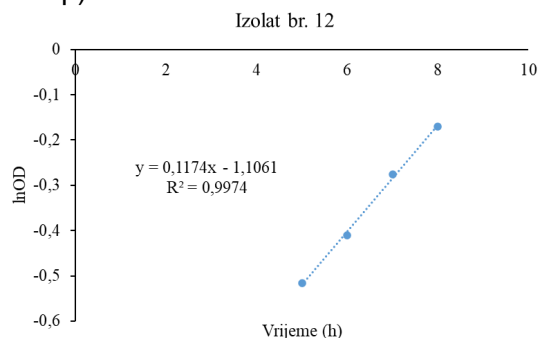
o)



p)



r)

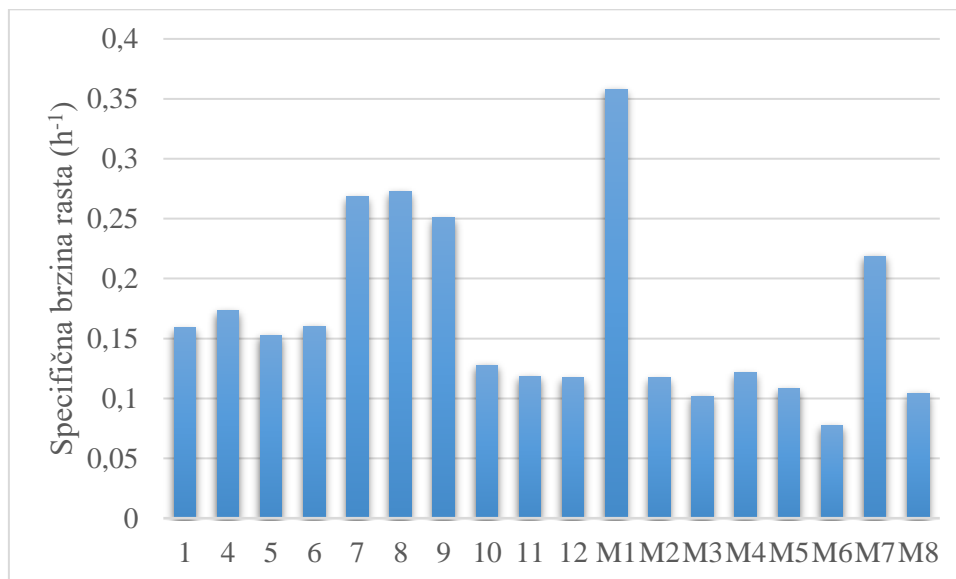


s)

Slika 9. a)-s) Jednadžbe pravca temeljene na vremenu i prirodnom logaritmu vrijednosti optičke gustoće u točkama eksponencijalne faze rasta

Na slici 9. može se vidjeti jednadžba pravca u točkama eksponencijalne faze rasta svakog

izolata. Iz jednadžbe pravca može se odrediti nagib pravca i time dobiti specifična brzina rasta pojedinog izolata.



Slika 10. Specifična brzina rasta svih ispitanih izolata određena kao funkcija log broja stanica (h⁻¹)

Iz priloženog grafa specifične brzine rasta može se primijetiti kako kvasac M1 ima najveću specifičnu brzinu rasta (0,358 h⁻¹), a iza njega slijede izolati bakterija mliječne kiseline 7, 8 i 9 s vrijednostima specifične brzine rasta iznad 0,25 h⁻¹.

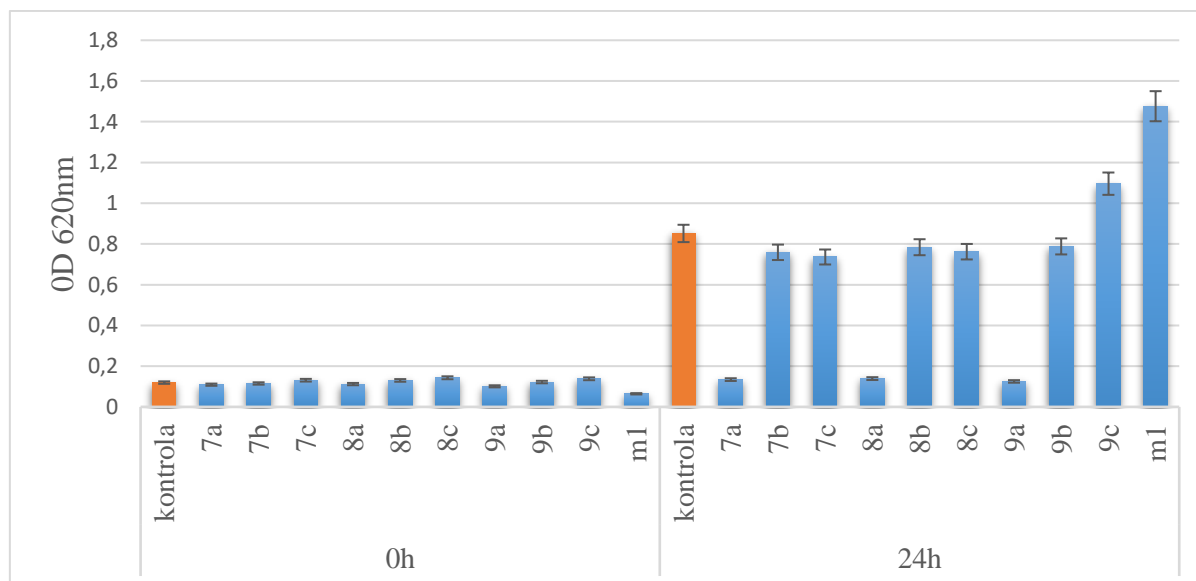
Navedeni rezultati su u skladu s onima koje su uočili Moreira i sur. (2005) koji su utvrdili specifičnu stopu rasta od 0,38 h⁻¹ za čiste kulture *S. cerevisiae* i *H. uvarum*, a te rezultate potvrdili su i Mendoza i sur. (2007).

4.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST IZOLATA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE I KVASCA

Antimikrobna aktivnost je sposobnost tvari ili organizma da smanji ili suzbije mikrobiološki rast i aktivnost. To je jedno od najvažnijih zdravstveno korisnih učinaka potencijalnih probiotika ili funkcionalnih proizvoda. Rast patogenih mikroorganizama u prisutnosti supernatanata 3 izolata bakterije mliječne kiseline (7,8 i 9) i 1 izolata kvasca (M1) analiziran je pomoću turbidimetrijske metode kako bi se procijenila antimikrobna aktivnost supernatanata.

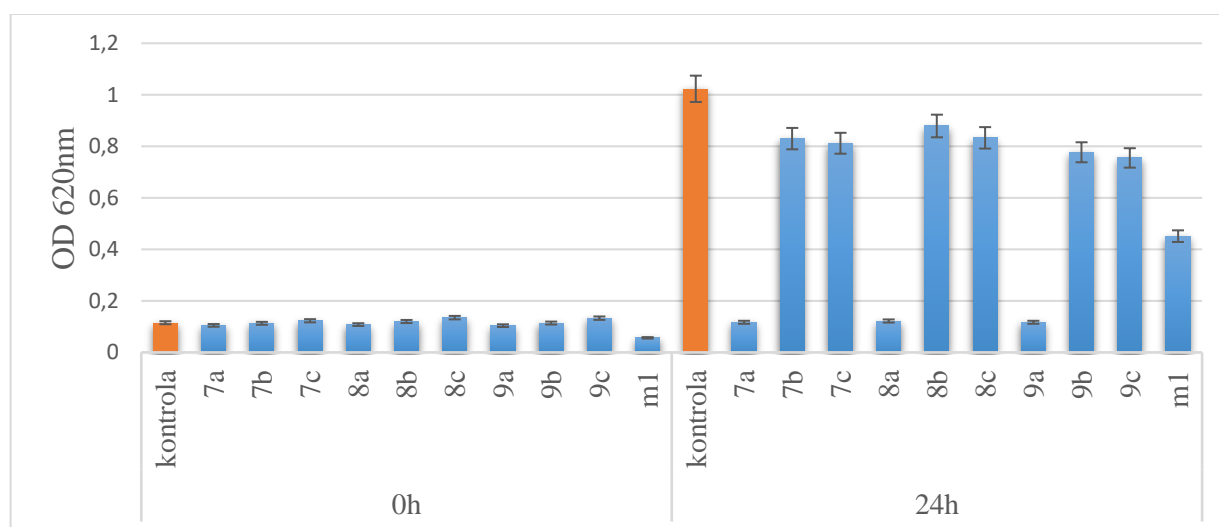
Uzorci 7a, 8a i 9a i M1 su sterilizirani filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm te netretirani. Kako bi se utvrdio utjecaj smanjenja pH vrijednosti uslijed proizvodnje organskih kiselina od strane bakterija mliječne kiseline, inhibicija je ispitana i u prisutnosti

neutraliziranog supernatanta. Na kraju, kako bi se procijenili učinci inhibicije proteinskih sastojaka, dio supernatanta je neutraliziran i termički tretiran, čime je došlo do denaturacije mogućih proteinskih komponenti. Kontrola je pripremljena bez dodatka supernatanta te se ispitalo inhibitorno djelovanje nakon 24 sata.



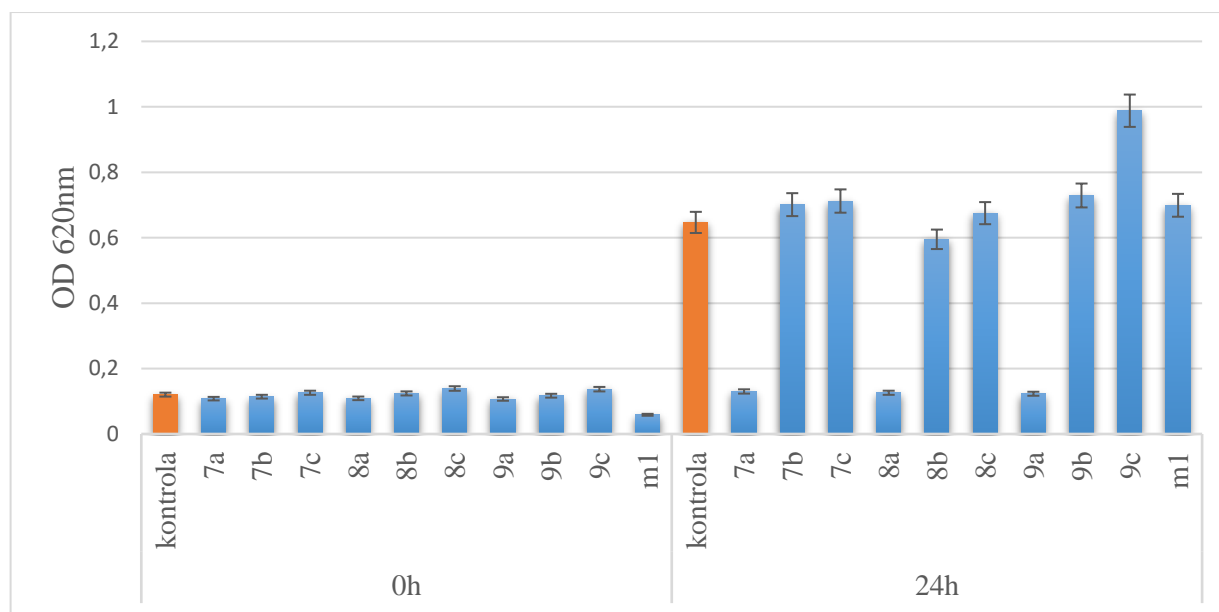
Slika 11. Rast test mikroorganizma *E. coli* ATCC@25922™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca i bakterija pri različitim vremenima inkubacije. Rast je izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620 nm ± standardna devijacija trostruke paralele.

7a- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm; 7b- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm i neutraliziran do pH 6,6; 7c- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; 8a- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm; 8b- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm i neutraliziran do pH 6,6; 8c- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; m1- izolat kvasca m1 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm



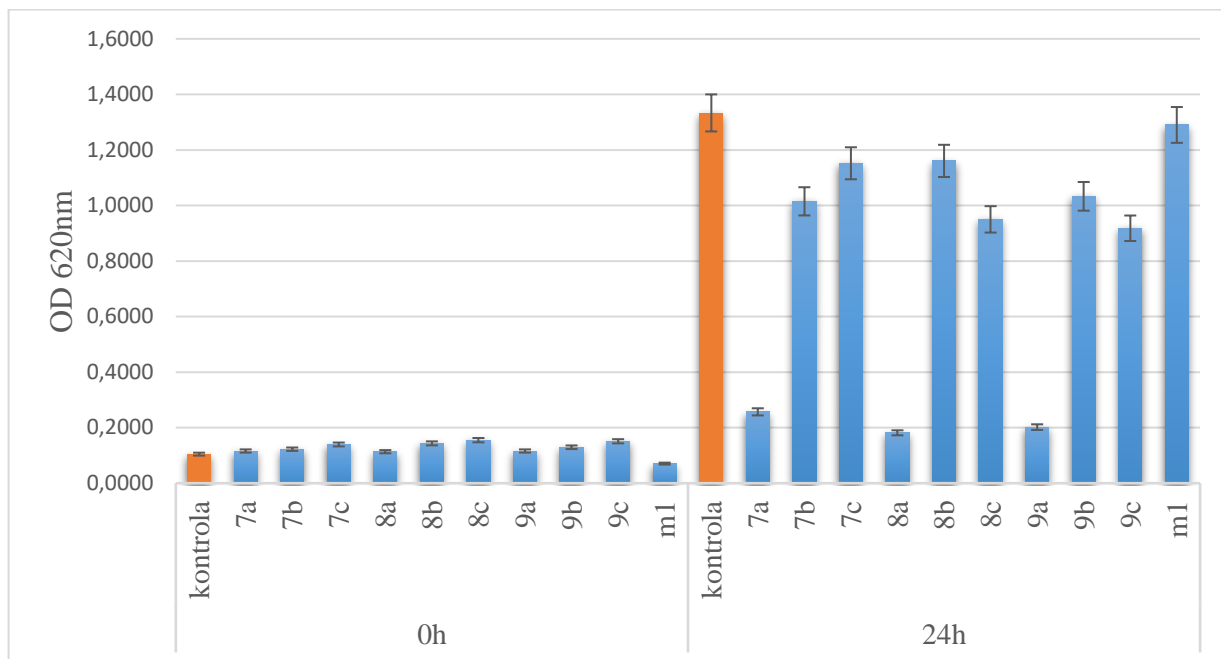
Slika 12. Rast test mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC@23074™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca i bakterija pri različitim vremenima inkubacije. Rast je

izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620 nm \pm standardna devijacija trostruke paralele. 7a- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m; 7b- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m i neutraliziran do pH 6,6; 7c- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; 8a- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m; 8b- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m i neutraliziran do pH 6,6; 8c- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; m1- izolat kvasca m1 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m



Slika 13. Rast test mikroorganizma *S. aureus* ATCC@23074™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca i bakterija pri različitim vremenima inkubacije. Rast je izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620 nm \pm standardna devijacija trostruke paralele.

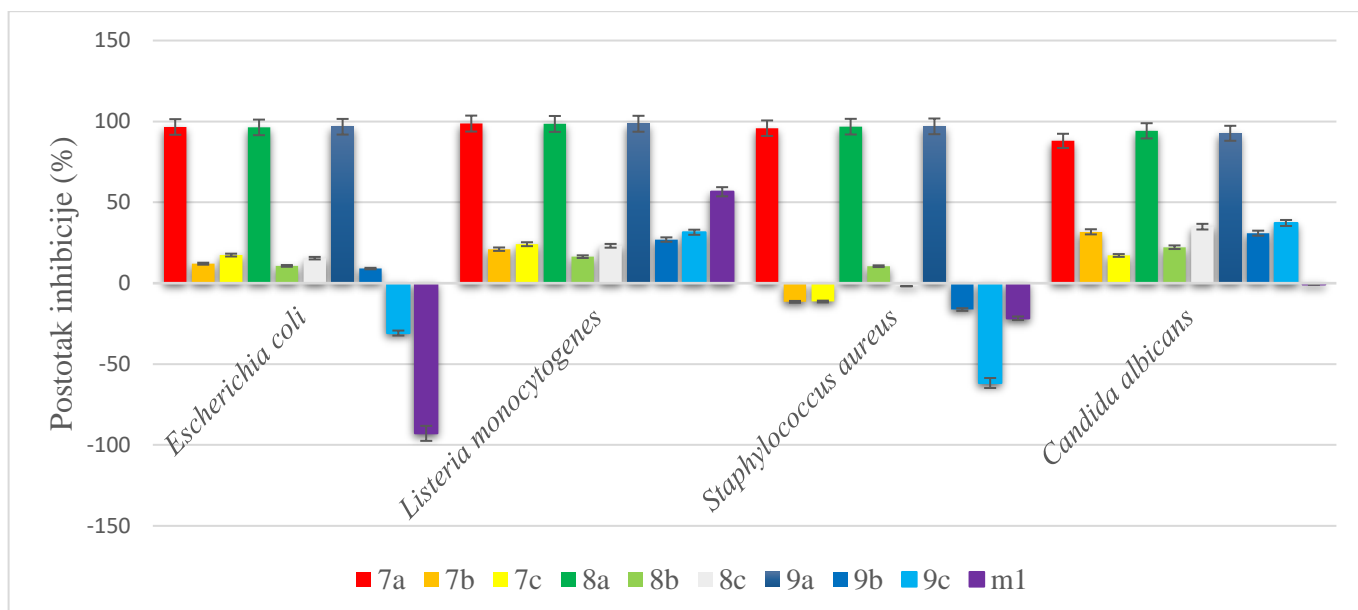
7a- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m; 7b- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m i neutraliziran do pH 6,6; 7c- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; 8a- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m; 8b- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m i neutraliziran do pH 6,6; 8c- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; m1- izolat kvasca m1 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μ m



Slika 14. Rast test mikroorganizma *C. albicans* ATCC®23074™ u prisutnosti supernatanta uzgojnog medija kvasca i bakterija pri različitim vremenima inkubacije. Rast je izražen kao povećanje optičke gustoće pri 620 nm ± standardna devijacija trostruke paralele.

7a- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm; 7b- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm i neutraliziran do pH 6,6; 7c- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; 8a- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm; 8b- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm i neutraliziran do pH 6,6; 8c- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; m1- izolat kvasca m1 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 μm

Obzirom na prikazane rezultate rasta patogenih mikroorganizama, izračunat je postotak inhibicije te su rezultati sumarno prikazani na slici 15.



Slika 15. Antimikrobna aktivnost izolata kvasca i bakterija mliječne kiseline prema odabranim patogenima izražena kao postotak inhibicije rasta ± SD

7a- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 µm; 7b- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 µm i neutraliziran do pH 6,6; 7c- izolat br. 7 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 µm, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; 8a- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 µm; 8b- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 µm i neutraliziran do pH 6,6; 8c- izolat br. 8 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 µm, neutraliziran i zagrijavan na 100 °C 20 minuta; m1- izolat kvasca m1 steriliziran filtracijom kroz bakteriološke filtre veličine pora 0,22 µm

Prema rezultatima dobivenim u istraživanju, prikazanim na slikama 11 – 15, može se primijetiti gotovo potpuna inhibicija patogena od strane svih supernatanata izolata bakterija mliječne kiseline u netretiranom obliku (7a, 8a i 9a). Postotak inhibicije za gotovo svaki patogen bio je veći od 95 %. S obzirom da nema značajne razlike između neutraliziranog i zagrijavanog supernatanta te da isti ne pokazuju inhibitorno djelovanje u znatnom obliku ni prema kojem patogenu, može se zaključiti da razlog jakog inhibitornog djelovanja leži u mliječnoj kiselini koju proizvode bakterije mliječne kiseline i koja ujedno snižava pH vrijednost.

Kvasac M1 pokazuje izrazito nisku razinu inhibicije prema svim patogenima osim prema *L. monocytogenes*. S obzirom na iznenađujuće visoku 57 %-tnu inhibiciju rasta *L. monocytogenes* i izrazito visoku vrijednost specifične brzine rasta odlučeno je i izolirani kvasac uključiti u daljnje istraživanje. U istraživanju Lozo i sur. (2004), utvrđeno je da *Lactobacillus paracasei* subsp.*paracasei* pokazuje antimikrobno djelovanje prema nekim patogenim bakterijama, a posebice prema *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella sp.* i *Pseudomonas aeruginosa*. Shahverdi i sur. (2023.) su dokazali dobra antimikrobna svojstva *Lactobacillus paracasei* prema *E. coli* i *S. aureus*. U istraživanju Younis i sur. (2017) pokazana je visoka antimikrobna aktivnost vrste *Candida intermedia* protiv *S. aureus* i *E. coli*, *C. kefyr* protiv *E. coli*, te *C. lusitaniae* protiv *S. aureus*. Umjerena aktivnost postignuta je kod vrsta *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* i *S. cerevisiae* protiv *E. coli*.

4.4. IDENTIFIKACIJA IZOLATA IZ MAGINJE

Zbog gotovo identičnih rezultata u poglavljima 4.3. i 4.2., odlučeno je pomoću API 50 CHL testa identificirati izolate 7,8 i 9.

Tablica 2. Fermentacijski profili bakterijskih izolata iz maginje dobiveni API 50 CHL testom

Ugljikohidrati	Izolat br. 7	Izolat br. 8	Izolat br. 9
Kontrola	-	-	-
Glicerol	-	-	-
Eritriol	-	-	-
D-arabinoza	+/-	-	+/-
L-arabinoza	-	-	-
Riboza	-	-	-
D-ksiloza	-	-	-

L-ksiloza	-	-	-
Adonitol	-	-	-
β -metil-ksilozid	-	-	-
Galaktoza	+	+	+
D-glukoza	+	+	+
D-fruktoza	+	+	+
D-manoza	+	+	+
L-sorboza	-	-	-
Ramnoza	-	-	-
Dulcitol	+	+	+
Inozitol	-	+/-	-
Manitol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
α -metil-D-manozid	-	-	-
α -metil-D-glukozid	-	-	-
N-acetil glukozamin	+	+	+
Amigdalín	+	+	+
Arbutín	+	+	+
Eskulin	+/-	+	+/-
Salicin	+	+	+
Celobioza	+	+	+
Maltoza	-	-	-
Laktoza	-	-	-
Melibioza	-	-	-
Saharoza	-	-	-
Trehaloza	+	+	+
Inulin	-	-	-
Melezitoza	+	+	+
D-rafinoza	-	-	-
Amidon	-	-	-
Glikogen	-	-	-
Ksilitol	-	-	-
β -gentobioza	+	+	+
D-turanoza	-	-	-
D-liksoza	-	-	-
D-tagatoza	+	+	+
D-fukoza	-	-	-
L-fukoza	+	+	+
D-arabitol	-	-	-
L-arabitol	-	-	-
Glukonat	+	+	+/-
2-keto-glukonat	-	-	-
5-keto-glukonat	-	-	-

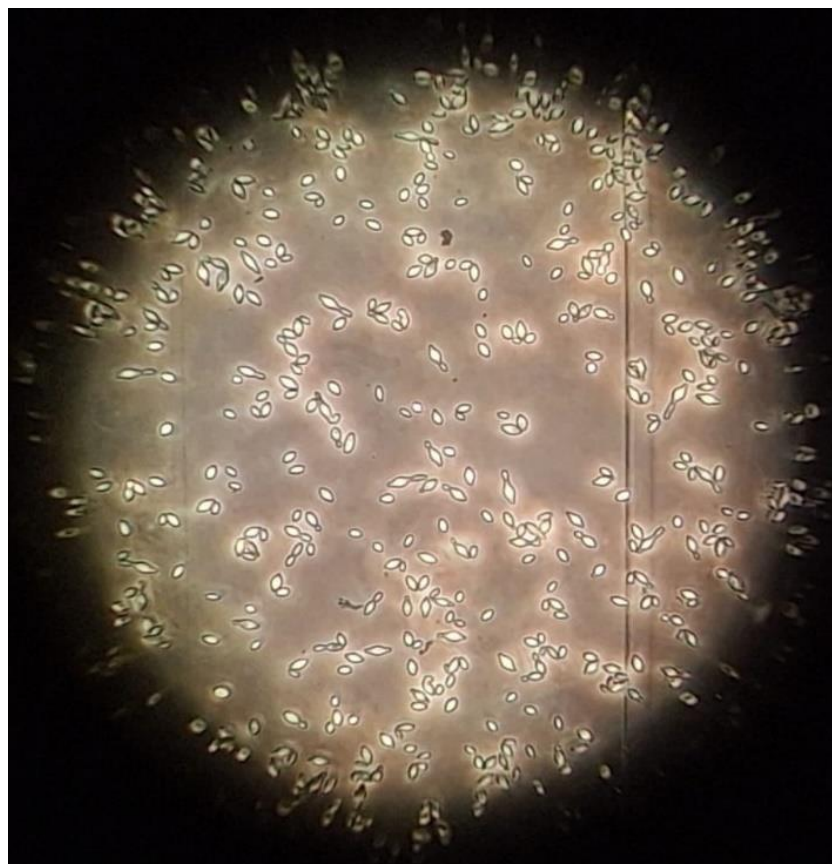
Tablica 3. Rezultati API 50 CHL biokemijske identifikacije izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz maginje

Oznaka soja	Rezultat	Postotak identifikacije (%)
Izolat br. 7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i>	99,7
Izolat br. 8	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i>	99,7
Izolat br. 9	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i>	99,7

Prema rezultatima prikazanima u tablicama 1 i 2, izolati 7, 8 i 9 su identificirani kao *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* uz visok postotak identifikacije za sva 3 izolata (99,7 %). Izolat kvasca M1 morfološki je identificiran kao rod *Kloeckera*, što se može vidjeti na slici 16.

Garcia i sur. (2016) su identificirali *Lactobacillus paracasei* u nusproduktima prerade voćne pulpe (jagoda, mango, graviola, macerola). De Albuquerque i sur. (2018) su također izolirali *Lactobacillus paracasei* iz nusprodukata prerade voća, što može potvrditi obilje tog mikroorganizma na voću.

Romano i Marchese (1998) su izolirali 37 sojeva *Kloeckera apiculata* prilikom spontane fermentacije mošta zvjezdastog voća (karambola).

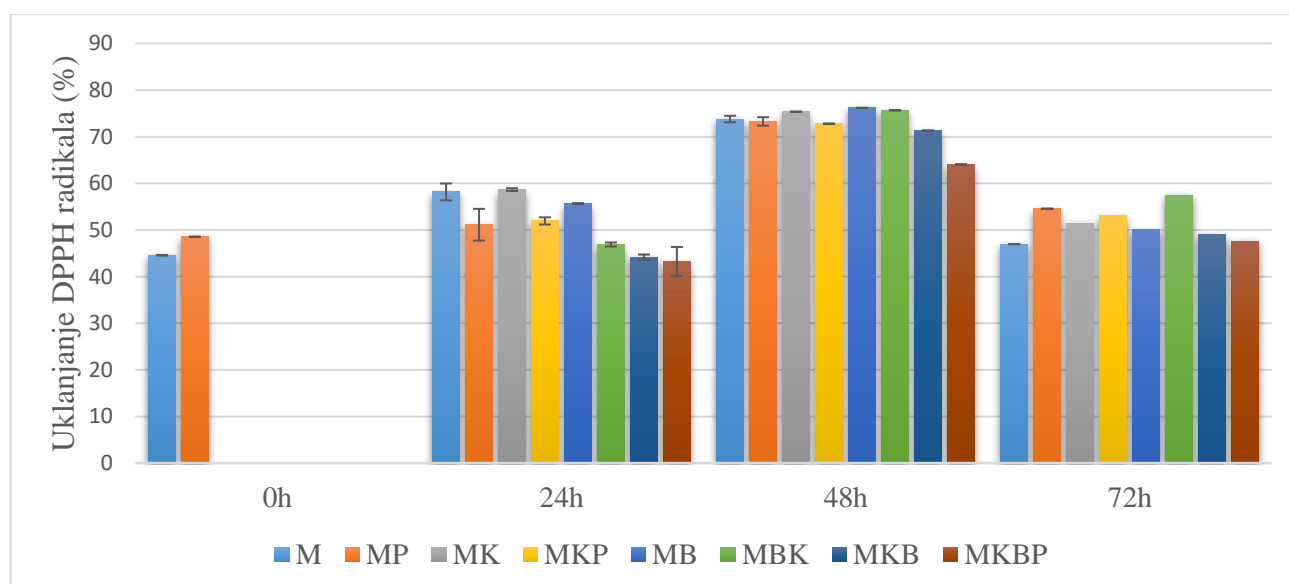


Slika 16. *Kloeckera* izolirana iz maginje pri povećanju 400x (vlastita fotografija)

4.5. SPOSOBNOST UKLANJANJA DPPH SLOBODNIH RADIKALA

Jedan od najpopularnijih kolorimetrijskih testova za procjenu sposobnosti biljaka i ekstrakata u uklanjanju slobodnih radikala je DPPH test (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil test). Ova metoda je precizna, jednostavna za izvođenje i ekonomična te omogućuje brzo ispitivanje opće aktivnosti antioksidansa. Temelji se na stabilnom i sintetičkom radikalu, DPPH. Kada DPPH reagira s antioksidativnim spojem, njegova svojstva slobodnog radikala nestaju, a boja mu se mijenja iz ljubičaste u žutu (Gonçalves i sur., 2018).

U ovom istraživanju ispitan je antioksidativni potencijal uzoraka nakon 0, 24, 48 i 72 sata fermentacije te su rezultati prikazani na slici 17 u obliku postotka uklanjanja DPPH slobodnih radikala.



Slika 17. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala uzorka maginje (M, MP) i fermentirane maginje (MK, MKP, MB, MBP, MKB, MKBP).

Rezultati su prikazani kao postotak kontrole \pm SD

M- maginja; MP- pasterizirana maginja; MK- maginja fermentirana kvascem; MKP- pasterizirana maginja fermentirana kvascem; MB- maginja fermentirana bakterijom; MBP- pasterizirana maginja fermentirana bakterijom; MKB- maginja fermentirana kvascem i bakterijom; MKBP- pasterizirana maginja fermentirana kvascem i bakterijom

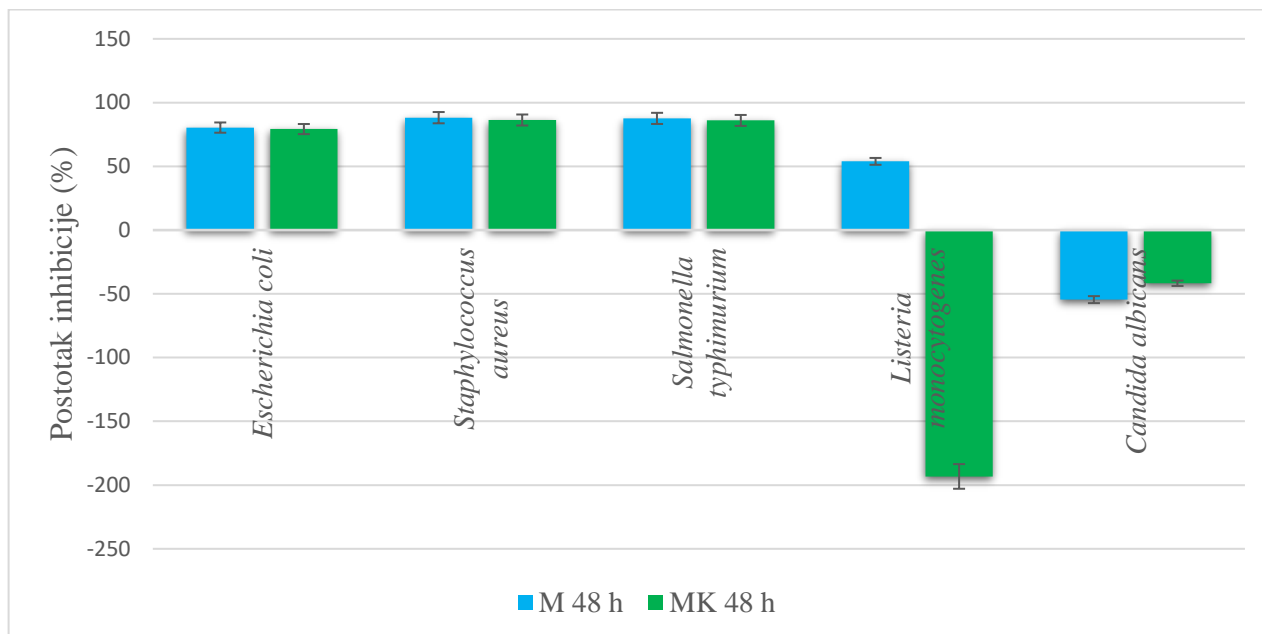
Iz rezultata prikazanih na slici 17 može se vidjeti da najbolji antioksidativni kapacitet uzorci pokazuju nakon 48 sati fermentacije. Nema značajne statističke razlike među uzorcima, ali uzorci MK, MB i MBP pokazuju najveći postotak uklanjanja DPPH radikala (iznad 75 %). Antioksidacijski kapacitet pasteriziranih uzoraka se ne razlikuje znatno od nepasteriziranih što bi se moglo objasniti dodatnom ekstrakcijom fenolnih spojeva pasterizacijom, a poznato je da isti doprinose pojačanom antioksidacijskom kapacitetu maginje. Statistički značajna razlika u sposobnosti uklanjanja DPPH radikala između uzoraka MK i MB nije pokazana. Velika količina

polifenola u maginji može objasniti njezino djelovanje u hvatanju slobodnih radikala i antioksidativnu aktivnost, zahvaljujući svojstvu gubitka protona, stvaranju kelata, dismutaciji radikala te oslobađanju vodikovih atoma iz hidroksilnih skupina u reakciji s radikalima, čime se formiraju stabilni fenoksilni radikali (Aksoy i sur., 2013).

Moualek i sur. (2016) su u svom istraživanju dokazali visoku sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala od strane vodenog ekstrakta listova planike. Kostelac i sur. (2024) istražili su antioksidacijsku sposobnost vodenog ekstrakta maginje i fermentiranog vodenog ekstrakta maginje u uklanjanju DPPH slobodnih radikala. Rezultati su pokazali da vodeni ekstrakt maginje ima snažan antioksidativni kapacitet, koji se smanjio nakon 24-satne fermentacije s bakterijskom kulturom *Lactiplantibacillus plantarum* DB2. Sposobnost uklanjanja slobodnih radikala DPPH smanjila se s početnih 98,98% na 77,15% nakon fermentacije. Uspoređujući te rezultate s rezultatima sa slike 17, gdje se može primijetiti lagano smanjenje sposobnosti uklanjanja slobodnih DPPH radikala s 58 % za uzorak M na 56 % za uzorak MB (uzorak fermentiran bakterijom *Lacobacillus paracasei* subsp. *paracasei*), može se zaključiti da fermenti imaju sličnu, a ponegdje (nakon 48 i 72 sata fermentacije) i bolju sposobnost uklanjanja DDPH radikala. Obzirom da je iznimno malo dostupnih istraživanja na temu antioksidacijskog potencijala kvašćevog fermenta maginje, u tom su području potrebna daljnja istraživanja.

4.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST UZORKA MK I M NAKON 48-SATNE FERMENTACIJE

Nakon pokazanog visokog antioksidacijskog kapaciteta, uzorak MK, koji se sastojao od 5 ml otopine stanica kvasca u fiziološkoj otopini + 20 g usitnjene maginje + 55 ml fiziološke otopine, podvrgnut je mjerenju antimikrobne aktivnosti protiv 5 patogenih mikroorganizama. Budući da je kvasac M1 pokazao lošu antimikrobnu aktivnost prema svim patogenima osim *L. monocytogenes* odlučeno je ispitati antimikrobnu aktivnost maginje fermentirane tim kvascem. Usporedbe radi, mjerila se antimikrobna aktivnost uzorka M (60 ml fiziološke otopine (0,9% NaCl) i 20 g usitnjene maginje), a za glavnu kontrolu je umjesto maginje i kvasca korištena fiziološka otopina (0,9 % NaCl) te se ispitalo inhibitorno djelovanje nakon 48 sati.



Slika 18. Antimikrobna aktivnost maginje nakon 48-satne fermentacije kvascem M1 (MK 48 h) i maginje otopljene u fiziološkoj otopini 48 sati (M 48 h) prema odabranim patogenima izražena kao postotak inhibicije rasta \pm SD

Prema rezultatima sa slike 18 vidimo da oba uzorka posjeduju snažno antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama *E. coli*, *S. aureus*. te *S. typhimurium*. Uzorak M vrlo dobro inhibira rast *L.monocytogenes* uz 54 %-tnu inhibiciju. Zanimljivo je za primijetiti da uzorak MK koji sadrži kvasac M1, a taj isti kvasac je pokazao dobru inhibitornu moć prema *L.monocytogenes*, sada ima izrazito nizak stupanj inhibicije rasta tog mikroorganizma. Također, uočeno je da niti jedan uzorak nije pokazao velik postotak inhibicije rasta *C.albicans*, na temelju čega se može zaključiti bolja antimikrobna specifičnost prema bakterijama nego prema kvascima. Također, zaključak koji bi se mogao donijeti je da je maginja ta koja je uzrokovala antimikrobno djelovanje, a ne kvasac ili fermentacija, budući da su postotci inhibicije veći s uzorkom M (nefermentirana maginja) nego s uzorkom MK (fermentirana maginja). Ovi rezultati su obećavajući zbog sve veće učestalosti otpornosti na antibiotike, stoga bi alternativni prirodni izvori antimikrobne aktivnosti mogli biti od velikog interesa. U istraživanju Gobin i sur. (2016) ekstrakt listova planike pokazao je značajan antibakterijski učinak na kliničke uropatogene sojeve *Enterococcus* te ima veliki potencijal za primjenu u prevenciji i pomoći u liječenju urinarnih infekcija. Ova biljka sadrži tvar zvanu arbutin, koja se pretvara u hidrokinon – bioaktivnu molekulu s antiseptičkim učinkom na urinarni trakt te je pretpostavka da je ista glavni razlog antimikrobnog djelovanja. Potrebna su daljnja istraživanja u području fermentacije maginje kvascima.

5. ZAKLJUČCI

1. Kvasac roda *Kloeckera* izoliran iz maginje ima vrijednost specifične brzine rasta $0,358 \text{ h}^{-1}$, dok bakterije mliječne kiseline vrste *Lactobacillus paracasei* imaju vrijednosti specifične brzine rasta između $0,25$ i $0,27 \text{ h}^{-1}$.
2. *Lactobacillus paracasei ssp paracasei* iskazuje izrazito visoke razine inhibicije rasta svih analiziranih patogena, a vrijednosti se kreću oko 95 %. *Kloeckera* pokazuje dobro antimikrobno djelovanje od 57 % na *Listeriu monocytogenes*.
3. Što se tiče sposobnosti uklanjanja slobodnih DPPH radikala, najbolje vrijednosti dobivene su nakon 48 sati fermentacije maginje, dok nakon 72 sata vrijednosti padaju. Nema statistički značajne razlike između fermentiranih i nefermentiranih uzoraka pa bi se moglo zaključiti da antioksidacijski potencijal leži u maginji.
4. Nema statistički značajne razlike između antimikrobne aktivnosti uzorka maginje nakon 48-satnog stajanja u vodi i maginje fermentirane kvascem *Kloeckera* 48 sati, a inhibicija rasta je bila viša od 80 % za *E. coli*, *S. aureus* i *S. typhimurium*, dok *L. monocytogenes* značajno inhibira (54 %) samo nefermentirani uzorak maginje. Bolja je antimikrobna specifičnost oba uzorka prema bakterijama nego prema kvascima.

6. LITERATURA

Adadi P, Barakova NV, Muravyov KY, Krivoschapkina EF (2019). Designing selenium functional foods and beverages: a review. *Food Res Int* **120**, 708–25.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.029>

Aksoy L, Kolay E, Ağılönü Y, Aslan Z, Kargioğlu M (2013) Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi J Biol Sci* **20**, 235-239. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.02.003>

Alkalbani NS, Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Olaimat AN, Liu SQ, Shah NP, i sur. (2022) Assessment of yeasts as potential probiotics: A review of gastrointestinal tract conditions and investigation methods. *J Fungi* **8**, 365. <https://doi.org/10.3390/jof8040365>

Alkalbani NS, Osaili TM, Al-Nabulsi AA, Olaimat AN, Liu S-Q, Shah NP i sur. (2022) Assessment of Yeasts as Potential Probiotics: A Review of Gastrointestinal Tract Conditions and Investigation Methods. *J Fungi* **8**, 365. <https://doi.org/10.3390/jof8040365>

Almeida AM, Martins MJ, Campagnolo ML, Fernandez P, Albuquerque T, Gerassis S i sur. (2022) Prediction scenarios of past, present, and future environmental suitability for the Mediterranean species *Arbutus unedo* L. *Sci Rep* **12**, 84. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03996-0>

Ashaolu TJ (2020) Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomed Pharmacother* **130**, 110625.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110625>

Augustin MA, Hartley CJ, Maloney G, Tyndall S (2023) Innovation in precision fermentation for food ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr* **64**, 6218–6238.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2166014>

Benyacoub J, Bosco N, Blanchard C, Demont A, Philippe D, Castiel-Higounenc I, Guéniche A (2014) Immune modulation property of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (ST11) strain and impact on skin defences. *Benef Microbes* **5**, 129-136. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0014>

Blaak EE, Canfora EE, Theis S, Frost G, Groen AK, Mithieux G i sur. (2020) Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Benef Microbes* **11**, 411–455.

<https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>

Bourdichon F, Arias E, Babuchowski A, Bückle A, Bello FD, Dubois A i sur. (2021) The forgotten role of food cultures. *FEMS Microbiol Lett* **368**, fnab085.

<https://doi.org/10.1093/femsle/fnab085>

Brown L, Caligiuri SPB, Brown D, Pierce GN (2018) Clinical trials using functional foods provide unique challenges. *J Funct Foods* **45**, 233–238.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.011>

Chiang SS, Pan TM (2012) Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 903-916.

<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3734-1>

Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M, Francavilla R (2021) Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: A door to the body. *Front Immunol* **12**, 178. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662597>

Damián MR, Cortes-Perez NG, Quintana ET, Ortiz-Moreno A, Noguez CG, Cruceño-Casarrubias CE i sur. (2022) Functional foods, nutraceuticals and probiotics: A focus on human health. *Microorganisms* **10**, 1065. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061065>

David R, Patricia RM, Abelardo M, Miguel G, de los Reyes-Gavilán CG, Nuria S (2016) Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front Microbiol* **7**, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>

de Albuquerque TMR, Garcia EF, de Oliveira Araújo A, Magnani M, Saarela M. de Souza EL (2018) In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics & Antimicro Prot* **10** 704–716.

<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>

Derrien M, van Hylckama VJE (2015) Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol* **23**, 354-366.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.002>

Dimidi E, Cox SR, Rossi M, Whelan K (2019) Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients* **11**, 1806. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>

Essa MM, Bishir M, Bhat A, Chidambaram SB, Al-Balushi B, Hamdan H i sur. (2023). Functional foods and their impact on health. *J Food Sci Technol* **60**, 820-834. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05193-3>

FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 1–11.

Fernandez-Pacheco P, Arévalo-Villena M, Bevilacqua A, Corbo MR, Pérez AB (2018) Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Properties for application in food industries. *LWT* **97**, 332-340. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.019>

Filannino P, Di Cagno R, Gobbetti M (2018) Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology* **49**, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.10.007>

Fooks LJ, Fuller R, Gibson GR (1999) Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int Dairy J* **9**, 53-61. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00040-1)

Franjić J (2016) Popularizacija hrvatske flore, *Šumarski list*, str. 7-8.

Frece J (2003) *In vitro* i *in vivo* istraživanja probiotičkog mehanizma djelovanja bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 (magistarski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Frece J, Markov K, Čanak I, Kostelac D, Jakopović Ž (2020) Fermentirana hrana: mikrobiologija i starter kulture. Sveučilište Sjever, Centar za digitalno nakladništvo, Koprivnica, str. 1-97.

Frece J, Markov K, Kovačević D (2011) Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* **12**, 92–98.

Frie B, Stocker R, Ames BN (1988) Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci* **37**, 569–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9748>

Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE, da Costa WCA, Oliveira K de S, Franco OL, i sur. (2016) Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. *Front Microbiol* **7**, 1371. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01371>

García-Martos P, Hernández-Molina JM, Galán F, Ruiz-Henestrosa JR, García-Agudo R, Palomo MJ i sur. (1998) Isolation of *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) in humans. *Mycopathologia* **144**, 73-75. <https://doi.org/10.1023/a:1006900909455>

Gobin I, Begić G, Jurica K, Stanković S, Abram M (2016) Antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus Unedo* L.) leaf extracts on selected uropathogens. 3. kongres sanitarne profesije.

Gonçalves AC, Bento C, Jesus F, Alves G, Silva LR (2018) Sweet cherry phenolic compounds: Identification, characterization, and health benefits. *Stud Nat Prod Chem* **59**, 31-78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00002-5>

Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P (2020) Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annu Rev Food Sci Technol* **11**, 93-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

Granato D, Nunes DS, Barba FJ (2017) An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: a proposal. *Trends Food Sci Technol* **62**, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.01.007>

Guarino MPL, Altomare A, Emerenziani S, Di Rosa C, Ribolsi M, Balestrieri P i sur. (2020) Mechanisms of action of prebiotics and their effects on gastrointestinal disorders in adults. *Nutrients* **12**, 1037. <https://doi.org/10.3390/nu12041037>

Guemmaz T, Arrar L, Baghiani A (2020) Total phenolic contents and antioxidant properties of Algerian *Alkanna tinctoria* aerial part extracts. *J Drug Deliv Ther* **10**, 39-44. <https://doi.org/10.22270/jddt.v10i5.4349>

Gutiérrez TJ (2018) Plantain flours as potential raw materials for the development of gluten-free functional foods. *Carbohydr polym* **202**, 265-279.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.121>

Hasler CM, Brown AC (2009) Position of the American Dietetic Association: functional foods.

J Am Diet Assoc **109**, 735-746. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2009.02.023>

Jiao X, Wang Y, Lin Y, Lang Y, Li E, Zhang X i sur. (2019) Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6J mice by modulating the gut microbiota. *J Nutr Biochem* **64**, 88-100.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.008>

Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal* **26**, 927-939.

<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.02.006>

Kos B (2001) Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kostelac D, Dolenc F, Markovinović AB, Markov K, Bursać Kovačević D, Frece J (2024) The Application of Probiotic Bacteria from Strawberry (*Fragaria ananassa* × Duch.) in the Fermentation of Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo* L.) Extract. *Microorganisms* **12**, 1000.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms12051000>

Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2011) *The yeasts: a taxonomic study*, Elsevier.

Lenssen KG, Bast A, de Boer A (2018) Clarifying the health claim assessment procedure of EFSA will benefit functional food innovation. *J Funct Foods* **47**, 386-396.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.019>

Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y (1999) Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA* **281**, 1415-23. <https://doi.org/10.1001/jama.281.15.1415>

Lhaj AZ, Bchitou R, Gaboun F, Abdelwahd R, Benabdelouahab T, Kabbour MR i sur. (2021) Moroccan strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits: Nutritional value and mineral composition.

Foods **10**, 2263. <https://doi.org/10.3390/foods10102263>

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods:

Impact on human health. *Pharmacogn Rev* **4**, 118-26. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Lozo J, Vukasinovic M, Strahinic I, Topisirovic L (2004) Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. *J Food Prot* **67**, 2727-2734. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.12.2727>

Macchioni V, Santarelli V, Carbone K (2020) Phytochemical profile, antiradical capacity and α -glucosidase inhibitory potential of wild *Arbutus unedo* L. fruits from Central Italy: A chemometric approach. *Plants* **9**, 1785. <https://doi.org/10.3390/plants9121785>

Madigan M, Martinko J, Stahl D, Clark D (2012) Brock Biology of Microorganisms, 13. izd., Pearson Education.

Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC (2023) Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells* **12**, 184. <https://doi.org/10.3390/cells12010184>

McFarland LV (2015) From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clin Infect Dis* **60**, 85-90. <https://doi.org/10.1093/cid/civ054>

Mendoza LM, de Nadra MCM, Fariás ME (2007) Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnol Lett* **29**, 1057–1063. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9355-0>

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD (2014) *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules*, **19**, 15799-15823. <https://doi.org/10.3390/molecules191015799>

Moreira N, Mendes F, Hogg T, Vasconcelos I (2005) Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol* **103**, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.029>

Moualek I, Aiche GI, Guechaoui NM, Lahcene S, Houali K (2016) Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pac J Trop Biomed* **6**, 937-

944. <https://doi.org/10.1016/j.apitb.2016.09.002>

Nunes RJS (2017) Micromedronho: design of microencapsulated *Arbutus unedo* leaves and fruits by spray drying for supplements and functional foods. (Doktorski rad)

Ogunremi OR, Agrawal R, Sanni AI (2015) Development of cereal-based functional food using cereal-mix substrate fermented with probiotic strain—*Pichia kudriavzevii* OG32. *Food Sci Nutr* **3**, 486–494. <https://doi.org/10.1002/fsn3.239>

Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, Del Castillo MD, Cano MP, de Pascual-Teresa S (2008) Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *J Food Compos Anal* **21**, 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.02.001>

Peredo-Lovillo A, Romero-Luna HE, Jiménez-Fernández M (2020) Health promoting microbial metabolites produced by gut microbiota after prebiotics metabolism. *Food Res Int* **136**, 109473. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109473>

Pineiro M, Asp NG, Reid G, Macfarlane S, Morelli L, Brunser O, Tuohy K (2008) FAO Technical meeting on prebiotics. *J Clin Gastroenterol* **42**, 156-159. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31817f184e>

Romano P, Marchese R (1998) Metabolic characterization of *Kloeckera apiculata* strains from star fruit fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 321-325. <https://doi.org/10.1023/A:1001816801164>

Ruiz-Rodríguez BM, Morales P, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata MC, Cámara M, Díez-Marqués C i sur. (2011) Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Res Int* **44**, 1244-1253. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.016>

Sanders ME, Huis in't Veld J (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**, 293-315.

Şanlıer N, Gökçen BB, Sezgin AC (2019) Health benefits of fermented foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 506-527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1366633>

Sen S, Mansell TJ (2020) Yeasts as probiotics: Mechanisms, outcomes, and future potential. *Fungal Genet Biol* **137**, 103333. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103333>

Shahverdi S, Barzegari AA, Vaseghi Bakhshayesh R, Nami Y (2023) In-vitro and in-vivo antibacterial activity of potential probiotic *Lactobacillus paracasei* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Heliyon* **9**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14641>

Shruthi B, Deepa N, Somashekaraiah R, Adithi G, Divyashree S, Sreenivasa MY (2022) Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnol Rep* **34**, e00716. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00716>

Son S, Lewis BA (2002) Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* **50**, 468–472. <https://doi.org/10.1021/jf010830b>

Staniszewski A, Kordowska-Wiater M (2021) Probiotic and potentially probiotic yeasts—Characteristics and food application. *Foods* **10**, 1306. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>

Stefanis L, Burke RE, Greene LA (1997) Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol* **10**, 299–305. <https://doi.org/10.1097/00019052-199708000-00004>

Šic Žlabur J, Bogdanović S, Voća S, Skendrović Babojelić M (2020) Biological potential of fruit and leaves of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from Croatia. *Molecules* **25**, 5102. <https://doi.org/10.3390/molecules25215102>

Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc A, Habjanič K, Matošić S (2010) Antimicrobial Activity – the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food technology and biotechnology* **48**, 296-307.

Tamang JP, Kailasapathy K (2010) *Fermented foods and beverages of the world*, CRC press.
van Wyk N, Badura J, von Wallbrunn C, Pretorius IS (2024) Exploring future applications of the apiculate yeast *Hanseniaspora*. *Crit Rev Biotechnol* **44**, 100-119. <https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2243760>

Verdenelli MC, Ghelfi F, Silvi S, et al. (2009) Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus*

and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur J Nutr* **48**, 355–363.

<https://doi.org/10.1007/s00394-009-0021-2>

Yann D, Pauline G (2014) Usefulness of natural starters in food industry: the example of cheeses and bread. *Food Nutr Sci* **5**, 49577. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.53041>

You S, Ma Y, Yan B, Pei W, Wu Q, Ding C, Huang C (2022) The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. *Front Nutr* **9**, 1000517.

<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1000517>

Young IS, Woodside JV (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* **54**, 176–86.

<https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>

Younis G, Awad A, Dawod RE, Yousef NE (2017) Antimicrobial activity of yeasts against some pathogenic bacteria. *Vet World* **10**, 979. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.979-983>

Zeb A (2020) Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *J Food Biochem* **44**, e13394. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Duje Glavina izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis