1. **Uvod**

U posljednjih dvadeset godina probiotički mikroorganizmi se jako puno koriste u proizvodnji različitih vrsta hrane, naročito u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda.

Nekoliko faktora, uključujući sigurnost, funkcionalne i tehnološke karakteristike, moraju se uzeti u obzir prilikom razmatranja procesa u kojima učestvuju probiotički mikroorganizmi. Fermentirani mliječni napitci su najpopularniji komercijalni industrijski proizvodi zbog unosa probiotičkih mikroba u ljudski probavni sistem.Osnovni hemijski sastav fermentiranih mliječnih proizvoda velike je nutritivne vrijednosti. Glavni sastojci su proteini, mast, ugljikohidrati, mineralne tvari i vitamini. Konzumiranje takvih proizvoda zbog blagotvornog zdravstvenog uticaja datira unazad nekoliko hiljada godina, a znanstvenici su ih od davnina opisivali kao lijekove za metaboličke poremećaje probavnog sistema.U ovom radu dat je pregled novijih spoznaja o probiotičkim fermentiranim mliječnim proizvodima.

Osnovni cilj ovog rada bio je da se pobliže upoznate sa ovom vrstom bakterija, načinom njihovog djelovanja u organizmu i proizvodima u kojima se nalaze. Zašto stanovništvo na području BiH, ali i Hrvatske, ne koristi ove proizvode u većoj mjeri ? Da li je razlog toga cijena samih proizvoda ili možda nedovoljna upućenost potrošača o zdravstvenom učinku ovih proizvoda, također će sepokušati objasniti u ovom radu. Treba naglasiti da se probiotički proizvodi danas sve više propagiraju putem medija i reklama, ne bi li se na taj način povećala svijest potrošača o značaju ovih proizvoda za zdravlje čovjeka.

1. **Probiotički mikroorganizmi i njihova svojstva**

Danas se sve češće čuju mišljenjada je 10- 70% kancerogenih oboljenja uzrokovano nepravilnom prehranom, koja je uzrok gomilanja toksičnih tvari u organizmu [1].

Posljednjih godina u prehrambenoj industriji sve su popularniji dodaci: probiotici, prebiotici i simbiotici, koji uz druga svojstva proizvodu osiguravaju i svojstva funkcionalne hrane. Pozitivno djelovanje probiotičkih bakterija je neupitno. Istraživanjima je dokazano kako je potrebno utvrditi ne samo stvarnu prisutnost probiotika u proizvodu već i njihovu količinu, tj. koncentraciju. Probiotici djeluju pozitivno na potrošača samo ako se nalaze u dovoljnoj količini,tj. koncentraciji (koja je u nekim zemljama već propisana ). Novija istraživanja pokazala su i primjenu prebiotika vrlo korisnom. Osim što prebiotici snažno potiču rast i razvoj probiotika, imaju i blagotvorno djelovanje na potrošača.

Prebiotici se definišu kao neprobavljivi ingredijenti hrane, koji u neizmjenjenom obliku dospjevaju u debelo crijevo i povoljno djeluju na rast i/ili aktivnost jedne ili više bakterijskih vrsta i time imaju povoljan zdravstveni efekat.Koncept prebiotika zasnovan je na saznanjima da inulin i oligosaharidi selektivno stimulišu bifidobakterije[2].

Da bi navedeni sastojak bio označen kao prebiotik potrebno je da posjeduje slijedeće karakteristike:

1. Ne smije biti hidrolizovan niti apsorbovan u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta
2. Mora biti selektivna sredina za određenu grupu korisnih mikroorganizama
3. Mora da dovede do izmjene sastava mikroflore kolona u pravcu povećanja broja saharolizičkih mikroorganizama i smanjenja broja truležnih vrsta
4. Mora imati pozitivan efekat na zdravlje domaćina

Mogući korisni efekti prebiotika su:

* Poboljšanje pražnjenja crijeva
* Povećanje produkcije masnih kiselina s manjim brojem C atoma
* Stimulacija rasta i aktivnost bifidobakterija
* Bolje usvajanje minerala
* Smanjenje serumskog holesterola i serumskih triglicerida
* Smanjenje rizika od raka debelog crijeva
* Smanjenje egzogenih i endogenih intestinalnih infekcija

U najznačajnije prebiotike spadaju: laktuloza, fruktooligosaharidi, inulin, galaktooligosaharidi, ostali nesvarljivi oligosaharidi i nesvarljivi škrob.

**Laktuloza**

Laktuloza kao galakto-oligosaharid, dobija se iz laktoze i proizvodi se u najvećim količinama. Laktuloza nije prisutna u mlijeku, ali se dobija u malim količinama kada se mlijeko zagrijava. Najviše se koristi kao laksativ u farmaceutskoj industriji. Dokazano je da laktuloza posjeduje karakteristike koje mogu da je svrstavaju u grupu prebiotika.

**Fruktooligosaharidi**

Ova grupa oligosaharida spada u najznačajnije.Fruktooligosaharidi se proizvode na dva različita načina i pri tome se dobijaju slični proizvodi.

**Inulin**

Inulin također spada u grupu potencijalnih prebiotika, sličan je oligofruktozi.

Kombinacija probiotičkih mikroorganizama i prebiotičkih sastojaka hrane poznata je pod imenom simbiotik [3]. “Simbiotik je smjesa probiotika iprebiotika koja korisno djeluje na domaćina poboljšavajućipreživljavanje probiotika za vrijeme prolaska kroz gornjidio probavnog sistema i osiguravajući efikasniju implantaciju u mikrofloru debelog crijeva” [4].

Značajni parametri za selekciju efikasnih probiotičkih mikroorganizama :

1. njihova otpornost na kiselinu (problem prolaska kroz želudac),
2. njihova otpornost na žučne soli (problem prolaska kroz duodenum),
3. sposobnost adhezije za ćelije epitela tankog crijeva (jejunuma i ileuma) ili debelog crijeva,
4. sposobnost proizvodnje antimikrobnih faktora,
5. sposobnost stimulacije mukoznog imunog sistema sa ili bez stimulacije sistematskog imuniteta,
6. efikasnost preživljavanja u GIT ( gastro – intestinalnom traktu ) nakon unošenja,
7. dužina boravka i stepen kolonizacije GIT.

 Definicija probiotičkih sojeva bakterija mijenjana je nekoliko puta, pa postoji više defincija probiotika, ovisno o autoru. Ovdje su neke od najpoznatijih definicija probiotika:

„Probiotici su živi mikrobni dodaci hrani koji doprinose zdravlju potrošača održavanjem ili poboljšavanjem ravnoteže njegove crijevne mikroflore“ [5].

Huis In’T Veld i suradnici su 1992. godine proširili definiciju probiotika kao „jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi i životinja ( npr. kao osušene stanice ili fermentirani napitak ), povoljno utiču na organizam poboljšavanjem osobine unutrašnje autohtone crijevne mikroflore“ [5].

Definiciju probiotika dao je i Evropski odbor stručnjaka ( European Expert Committee): „Živi mikroorganizmi koji konzumirani u određenom broju (najmanje 109 CFU po danu) uzrokuju zdravstveni boljitak iznad granica normalne prehrane“[1].

Posljednju definiciju probiotika dali su Schrezenmeir i de Vrese 2001. godine, a ona glasi: „Probiotici su održivi,definirani mikroorganizmi koji kada se nalaze u dovoljnoj količini mijenjaju mikrofloru domaćina i na taj način pozitivno djeluju na zdravlje domaćina“ [6].

Kao što vidite, sve ove definicije su slične i govore o jednom – o pozitivnom djelovanju probitičkih bakterija na zdravlje čovjeka. Postoji velika mogućnost da ova definicija bude promijenjena u budućnosti. Danas još uvijek nije dokazano da probiotičke bakterije mogu štetno da djeluju na zdravlje čovjeka ili da u većim koncentracija prouzrokuju smrt. Ipak postoje teorijski nepoželjni učinci probiotika, a to su:

* sistemska infekcija,
* opasnost od nepoželjnih metaboličkih aktivnosti
* opasnost od nepoželjnih učinaka i promjena imunološkog sistema i
* opasnost od prijenosa gena

Pozitivno djelovanje probiotičkih bakterija na zdravlje čovjeka mora biti znanstveno utvrđeno kliničkim studijama i ispitano na ljudima, a istraživanja treba da provedu neovisni istraživački timovi. Probiotici potiču uglavnom izgrupa bakterija koje se zovu bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije kojeinače čine normalnu, uobičajenu intestinalnu mikrofloru ljudi. Bifidobakterijesu osobito dominantan bakterijski rod prisutan u debelom crijevu zdravih ljudi.

Bakterije mliječne kiseline (BMK), kvasci, plijesni ili njihove kombinacije koriste se u proizvodnji fermentiranih mlijeka i sireva. Ipak, samo neki od sojeva imaju probiotička svojstva. Probiotički mikroorganizmi moraju podnositi djelovanje želučane kiseline i žučnih soli u probavnom sistemu ljudi. Danas su u svijetu identificirane različite vrste probiotičkih mikroorganizama. Probiotici se najčešće koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. Da bi probiotici mogli pozitivno djelovati na domaćima moraju se nalaziti u dovoljnoj koncentraciji i u odgovarajućim uvjetima sredine.

Faktori koji utiču na aktivnost probiotika su :karakteristike soja, karakteristike supstrata za fermentaciju, veličina inokuluma i ostali faktori.U ostale faktore spadaju temperatura i pH vrijednost.

Temperatura je veoma bitan faktor, jer od temperature na kojoj se odvija fermentacija ovisi i kvalitet finalnog proizvoda. Optimalna temperatura za rast i razvoj probiotika je 37°C. Obzirom da se fermentacija uglavnom vrši na 43°C, primjenom nižih temperatura produžava se vrijeme fermentaicije, a na taj način povećava se koncentracija probiotika.

Dokazano je da laktobacili proizvode octenu i mliječnu kiselinu i na taj način snižavaju pH vrijednost i inhibiraju rast patogenih mikroorganizama. Jedan od najznačajnijih faktora odumiranja probiotičkih stanica jeste snižavanje pH vrijednosti mlijeka i nakupljanje organskih kiselina.

Za dobivanje probiotičkog proizvoda najčešće se koriste bakterijemliječne kiseline iz rodova *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium*[7]*.* Različite vrste soja *Bifidobacterium* najbrojnije su u digestivnom traktu čovjeka.Debelocrijevo jevrlo gusto naseljeno mikroorganizmima čija koncentracijaprelazi 1011 stanica po gramu sadržaja. Ovi mikroorganizmi i njihovemetabolizamske aktivnosti mogu pozitivno i negativno uticati na ljudsko zdravlje. Niska pH vrijednost stomaka i visoka koncentracija žučnih soli koje se nalaze u tankom crijevu, a koje razaraju ćelijske membrane, su izazovi koje probitičke bakterije moraju prevazići [8].

Iako životinje također sadrže bakterije iz roda *Lactobacillus*i *Bifidobacterium,* koje se koriste za dobivnje probiotičkih proizvoda, smatra se da najveći efekat na ljudsko zdravlje imaju probiotici koji su ljuskog porijekla.

U tabeli 1 prikazani su neki primjeri probiotičkih mikroorganizama koji su najčešće korišteni u mliječnim proizvodima.

**Tabela 1: Komercijalni probiotički mikroorganizmi u fermentiranimmliječnim proizvodima uključivši napitke, sireve i pasteriziranamlijeka [1].**

|  |  |
| --- | --- |
| **Bakterijski sojevi** | **Tvrtka, država** |
| *Lactobacillus acidophilus* NCFM | Rhodia, Madison, SAD |
| *Lb. acidophilus* DDS - 1 | Nebraska Cultures, Lincoln, SAD |
| *Lb. rhamnosus* GG | Valio, Finska |
| *Lb. reuteri* SD2112 | McNeil Consumers, SAD |
| *Lb. casei* Shirota | Yakult, Tokyo, Japan |
| *Lb. casei* DN114001 | Dannon, Paris, Francuska |
| *Lb. johnsonii* LA1 | Nestle, Lausanne, Švicarska |
| *Lb. acidophilus* SBT - 2062 | Snow Brand, Tokyo, Japan |
| *Lb. acidophilus* La - 5 | Chr. Hansen, Copenhagen, Danska |
| *Lb. paracasei* CRL431 | Chr. Hansen, Milwaukee, SAD |
| *Lb. plantarum* 299V | Probi, Lund, Švedska |
| *Lb. rhamnosus* LB21 | Essum, Umea, Švedska |
| *Lb. salivarius* UCC118 | University College Cork, Cork, Irska |
| *Bifidobacterium bifidum* Bb - 12 | Chr. Hansen, Copenhagen, Danska |
| *B. longum* BB536 | Morinaga, Zama – City, Japan |
| *B. longum* SBT- 2928 | Snow Brand, Tokyo, Japan |
| *Lb. rhamnosus* DR20 | New Zealand Dairy Board, Palmerston North, N. Z.  |

1. **Industrijska primjena probiotika**

Ispitivanjem tržišta možete vidjeti da je danas sve veći broj probiotičkih proizvoda. Potražnja za ovim proizvodima u drugim, većim zemljama je velika, međutim ljudi u BiH, a naročito na USK još uvijek nisu u potpunosti upoznati sa ovom vrstom proizvoda. Stanovništvo na ovom području ima malu averziju prema ovoj vrsti proizvoda, vjerovatno iz razloga što kada se spominju bakterije misli se na nešto loše, na nešto što štetno djeluje na zdravlje čovjeka, a ne znaju da ove bakterije imaju terapijsko djelovanje.

Zdrave osobine probiotičkih bakterija isprepleću se sa zdravim osobinama mliječnih proizvoda pa tako uz dodatak vitamina, kalcija, drugih minerala i proteina iz mliječnih proizvoda slika probiotičkih bakterija postaje čak privlačnom za uzimanje [9].Danas putem medija i tv reklama možete vidjeti da se paleta ovih proizvoda stalno povećava, a akcenat se stalno stavlja na njihovo terapeutsko djelovanje. U probiotičke proizvode najčešće se ubrajaju fermentisana mlijeka, ali u zadnje vrijeme u ovu grupu proizvoda ubrajaju se i drugi, kao što su naprimjer razni tipovi sireva, dezerti, sladoled, fermentisani proizvodi na bazi soje itd.Kod specijalnih proizvoda, kao što je slatko mlijeko obogaćeno probioticima, probiotici se u mlijeko dodaju tako da prežive, ali se njihov daljnji rast sprječava postupcima hlađenja. Probiotici se danas jako puno koriste u proizvodnji funkcionalne hrane.Hrana je funkcionalna ako sadrži sastojke koji pozitivno djeluju na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu[10].

Fermentirani mliječni proizvodi poput jogurta, kefira i acidofila najpoznatiji su predstavnici funkcionalne hrane u skupini mliječnih proizvoda.Najvažnija namjena funkcionalne hrane nije da utaži glad niti da osigura ljudskom organizmu neophodne hranjive tvari, već da sprječava bolesti te da poboljša fizičko i psihičko stanječovjeka.U funkcionalnu hranu se ubrajaju i novi proizvodi sa probiotskim svojstvima koji predstavljaju kvalitativan pomak od uobičajnih proizvoda i pozicioniraju se na pola puta od hrane ka lijeku. Oni se nazivaju *nutriceuticals*. Osim u fermentiranimmliječnim proizvodima, bakterije mliječne kiseline probiotičkogdjelovanja mogu se naći u različitim suplementimau prahu, tekućim ekstraktima, kapsulama i tabletama.

Za poboljšanje teksture i senzorskih svojstava probiotičkih fermentiranihmlijeka često se koriste bakterije koje proizvode egzopolisaharide (EPS). Poznato je nekoliko bakterija mliječne kiseline koje proizvode EPS. Njihova tačna funkcija je još uvijek nejasna, iako se smatra da djeluju na adhezijskasvojstva stanice te njenu zaštitu u različitim eko sistemima. Bakterije mliječnekiseline koje proizvode EPS imaju važnu ulogu u mljekarskoj industriji zbognjihovog uticaja na teksturu, osjet u ustima i stabilnost fermentiranih mlijeka.Osim tehnološke funkcionalnosti, za neke se EPS, koje te bakterije proizvode,smatra da imaju blagotvorno fiziološko djelovanje.

**Tabela 2. Zainteresovanost kupaca za različite proizvode ili konstituente [2]**

|  |  |
| --- | --- |
| Hrana koja podstiče imuni sistem | 50% |
| Hrana koja smanjuje rizik za različite bolesti | 48% |
| Hrana koja pospješuje zdravlje | 47% |
| Aktivne kulture u jogurtu | 29% |

Danas se pored uobičajnih proizvoda sa sadržajem bakterijskih ćelija od 106-107 po ml proizvoda, uvode i novi proizvodi sa znatno većom koncentracijom bakterijskih ćelija i po nekoliko milijardi ćelija u ml. Ovi proizvodi se pozicioniraju kao lijek za određene gastrointestinalne poremećaje ili kao moćan imunološki stimulans.

1. **Probiotički proizvodi**

Zadnjih je godina vidljiv izrazito brz razvoj novih prehrambenih proizvoda, a korisnici su sve izloženiji marketinškompritisku njihova reklamiranja.Sve više takvih proizvoda naglašava svoja ljekovita svojstva,svoju funkcionalnost. No postavlja se pitanje do koje su mjere navodi na ambalaži istiniti i jesu li oni zakonski regulirani?

Danas se probiotički proizvodi nalaze i na našem tržištu, mada i nisu baš toliko popularni među potrošačima. Zašto je to tako ? Da li je po srijedi cijena samih prozvoda ili je u pitanju ipak nešto drugo ? Malo sam israživala po marketima i mjestima gdje se prodaju ovi proizvodi i zaključila da cijena ipak nije razlog što se ovi proizvodi ne prodaju u većoj količini. Cijena ovih proizvodi, npr. jogurta sa probioticima je približno ista kao i cijena običnog jogurta. Takav slučaj je i sa ostalim proizvodima. Razlog je u tome što ljudi misle na nešo loše kada se spomenu bakterije, jer većina ljudi nije upoznata s tom činjenicom da postoje i „dobre“ bakterije koje se nalaze u našem organizmu.Kod nas ove proizvode uglavnom koriste sportaši i to najčešće jogurt sa probioticima. U slijedećoj tabeli dat je set joguta sa probioticima koji se najčešće proizvode u Evropi :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Actimel jogurt Danone Nem. | L. casei immunitas |   |
| Bi Ac Molkerei Muller Nem. | Bifidus longum 536 |   |
| BIO sa aktivnim Caseiem(Danone) F | L.casei |   |
| LC1 (Nestle) Nem | L.acidophilus La1 |   |
| SymBalance (Toni Lait) Švajc | L.reuteri, L.acidophilus La5, L.casei 01, Bifidobacterium | Inulin |
| Vifit (Sudmilch) Nem. | L.casei GG | Oligofructosa |
| ABC Ferment (Sobbecke) Nem. | L.acidophilus, Bifidobacterium, L.casei | Inulin |
| LA-7 plus (Bauer) Nem. Vita (Tuffi) Nem. | L.acidophilus, B.Bifidum, L.acidophilus LA-H3, B.Bifidum LB-H1, L.casei LC-H2 | Oligofructosa |
| Fysiq yoghurt (Campina Melkunie= Mona) Hol. | L.acidophilus Gilliand | Inulin |

**Tabela 3 : Novi probiotski set jogurt proizvodi u Evropi [2]**

Probiotske kulture se koriste i za proizvodnju sireva i to svježih, ali i tvrdih po tipu Gaude i Mazdama.

Iako danas postoji veliki broj probiotičkih proizvoda, ipak su najpoznatiji oni koji sadrže bakteriju *Lactobacillus rhamnosus GG* ili LGG proizvodi.Budući da LGG preživljava visoku kiselost u želucu i naseljava ljudska crijeva, brzo uspostavlja poremećenu ravnotežu crijevne mikroflore i pojačava prirodnu crijevnu otpornost prema patogenim mikroorganizmima ( također je jako učinkovit u sprječavanju i liječenju proljeva, ali i niza drugih poremećaja i bolesti). Smatra se da terapijska dnevna doza iznosi 100 grama probiotičkog proizvoda koji sadrži od milijun do deset milijuna živih stanica LGG-a po gramu proizvoda.

* 1. **Probiotički napitci od kozjeg mlijeka**

Probiotički fermentirani proizvodi mogu se proizvoditi i od drugih vrsta mlijeka, ne samo od kravljeg. Tako se za dobivanje ovih napitaka koristi i kozje mlijeko. Kozje mlijeko ima neke nutritivne i zdravstvene prednosti pred kravljim mlijekom, prije svega bolju probavljivost i antialergijska svojstva. U toku fermentacije kozje mlijeko djelomično gubi svojstven okus, neprihvatljiv mnogim potrošačima, pa fermentacija kozjeg mlijeka probiotičkim bakterijskim kulturama, uz eventualni dodatak prebiotika, može rezultirati proizvodom velike nutritivno-zdravstvene vrijednosti.

Istraživana je fermentacija kozjeg mlijeka na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pa je proizveden jogurt, probiotički jogurt, fermentirano acidofilno i fermentirano bifido mlijeko te kefir od kozjeg mlijeka s dodatkom mlijeka u prahu, koncentrata proteina sirutke i inulina i uspoređen s kravljim mlijekom. U pokusima su korištene DVS kulture: jogurtna kultura YC 180, mješovita kultura *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* i *Bifidobacterium* spp. ABT 4, *Lactobacillus acidophilus* La 5 i *Bifidobacterium bifidum* Bb 12 (Chr. Hansen) te zamrznutakefirna kultura KC 1 (Visby) odnosno kefirna zrnca iz domaćinstva.

U ovim istraživanjima svi fermentirani proizvodi od kozjeg mlijeka imali su mekšu konzistenciju u odnosu na iste od kravljeg mlijeka. Konzistencija kontrolnih proizvoda od kozjeg mlijeka (bez dodataka) bila je gotovo tekuća. Također senzorska svojstva probiotičkih proizvoda od kozijeg mlijeka bila su bolja nego kod onih od kravljeg miljeka, a i samo vrijeme fermentacije bilo je brže.

* 1. **Probiotički kiselomliječni napitci**

Za dobivanje probiotičkog proizvoda najčešće se koriste bakterijemliječne kiseline iz rodova*Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium*, aliza uspješno probiotičko djelovanje potrebne su točno određene vrste tihrodova koje imaju dokazano terapijsko djelovanje [10]. Proizvodi koji u sebi sadrže bakterije mliječne kiseline (BMK) - probiotike, imaju velik značaj i to je jedan od razloga što je ovih proizvoda sve više na tržištu.

Dokazano je da je čovjek od svoje najranije aktivnosti koristio prirodno fermentisane proizvode, neznajući da su BMK prirodnog ambijenta, koji ga okružuje u najvećem broju slučajeva odgovorne za nastajanje fermentisanih proizvoda. U posljednjih desetak godina sve se više radi na konstrukciji starter kultura za dobivanje probiotičkih proizvoda, a što je posljedica izučavanja BMK na molekularno-genetičkom nivou. Prilagođavanje standardnih tehnologija za proizvodnju kiselomliječnih napitaka ili razvoj novih tehnoloških linija za dobivanje probiotičkih proizvoda, zavisiće od fizioloških zahtjeva BMK koje se budu koristile kao probiotici.Uključivanje sojeva bifidobakterija u starter kulture ima sve više značaja, s obzirom da su različite vrste soja *Bifidobacterijum* najbrojnije u digestivnom traktu čovjeka. U posljednje vrijeme se sve veći broj fermentisanih proizvoda koji sadrže žive BMK humanog porijekla pojavljuju na tržištu za mliječne proizvode sa BMK, koje imaju direktnog uticaja na zdravlje ljudi.Mlijeko fermentisano pomoću sojeva *Lactobacillus acidophilus* prisutno je na svjetskom tržištu već više godina. Šta više, različiti sojevi *Lactobacillus acidophilus* se koriste za dobivanje mliječnih proizvoda, kao što su acidofilni jogurt ili slatko acidofilno mlijeko. Nutritivna kao i tarapeutska vrijednost mliječnih proizvoda koji sadrže žive forme *Lactobacillus acidophilus* su predmet istraživanja već dvije decenije. Međutim, razvoj palete mliječnih proizvoda baziranih na *Lactobacillus acidophilus* može imati problema. Glavne poteškoće su vezane za spor rast većine *Lactobacillus acidophilus* u mlijeku, posebno bez dodataka stimulatora rasta, kao i održavanje varijabilnosti bakterija tokom skladištenja do finalne upotrebe, relativno visoke kiselosti i veoma često usljed neprihvatljivog mirisa ili konzistencije proizvoda.

Mnoga istraživanja su dokazala da industrijska primjena sojeva bakterija mliječne kiseline ne predstavlja ekološku opasnost, niti ima negativnih efekata na zdrastveno stanje potrošača.

* 1. **Probiotički sir od kravljeg i kozjeg mlijeka**

U posljednje vrijeme raste interes za proizvodnju različitih probiotičkih proizvoda, pa tako i probiotičkog sira.Dokazano je da proizvodi moraju sadržavati minimalno 106živih bakterija po mL/g proizvoda da bi imali terapeutsko djelovanje[11].

Pošto probiotičke bakterije sporo rastu u mlijeku i spori su proizvođači kiseline i tvari arome, često se kombiniraju s neprobiotičkim bakterijama mliječne kiseline. Tako su seDrgalić I., Tratnik Lj., Božanić R. i Koruga S. u svom radu bavili proizvodnjom sira sa probiotičkim bakterijama i to primjenom mješovite ABT-4 kulture koja sadržava probiotičke bakterije *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* spp. te neprobiotičku bakteriju mliječne kiseline *Streptococcus thermophilus*. Oni su izabrali kozje mlijeko jer je puno probavljivije od kravljeg, posjeduje jače izražene bakteriocidne, imunološke te antialergijske osobine. Oni su u pokusima proizvodnje svježeg sira koristili sirovo kozje i kravlje mlijeko dobiveno od domaćinstva iz okolice Zagreba.Utvrdili su da je optimalna količina sirila za sirenje kozjeg mlijeka (0,01%), bez obzira na udjel mliječne masti.Oni su dobili različite rezultate, ovisno o postotku mliječne masti u kravljem i kozjem mlijeku.

Probiotički svježi sirevi od kravljeg i kozjeg mlijeka proizvedeni uz optimalne uvjete bili su 100% prihvatljivi od testiranih potrošača i to s prosječnom ocjenom 7,72 za probiotički svježi sir od kravljeg mlijeka te 7,61 za probiotički svježi sir od kozjeg mlijeka. Na osnovu ovoga vidimo da se danas ulaže veliki trud kako bi se proširio asortiman proizvoda sa probiotičkim bakterijama, a koji bi zadovoljili potrebe potrošača.

* 1. **Aroma probiotičkog jogurta sa i bez dodataka**

Jogurt je danas najpoznatiji fermentirani mliječni proizvod, a veoma je popularan ne samo zbog terapijskih svojstava nego i zbog karakteristične arome, okusa, izgleda i konzistencije.

Jogurt se proizvodi kontroliranom fermentacijom jogurtnih kultura. Jogurtna kultura sadrži dvije bakterije mliječne kiseline i to *Streptococcusthermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus.* Te dvije kulture rastu u simbiozi.Jogurtnoj kulturi mogu se dodati probiotičke bakterije koje poboljšavaju terapijska svojstva jogurta. Da bi se stimulirao rast i metabolička aktivnost probiotičkih bakterija, jogurtu se dodaju oligosaharidi kao prebiotici.Karakterističnu aromu jogurtu uglavnom daju laktobacili koji proizvode mliječnu kiselinu i acetaldehid, ali kompleksna aroma je izbalansirana mnogim nusproizvodima fermentacije i drugim karbonilnim spojevima kao što su aminokiseline.Najvažnija tvar arome jogurta je acetaldehid. Njegova koncentracija mora biti relativno visoka jer o njemu ovisi optimalan okus jogurta. Druga važna komponenta je diacetil. Prisustvo diacetila vrlo je važno jer doprinosi delikatnom, punom okusu i aromi te pojačava okus jogurta.U jogurtu je i limunska, ali i različite organske kiseline (mravlja, octena, propionska i dr.) o kojima djelomično ovise konačna svojstva i senzorske karakteristike fermentiranih proizvoda.

Postoji mnogo metoda za određivanje tvari arome, a jedna od najčešće korištenih metoda za određivanje komponenata arome je headspace plinska kromatografija.

1. **Terapijska svojstva biofermentiranih mlijeka**

Probiotički proizvodi danas se koriste upravo iz razloga što imaju terapeutsko djelovanje i utiču na zdravlje čovjeka. Postoji nekoliko aspekata sa kojih se posmatra njihovo djelovanje na zdravlje čovjeka, a to su ublažavanje alergijskih reakcija i infekcija, olakšanje kod iritabilnog kolona, regulacija crijevne mikroflore i probave [12].

Ljudski gastrointestinalni sistem sastoji se od kompleksnog mikrobnog ekosistema kojega čini nekoliko stotina različitih bakterijskih vrsta. Debelo crijevo je, posebice, vrlo gusto naseljeno mikroorganizmima čija koncentracija prelazi 1011 stanica po gramu sadržaja. Ovi mikroorganizmi i njihovemetabolizamske aktivnosti mogu pozitivno i negativno uticati na ljudsko zdravlje. Izraz “intestinalna mikroflora” (različite bakterijske vrste u crijevima) podrazumijeva njeno korisno djelovanje na zdravlje čovjeka, a samo su neke bakterijske vrste patogene.Uspješna primjena probiotičkih fermentiranih mlijeka u terapiji određenih humanih bolesti uključuje slijedeće:

1. adheziju probiotičkih mikroorganizama na humane intestinalne stanice;
2. opadanje fekalne mutagenosti;
3. poboljšanje konstipacije;
4. proizvodnju bakteriocina;
5. uticaj na površinski karcinom mjehura;
6. uticaj na mikrobnu populaciju sline.

Rezultati ekstenzivnih istraživanja potvrdili su blagotvorno djelovanje fermentiranih mliječnih proizvoda u slučajevima netolerancije laktoze, infekcija probavnog sistema, viralne dijareje, dijareje uzrokovane antibioticima, u prevenciji i tretmanu putničke dijareje te gastritisa uzrokovanog bakterijom *Helicobacter pylori*. Manje konzistentni rezultati dobiveni su proučavanjem djelovanja fermentiranih mlijeka pri uticaju radioterapije, konstipacije i prevencije karcinoma.U slijedećoj tabeli dati su primjeri korisnog djelovanja probiotičkih fermentiranih mlijeka naljudsko zdravlje.

**Tabela 4: Primjeri korisnog djelovanja probiotičkih fermentiranih mlijeka na ljudsko zdravlje [1]**

|  |  |
| --- | --- |
| **Blagotvorni učinak** | **Mogući mehanizam djelovanja** |
| Poboljšanje tolerancije laktoze | Smanjena koncentracija laktoze u proizvodu, laktazna aktivnost BMK, aktivna laktaza prisutna u proizvodu. |
| Suzbijanje dijareje uzrokovane antibioticima te putničke dijareje | Suzbijanje patogena probiotičkim bakterijama i biogenima ( mliječna kiselina, laktoferin ), kompetitivna inhibicija, normalizacija intestinalne mikrobne populacije. |
| Suzbijanje gasroenteritičkog rotavirusa | Modulacija sastava intestinalne mikrobne populacije, indukcija ekspresije intestinalnog mucin gena, obnavljanje oštećene permeabilnosti epitela, imunomodulacija. |
| Kontrola upalnih bolesti crijeva | Normalizacija intestinalne mikrobne populacije, imunomodulacija koja dovodi do uravnoteženog imuno odgovora, opskrba epitelnih stanica debelog crijeva kratkolančanim masnim kiselinama i vitaminima ( folati ). |
| Redukcija faktora rizika za nastajanje karcinoma debelog crijeva | Redukcija toksičnih/mutagenih reakcija u crijevima, opskrba epitelnih stanica debelog crijeva kratkolančanim masnim kiselinama i vitaminima ( folati ), smanjenje dekonjugacije žučnih soli i njihove sekrecije, poboljšanje nutritivne bioraspoloživosti te antikarcinogena aktivnost sastojaka mlijeka ( konjugirana linolna kiselina, bioaktivni peptidi, glutation ).  |

Krajem 2007. godine objavljen je prijedlog Liste zdravstvenih tvrdnji vezano na EU Direktivu o prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama. U Listi se osim ostalih nutrijenatau hrani, obrađuju i probiotičke bakterije (ukupno73 vrste), prema čijoj se koncentraciji predlaže određena zdravstvena tvrdnja. Tvrdnjom se potvrđuje, sugerira ilinavodi na mišljenje da postoji veza između kategorije hranei zdravlja [12]. U slijedećoj tabeli date su neke vrste probiotičkih bakterija i način njihovog djelovanja na zdravlje čovjeka.

**Tabela 5. Primjeri iz Liste zdravstvenih tvrdnji [12]**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Vrsta probiotičke bakterije** | **Količina****u fermentiranome mliječnom proizvodu****(cfu/dan)** | **Predložena zdravstvena tvrdnja** |
| *Bifi dobacterium animalis* ssp. lactis | Najmanje 1010 | Pomaže poboljšanju zdravlja flore probavnogtrakta |
| *Lactobacillus gasseri* i*Lactobacillus coryniformis* | Najmanje 108 uz potrošnju 3-4 sedmice | Regulira crijevnu mikrofloru *ili*Štiti probavni trakt *ili*Poboljšava probavu *ili*Jača / podupire / pomaže obrambenesposobnosti organizma |
| *Lactobacillus johansonii* | Najmanje 108 | Regulira probavu *ili*Regulira crijevnu mikrofl oru *ili*Pomaže poboljšanju zdravlja flore probavnog trakta |
| *Lactobacillus paracasei* | Najmanje 109 | Regulira probavu *ili*Regulira crijevnu mikrofl oru *ili*Pomaže poboljšanju zdravlja flore probavnogtrakta *ili*Smanjuje napuhnutost |
| *Bifi dobacterium animalis* ssp. *lactis Bb-12* | Najmanje 109 kao jogurt | Jača / podupire obrambene sposobnostiorganizma |

1. **Probiotici i liječenje poremećaja i oboljenja probavnog**

**trakta**

Probiotičke bakterije pozitivno djeluju u prevenciji i terapiji različitih bolesti. Danas se uticaj probiotika na zdravlje proučava s nekoliko aspekata: ublažavanjealergijskih reakcija i infekcija, olakšanje kod iritabilnogkolona, regulacija crijevne mikroflore i probave [12].

Ljudski gastrointestinalni sistem sastoji se od kompleksnog mikrobnogekosistema kojega čini nekoliko stotina različitih bakterijskih vrsta. Debelocrijevo je, posebice, vrlo gusto naseljeno mikroorganizmima čija koncentracijaprelazi 1011 stanica po gramu sadržaja. Ovi mikroorganizmi i njihovemetabolizamske aktivnosti mogu pozitivno i negativno uticati na ljudsko zdravlje.

Danas je opće poznata i dokazana činjenica da su probiotici živi mikroorganizmi čijom se konzumacijom višestruko pozitivno djeluje na ljudsko zdravlje, a većina ih se povezuje sa fermentacijom samog proizvoda [13].Osim u fermentiranimmliječnim proizvodima bakterije mliječne kiseline probiotičkogdjelovanja mogu se naći u različitim suplementimau prahu, tekućim ekstraktima, kapsulama i tabletama.

* 1. **Dijareja**

Dijareja spada u najčešće bolesti u svijetu i ponekad može čak da završi i smrtonosno. Postoji više tipova dijareje: akutna dijareja kod djece, putnička dijareja, dijareja uzrokovana terapijom zračenja, dijareja uzrokovana liječenjem antibioticima i dijareja uzrokovana netolerancijom na laktozu [14].

U većini slučajeva akutna dijareja kod djeceposljedica je infekcije rotavirusima.Istraživanja koja su obuhvatila djecu udobi od mjesec do 36 mjeseci pokazala su da svakodnevnokorištenje probiotičkih bakterija mliječne kiseline i/ilibifidobakterija neovisno o tome jesu li one bile u sastavufermentiranih mlijeka, kapsule ili oralne rehidratacijskeotopine, smanjuje trajanje dijareje 30 - 40 %. Također rezultati dvogodišnje studije (2000. - 2002.) pokazuju daprobiotičke bakterije *Bifidobacterium lactis* i *Lactobacillusreuteri* u koncentraciji od 107 cfu/g smanjuju pojavu dijarejeu dojenčadi kao i njezino vremensko trajanje.

Danas se još uvijek nemože sa sigurnošću govoriti kolika je stvarna učinkovitostupotrebe probiotičkih bakterija u liječenju putničke dijareje. Rezultati istraživanja koje je proveo McFarland (2007.),potvrđuju da korištenje mješovite kulture *Lactobacillusacidophilus* i *Bifidobacterium bifidum* uz *Saccharomycesboulardii*sigurno i visoko učinkovito djeluje u prevencijiputničke dijareje [14].

Terapijom antibioticima narušava se prirodna ravnotežacrijevne mikrobne populacije, što omogućava ubrzani rastbakterije *Clostridium difficile,* a kao posljedica toga je nastanak dijareje. Istraživanja koja je proveo McFarland 2006., pokazala su da upotreba probiotika može smanjit rizik od nastanka dijareje u djece kao posljedice uzimanja antibiotikana 11,9 % od potvrđenih 28,5 % slučajeva u kontrolnoj skupini.

Zračenje je jedna od najčešćih metoda koja se koristi u liječenjubrojnih tumora. Kao posljedica toga je činjenica dapribližno 80 % pacijenata ima akutne simptome, od kojihje dijareja najučestalija. Dokazano je da uzimanjem liofilizirane mješoviteprobiotičke kulture sastavljene od četiri soja laktobacila, trisoja bifidobakterija i jednog soja *Streptococcus delbrueckii*subsp. *thermophilus* tijekom terapije, dijareja se možeznačajno smanjiti.

U 80 % laktoza netolerantnih osoba nakon unosa 18 g laktoze mlijekom javlja se dijareja i/ili nadimanje.

U slijedećoj tabeli prikazani su sojevi probiotičkih bakterija s klinički potvrđenim djelovanjem na različite vrste dijareje.

**Tabela 6: Učinkovitost probiotičke bakterije protiv dijareje [3]**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Vrsta dijareje** | **Probitoička bakterija** | **Rezultat terapije** |
| **Dojenička dijareja** | *Lactobacillus rhamnosus GG* | Smanjenje trajanja. |
| *L. reuteri* | Smanjenje trajanja. |
| *Bifidobacterium bifidum i Sreptococcus thermophilus* | Spriječena rotavirusna dijareja. |
| *L. rhamnosus i L. reuteri* | Poboljšanje stanja akutne dijareje i smanjeno širenje rotavirusa. |
| *L. rhamnosus i L. reuteri* | Smanjenje trajanja dijareje u nehospitalizirane djece s blagim gastroenteritisom. |
| **Dijareja uzrokovana antibioticima** | *B. Longum* | Smanjenje trajanja dijareje uzrokovane eritromicinom. |
| *B. Longum i L. acidophilus* | Smanjenje broja slučajeva dijareje uzrokovane klindamicinom. |
|  *L. acidophilus i L. bulgaricus* | Smanjenje broja slučajeva dijareje uzrokovane ampicilinom. |
| *Lactobacillus rhamnosus GG* | Smanjenje trajanja dijareje uzrokovane eritromicinom.  |
| *Lactobacillus rhamnosus GG*  | Smanjenje pojave dijareje. |
| *Enterococcus faecium* | Smanjenje pojave dijareje uzrokovane antituberkuloznom terapijom. |
| *E. faecium* | Smanjuje pojavu dijareje. |
| *S. boluardi* | Smanjenje pojave dijareje uzrokovane β–laktaminima i tetraciklinima. |
| **Kolitis uzrkovan s *Clostridium difficile*** | *Lactobacillus rhamnosus GG* | Poboljšava stanje ili liječi kolitis. |
| *Lactobacillus rhamnosus GG* | Sprječava dijareju uzrkovanu s *Clostridium difficile* |
| **Putnička dijareja** | *L. acidophilus, B. bifidium, L.bulgaricus, S. thermophilus* | Smanjuje učestalost, ali ne i trajanje dijareje. |
| *Lactobacillus rhamnosus GG* | Smanjuje pojavu dijareje. |
| *S. boluardi* | Smanjuje pojavu dijareje. |

* 1. **Crijevne upale**

Probavni sistem je mjesto iznimne metaboličke aktivnosti koju mogu ometati mnogi faktori kao što su: upala crijeva, promjene crijevne mikroflore, smetnje u metabolizmu lijekova, povećani unos masti, kao i genetiči faktori. Danas se u kliničkoj prehrani koriste posebne dijete s probioticima za liječenje crijevnih upala, jer se unosom odgovarajućih probiotičkih bakterija mliječne kiseline postižne zaštitini učinak na organizam.

* 1. **Urogenitalne infekcije**

U ženskoj populaciji česte su infekcije urinarnog trakta. Pojedini sojevi laktobacila urovaginalnog porijekla posjeduju adhezivna svojstva kojima inhibiraju i/ili sprječavaju naseljavanje uropatogena na epitelne stanice. Najbolji učinak imaju bakterije roda L. rhamnosus GR-1 i L. fermentum RC-14.

* 1. **Snižavanje serumske razine kolesterola**

U crijevima i jetri mogu da se nalaze znatne količine kolesterola. Visoka razina kolesterola u plazmi može da dovede i do srčanog udara. Smatra se da neki sojevi *L. acidophilus* i *Bifidobacterium*mogu sniziti razinu kolesterola u crijevima, međutim mehanizam snižavanja kolesterola još uvijek nije u potpunosti razriješen.

1. **Doziranje i deklaracija probiotika**

Sigurnost upotrebe probiotičkih bakterija mora se uvijek iznova procjenjivati.Osim u fermentiranimmliječnim proizvodima, bakterije mliječne kiseline probiotičkog djelovanja danas se mogu naći u različitim suplementimau prahu, tekućim ekstraktima, kapsulama i tabletama.

Premaliteraturnim podacima i kliničkim studijama, za zdravstveniučinak potrebna je minimalna količina probiotičkih kulturaod 107 cfu/ml napitka ili 109 cfu/dan, tj. u 100 ml napitka.Jedinica cfu (engl. Colony Forming Units) – označavabroj poraslih kolonija (npr. 107 cfu/ml odgovara 10 milijunakolonija u 1 mililitru napitka). Treba naglasiti da nemaju svi fermentirani proizvodi probiotički učinak, jer im je količina probiotičkih kultura manja od minimalno potrebne da biproizvod imao probiotički učinak.

Prilikom deklaracije ovih proizvoda treba poštovati određene zakonitosti. Ako se proizvod želi deklarirati kao probiotik, proizvođačje obavezan navesti vrstu i količinu mliječno-kiselihbakterija (cfu/ml), napisati zdravstvenu tvrdnju, te prije stavljanja na tržište napraviti analizu zdravstvene ispravnosti u zavodu za javno zdravstvo. Danas se ipak postavlja pitanje do kojesu mjere navodi na ambalaži istiniti i jesu li oni zakonski regulirani?

1. **Zaključak**

Na osnovu svega izloženog u radu može se zaključiti slijedeće :

1. Probiotici djeluju pozitivno na potrošače samo ako se u proizvodu nalaze u dovoljnoj količini.
2. Prebiotici djeluju pozitivno na zdravlje čovjeka jer u neizmijenjenom obliku dospijevaju u debelo crijevo i na taj način stimuliraju rast bakterijskih vrsta koje imaju pozitivan zdravstveni učinak. Kombinacijom prebiotika i probiotika nastaje simbiotik.
3. Za fermentirane probiotičke proizvode bitna je sposobnost kulture da utiče pozitivno na senzorska svojstva proizvoda.
4. Interakcija probiotičkih i ostalih mliječno kiselih bakterija u sastavu utiče na kvalitet gotovog proizvoda.
5. Probiotičke mliječne kisele bakterije znatno snažnije djeluju na patogene ukoliko se nalaze u fermentiranom mlijeku, nego ako su izloirane kao čiste aktivne stanice u suspenzijama probiotika.
6. Postoje mnogi zahtjevi kojima mikroorganizmi moraju udovoljavati da bi bili tretirani kao probiotici. Zajedničko svima je obilježje da povoljno djeluju na zdravlje domaćina, te da se mogu ciljano koristiti u prevenciji i liječenju određenih oboljenja.
7. Osim svojih pozitivnih terapeutskih karakteristika, kultura probiotika mora biti sposobna da preživi pod uticajem parametara procesa, zadrži svoje probiotičke osobine nakon procesa, te bude sposobna opstati u velikom broju tokom trajanja skladištenja.
8. Na probiotičkim proizvodima najčešće stoji deklaracija ''terapijski'', pa ih kupac kupuje s ciljem poboljšanja i očuvanja zdravlja.
9. Različiti mliječni proizvodi, naročito fermentirani probiotički proizvodi, se uvoze jer ne postoji domaća proizvodnja.

**Komentar**

U posljednjih desetak godina probiotičke bakterije imale su značajnu ulogu u prevenciji i terapiji dijareje. Cilj ovog rada bio je istaknuti najznačajnije rezultate o preventivnom i terapijskom uticaju probiotičkihbakterija na: akutnu dijareju kod djece, putničku dijareju,te dijareje uzrokovane liječenjem antibioticima, zračenjem inetolerancijom na laktozu, utvrđene u razdoblju posljednjihdesetak godina.Korištenje probiotičkih bakterija u prevenciji i terapiji različito uzrokovanih dijareja nema isti učinak. U literaturi često različito interpretirani rezultati o učinkovitosti probiotičkihbakterija u prevenciji i terapiji dijareje posljedica su iznimnesloženosti tih vrsta istraživanja.

1. **Literatura**
2. Tamime, A.J., Božanić, R., Rogelj,I.( 2003 ): Probiotički fermentirani mliječni proizvodi*.*Mljekarstvo 53 (2) 111-134.
3. Šarović, J.( 2006 ): Značaj probiotika i prebiotika u proizvodnji fermentisanih napitaka. (http://www.tehnologijahrane.com ). Pristupljeno dana: 30. 09. 2009.
4. Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beluhan, S., Matošić, S. ( 2003 ):Sinbiotička svojstva Lactobacillus acidophilus M92.Mljekarstvo 53 (2) 83-110.
5. Krznarić, Ž. ( 2008 ):Klinička prehrana danas.Medicus, Vol. 17, No. 1, str. 65.
6. Kočevski, D. ( 2005 ):Ispitivanje stupnja inhibicije Listeria monocytogenes u fermentiranim napitcima od kozijeg i kravljeg mlijeka. Diplomski rad, Prehrambeno tehnološki fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek.
7. Lee, Y.K., Salminem, S.( 2009 ): Probiotic microorganisms.Handbook of Probiotics and Prebiotics, Second Edition.
8. Hruškar, M., Bucak, I., Vahčić, N. ( 2003): Aroma probiotičkog jogurta sa i bez dodataka. Mljekarstvo 53 (3) 195-210.
9. Lee, Y.K., Salminem, S.( 2009 ): Probiotic microorganisms. Handbook of Probiotics and Prebiotics, Second Edition.
10. Prof. dr. sc. Papa, B. Zdrav život br. 67/2008. (http://www.zdrav-zivot.com.hr ). Pristupljeno dana: 15. 11. 2009.
11. Šušković, J. Probiotici – funkcionalni dodaci hrani. (http://www.hmu.hr/index.php ). Pristupljeno dana: 25. 11. 2009.
12. Drgalić, I., Tratnik, Lj., Božanić, R., Koruga, S. ( 2006 ): Optimiranje proizvodnje probiotičkog svježeg sira od kozjeg i kravljeg mlijeka. Mljekarstvo 56 (2) 107-118.
13. Pollak, L. ( 2008 ): Dodaci prehrani i hrana za posebne prehrambenepotrebe.Medicus, Vol. 17, No. 1, 47 – 55.
14. Justin L. Sonnenburg, Christina T. L. Chen, Jeffrey I. Gordon ( 2006 ): Genomic and Metabolic Studies of the Impact of Probiotics on a Model Gut Symbiont and Host. PLoS Biology, December , Volume 4 , Issue 12, str. 2213.
15. Samaržija,D., Tudor, M., Prtilo, T., Dolenčić Špehar, I., Zamberlin, Š., Havranek, J. ( 2009 ):Probiotičke bakterije u prevenciji i terapiji dijareje. Mljekarstvo 59 (1), 20-24.

Objavljeno na: [www.maturski.org](http://www.maturski.org/)