

ZDRAVSTVENI UČINAK I PRIMJENA KVASCA SACCHAROMYCES BOULARDII

Stanić, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Karlovac
University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:101362>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-22**



VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
Karlovac University of Applied Sciences

Repository / Repozitorij:

[Repository of Karlovac University of Applied
Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA
PRERADA MLIJEKA

MAJA STANIĆ

ZDRAVSTVENI UČINAK I PRIMJENA KVASCA
SACCHAROMYCES BOULARDII

ZAVRŠNI RAD

KARLOVAC, 2022.

Veleučilište u Karlovcu
Stručni studij prehrambena tehnologija
Prerada mlijeka

Maja Stanić

Zdravstveni učinak i primjena kvasca
Saccharomyces boulardii

Završni rad

Mentor: dr. sc. Bojan Matijević, prof. v.š.

Broj indeksa studenta: 031461053

Karlovac, rujan 2022.

IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Maja Stanić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Zdravstveni učinak i primjena kvasca *Saccharomyces boulardii*** rezultat vlastitog rada i istraživa te se oslanja se na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 29. rujan 2022.

Maja Stanić

Veleučilište u Karlovcu
Odjel prehrambene tehnologije
Stručni studij prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ZDRAVSTVENI UČINAK I PRIMJENA KVASCA *SACCHAROMYCES BOULARDII*

Maja Stanić

Rad je izrađen ...

Mentor: dr.sc. *Bojan Matijević*, prof. v.š.

Sažetak

Probiotici su živi mikroorganizmi koji pružaju zdravstvenu dobrobit za domaćina bilo da dolaze u fermentiranoj hrani ili osušeni u obliku kapsula. Oni pripadaju bakterijama iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ili *Bacillus*. Osim bakterija probiotike nalazimo i među kvascima iz roda *Saccharomyces*. *Saccharomyces boulardii* je kvasac koji se intenzivno istražuje u pogledu probiotičkih svojstava, a prema najnovijim molekularnim istraživanjima taksonomski se svrstava vrsti *Saccharomyces cerevisiae*, iako su po svojstvima potpuno različiti. Prema nekim autorima, radi se o varijetetu navedene vrste. *Saccharomyces boulardii* pokazuje terapijska svojstva kod dijareja izazvanih djelovanjem antibiotika, prisustvom *Clostridium difficile*, pojave iritabilnog kolona, kod osoba oboljelih od AIDS-a i sl. Osim toga ovaj kvasac ima potencijal za prehrambenu industriju, proizvodnju mliječnih proizvoda, bezalkoholnih i alkoholnih pića (posebice piva i vina), a može se koristiti i kao zaštitna kultura kako bi se spriječilo kvarenje hrane uzrokovano plijesnima.

Broj stranica: 27

Broj slika: 4

Broj tablica: 7

Broj literaturnih navoda: 47

Broj priloga: -

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: primjena, probiotici, *Saccharomyces boulardii*, zdravstveni učinak

Datum obrane: 29. rujan 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Goran Šarić*, v. pred.
2. dr. sc. *Jasna Halambek*, v. pred.
3. dr. sc. *Bojan Matijević*, prof.v.š.
4. dr. sc. *Marijana Blažić*, prof.v.š. (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J.J. Strossmayera 9, 4700 Karlovac, Hrvatska.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Karlovac University of Applied Sciences
Department of Food Technology
Professional Study of Food Technology

Final paper

Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Food Technology

HEALTH EFFECT AND APPLICATION OF *SACCHAROMYCES BOULARDII* YEAST

Maja Stanić

Final paper performed at ...

Supervisor: Ph.D. *Bojan Matijević*, college prof.

Abstract

Probiotics are live microorganisms that provide health benefits to the host whether they come in fermented food or dried in capsule form. They belong to bacteria from the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* or *Bacillus*. In addition to bacteria, probiotics are also found among yeasts from the genus *Saccharomyces*. *Saccharomyces boulardii* is a yeast that is intensively researched in terms of probiotic properties, and according to the latest molecular research, taxonomists classify it as *Saccharomyces cerevisiae*, although their properties are completely different. According to some authors, it is a variety of the mentioned species. *Saccharomyces boulardii* shows therapeutic properties in diarrhea caused by the action of antibiotics, the presence of *Clostridium difficile*, the appearance of irritable colon, in people suffering from AIDS, etc. In addition, this yeast has potential for the food industry, the production of dairy products, non-alcoholic and alcoholic beverages (especially beer and wines), and can also be used as a protective culture to prevent food spoilage caused by molds.

Number of pages: 27

Number of figures: 4

Number of tables: 7

Number of references: 47

Original in: Croatian

Key words: application, health effect, probiotics, *Saccharomyces boulardii*

Date of the final paper defense: 29 November 2022

Reviewers:

1. Ph.D. *Goran Šarić*, sen. lecturer
2. Ph.D. *Jasna Halambek*, sen. lecturer
3. Ph.D. *Bojan Matijević*, college prof.
4. Ph.D. *Marijana Blažić*, college prof. (substitute)

Final paper deposited in: Library of Karlovac University of Applied Sciences, J.J.Strossmayer Square No. 9, Karlovac, Croatia.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Osnovni pojmovi o probioticima	2
2.1.1. Izbor sojeva za probiotičku uporabu	3
2.1.2. Rod, vrsta i sojevi koji se koriste kao probiotici	5
2.2. Kvasci i njihova primjena	6
2.2.1. Uporaba kvasca	7
2.3. Kvasci kao probiotici	8
2.3.1. Svojstva kvasca <i>Saccharomyces boulardii</i>	9
2.3.2. Mehanizmi djelovanja probiotičkog kvasca <i>Saccharomyces boulardii</i>	11
2.3.3. Učinak na zdravlje	12
2.3.4. Sigurnost unosa <i>Saccharomyces boulardii</i> kao probiotika	16
2.4. <i>Saccharomyces boulardii</i> u proizvodnji hrane	16
2.4.1. Primjenat <i>Saccharomyces boulardii</i> u mliječnim proizvodima	17
2.4.2. Primjena <i>Saccharomyces boulardii</i> u proizvodnji bezalkoholnih pića	23
2.4.3. Primjena <i>Saccharomyces boulardii</i> u proizvodnji alkoholnih pića	23
2.4.4. <i>Saccharomyces boulardii</i> kao zaštitna mikrobnna kultura	24
3. ZAKLJUČCI	25
4. LITERATURA	26

1. UVOD

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) i Međunarodnom znanstvenom udruženju za probiotike i prebiotike (ISAPP) (Hill i sur., 2014), probiotici su “živi mikroorganizmi koji daju zdravstvene dobrobiti kada se daju u odgovarajućim količinama”. ISAPP je fermentiranu hranu definirao kao "hranu dobivenu željenim rastom mikroorganizama i enzimskom pretvorbom sastojaka hrane" (Marco i sur., 2021). Primjeri fermentirane hrane su jogurt, sirevi, kefir, kiseli kupus i sl.

Probiotici pripadaju bakterijama iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ili *Bacillus* i mogu biti prisutni u hrani (neki jogurti mogu sadržavati probiotike) ili dodatcima prehrani (kapsule). Osim bakterija probiotike nalazimo i među kvascima iz roda *Saccharomyces*.

Kvasac *Saccharomyces boulardii* otkrio je znanstvenik Henri Boulard davne 1923. godine. Naime, tijekom svog putovanja po Indokini, Boulard je uočio kako lokalno stanovništvo koristi egzotično voće lychee i mangosteen za tretiranje dijareje koji je simptom kolere. Ubrzo je otkrio da je za zdravstvene koristi ovog voća zapravo zaslužan kvasac.

Za razliku od bakterija, koje su također jednostanični organizmi, stanica kvasca ima drugačiji način djelovanja, međutim, u konačnici imaju nekoliko zajedničkih svojstva. I bakterije i kvasci važni su u proizvodnji hrane, mogu biti opasni, ali također mogu pokazivati i blagotvoran učinak na zdravlje ljudi. Poznato je da bakterije mliječne kiseline doprinose stvaranju ravnoteže u crijevima, a na sličan način to može činiti i kvasac *Saccharomyces boulardii*.(Vranešić-Bender, 2016)

Cilj rada je prikazati svojstva kvasca *Saccharomyces boulardii*, njegovu primjenu u proizvodnji hrane i blagotvoran učinak na zdravlje ljudi.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Osnovni pojmovi o probioticima

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije, „Probiotici su živi organizmi koji konzumirani u određenom broju (minimalno 10^9 CFU/dnevno) iskazuju zdravstveni učinak iznad granica normalne prehrane“ (Šušković i sur., 2009). Kao takvi, mogu se sastojati od jednog soja bakterija ili biti smjesa mikroorganizama, a njihova aktivnost nije ograničena na gastrointestinalni trakt već može djelovati na mikrobnu zajednicu respiratornog ili urogenitalnog trakta. Probiotici se prema načinu primjene mogu podijeliti na bioterapeutike i funkcionalne dodatke prehrani. Bioterapeutici spadaju u kategoriju “živih lijekova” a namijenjeni su za prevenciju i terapiju mnogih bolesti (Šušković i sur., 2009). Funkcionalni dodatci prehrani pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore i imunološki sustav. Često ih farmaceutska industrija naziva nutraceuticima. Prema definiciji, nutraceutik je svaka tvar koja je hrana ili dio hrane s medicinskim ili zdravstvenim dobrobitima, uključujući prevenciju ili liječenje bolesti (Čalić i sur., 2011). Mehanizmi djelovanja koje su istraživači otkrili u različitim probiotičkim sojevima uključuju modulaciju imunološkog sustava, interakcije s gastrointestinalnom mikrobiotom, proizvodnju organskih kiselina, konkurentnu isključenost, poboljšanu barijernu funkciju, proizvodnju malih molekula sa sistemskim djelovanjem i proizvodnju enzima. (Sanders, 2018.) Na žalost, još je mnogo toga nejasno. Nisu svi mehanizmi dokazani na ljudima, niti su povezani sa pozitivnim zdravstvenim ishodom kod ljudi, a osim toga, probiotici će doprinijeti određenom kliničkom ishodu kroz više različitih mehanizama, što komplicira istraživanje (Sanders, 2018). Postoje dva pristupa povećanju broja korisnih mikroorganizama u gastrointestinalnom sustavu. Prvi je unošenje živih organizama - probiotika, a drugi je uvođenje selektivnih ugljikohidrata, odnosno energije probioticima - prebiotika. (Šušković i sur., 2009). Prema Međunarodnoj znanstvenoj udruzi za probiotike i prebiotike, prebiotici selektivno potiču rast i aktivnost probiotika i na taj način utječu pozitivno na cjelokupno zdravlje organizma. Za razliku od probiotika, prebiotici nisu živi mikroorganizmi već neprobavljivi sastojci hrane, posebna vrsta vlakana, koja potječu iz biljaka. Poznati prebiotici uključuju polisaharide i oligosaharide kao što su, galakto - oligosaharidi, frukto – oligosaharidi od kojih su najpoznatiji inulin i laktuloza te oligosaharidi iz majčina mlijeka (Anadón i sur., 2016). Inulin (β – (2,1) – fruktan) je jedan od najviše istraženih i korištenih prebiotika iz porodice fruktana. Komercijalno se dobiva se iz korijena cikorije hidrolizom uz enzim inulazu. Nalazi se u manjim količinama i u mesu, bananama,

češnjaku i šparogama. Slično probioticima, prebiotici pripadaju generalno u klasu “hrane debelog crijeva” odnosno hrane koja je ušla u debelo crijevo i služi kao supstrat endogenih bakterija debelog crijeva, što neizravno opskrbljava domaćina energijom, metaboličkim supstratima i esencijalnim mikronutrientima. Iako inulin i oligofruktoza nemaju izravan imunogeni učinak oni mogu, utjecajem na crijevnu floru, posredno modulirati različite parametre imunološkog sustava (Anadón i sur, 2016). Pojam koji opisuje sinergijsko djelovanje probiotika i prebiotika u svrhu promicanja zdravlja zovemo sinbiotik (Hauser i sur., 2020, Krčelić, 2020).

2.1.1. Izbor sojeva za probiotičku uporabu

Soj probiotika je identificiran rodom, vrstom, podvrstom i alfanumeričkom oznakom. Za pronalazak učinkovitog probiotika, potrebna je točna taksonomska identifikacija te potpuna karakterizacija soja što je vrlo važno za precizno utvrđivanje dobrobiti pojedinog soja iz mješavine kultura u probiotičkom proizvodu (Hauser i sur, 2020). Također, za razliku od klasičnih mliječnih starter kultura, probiotički mikroorganizmi moraju zadovoljiti čitav niz kriterija kako bi bili pogodni za uporabu. Neki od tih kriterija uključuju otpornost na žučne soli, želučanu kiselinu i proteolitičke enzime, proizvodnju antimikrobnih tvari, da ne utječu nepovoljno na senzorska svojstva proizvoda te da pritom koloniziraju debelo crijevo (Šušković i sur., 2009). Detaljniji pregled kriterija za izbor probiotičkih sojeva navedeni su u tablicama 1, 2, i 3. Budući da mlijeko nije prirodan supstrat rasta za probiotičke bakterije koje potječu iz probavnog sustava, potrebno je izbjeći moguće probleme kao što je previše spor rast i razvoj kiseline, slabo preživljavanje u proizvodu tijekom čuvanja, slab okus i aroma proizvoda. To se kontrolira uporabom tradicionalnih kultura u proizvodnji komercijalnih probiotičkih proizvoda (Tamime i sur., 2003). Da bi proizvod uopće imao terapijska svojstva mora sadržavati minimalno 10^6 živih stanica/ml (Tratnik i Božanić, 2012).

Tablica 1. Kriteriji za odabir probiotičkog soja (Prilagođeno prema Šušković i sur., 2009, Krčelić, 2020).

Opći kriteriji	<ol style="list-style-type: none"> 1. Točna taksonomska identifikacija. 2. Humano podrijetlo probiotika za ljudsku uporabu. 3. Netoksičnost i nepatogenost. 4. Genetička stabilnost. 5. Otpornost prema žučnim solima. 6. Otpornost prema niskim pH-vrijednostima.
Tehnološki kriteriji	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stabilnost poželjnih karakteristika tijekom priprave kulture, skladištenja i isporuke. 2. Visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu (10^6 - 10^8 ml⁻¹). 3. Brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa priprave probiotičkih kultura te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije. 4. Dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kada su uključeni u fermentacijske procese.
Funkcionalni kriteriji	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metaboličke aktivnosti u "ciljanom" području primjene u organizmu. 2. Sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela. 3. Produkcija antimikrobnih supstanci. 4. Antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama. 5. Mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancama koje proizvodi autohtona mikroflora. 6. Imunomodulacijski učinak. 7. Sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje.

2.1.2. Rod, vrsta i sojevi koji se koriste kao probiotici

Soj probiotika je identificiran rodom, vrstom, podvrstom i alfanumeričkom oznakom koja identificira specifični soj. U znanstvenom svijetu dogovorena je nomenklatura mikroorganizama – primjerice, *Lactobacillus casei* DN-114 001 ili *Lactobacillus rhamnosus*. Marketing i tržišna imena ne podliježu tom dogovoru. Prema smjernicama Svjetske zdravstvene organizacije i Organizacije za hranu i poljoprivredu proizvođači probiotika bi morali registrirati njihov soj u međunarodnu bazu koja će dati dodatnu oznaku soju. Tablica 2. pokazuje nekoliko primjera komercijalnih sojeva i njihova imena (Houser i sur., 2020).

Tablica 2. Nomenklatura koja se koristi za probiotike (Houser i sur., 2020).

Rod	Vrsta	Podvrsta	Oznaka genetičke varijante	Međunarodna oznaka genetičke varijante	"Nadimak" genetičke varijante	Naziv proizvoda
<i>Lactobacillus</i>	<i>Rhamnosus</i>	<i>none</i>	GG	ATTC 53103	LGG	<i>Culturelle</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i>	<i>lactis</i>	DN-173 010	CNCMI-2494	<i>Bifidus regularis</i>	<i>Activia</i> jogurt
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	<i>longum</i>	35624	NCIMB 41003	<i>Bifantis</i>	<i>Align</i>

Korištenje oznaka probiotika je važno radi mogućnosti povezivanja direktne dobrobiti s konkretnim sojem ili kombinacijom sojeva u odgovarajućim efektivnim dozama na čemu se može tada i preporučiti određeni soj za željeni učinak. Neki sojevi imaju sposobnost utjecati na neurološke, imunološke i antimikrobne aktivnosti, iako treba uzeti u obzir kako su neki mehanizmi aktivnosti probiotika vrlo slični ili isti unutar različitih sojeva, vrsta pa čak i rodova. Tako je, primjerice, u brojnim probiotičkim sojevima prisutna sposobnost povećavanja proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina ili snižavanje intraluminalnog pH debelog crijeva. Brojni sojevi kojima se pripisuju mnoge dobrobiti pripadaju upravo vrstama *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Houser i sur., 2020).

Mikroorganizmi koji se upotrebljavaju za proizvodnju probiotičkih proizvoda najčešće pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Saccharomyces*, a koji su dio mikrobne populacije probavnog i urogenitalnog trakta ljudi (i životinja). Najčešće bakterije koje se koriste u proizvodnji probiotičkih proizvoda su: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus casei ssp. casei* i *Lactobacillus rhamnosus*. Bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije karakterizira sposobnost stvaranja različitih organskih spojeva i kiselina, vodikovog peroksida, ugljikovog dioksida, diacetila i bakteriocina koje luče u stanište u kojem rastu (Samardžija i sur., 2009).

Valja napomenuti da se zna i za druge vrste koje nisu potpuno istražene iako se koriste dugi niz godina. Primjerice, rod *Bacillus* se koristi već 50 godina u talijanskom proizvodu komercijalnog imena Enterogermina. Neke od vrsta iz tog roda bakterija koje bi mogle biti obećavajuće su *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* i *Bacillus licheniformis*. Budući da je riječ o sporogenim bakterijama uočene su brojne prednosti u proizvodnji probiotičkih proizvoda sa takvim kulturama. Neke od njih su primjerice visoka otpornost spora na toplinu, niski pH, mogućnost čuvanja na sobnoj temperaturi i otpornost na antibiotike (Soccol i sur., 2010, Krčelić, 2020).

2.2. Kvasci i njihova primjena

Kvasci su eukariotski jednostanični organizmi iz carstva Fungi. Većina vrsta kvasaca pripada koljenu *Ascomycota*, a nekoliko njih su *Basidiomycota*. Danas je poznato više od 1500 vrsta kvasaca (Kurtzman i Fell, 2006), među kojima je najpoznatiji modelni kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Razmnožavanje kvasaca može biti aseksualno pupanjem ili fisijom, odnosno poprečnom diobom te seksualno stvaranjem spora. Kvasci su heterotrofni organizmi koji preferiraju metabolizirati šećere, koje prevode do etanola i CO₂, ali mogu koristiti različite izvore ugljika, poput aminokiselina, organskih kiselina, poliola, alkohola, masnih kiselina i drugih spojeva, ovisno o vrsti kvasca. Prema procesu kojim dobivaju energiju, kvasci se dijele na: nefermentativne kvasce koji imaju samo respiracijski metabolizam; obligatno-fermentativne koji mogu metabolizirati samo glukozu kroz alkoholnu fermentaciju; i fakulativno-fermentativne kvasce koji imaju ili potpuno respiracijski ili fermentativni metabolizam ili čak oba, ovisno o uvjetima rasta, vrsti i koncentraciji izvora ugljika te dostupnosti kisika (Toffalo i Suzzi, 2016). Neki su kvasci patogeni za ljude i životinje (poput kvasca *Candida albicans*), a neki su važni u biotehnološkoj proizvodnji.

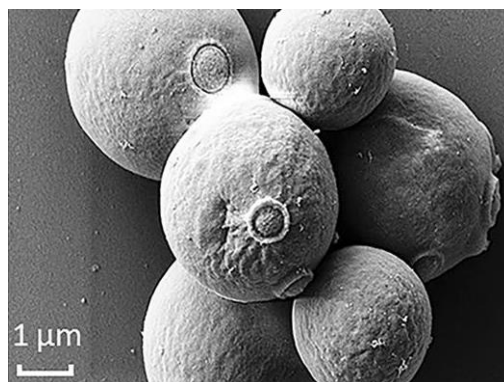
Tablica 3. Značaj kvasaca u proizvodnji hrane i pića (Fllet, 2006).

- Proizvodnja sastojaka i dodataka u preradi hrane.
- Kvarenje hrane i pića.
- Biološka kontrola patogenih mikroorganizama i mikroorganizama kvarenja.
- Probiotici i bioterapijske aktivne tvari.
- Izvor alergena iz hrane.
- Izvor oportunističkih, patogenih kvasaca.

2.2.1. Uporaba kvasca

Uporaba i proizvodnja kvasca temelji su biotehnologije (bioproceno inženjerstvo) i prehrambene tehnologije. U industrijskoj biotehnološkoj proizvodnji primjenjuje se tek 20-ak rodova kvasaca, a najznačajniji su askomiceti iz roda *Saccharomyces*, koji su važni uzročnici vrenja (fermentacije) pa se rabe kao pivski, vinski, alkoholni i pekarski kvasac. Da bi se stanice kvasca razmnožavale i rasle, potrebna im je energija koju dobivaju iz različitih šećera. U procesu alkoholne fermentacije kvasci šećere fermentiraju u ugljikov dioksid i etilni alkohol. U proizvodnji kruha, ugljikov dioksid ostaje zarobljen u tijestu i uzrokuje povećanje volumena, a alkohol isparava u procesu pečenja. Sojevi *Saccharomyces cerevisiae* preinačeni metodama genetičkog inženjerstva se u nekoliko posljednjih desetljeća rabe u suvremenoj farmaceutskoj proizvodnji bioloških lijekova (npr. inzulina). Osim toga, *S. carlsbergensis* važan je u proizvodnji nekih piva, a *S. kefir* jedan je od uzročnika specifičnog vrenja mlijeka kojim nastaje kefir (Godinić Mikulčić, 2020).

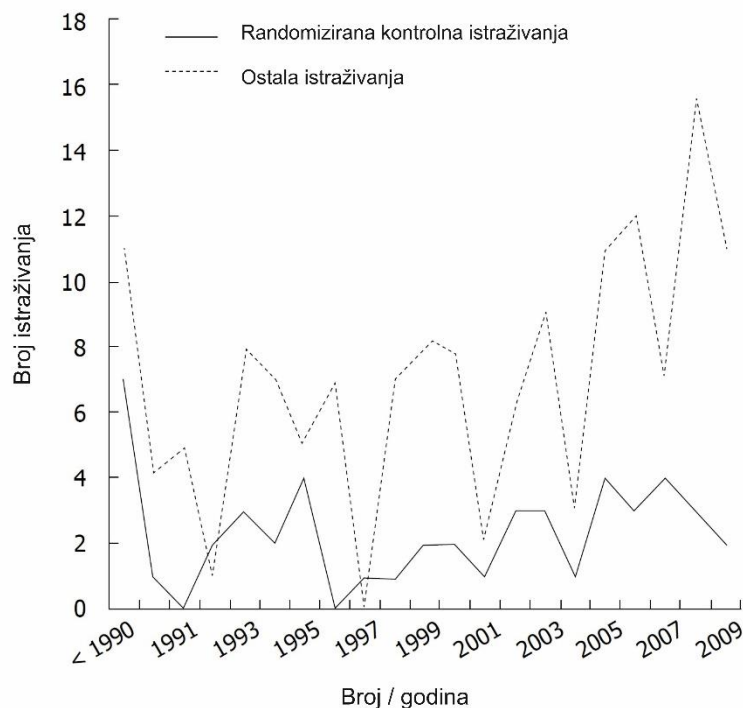
Europska agencija za lijekove (European Medicines Agency, EMA) odobrila je uporabu 20-ak bioloških lijekova proizvedenih u stanicama kvasaca koji se trenutačno nalaze na europskome tržištu. Neki kvasci služe u proizvodnji enzima, vitaminskih pripravaka (B-kompleks), karotenoida astaksantina (snažan antioksidans) i bioloških lijekova (poput efedrina za liječenje plućnih bolesti). Rabe se i u proizvodnji mikrobne biomase (u bioreaktorima za proizvodnju krmiva, gnojiva i različitih kemikalija), limunske kiseline, kvašćeva ekstrakta (aditivi i arome u hrani), etanola iz ksiloze (tzv. drveni šećer) čime na veoma ekonomičan način nastaje bioetanol, te u procesima za obradbu otpadnih voda kemijske industrije, gdje kvasci metaboliziraju aromatske spojeve (Godinić Mikulčić, 2020).



Slika 1. Prikaz stanica kvasca *S. cerevisiae* snimljen elektronskim mikroskopom (Recek i sur., 2018).

2.3. Kvasci kao probiotici

Kvasac *Saccharomyces cerevisiae* ima dugu povijest upotrebe u proizvodnji hrane, ali su rijetko ispitivana njegova probiotička svojstva. Međutim, jedan drugi iz istoga roda, blisko povezan, *S. boulardii*, koji je otkrio francuski mikrobiolog Henri Boulard 1920. god. On je u Indokini tražio nove vrste kvasca za procese fermentacije. Uspio je izolirati novu vrstu kvasca koji je nazvao "*Saccharomyces boulardii*". Patent za ovaj kvasac otkupio je Laboratories Biocodex 1947. god., i započeo s istraživanjima i proizvodnjom. Slika 2. prikazuje interes za ovu vrstu kvasca i broj objavljenih znanstvenih publikacija, uključujući pretkliničke radove o mehanizmima djelovanja, životinjske modele učinkovitosti, farmakokinetiku, rane studije o sigurnosti i rasponu doza. Osim toga, trenutno postoji veliki broj randomizirana kontrolirana klinička ispitivanja, koja obuhvaćaju ispitanike (pedijatrijski i odrasli ispitanici), istražujući sigurnost i učinkovitost *S. boulardii*, a obuhvaćaju nekoliko indikacija bolesti, od kojih je 81% pronašlo značajnu učinkovitost za *S. boulardii*. (McFarland, 2010).



Slika 2. Prikaz objavljenih znanstvenih publikacija o *S. boulardii* u periodu od 1976. do 2009. (McFarland, 2010).

2.3.1. Svojstva kvasca *Saccharomyces boulardii*

Kvasac *S. boulardii* pripada porodici *Saccharomycetaceae*, koljenu *Ascomycota*, veličine je između 4 i 8 μm , okruglog je ili eliptičnog oblika i tvori askospore. Raste na standardnom hranilištu za kvasce, sposoban je asimilirati i fermentirati ugljikohidrate i prirodno je rezistentan na antibiotike. Optimalna temperatura rasta kvasaca *S. boulardii* je 37°C što je i fiziološka temperatura čovjekova tijela. Također, dobro podnosi uvjete niske pH vrijednosti od 2 do 4 i otporan je na žučne soli i sokove gušterače. Upravo zbog toga, kvasac *S. boulardii* ima mogućnost primjene u svojstvu probiotika. Osim toga, nema patogena svojstva, a produktima vlastitog metabolizma iskazuje i antipatogeno djelovanje (McFarland, 2010; Tomičić, 2018).

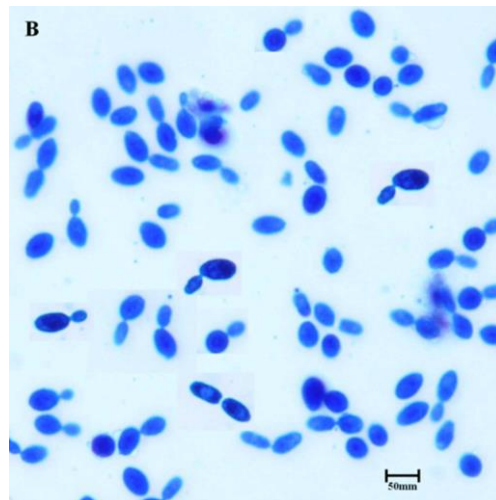
Tablica 4. Metaboličke, fiziološke i genetske značajke *S. boulardii* (Sen, 2020).

Značajke	Parametri
Optimalna temperatura rasta	37°C
Otpornost na visoke temperature (52 °C)	65% održivosti
pH otpornost na kiselinu (pH = 2/1h)	DA, 75% održivosti
Tolerancija na žučne kiseline (>0,3% (w/v))	NE, preživljavanje do 0.10% (w/v)
Osnovna pH otpornost (pH = 8)	DA
Asimilacija galaktoze	NE
Ploidnost	Diploid
Homo ili heterotalne	Homotalne
Vrsta razmnožavanja	Oboje
Sporulacija	Asporogen, ali daje plodne hibride sa <i>S. cerevisiae</i>
Stvaranje pseudohifa	Povećana

*w=težina, v=volumen

Identifikacija kvasca *S. boulardii* kao zasebne vrste ili varijeteta vrste *S. cerevisiae* i dalje je predmetom brojnih znanstvenih istraživanja. Rezultati brojnih taksonomskih studija su pokazali, da je *S. boulardii* soj kvasca *S. cerevisiae* (van der Aa Kuhle i sur., 2005; Tomičić, 2018). Isto tako, *S. boulardii* se ne priznaje kao posebna vrsta u skladu sa trenutnom taksonomijom, i kao takav, kvasac treba se imenovati kao *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Pored toga, kvasac *S. boulardii* je moguće odvojiti od ostalih sojeva vrste *S. cerevisiae* s obzirom na njegov probiotski potencijal, njegovu nesposobnost da koristi galaktozu i proizvodi askospore. Iz tih razloga neki znanstvenici vjeruju da se probiotički

kvasac treba smatrati kao zasebna vrsta. Isto tako, nekoliko studija posebno sa mikrosatelitskim polimorfizmom su pokazale jasan obrazac na osnovu koga je moguće napraviti razlika između kvasaca *S. boulardii* i *S. cerevisiae* (van der Aa Kuhle i Jespersen, 2003). Pored mikrosatelitskog polimorfizma tu je i analiza RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA) pomoću kojih je moguće razlikovati sojeve vrsta *S. boulardii* i *S. cerevisiae*, kao i razlikovanje na osnovu elektroforetskih kariotipova između *S. boulardii* u usporedbi sa *S. cerevisiae* (Czerucka i sur., 2007). Zbog sukobljenih rezultata istraživanja u praksi se trenutno koristi ime *S. boulardii* (nom. nud). Nom.nud. (nomen nudum) je latinski izraz koji označava »golo ime«. Termin se uglavnom koristi za vrste koje su slične poznatim vrstama, ali nisu još uvijek taksonomski klasificirane. Ovi sojevi su u procesu dobivanja znanstvenog imena, dok se ne dobije detaljan opis, što je u skladu sa važećim standardima nomenklature (ICZN, 2014; Tomičić, 2018).



Slika 3. Mikroskopski prikaz kvasca *S. boulardii* (Hossain i sur., 2020).

Kvasac *Saccharomyces boulardii* se najčešće koristi u liofiliziranom obliku u kapsulama ili granulama od 1962. god. kada je prvi puta predstavljen na francuskom tržištu kao terapeutik za dijareju. Od 60-ih godina prošlog stoljeća mnogim se eksperimentalnim i pred kliničkim studijama dokazao njegov protuupalni, antimikrobni, enzimatski, metabolički i antitoksični učinak. Istraživanja korisnosti kvasca *S. boulardii* za organizam domaćina sustavno se provode od 1980 godine. Tako danas postoje mnogobrojni klinički dokazi o njegovoj učinkovitosti (Tomičić, 2018). Nadalje, *S. boulardii* je jedini probiotički kvasac znanstveno dokazanog djelovanja dvostrukim slijepim istraživanjima te se danas smatra jednim od najvrjednijih i najučinkovitijih probiotičkih mikroorganizama (Tomičić, 2018).

Osim toga, postoje mnogobrojne pouzdane kliničke studije koje opisuju njegovo terapijsko djelovanje na različite probavne smetnje kod ljudi.

2.3.2. Mehanizmi djelovanja probiotičkog kvasca *Saccharomyces boulardii*

Mehanizmi djelovanja probiotičkog kvasca *S. boulardii* su sljedeći (Tomičić, 2018):

1. Inhibicija bakterijskih produkata

Kvasac *S. boulardii* proizvodi serinske proteaze, koje cijepaju toksin A i B patogene bakterije *Clostridium difficile* (Im i Pothoulakis, 2010).

2. Povećan imunološki odgovor

Probiotički kvasac stimulira proizvodnju antitijela protiv toksina A patogene bakterije *C. difficile* (Im i Pothoulakis, 2010; Czerucka i sar., 2007).

3. Modifikacija signalnih puteva, koji su uključeni u inflamatorne i neinflamatorne bolesti:

S. boulardii može smanjiti inflamaciju u gastrointestinalnom traktu stimulirajući regulatorne T stanice i inhibirajući mitogenom aktivirane protein (MAP) kinaze i nuklearni faktor kapa B (NF- κ B), što dovodi do smanjenja lučenja interleukina (IL-8) i faktora nekroze tumora alfa (Pothoulakis, 2009).

4. Održavanje integriteta stanica odnosno funkcije stanične membrane:

Kvasac *S. boulardii* u konkurenciji za mjestima vezanja u crijevima inhibira adheziju i rast patogenih mikroorganizama na intestinalnom epitelu i na taj način sprečava oštećenje ovih organizama (Czerucka i sur., 2007).

5. Koflokulacija s patogenim bakterijama:

Probiotički kvasac *S. boulardii* veže neke od patogenih bakterija (*Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*) na svoju površinu (lecitin receptori) umjesto na crijevne receptore, omogućavajući brže otklanjanje patogenih bakterija iz tijela (Czerucka i sur., 2007).

6. Utjecaj na proliferaciju stanica:

Kvasac *S. boulardii* vezanjem na ciljano mjesto u crijevima utječe na proliferaciju stanica. U slučaju karcinoma debelog crijeva blokira receptor za epidermalni faktor rasta (EGFR) i time blokira s EGF (epidermalni faktor rasta) induciranu proliferaciju i potiče apoptozu (Im i Pothoulakis, 2010).

7. Poboljšanje biostrukture fecesa:

Kvasac *S. boulardii* ima povoljan utjecaj na poboljšanje biostrukture fecesa kod pacijenata sa dijarejom sprečavanjem izlučivanja vode i elektrolita kao i povećavanje broja disaharida, koji se tako lakše razgrađuju u monosaharide i absorbiraju u krvi (Im i Pothoulakis, 2010).

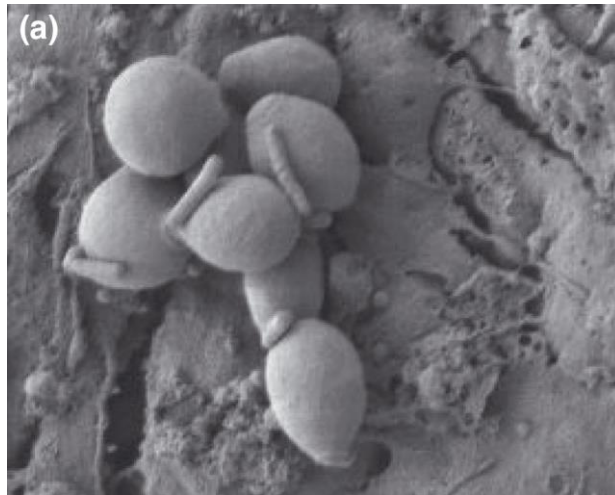
8. Utjecaj na sekreciju imunoglobulina A (IgA):

Nedavne studije potvrđuju, da probiotički kvasac *S. boulardii* može utjecati na sekreciju imunoglobulina A (IgA) (Rodrigues i sur., 2000). *S. boulardii* također stimulira proizvodnju imunoglobulina A, koji inhibira inflamatorni put (Im i Pothoulakis, 2010).

2.3.3. Učinak na zdravlje

Brojne dobrobiti na zdravlje pripisuju se *S. boulardii*. Međutim, mali broj zdravstvenih tvrdnji je potvrđen dobro smišljenim istraživanjima, posebno je mali broj istraživanja u pedijatriji. *S. boulardii* je živi kvasac koji se intenzivno koristi kao probiotik i često se prodaje kao dodatak prehrani (McFarland, 2010). Identificirano je nekoliko mehanizama djelovanja na domaćina kao i protiv patogenih mikroorganizama, a uključuju regulaciju homeostaze crijevne mikroflore, ometanje sposobnosti patogena da koloniziraju i inficiraju sluznicu, modulaciju lokalnih i sustavnih imunoloških odgovora, stabilizaciju funkcije gastrointestinalne barijere i indukcije enzimske aktivnosti koja pogoduje apsorpciji i prehrani (tablice 5 i 6).

Višestruki profilaktički i terapijski učinci ovog probiotičkog kvasca u upalnim gastrointestinalnim bolestima naglašavaju učinkovitost *S. boulardii* u crijevnim bolestima. Ova učinkovitost u prevenciji i liječenju akutnih i kroničnih gastrointestinalnih bolesti određena je mnogim čimbenicima i procijenjena je u nekoliko kliničkih ispitivanja (tablica 7).



Slika 4. Mikroskopski prikaz T84 stanica izloženih djelovanju *Saccharomyces boulardii* i *Salmonella typhimurium* (Czerucka i sur., 2007).

Tablica 5. Zdravstveni učinak *S. boulardi* na probavni sustav (Kelesidis i Pothoulakis, 2012).

<p>Luminalno djelovanje</p> <p>1. Antimikrobno djelovanje Inhibicija rasta bakterija i parazita Smanjenje crijevne translokacije patogena Neutralizacija čimbenika patogenosti bakterija Supresija adhezije stanica domaćina koja ometa kolonizaciju bakterija</p> <p>2. Antitoksični učinci Inhibicija veznih mjesta za receptore toksina Stimulacija proizvodnje antitijela protiv toksina A <i>Clostridium difficile</i> Izravna proteoliza patogenih toksina/Izlučivanje enzima (Proizvodi serin proteazu koja cijepa <i>C. difficile</i> toksin A) Sintaza fosfataze od 63 kDa koja uništava endotoksin patogene <i>Escherichia coli</i> Proizvodnja protein od 120 kDa koji smanjuje djelovanje toksina kolere</p> <p>3. Unakrsna komunikacija s normalnom mikrobiotom Kada se <i>S. boulardii</i> daje miševima izloženim antibioticima ili pacijentima s dijarejom, normalna mikrobiota brzo se uspostavlja.</p>
<p>Trofičko djelovanje na sluznicu crijeva</p> <p>Smanjuje broj zaraženih stanica i potiče rast i diferencijaciju crijevnih stanica kao odgovor na trofične čimbenike. Sprječava apoptozu i sintezu TNF Smanjuje mukozitis Obnavlja puteve transporta tekućine Stimulira proizvodnju proteina i energije te obnavlja metaboličke aktivnosti u epitelnim stanicama debelog crijeva Izlučuje mitogene faktore koji pospješuju restituciju stanica Pospješuje otpuštanje enzima membrane Stimulira proizvodnju glikoproteina Stimulira proizvodnju crijevnih poliamina Vraća normalnu razinu kratkolančanih masnih kiselina u debelom crijevu (SCFA) Stabilizira funkciju gastrointestinalne barijere i jača uske spojeve enterocita Smanjuje hiperplaziju kripti i oštećenje stanica u modelima kolitisa Smanjuje crijevnju propusnost kod pacijenata s Crohnovom bolešću</p>
<p>Regulacija imunološkog odgovora</p> <p>1. <i>S. boulardii</i> stimulira urođeni imunitet Pokreće aktivaciju komplementa i migraciju monocita i granulocita Povećava broj Kuppferovih stanica u miševa bez mikroflora Pojačava imunološki odgovor sluznice i sekretorne razine IgA u crijevima Pojačava sustavni imunološki odgovor i razine IgG u serumu na toksine A i B <i>C. difficile</i>. Doprinosi ranijoj proizvodnji IFN-γ i IL-12 Stimulira regulatorne T stanice Inhibira aktivaciju T stanica izazvanu dendritskim stanicama Modificira migraciju limfocita kod kronične upalne bolesti crijeva Modificira prianjanje limfocita na endotelne stanice, poboljšava kotrljanje i prianjanje stanica</p> <p>2. Smanjenjem proupalnih odgovora i promicanjem mukoznih protuupalnih signalnih učinaka Smanjuje ekspresiju proupalnih citokina (IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α i IFN-γ) Povećava ekspresiju protuupalnog citokina IL-10 Ometa putove transdukcije signala posredovane NF-κB, u imunološkim i epitelnim stanicama debelog crijeva Blokira aktivaciju ERK1/2 i MAP kinaza Smanjuje NO i inhibira proizvodnju inducibilnog NOS Modulira migracijsko ponašanje T stanica i povećava hvatanje T pomoćnih stanica u mezenterične limfne čvorove Stimulira proizvodnju protuupalnih molekula u ljudskim kolonocitima kao što je PPAR-γ</p>
<p>ERK, kinaza regulirana izvanstaničnim signalom; IL, interleukin; INF-γ, interferon gama; IgA, imunoglobulin A; IGF, faktor rasta inzulina; MAP, mitogenom aktivirani protein; NF-κB, nuklearni faktor kapa B; NO, dušikov oksid; NOS, dušikov oksid sintaza; PPAR-γ, receptor-gama aktiviran proliferatorom peroksisoma; TNFα: faktor nekroze tumora alfa</p>

Tablica 6. Učinak *S. boulardi* na crijevne infekcije (Kelesidis i Pothoulakis, 2012).

<i>Clostridium difficile</i>
Inhibira dijareju posredovanu toksinom A, crijevnu upalu i histološka oštećenja smanjenjem vezanja toksina A-receptora Otpušta proteazu koja cijepa toksine <i>C. difficile</i> i crijevne receptore toksina Stimulira razinu specifičnog imunoglobulina antitoksina A Inhibira sintezu IL-8 i aktivaciju MAP kinaza Erk1/2 i JNK/SAPK induciranu toksinom A <i>C. difficile</i> Značajno manje životinja zaraženih <i>C. difficile</i> uginulo je ako im je davan <i>S. boulardii</i>
<i>Helicobacter pylori</i>
Mijenja strukturu <i>H. pylori</i> .
<i>Vibrio cholera</i>
Inhibira učinak toksina <i>V. cholerae</i> i smanjuje aktivnost cAMP-a <i>S. boulardii</i> i CT receptori sisavaca mogu biti strukturno i funkcionalno slični i kvasac veže CT
Amebna dizenterija
Smanjuje broj crvenih krvnih zrnaca vezanih za amebe Smanjuje broj ameba koje nose crvena krvna zrnca
EHEC
<i>S. boulardii</i> modificira signalizaciju domaćina kao što su putovi povezani s NF-κB aktivirani bakterijskom invazijom s EHEC-om Dodavanje monoslojevima kolonocita T84 smanjuje fosforilaciju MLC i smanjuje transepitelni otpor kao odgovor na EHEC
EPEC
Modificira EPEC infekciju i djeluje kao receptor mamac za EPEC Smanjuje broj unutarstaničnih EPEC Blokira transepitelnu otpornost i promjene propusnosti, poništava poremećenu distribuciju ZO-1 i odgađa apoptozu epitelnih stanica kao odgovor na EPEC Defosforilira LPS iz <i>E. coli</i> O55B5
CT, toksin kolere; EHEC, enterohemoragična <i>E. coli</i> ; EPEC, enteropatogena <i>E. coli</i> ; ERK, kinaza regulirana izvanstaničnim signalom; LPS, lipopolisaharid; MAP, mitogenom aktivirani protein; MLC, laki lanac miozina; NF-βB, nuklearni faktor kapa B; ZO-1, zonula occludens 1

Tablica 7. Učinkovitost *S. boulardii* u liječenju akutnih i kroničnih bolesti (Kelesidis i Pothoulakis, 2012).

Akutne bolesti
Dijareja uzrokovana antibioticima Infekcija <i>Clostridium difficile</i> Akutna dijareja Dijareja povezan s enteralnom prehranom Putnička dijareja Infekcija <i>Helicobacter pylori</i>
Kronične bolesti
Crohnova bolest Ulcerozni kolitis Sindrom iritabilnog crijeva Parazitske infekcije Amebični kolitis Dijareja povezan s virusom HIV-a

2.3.4. Sigurnost unosa *Saccharomyces boulardii* kao probiotika

Iako ni u jednom kliničkom ispitivanju sa *S. boulardii* nisu primijećeni štetni učinci, primjena ipak nije bez rizika. Upotreba *S. boulardii* povećava rizik od komplikacija imunokompromitiranih pacijenata. Sekundarne komplikacija s kvascima iz roda *Saccharomyces* (fungemija) javlja se nakon njegove primjene kod pacijenata s teškom općom ili crijevnom bolešću koji su imali stalni kateter (Kelesidis i Pothoulakis, 2012).

Prijavljeno je gotovo 100 slučajeva sekundarne komplikacije sa *S. boulardii*. Smatra se da je podrijetlo translokacija iz probavnog trakta ili kontaminacija preko ruku medicinskih djelatnika. Doista, jednostavnim otvaranjem ambalaže sa *S. boulardii* može kontaminirati zrak, a posebno je opasna za pacijente s oslabljenim imunitetom. Nakon što se dijagnoza postavi, fungemija sa *S. boulardii* može se učinkovito liječiti antimikoticima, iako je prijavljen neuspjeh liječenja flukonazolom.

Prijavljena je i rijetka gastrointestinalna alergijska reakcija nakon što je dojenče konzumiralo *S. boulardii* s ciljem liječenja enterokolitisa izazvanog proteinima hrane (Kelesidis i Pothoulakis, 2012).

2.4. *Saccharomyces boulardii* u proizvodnji hrane

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

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

uzorak bez ekstrakta metabolita kvasca X 100. Razlike u učinkovitosti inhibicijskog djelovanja na pojedinačne bakterijske vrste pripisuju se strukturnim razlikama u građi receptora sadržanih u bakterijskoj staničnoj stijenci (Niamah, 2010). Metaboliti *S. boulardii* učinkovito inhibiraju bakterijske vrste uzročnike kvarenja hrane kao i patogene bakterije prisutne u hrani. Stupanj inhibicije kvasca *S. boulardii* na te izolate bio je veći povećanjem koncentracije inhibitornih metabolita. Posljedično tome, kvasac *S. boulardii* može se koristiti i u svojstvu prirodnog konzervansa u određenim vrstama hrane (Niamah i sur., 2017, Ille, 2018).

2.4.1. Primjena *Saccharomyces boulardii* u mliječnim proizvodima

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

Mljekarska industrija, u usporedbi s ostalom prehrambenom industrijom najbrže na tržište isporučuje nove funkcionalne prehrambene proizvode. Najčešće za tu se svrhu koriste probiotički bakterijski sojevi koji se u formi kultura koriste u proizvodnji fermentiranih mlijeka. Rjeđe se u sastavu kultura koriste određene vrste probiotičkih kvasca, a mogućnost korištenje i kvasca *S. boulardii* je u eksperimentalnoj fazi. Između ostalog, poznato je da kvasac *S. boulardii* ima sposobnost jakog proteolitičkog djelovanja i da stvara više različitih peptidaza koje mogu razgrađivati i proteine mlijeka. Također, ta vrsta kvasca ima i sposobnost stvaranja visokih koncentracija vitamina B kompleksa. Zbog tih sposobnosti utemeljena je pretpostavka da korištenje kvasca *S. boulardii* u mljekarskoj industriju može služiti za poboljšanje rasta bakterija iz sastava kultura u mlijeku (Niamah, 2017, Ille, 2018). Međutim za njegovo korištenje u svojstvu probiotičke kulture provode se brojna vrlo kompleksna istraživanja (Yerlikaya, 2014). U svojstvu probiotičkog kvasca *S. boulardii* je testiran u proizvodnji jogurta, kefira, acidofilno-kvašćevog mlijeka, toplinski obrađenog mlijeka na $>135^{\circ}\text{C}$ (UHT1 mlijeka) i sladoleda.

Jogurt

Hattingh i Viljoen (2001) za proizvodnju jogurta koristili su tekući (YNB broth2) pripravak probiotičkog soja *S. boulardii* ATCC 74012. Kvasac je najprije uzgojen na modificiranoj hranjivoj podlozi za kvasce, a potom je pomiješan sa sterilnom vodom da se dobije minimalna koncentracija kvasca u inokulumu od 10^6 cfu/ml. Tako pripremljeni

inokulum u količini od 2,5% korišten je za proizvodnju standardnog i jogurta proizvedenog od steriliziranog mlijeka (UHT postupak) te voćnog jogurta. Nakon proizvodnje jogurti su u kontroliranim uvjetima pohranjeni na temperaturi od 5°C tijekom 29 dana. Analizom je utvrđen nepromijenjen broj kvasaca sadržanih u inokulumu od 7,6 log₁₀ cfu/ml u standardnom i UHT jogurtu dok se u voćnom jogurtu početna populacija kvasaca povećala na 8,1 log₁₀ cfu/ml. Porast broja kvasca *S. boulardii* u voćnom jogurtu može se pripisati većoj dostupnosti fermentiranih šećera, i derivata saharoze i fruktoze sadržanih u voćnom dodatku. Neovisno što *S. boulardii* ne metabolizira laktozu, on ima sposobnost u mlijeku koristi dostupne organske kiseline, galaktozu i glukozu derivirane bakterijskim metabolizmom laktoze iz sastava jogurtne kulture. Navedeno istraživanje potvrdilo je sposobnost preživljavanja probiotičkog soja *S. boulardii* ATCC 74012 u jogurtu 29 dana u brojeve većem od 10⁶ cfu/ml (Pandiyani i Kumaresan, 2013). Pema usvojenim kriterijima da bi bilo koji mikrobnji soj imao status probiotičkog soja, između ostalog, mora imati u bilo kojem prehrambenom proizvodu sposobnost preživljavanja u broju većem od 10⁶ cfu/ml do kraja njegova vijeka održivosti.

Slično istraživanje provedeno je za standardni (klasični) jogurtu koji je uz jogurtnu kulturu inokuliran s pripravkom *S. boulardii* (43x10⁶ cfu/ml), u količinama od 1%, 2% i 3%. Potom je jogurt inkubiran na 37°C do kompletne koagulacije i pohranjen na 4°C kroz 21 dan. Kontrolna skupina jogurta inokulirana je s 5 % klasične jogurtne kulture (92x10⁸ cfu/ml). Brzina snižavanja pH vrijednosti odnosno brzina zakiseljavanja mlijeka bila je manja za jogurte s dodatkom *S. boulardii* inokuluma u odnosu na kontrolni jogurt. Utvrđene pH vrijednosti nakon završene fermentacije za jogurte s dodatkom 1%, 2% i 3% inokuluma bile su 4,18; 4,12 i 4,05 a pH vrijednost kontrolnog jogurta bila je 4,22. Koncentracija slobodnih aminokiselina (SAK) kao posljedica proteolitičke aktivnosti povećala se kod svih jogurta inokuliranih kvascem *S. boulardii*, ovisno o dužini trajanja fermentacije. Za jogurte s dodatkom 1%, 2 % i 3% inokuluma kod kojih je fermentacija trajala manje od 6 sati, vrijednosti SAK bile su 70, 85, i 95 µg/ml, a za kontrolni jogurt 50 µg/ml. Fermentacija duža od 6 sati utjecala je na daljnje povećanje koncentracije SAK na 215, 230 i 250 µg/ml za jogurte s dodatkom 1%, 2% i 3% inokuluma dok je u kontrolnom jogurtu koncentracija SAK bila 200 µg/ml.

Dodatak *S. boulardii* inokuluma ima značajan (p ≤ 0,05) utjecaj na kapacitet zadržavanja vode u jogurtu. U jogurtu s dodatkom 3% inokuluma kapacitet za zadržavanje vode bio je 50%, a kontrolnog jogurta 40%. Tako, inokulacija kvascem *S. boulardii* od 1% smanjuje mogućnost sinereze za 88%, od 2% za 86% a od 3% za 85%). Za usporedbu,

sinereza kontrolne skupine jogurta bila je 90 %. Osim toga, *S. boulardii* inokulum djeluje sinergistički na klasičnu kulturu jogurta i pospješuje njeno preživljavanje. Utvrđeno je da nakon 21 dan pohrane klasična jogurtna kultura u svom sastavu ima 7,53 log₁₀ cfu/g *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 7,55 log cfu/g *Streptococcus thermophilus* i 6,31 log cfu/g *S. boulardii*. Također, inokulumi s dodatkom 2% i 3% kvasca *S. boulardii* imaju pozitivan učinak na reološka i kemijska svojstva jogurta. Populacija živih kvasca veća od 10⁶ cfu/g prisutna u jogurtu 21 dan pohrane zadovoljava kriterije za njegovo svrstavanje u skupinu probiotičkih jogurta (Niamah, 2017, Ille, 2018).

Provedeno je i istraživanje primjene *S. boulardii* pripravka u jogurtu od kozjeg mlijeka. Proizvedena su 3 jogurta, jogurt 1- kontrolni jogurt s dodanom jogurtnom kulturom), jogurt 2 - jogurt s dodanom jogurtnom kulturom i *S. boulardii* pripravkom, jogurt 3 – jogurt u koji je *S. boulardii* dodan nakon inkubacije jogurtnom kulturom. Za proizvodnju jogurta korištena je klasična jogurtna kultura (10⁷ cfu/ml) dok je u jogurt 2 još dodan *S. boulardii* kvasac (10⁷ cfu/ml). Uzorci su pohranjeni na 6°C kroz 28 dana. Mjerenjem brojnosti populacije utvrđene su najviše vrijednosti, nakon 3 dana pohrane za jogurt 3 (5,6 log₁₀ cfu/g) i nakon 10 dana za jogurt 2 (6,4 log₁₀ cfu/g). Nakon 28 dana pohrane, brojnost je bila 4,9 log₁₀ cfu/g za jogurt 2 i 4,7 log₁₀ cfu/g za jogurt 3. U usporedbi s jogurtom od kravljeg mlijeka gdje broj *S. boulardii* od 10⁷ cfu/g ostaje stabilan do 29 dana pohrane (Hattingh i Viljoen, 2001; Karaolis i sur., 2013) kompatibilnost kozjeg mlijeka za izradu probiotičkog jogurta s kvascem *S. boulardii* je značajno niža. Međutim, temperatura inkubacije u navedenom istraživanju bila je viša od optimalne za *S. boulardii* što može biti uzrokom slabijeg rasta. Ipak, kao i u prethodnom istraživanju, utvrđeno je da *S. boulardii* poboljšava preživljavanje bakterija iz sastava klasične jogurtne kulture kroz 28 dana i u kozjem mlijeku.

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

samo je jedan ocjenitelj istaknuo jaki „kozji“ okus. Kako bi se kozji jogurt s kvascem *S. boulardii* mogao plasirati kao nutraceutik potrebno je provoditi daljnja istraživanja (Ille, 2018).

Kefir

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

Ivanova i suradnici (2012) proveli su ispitivanje fermentacija 7 uzoraka 0,400 l obranog kravljeg mlijeka s dodanom kefirnom kulturom (6 g kefirnih zrna) i *S. boulardii* kvascem (0,08 mg) u nizu od prve do sedme fermentacije, a uzorak bez dodanog kvasca služio je kao kontrolni. Svaka fermentacija provedena je u istim uvjetima, na temperaturi od C kroz 16 sati i s hlađenjem od 4 sata do temperature od 4 °C. Uzorci su potom liofilizirani na – 50 °C u vakuumu korištenjem laboratorijskog liofilizatora Martin Christ. Tijekom trajanja fermentacija mjerena je kiselost kefira. Kiselost klasično proizvedenog kefira je oko 4,4 (pH), no na početku fermentacija zamijećeno je snižavanje pH vrijednosti zbog čega su u 3. i 5. fermentaciji dodani sojevi *S. thermophilus* s pojačanim proteolitičkim djelovanje (veće nastajanje diacetila – okusne komponente) kako se pH ne bi previše snizio. Ukupan broj kvasaca sadržanih u kefirnim zrnima dodatkom *S. boulardii* soja se udvostručio, dok se broj bakterija iz dodane kefirne kulture nije mijenjao. Sveukupno, rezultati su pokazali da se pokusni kefir sa *S. boulardii* dodatkom ne razlikuje od kefira proizvedenog na klasičan način, štoviše zamijećeno je poboljšanje okusa te ne postoje prepreke za industrijsko korištenje ovakvih kultura za proizvodnju kefira (Ivanova i sur., 2012; Ille 2018).

Acidofilno - kvaščevo mlijeko

Kalpna (2008) je pokusno pripremio acidofilno-kvaščevo mlijeko iz steriliziranog, obranog mlijeka koje je hladio do 30°C te mu dodao 2 % *S. boulardii* kulture (5 različitih izolata), a uzorci su inkubirani na 37°C kroz 24 sata. Po završetku inkubacije dodan je *Lactobaccillus acidophilus* (NDC 15) u količini 1 % inokuluma te je uzorak dodatno inkubiran još 12 sati. Fermentacija je zatim prekinuta i uzorci su pohranjeni na 4°C. *S. boulardii* iskorištava mliječnu kiselinu za svoj rast i razmnožavanje te je uspješno održavao razinu populacije iznad 6 log jedinica. Kako bi se potvrdilo preživljavanje *S. boulardii* u

hladnim uvjetima pohrane duljeg trajanja usporedila se brojnost mikroorganizama u svježem uzorku u kojem je brojnost *L. acidophilus* iznosila 5,263 log cfu/ml i *S. boulardii* 7,10⁵ log cfu/ml te ona uzorka nakon 10 dana hladne pohrane gdje je brojnost *L. acidophilus* iznosila je 5,938 log cfu/ml i *S. boulardii* 7,195 log cfu/ml. Osim toga utvrđeno je sinergističko ponašanje između kvasaca i *L. acidophilus* kulture čiji je rast poboljšán, a nisu zamijećene negativne senzorne ili organoleptičke promjene (Ille 2018).

Trajno mlijeko

Trajno mlijeko pripravljeno je s inokulumom od 2,5 % *S. boulardii* kulture. Zamijećeno je preživljavanje i povećanje *S. boulardii* populacije s 8,15 log 10 cfu/ml na 8,5 log 10 cfu/ml unutar 29 dana pohrane UHT mlijeka na 5°C. Također pH mlijeka prvi dan je bio 6,55, a kroz 29 dana kontinuirano 6,59. S obzirom na sterilizaciju mlijeka samo je mala količina hidrolizirane laktoze bila dostupna kvascima. Svojom rastom i razmnožavanjem *S. boulardii* je proizveo male, 1,04 %, količine mliječne kiseline i etanola, 0,5%, što dokazuje da postoji funkcionalan metabolizam ugljikohidrata. Zaključak tog pokusa je da se kvasci poput *S. boulardii* probiotičkog soja uspješno mogu koristiti u proizvodnji mlijeka s obzirom da dobro opstaju u tim uvjetima, a količine alkohola i plinova su nezamjetne (Hattingh i Viljoen, 2001; Ille, 2018).

Sladoled

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

Senzornim ocjenjivanjem, svi su se sladoledi (s pojedinačnim kulturama i mješovitim kulturama) pokazali ispravnima i željenih organoleptičkih karakteristika bez narušenog okusa te s zadržavanjem potrebne brojčane populacije za klasifikaciju u probiotike, 10⁶ cfu/ml. Također, zamijećeno je da *S. boulardii* bolje raste u kombinaciji s *L. acidophilus*, nego kao monokultura (Pandiyan, 2010; Ille 2018).

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

2.4.2. Primjena *Saccharomyces boulardii* u proizvodnji bezalkoholnih pića

Pachori i Kulkarni (2017) istraživali su upotrebu *S. boulardii* u razvoju probiotičkog kokosovog mlijeka i pokazali su da je konzumacija ovog proizvoda imala pozitivan učinak na zdravlje. Osim toga, proces uključivanja probiotičkog kvasca nije mijenjao senzorska svojstva proizvoda. Na taj način autori preporučaju probiotičko kokosovo mlijeko kao alternativno piće za vegetarijance i osobe alergične na protein mlijeka, koje nisu u mogućnosti konzumirati probiotičke mliječne proizvode.

Senkarcinova et al. (2019) proučavali su upotrebu *S. boulardii* u razvoju probiotičkog bezalkoholnog piva. Oni su svojim istraživanjem pokazali kako kvasac može fermentirati pivsku sladovinu i uspješnije provodi fermentaciju. Dobiveno bezalkoholno pivo imalo je više hlapljivih spojeva. Također, njihovim istraživanjem otvaraju se nove mogućnosti u proizvodnji bezalkoholnog piva s dodatnom pozitivnim učinkom na zdravlje (García i sur., 2018; de Souza i sur., 2022).

Santana i sur. (2020) proučavali su i primjenu *S. boulardii* u soku od indijskog orašića iz brazilskog "cerrada" uz dodatak fruktoze, saharoze i ksilitola, te umjetnih sladila aspartama, stevije i sukraloze. Uzorcima soka dodali su *S. boulardii* u količini 10^8 CFU/ mL. Nakon 28 dana čuvanja broj živih stanica kvasca bio je veći od 7 log CFU / mL što upućuje da se navedeni sok može smatrati probiotičkim napitkom.

2.4.3. Primjena *Saccharomyces boulardii* u proizvodnji alkoholnih pića

S. boulardii je primijenjen u kombinaciji sa *S. cerevisiae* u proizvodnji craft piva. Ovo istraživanje je pokazalo da probiotički kvasac dobro preživljava tijekom procesa fermentacije, povećava antioksidativna svojstva, ali i dominaciju na kraju zrenja piva u odnosu na *S. cerevisiae* (Capece i sur., 2018). Stoga se može primijeniti u proizvodnji craft piva bez ili malim udjelom alkohola.

Mulero-Cerezo i sur. (2019) također su predložili upotrebu *S. boulardii* kao vrijednog probiotičkog kvasca u proizvodnji craft piva, pružajući veću antioksidacijsku aktivnost, niži udio alkohola, slična senzorska svojstva i veću održivost stanica nakon 45 dana.

Paula i sur. (2019) u svojim istraživanjima su zaključili da *S. boulardii* nudi novi put u razvoju alkoholnih pića i mogućnost poboljšanja njihove kvalitete (García i sur., 2018; de Souza i sur., 2022).

2.4.4. *Saccharomyces boulardii* kao zaštitna mikrobnna kultura

Da Silva i sur. (2015) uspješno su pokazali sposobnost *S. boulardii* kao zaštitne kulture. Naime u istraživanjima su značajno smanjili tvorbu spora plijesni *Aspergillus parasiticus* u kikirikiju. Utvrđeno je *S. boulardii* inhibira sporulaciju plijesni, postičući bolje rezultate ukoliko je veći broj živih stanica. Također, prisutnost *S. boulardii* promijenila je i boju kolonije *A. parasiticus*, ali ne i morfologiju spora. Smanjeno je i nastajanje aflatoksina u prisutnosti *S. boulardii*, ali bolji učinak je postignut kada je djelovao kao dikultura (*S. boulardii* i *Lactobacillus delbrueckii*) Stanice kvasca ostale su žive u kikirikiju i nakon 300 dana skladištenja (García i sur., 2018).

U drugom istraživanju, Heling i sur. (2017.) analizirali su upotrebu *S. boulardii* kao biološke zaštite kod banana.. Banane su prethodno dezinficirane i tretirane stanicama *S. cerevisiae* ili *S. boulardii* te kontaminirane sa plijesni *Colletotrichum musae*. *S. cerevisiae* ili *S. boulardii* smanjili su za 48 odnosno 35% nekrozu tkiva banane. Stoga su autori zaključili da se navedeni kvasci potencijalno mogu koristiti kao zaštitne kulture kako bi se suzbila aktivnost navedene plijesni (Heling i sur., 2017; García i sur., 2018; de Souza i sur., 2022).

3. ZAKLJUČCI

Na temelju prikupljene literature i analize dostupnih podataka mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. U području probiotika provode se brojna klinička istraživanja kako bi se utvrdila njihova zdravstvena dobrobit, razvijaju se novi proizvodi, ali i otkrivaju nove vrste bakterija s potencijalnim probiotičkim djelovanjem, ali i kvasca *Saccharomyces boulardii*.
2. *Saccharomyces boulardii* se prema molekularnim istraživanjima taksonomski svrstava vrsti *Saccharomyces cerevisiae*, iako ima potpuno različita svojstva.
3. Klinička istraživanja pokazuju povoljan utjecaj na zdravlje kvasca *Saccharomyces boulardii*, pokazuje terapijska svojstva kod dijareja izazvanih djelovanjem antibiotika, prisustvom *Clostridium difficile*, pojave iritabilnog kolona, kod osoba oboljelih od AIDS-a i dr.
4. *Saccharomyces boulardii* može se unositi u organizam kao dodatak prehrani (kapsule, osušeni prah) ili kao žive stanice u obliku različitih prehrambenih proizvoda.
5. Novija istraživanja pokazuju potencijal primjene kvasca *Saccharomyces boulardii* u proizvodnji hrane, različitih mliječnih proizvoda, bezalkoholnih i alkoholnih pića.
6. *Saccharomyces boulardii* može se koristiti kao mikroba kultura za zaštitu od kvarenja hrane uzrokovano plijesnima, ali i nastanka mikotoksina.

4. LITERATURA

1. Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. Ares, I., Martínez, M.A (2016): Prebiotics and probiotics: An assessment of their safety and health benefits, *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics, Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*, Watson, R., Preedy, V. (ur.), Academic Press, Cambridge, 3 – 23.
2. Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa, A., Siesto, G., Pietrafesa, R., Zambuto, M., & Romano, P. (2018): Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added, *International Journal of Food Microbiology*, 284, 22 – 30.
3. Czerucka D., Piche T., Rampal P. (2007): Yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii* *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **26**, 767 – 778.
4. CZN (2014): What is a nomen nudum. London, International Commission on Zoological Nomenclature: 1 str. <http://iczn.org/content/what-nomen-nudum> (pristupljeno: 17. srpnj 2022.).
5. Čalić, S., Friganović, E., Maleš, V., Mustapić, A. (2011): Funkcionalna hrana i potrošači, *Praktični menadžment*, **2** (2), 51-57.
6. Da Silva, J.F.M., Peluzio, J.M., Prado, G., Madeira, J.E.G.C., Silva, M.O., De Moraes, P.B., Rosa, C.A., Pimenta, R.S. (2015): Use of probiotics to control aflatoxin production in peanut grains, *The Scientific World Journal*, **1**, 1–8.
7. de Souza, H.F., Carosia, M.F., Carolina Pinheiro, C, de Carvalho, V., de Oliveria, C.A.F., Kamimura, E.S. (2022): On probiotic yeasts in food development: *Saccharomyces boulardii*, a trend, *Food Science and Technology*, **42**, e92321.
8. Fllet, G.H. (2006): The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production, *Yeasts in Food and Beverages*, Querol, A., Fleet, G. (ed), Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, 1 – 12.
9. Godinić Mikulčić, V. (2020): Kvasac, *Hrvatska tehnička enciklopedija*, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb.
10. Hattingh, A. L., Viljoen, B. C. (2001): Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products, *Food Research International*, **34**, 791 – 796.
11. Hauser, G., Benjak Horvat, I., Zelić, M., Prusac, M., Velikovski Škopić, O. (2020): Probiotici i prebiotici – koncept, *Medicus*, **29** (1), 95 – 114.

12. Heling, A.L., Kuhn, O.J., Stangarlin, J.R., Henkemeier, N.P., Coltro-Roncato, S., Gonc_alves, E.D. (2017): Controle biológico de antracnose em pos-colheita de banana “Maca” com *Saccharomyces* spp., *Summa Phytopathol*, **43**, 49 – 51.
13. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014): Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **11** (8), 506 – 514.
14. Hossain, M.N., Afrin, S., Humayun, S., Ahmed, M.M., Saha, B.K. (2020): Identification and Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soya Paste, *Frontiers in Nutrition*, **27**, 1-10.
15. Illle, L. (2018): Korištenje probiotičkog kvasca *Saccharomyces boulardii* u proizvodnji mliječnih proizvoda, Diplomski rad, Agronomski fakultet, Sveučilište u zagrebu, Zagreb.
16. Im, E., Pothoulakis C. (2010): Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research, *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **34** (1), 62 – 70.
17. Ivanova, G., Momchilova, M., Rumyan, N., Atanasova, A., Georgieva, N. (2012): Effect of *Saccharomyces boulardii* yeasts addition on the taste and aromatic propeties of Kefir, *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, **47**, 59 – 62.
18. Kalpana, D. (2008): Biotherapeutic properties of probiotic *Saccharomyces* species and its survival in acidophilus milk. Karnal, Haryana, India: National Dairy Research Institute, doktorska disertacija.
19. Karaolis, C., Botsaris, G., Pantelides, I., Tsaltas, D. (2013): Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt: survival and organoleptic effects, *International Journal of Food Science and technology*, **48**, 1445 – 1452.
20. Kelesidis, T., Pothoulakis, C. (2012): Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders, *The Adv Gastroenterol*, **5** (2), 111 – 125.
21. Krčelić, A. (2020): Zdravstveni učinak probiotika: stavovi potrošača, Završni rad, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac.
22. Kurtzman C.P., Fell J.W. (2006): Yeast Systematics and Phylogeny — Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, *The Yeast Handbook*, Springer, 11-30.

23. Lazo-Vélez, M.A., Serna-Saldívar, S.O., Rosales-Medina, M.F., Tinoco-Alvear, M., Briones-García, M. (2018): Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: a review, *Journal of Applied Microbiology*, **125**, 943 – 951.
24. Marco, M.L., Sanders, M.E., Gänzle, M., Arrieta, M.C., Cotter, P.D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzappel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B.E., Hutkins, R. (2021): The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **18** (4), 196 – 208.
25. McFarland, L.V. (2010): Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients, *World Journal of Gastroenterology*, **16** (18), 2202 – 2222.
26. Mulero-Cerezo, J., Briz-Redón, Á., & Serrano-Aroca, Á. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: valuable probiotic starter for craft beer production, *Applied Sciences*, **9** (16), 3250.
27. Niamah, A.K. (2017): Physicochemical and Microbial Characteristics of Yogurt with Added *Saccharomyces boulardii*, *Current research in Nutrition and Food Science Journal*, **5**, 300-307.
28. Pachori, R. R., & Kulkarni, N. S. (2017): Studies on development of probioticated coconut water, *Online International Interdisciplinary Research Journal*, **7**, 9 – 17.
29. Pandiyan, C., Kumaresan, G. (2013): Utilization of Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* in Dairy Products- A Overview, *Probiotics in Sustainable Food Production: Current Status and Future Prospects Probiotic Foods*, 57-60.
30. Paula, B. P., Chávez, D. W. H., Lemos, W. J. F. Jr., Guerra, A. F., Corrêa, M. F. D., Pereira, K. S., Coelho, M. A. Z. (2019): Growth parameters and survivability of *Saccharomyces boulardii* for probiotic alcoholic beverages development, *Frontiers in Microbiology*, **10**, 2092.
31. Pothoulakis C. (2009): Anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **30** (8), 826 – 833.
32. Recek, N., Zhou, R., Zhou, R., Setoa, V., Speight, R.E., Mozetič, M., Vesel, A., Cvelbar, U., Bazaka, K., Ostrikov, K. (2018): Improved fermentation efficiency of *S. cerevisiae* by changing glycolytic metabolic pathways with plasma agitation, *Scientific Reports*, **8**, 1 – 13.
33. Samaržija, D., Tudor, M., Prtilo, T., Dolenčić Špehar, I., Zamberlin, Š., Havranek, J. (2009): Probiotičke bakterije u prevenciji i terapiji dijareje, *Mljekarstvo*, **59** (1), 28-32.

34. Sanders, M.E., Merenstein, D., Merrifield, C.A., Hutkins, R. (2018): Probiotics for human use, *Nutrition Bulletin*, **43** (3), 212–225.
35. Santana, R. V., Santos, D. C., Santana, A. C. A., Oliveira, J. G. Fo., Almeida, A. B., Lima, T. M., Silva, F. G., & Egea, M. B. (2020): Quality parameters and sensorial profile of clarified “Cerrado” cashew juice supplemented with *Sacharomyces boulardii* and different sweeteners, *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, **128**, 109319.
36. Sen, S. i Mansell, T. J. (2020): Yeasts as probiotics: mechanisms, outcomes, and future potential, *Fungal Genetics and Biology*, **137**, 1-6
37. Senkarcinova, B., Dias, I. A. G., Nespors, J., Branyik, T. (2019): Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*, *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*, **100**, 362-367.
38. Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P.D.S., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamaguishi, C.T., Lindner, J.D.D., Thomaz-Soccol, V. (2010): The Potential of Probiotics: A Review, *Food Technology and Biotechnology*, **48** (4), 413-434.
39. Šušković, J., et al. (2009): Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **4** (3-4), 77-84.
40. Tamime, A., Božanić, R., Rogelj, I. (2003): Probiotički fermentirani mliječni proizvodi, *Mljekarstvo*, **53** (2), 111-134.
41. Tofalo, R., Suzzi, G. (2016): Yeasts. *Encyclopedia of Food and Health*, 593-599
42. Tomičić, Z. (2018): Uticaj probiotskog kvasca *Saccharomyces boulardii* na adheziju *Candida glabrata*, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
43. Tratnik Lj, Božanić R (2012): *Mlijeko i mliječni proizvodi*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
44. van der Aa Kuhle A., Jespersen L. (2003): The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene, *Systematic and Applied Microbiology*, **26** (4), 564-571.
45. van der Kuhle A., Skovgaard K., Jespersen L. (2005): In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains, *International Journal of Food Microbiology*, **101** (1), 29 – 39.
46. Vranešić – Bender, D. (2016): *Saccharomyces boulardii* – kvasac koji se bori protiv proljeva, *Revija za zdravlje*, **1**, 30.

47. Yerlikaya, O. (2014): Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks, *Food Science and Technology*, **34**, 221 – 229.