

Biotehnološka proizvodnja bakterijskih sojeva Lactobacillus brevis D6 I Lactobacillus fermentum D12

Balić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:534417>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-22**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2018.

Ema Balić

863/BPI

BIOTEHNOLOŠKA
PROIZVODNJA BAKTERIJSKIH
SOJEVA *Lactobacillus brevis* D6 i
***Lactobacillus fermentum* D12**

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jagode Šušković te uz pomoć asistentica Martine Banić, mag. ing. biotechn. i Katarine Zorić, mag. ing. biotechn., u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini“, (IP-2014-09-7009).

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jagodi Šušković na stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada, te na divnom odnosu prema studentima i svom znanju što nam je prenijela tijekom predavanja.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Blaženki Kos, doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc, te asistenticama Katarini Zorić, mag. ing. biotechn. i Martini Banić, mag. ing. biotechn. na svom trudu, savjetima i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na svojoj podršci koju su mi pružili tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika,
enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA BAKTERIJSKIH SOJEVA *Lactobacillus brevis* D6 I *Lactobacillus fermentum* D12

Emma Balić 863/BPI

Sažetak: Za probiotičke pripravke od iznimne je važnosti da sadrže žive stanice u koncentraciji većoj od 10^6 stanica po gramu proizvoda, jer jedino ako su prisutne u dovoljnoj količini mogu izazvati pozitivne učinke kod potrošača. Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj različitih nosača za mikroinkapsulaciju na preživljavanje bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12. Od tri ispitana nosača, alginata, karagenana i kazeina s djelovanjem transglutaminaze, alginat se pokazao kao najbolji nosač pri čemu je smrtnost stanica nakon procesa mikroinkapsulacije iznosila 0,125 log jedinica za soj *L. brevis* D6, odnosno 0,27 log jedinica za soj *L. fermentum* D12. Zatim je ispitano djelovanje različitih lioprotektora na stanice liofilizirane u alginatu. Od svih ispitanih lioprotektora (laktoza, inulin, saharoza, sorbitol i obrano mlijeko) obrano mlijeko se pokazalo kao najbolji lioprotektor za oba soja. Na kraju istraživanja je ispitano preživljavanje liofiliziranih mikroinkapsuliranih sojeva u simulirani uvjetima gastrointestinalnog trakta. Oba soja su pokazala visoko preživljavanje, odnosno bilo ih je u koncentraciji višoj od 10^9 CFU mL⁻¹.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, probiotici, mikroinkapsulacija, liofilizacija

Rad sadrži: 48 stranica, 11 slika, 8 tablica, 88 literaturnih navoda

Jezika izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Pomoć pri izradi: Martina Banić, mag. ing. biotechn. i Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
2. prof. dr. sc. Jagoda Šušković
3. izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić
4. prof. dr. sc. Ksenija Markov

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic
And Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF BACTERIAL STRAINS *Lactobacillus brevis* D6 and *Lactobacillus fermentum* D12

Ema Balić 863/BPI

Abstract: It is crucial for probiotic preparations to contain at least 10^6 viable cells per gram of the product to be able to express their health benefits for the host. The aim of this thesis was to investigate the influence of different methods of microencapsulation on the survival of probiotic bacteria *Lactobacillus brevis* D6 and *Lactobacillus fermentum* D12. Hence, three different matrixes for microencapsulation were used (alginate, carrageenan and casein with enzyme transglutaminase) to determine the best one and the alginate has been shown as the best. After process of microencapsulation the number of live cells of *Lactobacillus brevis* D6 strain was reduced by $0.125 \log \text{CFU g}^{-1}$ and of *Lactobacillus fermentum* D12 strain by $0.27 \log \text{CFU g}^{-1}$. Moreover, it was investigated how different lioprotectors (lactose, inulin, sucrose, sorbitol and skim milk) influence on viability of cells and skim milk had best characteristics. Finally, survival rate of bacterial strains through simulated gastrointestinal tract was investigated. Both strains have shown high survival rate, respectively concentrations were more than 10^9CFU mL^{-1} .

Keywords: lactic acid bacteria, probiotics, microencapsulation, lyophilization

Thesis contains: 48 pages, 11 figures, 8 tables, 88 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Jagoda Šušković, Full professor

Technical support and assistance: Martina Banić, mag. ing. biotechn., Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Reviewers:

1. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor
2. PhD Jagoda Šušković, Full professor
3. PhD Jasna Mrvčić, Associate professor
4. PhD Ksenija Markov, Full professor

Thesis defended:

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	TEORIJSKI DIO	3
2.1	Metode mikroinkapsulacije probiotičkih bakterija.....	3
2.1.1	Probiotici	3
2.1.2	Mikroinkapsulacija.....	5
2.1.3	Metode mikroinkapsuliranja	6
2.2	Nosači za mikroinkapsulaciju.....	12
2.2.1	Alginat.....	13
2.2.2	Karagenan.....	14
2.2.3	Kitozan	15
2.2.4	Proteini mlijeka	15
2.2.5	Škrob	16
2.2.6	Usporedba različitih nosača za mikroinkapsulaciju	16
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
3.1	MATERIJALI.....	19
3.1.1	Radni mikroorganizmi.....	19
3.1.2	Hranjive podloge	19
3.1.3	Kemikalije	20
3.1.4	Aparatura i pribor	21
3.2	METODE RADA	22
3.2.1	Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	22
3.2.2	Izolacija kromosomke DNA.....	22
3.2.3	Nasumična amplifikacija polimorfne DNA (eng. Random Amplified Polymorphic - DNA Polymerase chain reaction (RAPD-PCR)).....	23
3.2.4	Elektroforeza u denaturirajućem gradijentu - DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....	24
3.2.5	Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u alginatu.....	26
3.2.6	Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u κ -karagenanu	27
3.2.7	Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u kazeinu djelovanjem transglutaminaze.....	27
3.2.8	Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica uz dodatak različitih lioprotektora....	28

3.2.9	Preživljavanje mikroinkapsuliranih i liofiliziranih sojeva bakterija mliječne kiseline tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta	28
4	REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1	Mikroinkapsulacija i liofilizacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline	29
4.2	Preživljavanje mikroinkapsuliranih i liofiliziranih sojeva bakterija mliječne kiseline tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta.....	34
5	ZAKLJUČCI.....	39
6	LITERATURA.....	40

1 UVOD

Probiotici su pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji primijenjeni u ljudi ili životinja, blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore (Šušković, 1996). Kao probiotici se mogu koristiti različiti mikroorganizmi, ali se bakterije mliječne kiseline, koje imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) status, najčešće koriste za proizvodnju probiotičkih pripravaka. Probiotički pripravci moraju sadržavati žive stanice u koncentraciji većoj od 10^6 kako bi imali pozitivan zdravstveni učinak na zdravlje. Kako bi se osiguralo da probiotičke bakterije prežive u zadovoljavajućem broju tijekom obrade, čuvanja i nakon oralne konzumacije u gastrointestinalnom traktu primjenjuju se različite metode mikroinkapsulacije i sušenja. Mikroinkapsulacija je tehnološki postupak imobilizacije probiotičkih bakterija unutar ograničenog prostora nosača s ciljem njihove stabilizacije tijekom biotehnološkog postupka proizvodnje i primjene kao bioterapeutika (Champagne i Fustier, 2007). Na taj način se probiotičke stanice mogu zaštititi od degradacije štetnim faktorima kojima se susreću tijekom proizvodnje i prolaza kroz gastrointestinalni trakt, a omogućeno je njihovo oslobađanje u kontroliranim uvjetima. Nosači koji se koriste za mikroinkapsuliranje moraju biti sigurni materijali koji se mogu koristiti u prehrani. Najčešće korišteni nosači su: alginat, karagenan, kazein, kitozan, želatina i škrob. Liofilizacija ili sušenje smrzavanjem je metoda sušenja kod koje se procesom dehidratacije postiže zamrzavanje proizvoda i zatim se smanjuje okolni tlak kako bi se omogućilo da se smrznuta voda izravno sublimira od krute faze do plinske faze. Tijekom procesa liofilizacije često se dodaju lioprotektori koji različitim mehanizmima sprečavaju oštećenja stanica tijekom zamrzavanja, sušenja i skladištenja.

Cilj ovog rada je bio ispitati najpovoljniji način biotehnološke proizvodnje bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12. Navedeni sojevi su autohtoni izolati iz tradicionalno proizvedenog dimljenog sira, identificirani i selekcionirani kao potencijalni probiotički sojevi u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura. Budući da će se ti sojevi koristiti kao funkcionalne starter kulture za kontroliranu proizvodnju sireva, u ovom radu je ispitana primjena tri različita nosača, alginata, κ -karagenana i kazeina uz djelovanje enzima transglutaminaze, za mikroinkapsulaciju kako bi se odabrao onaj najpovoljniji odnosno onaj koji omogućava najbolje preživljavanje navedenih sojeva tijekom procesa proizvodnje, skladištenja i primjene. Uz to, bilo je potrebno ispitati koji će lioprotektor najbolje zaštititi mikroinkapsulirane sojeve tijekom procesa sušenja liofilizacijom.

Kao lioprotektori su korišteni laktoza, inulin, saharoza, sorbitol i obrano mlijeko u prahu. Na kraju je ispitano preživljavanje liofiliziranih mikroinkapsuliranih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

2 TEORIJSKI DIO

2.1 METODE MIKROINKAPSULACIJE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA

2.1.1 Probiotici

Probiotici se definiraju kao živi mikroorganizmi koji, dodani u odgovarajućoj koncentraciji, imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina. To može biti pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji primijenjeni u ljudi ili životinja, blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore (Rafter, 2003; Šušković, 1996). Pozitivni učinci probiotika uključuju inhibiciju rasta patogenih mikroorganizama (uslijed snižavanje pH vrijednosti medija, odnosno proizvodnje organskih kiselina, mliječne i octene, te drugih antimikrobnih supstancija, kao što su bakteriocini, vodikov peroksid, acetaldehid i diacetil, zatim uslijed onemogućavanja adhezije patogena konkuriranjem za mjesta vezanja, kompetitivna ekskluzija, i za nutrijente), održavanje stabilne ravnoteže crijevne mikroflore, stimuliranje imunostava, olakšavanje konstipacije, poticanje bolje apsorpcije kalcija, sintezu vitamina te sudjelovanje u razgradnji ugljikohidrata i proteina (Šušković i sur., 2010).

Kroz veliki broj istraživanja su opisani povoljni zdravstveni učinci probiotika na potrošača, kao što su pomoć kod gastrointestinalnih infekcija (kao što je na primjer infekcija bakterijom *Helicobacter pylori*) i uslijed toga ublažavanje simptoma upalnih procesa u intestinalnom traktu, zatim antimikrobna aktivnost, poboljšavanje metabolizma laktoze, snižavanje kolesterola u serumu, stimulacija imunološkog sustava te antimutagena, antikancerogena i antidiuretska svojstva (Chassard i sur., 2011; Imasse i sur., 2007; Jones i Jew, 2007; Sanders i sur., 2007; Shah, 2007; Madureira i sur., 2005; Nomoto, 2005; Gotcheva i sur., 2002; Agerholm-Larsen i sur., 2000; Kailasapathy i Chin, 2000; Gomes i Malcata, 1999).

Većina poznatih probiotika izolirana je iz mikrobiote humanog intestinalnog trakta. Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u ljudskom zdravlju, ne samo zbog sudjelovanja u probavnom procesu, nego i zbog funkcije koju ima u razvoju imuniteta pa se tako smatra da su mehanizmi djelovanja probiotičkih bakterija modifikacija sastava endogene intestinalne mikrobiote i njezine metaboličke aktivnosti, prevencija prerastanja i kolonizacije patogena te poticanje imunološkog sustava (Round i Mazmanian, 2009; Ouwehand i sur., 2002).

Vrlo je važno okarakterizirati rod i vrstu probiotičke bakterije, ali isto tako i soj jer svaka vrsta ima različite sojeve s različitim prednostima za zdravlje tako da je pozitivan učinak probiotika specifičan za svaki soj (Canani i sur., 2007). Zdravstvene koristi probiotičkih bakterija mogu biti posljedica proizvodnje organskih kiselina i/ili bakteriocina, zatim natjecanja s patogenima za izvore ugljika i za mjesta vezanja u intestinalnom traktu te poboljšanja imunološkog sustava (Chen i Chen, 2007).

Bakterije mliječne kiseline se smatraju najvažnijim predstavnicima probiotika s vrlo pozitivnim učinkom na humani gastrointestinalni trakt (Burgain i sur., 2011). To su gram-pozitivne, nesporogene, katalaza-negativne bakterije prirodno prisutne na supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, razgradni biljni materijali i u humanom gastrointestinalnom traktu. Glavni proizvod njihovog metabolizma je mliječna kiselina, ali uz to proizvode još i octenu kiselinu, vodikov peroksid, diacetil, acetaldehid, masne kiseline i neke druge antimikrobne komponente kao što su bakteriocini (male proteinske molekule s antimikrobnim djelovanjem prvenstveno prema srodnim vrstama). Prema američkoj upravi za hranu i lijekove bakterije mliječne kiseline imaju GRAS status te su industrijski vrlo važne i upotrebljavaju se kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda, a istovremeno se intenzivno istražuju u okviru probiotičkog koncepta. Sistematika i nomenklatura bakterija mliječne kiseline je tijekom vremena doživljavala stalne promjene. Današnja klasifikacija bakterija bazirana na molekularnim metodama je uvelike unaprijedila filogenetički odnos među prokariotima, posebice među bakterijama mliječne kiseline. Na temelju komparativnih sekvencijskih podataka Gram-pozitivne bakterije tvore dvije linije potomstva. Jedna linija se sastoji od gram-pozitivnih bakterija sa sastavom DNA manjim od 50% G + C parova takozvana grana *Clostridium*, gdje se nalaze i bakterije mliječne kiseline, dok druga grana *Actinomyces*, obuhvaća bakterije sa sadržajem G + C parova baza većim od 50%, a to su i bifidobakterije, koje su filogenetički različite, ali fiziološki pripadaju bakterijama mliječne kiseline jer proizvode mliječnu i octenu kiselinu kao krajnje proizvode fermentacije ugljikohidrata.

Probiotičke bakterije mogu polučiti pozitivan učinak na potrošača ako dođu do debelog crijeva žive i u dovoljno visokoj koncentraciji (Gilliland, 1989). Najmanji broj živih probiotičkih stanica (CFU g⁻¹), koji mora biti prisutan u proizvodu u trenutku konzumacije, kako bi postojao pozitivan medicinski (preventivni ili terapijski) učinak bi prema IDF-u

(International Dairy Federation) trebao biti $\geq 10^7$ CFU g⁻¹. Znači taj broj se mora u proizvodnju održati do isteka njegovog roka trajanja (Ouweland i Salminen, 1998).

2.1.2 Mikroinkapsulacija

Mikroinkapsulacija se često spominje kao način zaštite bakterija od nepovoljnih uvjeta okoline (Anal i Singh, 2007; Champagne i Fustier, 2007). Cilj mikroinkapsulacije je stvoriti mikrookoliš u kojem će bakterije preživjeti tijekom obrade, skladištenja i otpuštanja na željenom mjestu u intestinalnom traktu. Mikroinkapsulacija je tehnološki postupak imobilizacije probiotičkih bakterija unutar ograničenog prostora nosača s ciljem njihove stabilizacije tijekom biotehnološkog postupka proizvodnje i primjene kao bioterapeutika (Champagne i Fustier, 2007). Mikrokapsule su čestice koje sadrže aktivnu tvar okruženu nekim nosačem. Nosači koje se koriste u mikroinkapsulaciji mogu biti različite vrste polisaharida, proteina, i enzima, ovisno o tvari koji trebaju zaštititi. Zaštita bioaktivnih spojeva, kao što su vitamini, antioksidansi, proteini i lipidi, se može ostvariti koristeći različite tehnike mikroinkapsulacije. Mikroinkapsulacija se u prehrambenoj industriji koristi zbog kontroliranja oksidativnih reakcija, maskiranja okusa, boja i mirisa, pružajući trajno i kontrolirano otpuštanje te zbog produžavanja roka trajanja proizvoda. U slučaju probiotika, oni moraju biti zaštićeni od trenutka proizvodnje pa sve do konzumacije proizvoda.

Glavni stresovi kojima probiotici mogu biti izloženi su:

- okolišni stres poput izlaganja toplini i hladnoći tijekom procesiranja i visoki hidrostatski pritisak tijekom pakiranja
- kiselinski, oksidativni i osmotski stres tijekom proizvodnje
- te tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt kiselinski stres i izlaganje tvarima koje izlučuje gušterača, kao što su žučne soli i probavni enzimi.

Mikrokapsula omogućuje separaciju bakterijskih stanica iz mikrookoliša, što doprinosi stabilnosti tijekom proizvodnje i skladištenja, stabilnosti i aktivnosti tijekom primjene, omogućava ravnomjerno i kontrolirano otpuštanje u specifičnim uvjetima te omogućava prolaz metabolita malih molekularnih masa kroz membranu kapsule. Mikrokapsula se sastoji od polupropusne, sferične, tanke i čvrste membranske stijenke, a može biti veličine od nekoliko

mikrometara do nekoliko milimetara. Bakterijske stanice zadržavaju se unutar mikrokapsula, a hranjive tvari i metaboliti lako difundiraju kroz polupropusnu membranu. Probiotičke stanice koje čine sadržaj „mikrokapsule“ otpuštaju se pomoću različitih mehanizama, primjerice otapanjem stijenke nosača, fuzijom stijenke i difuzijom materijala.

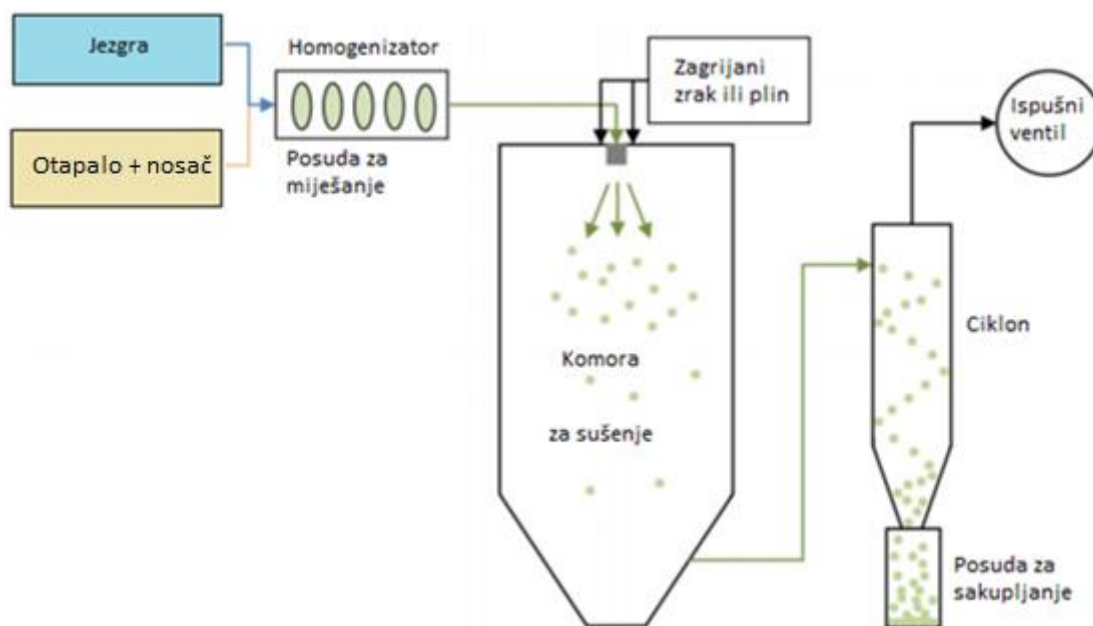
Kod odabira najbolje metode mikroinkapsuliranja za probiotičke bakterije treba uzeti u obzir brojne aspekte kako bi se osiguralo preživljavanje bakterija tijekom procesa proizvodnje (mikroinkapsuliranja i sušenja), zatim u uvjetima skladištenja i potrošnje, kao i kontrolirano otpuštanje u intestinalnom traktu potrošača (Chavarri i sur., 2012).

2.1.3 Metode mikroinkapsuliranja

2.1.3.1 Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je metoda dobivanja suhog praha iz tekuće ili polutekuće faze naglim sušenjem vrućim zrakom pri čemu je aktivni sastojak otopljen u mikroinkapsulacijskom mediju tvoreći emulziju ili suspenziju (slika 1) (Chavarri i sur., 2012). Kao otapalo se najčešće koristi hidroklorid poput želatine, biljne gume, modificiranog škrob, dekstrina ili nekih neželatinizirajućih proteina. Sušenje raspršivanjem je inače često korištena industrijska metoda za dobivanje mlijeka u prahu, instant kave, voćnih sokova u prahu, a sastoji se od tri faze, raspršivanja, sušenja i separacije odnosno odvajanja osušenog proizvoda i zraka. Tehnologija sušenja raspršivanjem omogućuje visoku stopu proizvodnje uz relativno niske troškove proizvodnje, a dobiveni prašci su stabilni i lako primjenjivi (Petrovic i sur., 2007). Nedostatak ove metode je taj što nije pogodna za sušenje materijala koji su osjetljivi na visoke temperature i materijale sklone oksidaciji. Dakle, većina probiotičkih sojeva ne može preživjeti visoke temperature i dehidraciju tijekom procesa sušenja raspršivanjem. Nizak postotak preživljavanja je uzrokovan uglavnom oštećenjem citoplazmatske membrane, ali isto tako stanična stijenka, ribosomi i DNA mogu biti oštećeni pri višim temperaturama (Teixeira i sur., 2000). Corcoran i suradnici (2004) su uočili da su kulture u stacionarnoj fazi otpornije na toplinu u usporedbi sa stanicama u eksponencijalnoj fazi rasta. Kako bi se osiguralo bolje preživljavanje probiotika, tijekom sušenja se dodaju zaštitna sredstva. Tako je na primjer dokazano da ugradnja zaštitnih sredstava kao što su trehaloza (Conrad i sur., 2000), krute tvari bez masti i / ili aditol (Selmer-Olsen i sur., 1999), faktora koji potiču rast, uključujući razne probiotičke / prebiotičke kombinacije (Desmond i sur., 2002) i granuliranog škroba (Crittenden

i sur., 2001) mogu poboljšati održivost kulture tijekom sušenja i skladištenja (Picot i Lacroix, 2003).



Slika 1. Shematski prikaz mikroinkapsulacije procesom sušenja raspršivanjem (Chavarri i sur., 2012)

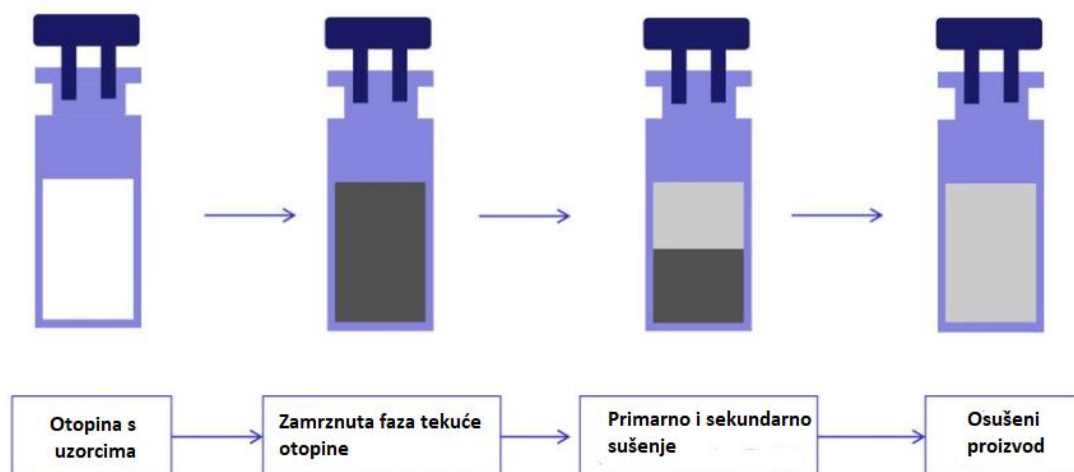
2.1.3.2 Raspršivanje hlađenjem

Ovaj postupak je sličan sušenju raspršivanjem. Glavna razlika u postupku hlađenja raspršivanjem je noseći materijal i radni uvjeti vezani uz postupak. U ovom slučaju se otopljeni nosači s niskim točkom tališta koriste za mikroinkapsulaciju bakterija, a smjesa nosača i bakterijskih stanica se ubrizgava u struji hladnog zraka kako bi se omogućilo skrućivanje nosećeg materijala. Zanimljivo je da mikrokapsule proizvedene na ovaj način uglavnom nisu topljive u vodi. Međutim, zbog toplinskih uvjeta postupka, hlađenje raspršivanjem se rijetko koristi za mikroinkapsuliranje probiotika.

2.1.3.3 Liofilizacija

Liofilizacija je proces sušenja proizvoda u zamrznutom obliku pri čemu se voda ili neko drugo otapalo odvodi sublimacijom. Proces liofilizacije se sastoji od dvije odnosno tri faze; faze zamrzavanja i faze sušenja koja se dalje dijeli na primarno i sekundarno sušenje. Stanice se u prvoj fazi zamrzavaju u vanjskoj jedinici za zamrzavanje do temperatura od -80°C , zatim se zamrznuti uzorci postavljaju u komoru za sušenje nakon čega slijedi zatvaranje i stvaranje

vakuuma, uz prethodno zagrijavanje vakuum pumpe. Tu započinje druga faza, odnosno faza sušenja tako što se zamrznuta voda iz krutog stanja, sublimacijom, prevodi direktno u paru pod vakuumom pa je postizanje vakuuma važno za uspješnu liofilizaciju. Isto tako je vrlo važno da biomasa bude raspoređena u što tanjem sloju jer se uzorak suši od površine prema dnu pa se na površini uzorka stvara suhi sloj koji može postati prepreka ostatku vode s dna koja treba ispariti. Što je taj sloj deblji, para će teže izlaziti i sušenje će se usporiti. Tijekom sušenja se razlikuju dvije faze, faza primarnog i faza sekundarnog sušenja. Primarno je sušenje to iz zamrznutog stanja tijekom kojeg se u pripravak dovodi toplina preko polica kako bi se ubrzao proces sublimacije. Temperatura kondenzatora je otprilike -50°C za vodene uzorke, a ukoliko se radi o nekim otapalima s nižom točkom ledišta, tada ta temperatura mora biti i niža. Ovdje je potrebno naglasiti da je od iznimne važnosti da biomasa stvarno bude potpuno smrznuta prije početka procesa sušenja jer će u protivnom vakuum u primarnoj fazi sušenja uzrokovati ključanje otopljenog dijela uzorka. Temperatura kondenzatora bi trebala biti $15\text{-}20^{\circ}\text{C}$ niža od temperature polica. Pokretačka sila liofilizacije je zapravo razlika tlaka para koji nastaje zbog razlike temperature uzorka i temperature u kondenzatoru. Zamrznuti uzorak postepeno dehidratira bez bitne promjene strukture i oblika što kasnije olakšava proces rehidratacije. Primarnim sušenjem se iz pripravka izdvaja slobodna voda i ono završava kada se iz pripravka ukloni otprilike 95% vode jer tada u pripravku više nema leda pa i sublimacija tada završava. Sekundarno sušenje je sušenje iz tekućeg stanja i njime se nastoji ukloniti tzv. vezana voda. Taj proces se temelji na izotermnoj desorpciji do koje dolazi podizanjem temperature polica do 20°C . Ova faza završava kada se izjednači temperatura uzorka i okoline, a traje puno kraće, otprilike 2 sata (Chávez i Ledebøer, 2007). Faze postupka liofilizacije su prikazane na slici 2.



Slika 2. Faze procesa liofilizacije (Nahata, 2018)

Iako tijekom liofilizacije dolazi do samo minimalnih oštećenja stanica, do njih može doći. Dakle, tijekom procesa liofilizacije, stanice su izložene „hladnom šoku“ tj. temperaturama zamrzavanja i osmotskom šoku tj. dehidraciji. Tijekom sušenja smanjuje se količina vode u stanicama kako bi se usporili metabolički procesi, a pri tome je važno sačuvati staničnu strukturu i stanične funkcije. Uklanjanje vode predstavlja stres za stanicu jer fosfolipidi stanične membrane moraju podnijeti prelazak iz tekuće u gel fazu. U citoplazminoj membrani fosfolipidi su hidratizirani. Uklanjanjem vode se povećavaju Van der Waalove sile između lanaca ugljikovodika i dolazi do oštećenja membrane, a dodatak nekih protektora, na primjer šećera, utječe na snižavanje temperature pri kojoj se taj prelazak odvija jer se vežu na površinu fosfolipida umjesto vode i na taj način čuvaju strukturu stanične membrane. Znači za protektivni učinak šećera su zaslužne vodikove veze između fosfatne grupe fosfolipida i hidroksilne grupe šećera. Dakle, šećeri ovdje djeluju kao lioprotektori, a lioprotektori su dodaci koji se koriste tijekom sušenja i osmolize odnosno liofilizacije čija je uloga stabilizacija membrane i sprečavanje nepovratnih oštećenja staničnih biopolimera. Osim mono, di i polisaharida, mogu se koristiti i druge tvari kao što su proteini mlijeka i sirutke, šećerni alkoholi, aminokiseline i njihovi derivati.

2.1.3.4 „Fluid-bed“ aglomeriranje

„Fluid-bed“ tehnologija se temelji na korištenju fluidizirajućeg zraka kako bi se osigurala jednolična cirkulacija čestica ispred mlaznice za raspršivanje. Ta mlaznica se koristi za raspršivanje odabranog materijala za prekrivanje (rastopljeni produkt ili vodena otopina) koji se skrutne pri niskoj temperaturi ili isparavanjem otapala (Chavarri i sur., 2012).

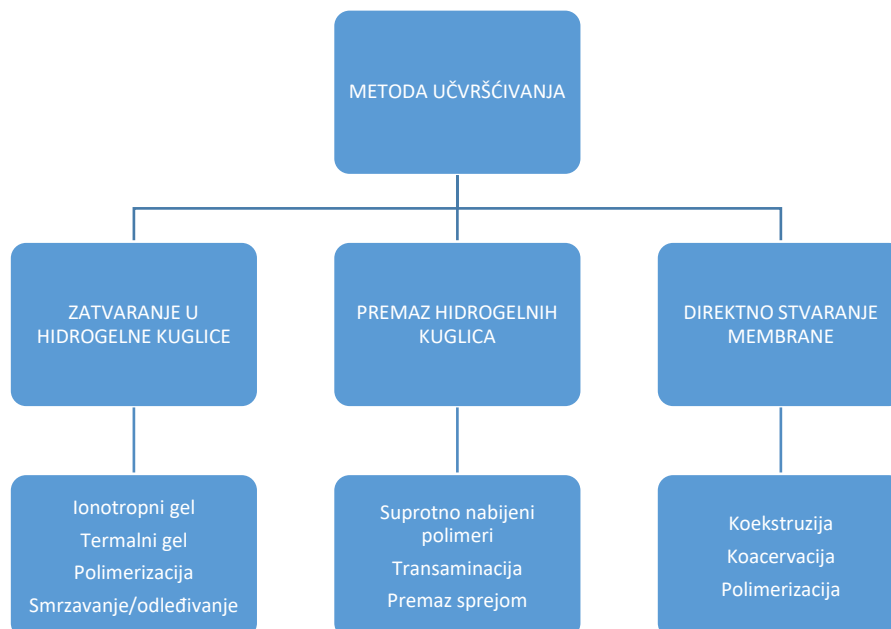
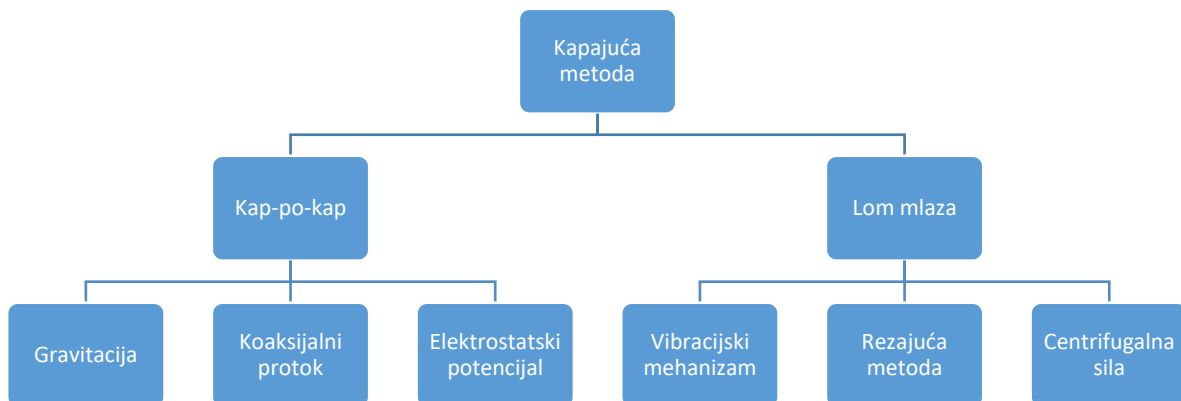
Stummer i suradnici (2012) su ispitivali sušenje fluidiziranog sloja kao metodu dehidracije bakterije *Enterococcus faecium* i zaključili da se tehnologija fluidiziranog sloja može koristiti kao alternativa za dehidraciju probiotičkih bakterija raslojavanjem stanica na kugličnim peletima s različitim zaštitnim sredstava kao što su glukoza, maltodekstrin, obrano mlijeko, trehaloza ili saharoza. Prema opisanom postupku, moguće je kombinirati dva proizvodna koraka: (1) dehidraciju stanica za čuvanje optimalnih svojstava stanica i (2) preradu u prikladnu čvrstu formulaciju s odgovarajućim fizičkim svojstvima (kuglasti peleti poboljšavaju protočnost za punjenje kapsula ili doziranje u različitim formulacijama.)

2.1.3.5 Metoda ekstruzije

Metode mikroinkapsuliranja u mikrosfere uključuje dva osnovna koraka: (1) unutarnja faza koja sadrži probiotičke bakterije raspršene u malim kapljicama, a zatim (2) se te kapljice učvršćuju geliranjem ili formiranjem membrane na njihovoj površini. Kada se tekućina počinje pumpati kroz mlaznicu, prvo izlazi ekstrudirana kao individualna kapljica, dok se povećanjem brzine protoka kapljice prevodi u kontinuirani mlaz koji se zatim lomi na male kapljice. Iz toga slijedi da se ekstruzijske metode mogu podijeliti u dvije grupe, prvu kap-po-kap i drugu u kojoj se mlaz lomi (slika 3) (Chavarri i sur., 2012).

Postoje mnoga istraživanja koja uključuju tehniku ekstruzije za mikroinkapsulaciju probiotičkih bakterija u svrhu njihove zaštite i stabilizacije. Shah i Ravula (2002) su mikroinkapsulirali bakterije iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* u kalcijevom alginatu i kao takve ih koristili u smrznutom fermentiranom desertu na bazi mlijeka. a preživljavanje bakterijskih stanica je poboljšano mikroinkapsuliranjem. Dodatno su drugi znanstvenici prvo mikroinkapsulirali bakteriju, iz roda *Bifidobacterium*, u alginatu, a zatim su dobivene mikrokapsule dodali u smjesu s drugim zaštitnim spojevima (kao što sirutka i želatina) i dobivena je veća otpornost u kiselom mediju u usporedbi sa slobodnih stanica i samo s mikroinkapsuliranim stanicama (Liserre i sur., 2007). Sličan rezultat su dobili Chavarri i

suradnici (2010), koji su koristili kitozan za poboljšavanje stabilnosti alginatnih kapsula s probiotikom. U ovim istraživanjima je tehnikom ekstruzije pokazan učinkovit način poboljšavanja preživljavanja probiotičkih bakterija u simuliranim uvjetima humanog gastrointestinalnog trakta.



Slika 3. Klasifikacija metoda za izradu čvrstih kapi (Chavarri i sur., 2012)

2.1.3.6 Adhezija na granule škroba

Škrob je jedinstven među ugljikohidratima jer se prirodno javlja u granulama. Njihova veličina ovisi o porijeklu škroba, a u rasponu su od 1 do 100 μm . Oni su prilično gusti i netopljivi, dok su hidrolizati škroba tek djelomično topljivi u vodi na sobnoj temperaturi. Zrnata struktura je nepovratno izgubljena kada se granule zagrijavaju u vodi oko 80°C, a toplina i mehanička energija nužni su za potpuno otapanje granula.

Škrob je obično djelomično ili potpuno otopljen prije nego što se koristi u primjeni hrane. Hidrolizati škroba ili kemijski modificirani škrob se koriste kao mikroinkapsulacijski nosači za lipofilne arome (Murúa-Pagola i sur., 2009; Jeon, 2003). Djelomično hidrolizirane i umrežene škrobne granule se predlažu kao prikladni nosači za različite funkcionalne sastojke hrane. Kako bi se škrobne granule hidrolizirale, potrebna je upotreba amilaza, a kukuruzni škrob je najprikladniji za tu svrhu.

2.2 NOSAČI ZA MIKROINKAPSULACIJU

Nosači za mikroinkapsulaciju se mogu koristiti pojedinačno ili u kombinaciji kako bi stvorili monoslojni materijal. Korištenje nosača s dvostrukom membranom može spriječiti njihovo izlaganje kisiku tijekom skladištenja i može povećati otpornost stanica na kisele uvjete i veće koncentracije žučnih soli. Prilikom primjene mikroinkapsulacije u prehrambenoj industriji neophodno je osigurati upotrebu netoksičnih (engl. *food grade*) materijala. U literaturi se navode različiti nosači. Od prirodnih polisaharida, iz biljaka to su škrob i njegovi derivati kao što su amiloza i dekstrin, i pektin pa karagenana i alginat kao morski ekstrakti, životinjski polisaharidi kitozan i gelan te mikrobnii ksantan. Najčešće se koriste alginat ili karagenan zbog njihovog svojstva stvaranja gela tijekom mikroinkapsulacije. Stvaranje gela doprinosi zaštiti sadržaja unutar kapsule, pri čemu alginat, kao i kitozan te pektin tvori gel na temelju ionske izmjene s kalcijevim ionima, dok karagenan, gelan i ksantan tvore gelove promjenom temperature. Uz primjenu polisaharida, kao zaštitno sredstvo mogu se koristiti i različiti proteini, kao što je želatina, protein životinjskog porijekla, koja također tvori temperaturni gel, zatim proteini mlijeka, kao što je kazein te proteini sirutke koji uključuju alfa i beta laktalbumine i imunoglobuline. Oni se koriste budući da su biorazgradivi, a mogu se primijeniti

u različitim prehrambenim proizvodima. Uz to, još se koristi gluten, protein iz žitarica (Chavarri i sur., 2012).

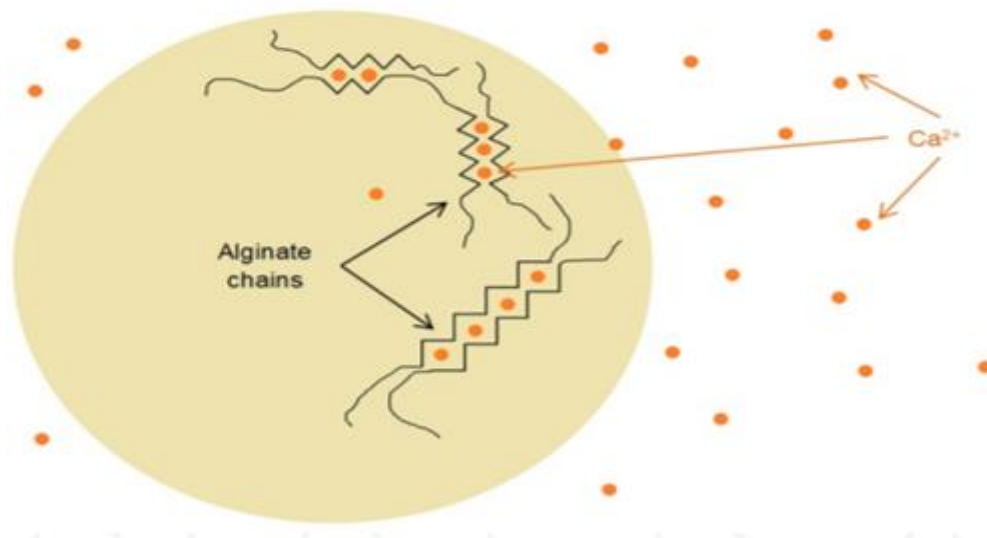
2.2.1 Alginat

Najčešće korišten biopolimer za mikroinkapsulaciju je alginat. Alginat je prirodan polisaharid koji se nalazi u morskim algama, ali se pojavljuje i kao polisaharid u obliku kapsule u nekim bakterijama (Gudmund, 2006). Budući da je prirodni polimer, alginatne kiseline čine skupinu linearnih binarnih kopolimera koje su 1-4 glikozidnom vezom vezane na α -L-guluronsku kiselinu (G) i njezin C-5 epimer β -D manuronske kiseline (M), a alginati su soli (ili esteri) ovih polisaharida. Sastoji se od nekoliko građevnih blokova (100-3000 jedinica) koji su međusobno povezani u krutom i djelomično fleksibilnom lancu. Relativne količine dviju uronskih jedinica i njihov sekvencijalni raspored duž polimernog lanca mogu značajno varirati, ovisno o podrijetlu alginata: mogu se naći tri vrste blokova: homopolimerni M-blokovi (MM), homopolimerni G-blokovi (GG) i heteropolimerni sekvencijski izmjenični MG-blokovi (MG). Ovaj sastav i način strukture osiguravaju alginatu funkcionalna svojstva za ugradnju u mikroinkapsulacijski matriks (Chavarri i sur., 2012).

Inkapsulacija probiotičkih bakterija u alginatu moguća je zbog njegove netoksičnosti i brzog postupka umrežavanja. Otapanje alginata u vodi daje viskoznu otopinu čija se viskoznost povećava duljinom makromolekula (broj monomernih jedinica), a na njegovu topljivost utječu pH (pri pH <3 se taloži kao alginska kiselina), prisutnost iona suprotnog naboja (alginat se taloži umrežavanjem, geliranjem, s dvovalentnim ionima kao što su Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , itd.) i sekvencijalnim rasporedom monomera (fleksibilnost alginatnih lanaca u otopini raste u poretku MG <MM <GG). Geliranje nastaje kada kation poput Ca^{2+} sudjeluje u međusobnom vezanju između G-blokova što dovodi do trodimenzionalne mreže (slika 4) (Chavarri i sur., 2012).

Prednost alginata je u tome što lako formira kapsulu oko bakterijskih stanica, siguran je za ljudski organizam, jeftin je, ne zahtijeva ekstremne uvjete proizvodnje te se može dobro otopiti u debelom crijevu i otpustiti zatvorene stanice. Nedostatak alginata je taj što su alginatne mikro kapsule osjetljive na kiseli okoliš te što zbog poroznosti ne mogu zaštititi stanice od okoline (Mortazavian i sur., 2008; Gouin, 2004). Ipak, ti nedostaci se mogu nadoknaditi miješanjem alginata s drugim polimernim spojevima, premazivanjem kapsula drugim spojem ili strukturnom modifikacijom alginata korištenjem različitih aditiva (Krasaekoopt i sur., 2003).

Primjer miješanje alginata s drugim polimera je korištenje u kombinaciji s kitozanom. Kitozan ima vrlo dobru sposobnost formiranja filma te se koristi kao vanjska ovojnica u kapsulama dobivenim anionskim polimerima poput alginata.



Slika 4. Prikaz formiranja alginatne mikrokapsule u trenutku kada Ca^{2+} ion difundira u sustav (Chavarri i sur., 2012)

2.2.2 Karagenan

Karagenan pripada porodici polisaharida sa sulfatima visoke molekulske mase, a dobiva se iz različitih vrsta morskih crvenih algi. Najčešće se koristi κ -karagenan, uz koji još postoje λ - i τ -karagenana. Ovaj polimer se uglavnom koristi kao sredstvo za geliranje, za poboljšavanje teksture ili kao stabilizator hrane te za farmaceutske i kozmetičke pripravke. Njegova primarna struktura temelji se na izmjeničnoj disaharidnoj ponavljajućoj jedinici α -(1,3)-galaktoze 4-sulfata i η -(1,4)-3,6-anhidro- δ -galaktoze.

κ -karagenan zahtijeva visoku temperaturu (60-90°C) za otapanje, posebno kada se primjenjuje pri visokim koncentracijama (2-5%). Međutim, kada se koristi za mikroinkapsuliranje probiotika, stanice se dodaju u otopinu polimera pri temperaturi od 40 do 50°C. Karagenan tvori termoreverzibilne gelove koji se hlade u prisutnosti K^+ iona kao stabilizatora. Geliranje s dvovalentnim kationima, kao što su Ca^{2+} ili Cu^{2+} je također moguće, ali ne tako često, a toplinsko geliranje je najčešća metoda (Mangione i sur., 2005; Mangione i sur., 2003).

κ -karagenanske kuglice za probiotičku mikroinkapsulaciju se mogu proizvesti koristeći nekoliko tehnologija kao što su ekstruzija i tehnika stvaranje emulzije. Mikroinkapsuliranje probiotičkih stanica u κ -karagenanskim zrcima omogućava poboljšanje njihovog preživljavanja, ali proizvedene mikrokapsule su krhke i ne mogu podnijeti naprezanja (Chen i Chen, 2007).

2.2.3 Kitozan

Kitozan je deacetilirani derivat hitina, koji je prisutan u školjkama, gljivama, insektima i mekušcima. Ovaj polimer je linearni polisaharid, koji se može smatrati koopolimerom, a sastoji se od nasumično raspodijeljenog β -(1,4) vezanog D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina. Funkcionalna svojstva kitozana su određena molekulskom masom, ali i stupnjem acetilacije (DA), koji predstavlja udio jedinica N-acetil D-glukozamina s obzirom na ukupan broj jedinica (Chatelet i sur., 2001). Kitozan je topiv u kiselom do neutralnom mediju, ali topljivost i viskoznost otopine ovisi o dužini lanaca i DA.

Budući da je kitozan pozitivno nabijen polimer, on tvori ionske hidrogelove dodavanjem aniona i također interakcijom s negativno nabijenim polimerima kao alginatom ili ksantanom (Chávarri i sur., 2010). Moguće je dobiti hidrogel taloženjem u osnovnom mediju ili kemijskim umrežavanjem s glutaraldehidom. Kitozan je biorazgradiv i biokompatibilan. Ima antibakterijsko djelovanje, što se mora uzeti u obzir kada se koristi za mikroinkapsuliranje probiotičkih bakterija. Zbog mogućnosti negativnog utjecaja na preživljavanje bakterija, a zbog toga što ima vrlo dobru sposobnost formiranja filma, kitozan se koristi kao vanjska ovojnica u kapsulama načinjenim anionskim polimerima poput alginata. Ovakva primjena kitozana može poboljšati preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom skladištenja i tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt što je čini dobrim načinom dostave živih bakterijskih stanica u debelo crijevo (Chávarri i sur., 2010; Capela, 2006).

2.2.4 Proteini mlijeka

Proteini mlijeka mogu u odgovarajućim uvjetima tvoriti gelove. Proteini su lanci molekula aminokiselina povezani peptidnim vezama, a mogući su različiti tipovi proteina zbog velikog broja aminokiselina (22 jedinica) i različite mogućnosti sekvenci. Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, proteini mlijeka su vrlo zanimljivi za mikroinkapsulaciju. Postoje dvije glavne kategorije proteina mlijeka koje se dijele prema kemijskom sastavu i fizikalnim svojstvima, a to su kazein i proteini sirutke. Kazein je bogati prolinom, strukturno

otvoreni reomorfični proteini koji imaju različite hidrofobne i hidrofilne dijelove, a 95% kazeina se prirodno formira u kazeinske micelle. Proteini sirutke prvenstveno uključuju α -laktoalbumin, β laktoglobulin, imunoglobuline i serumski albumin, ali i brojne manje proteine, no proteini sirutke su globularni.

Proteini mlijeka su prirodna sredstva za stanice probiotika te se zbog strukturnih i fizikalno-kemijskih svojstava mogu se koristiti za transport probiotika (Livney, 2010).

2.2.5 Škrob

Škrob je polisaharid sastavljen od α -D-glukoznih jedinica vezanih glikozidnim vezama, koje proizvode sve zelene biljke. Sastoji se od dva polisaharida, amiloze i amilopektina. Amiloza je linearni i spiralni lanac glukoznog polimera, dok je amilopektin vrlo razgranati lanac. Sadržaj svake frakcije ovisi o porijeklu škroba, ali općenito sadrži oko 20-30% amiloze i 70-80% amilopektina.

Kao što je opisano u poglavlju 2.1.3.6., probiotičke bakterije se mogu mikroinkapsulirati adhezijom na škrobne granule, no škrob je obično kemijski ili fizički modificiran za različite primjene, čak se i za kapsuliranje koriste maltodekstrini ili ciklodekstrini, obično u kombinaciji s tehnologijom sušenja raspršivanjem. Škrobna granula je idealna površina za pridržavanje probiotičkih stanica, a rezistentni škrob (škrob koji nije razgrađen enzimima gušterače u tankom crijevu) može doći do debelog crijeva u kojem se fermentira (Kritchevsky, 1995). Stoga, rezistentni škrob osigurava dobru enteričke dostavu i bolje oslobađanje bakterijskih stanica u debelom crijevu. Štoviše, rezistentni škrob može djelovati kao prebiotik probiotičkim bakterijama u debelom crijevu (Haralampu, 2000; Thompson, 2000).

2.2.6 Usporedba različitih nosača za mikroinkapsulaciju

Kao što je već rečeno, kako bi se ispunili mnogi zahtjevi uspješnog mikroinkapsuliranja probiotika, primijenjene su različite tehnike za povećanje otpornosti ovih mikroorganizama uključivanje nekih polimera u hrani u matricu alginata. Zbog toga postoji veliki broj istraživanja koja ispituju utjecaj različitih nosača za mikrokapsulaciju na preživljavanje probiotika u *in vitro* modelima koji simuliraju prolaz kroz gastrointestinalni trakt, što je prikazano u tablicama 1-3.

Tablica 1. Učinkak mikroinkapsulacije, s nosačima koji se baziraju na proteinima mlijeka, na preživljavanje probiotika u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (Bakr Shori, 2017)

Probiotik	Vrsta inkapsulacijskog materijala	Preživljavanje probiotika [logCFU g ⁻¹]	Vrijeme inkubacije [min]	Referenca
<i>L. lactis</i>	Mliječni matriks sa sirutkom	2,8 ↑	90	Heidebach i sur. (2009a)
<i>L. paracasei</i>	Natrij kazein geliran s transglutaminazom	0,8↑	90	Heidebach i sur. (2009a)
<i>L. paracasei</i>	Natrij kazein geliran s transglutaminazom	2↑	90	Heidebach i sur. (2009b)
<i>B. lactis</i>	Natrij kazein geliran s transglutaminazom	0,6↑	90	Heidebach i sur. (2009b)
<i>L. casei</i>	Natrij-kazein i gelan guma gelirana sa glukano-δ-laktonom	3↑	120	Nag i sur. (2011)
<i>L. bulgaricus</i>	Alginat-mlijeko	~10 ¹⁰ *	120	Shi i sur. (2013a)
<i>L. rhamnosus</i>	Micelarni kazein i denaturirani proteini sirtuke	~10 ¹¹ *	120	Burgain i sur. (2013)

B. lactis = *Bifidobacterium lactis*; *L. bulgaricus* = *Lactobacillus bulgaricus*; *L. paracasei* = *Lactobacillus paracasei*; *L. casei* = *Lactobacillus casei*; *L. rhamnosus* = *Lactobacillus rhamnosus*; ↑ = više nego početni broj stanica * isti broj kao početni broj, CFU = jedinica za broj kolonija

Tablica 2. Učinkak mikroinkapsulacije, s nosačima koji se baziraju na alginatu, na preživljavanje probiotika u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (Bakr Shori, 2017)

Probiotik	Vrsta inkapsulacijskog materijala	Postotak preživljavanja [%]	Vrijeme inkubacije [min]	Referenca
<i>L. acidophilus</i> CGMCC1.2686	Alginat- CaCO ₃	22	120	Cai i sur. (2014)
<i>L. acidophilus</i> CGMCC1.2686	Alginat- Ca- etilendiamintetraacetat	7,1	120	Cai i sur. (2014)
<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103	Ca- alginat	43	180	Guimarães i sur. (2013)
<i>B. animalis</i> DN-173 010	Ca- alginat	72	180	Guimarães i sur. (2013)
<i>B. longum</i> BIOMA 5920	Alginat i kolagen koji je sličan ljudskom	51	120	Su i sur. (2011)
<i>B. adolescentis</i> 15703T	Želirane mikrosfere s alginatom	~30	120	Annan i sur. (2008)

B. adolescentis = *Bifidobacterium adolescentis*; *B. animalis* = *Bifidobacterium animalis*; *B. longum* = *Bifidobacterium longum*; *L. acidophilus* = *Lactobacillus acidophilus*; *L. rhamnosus* = *Lactobacillus rhamnosus*

Tablica 3. Učinkak mikroinkapsulacije, s nosačima koji se baziraju na kitozanu, na preživljavanje probiotika u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (Bakr Shori, 2017)

Probiotik	Vrsta inkapsulacijskog materijala	Preživljavanje probiotika [logCFU g ⁻¹]	Vrijeme inkubacije	Referenca
<i>E. faecium</i> MC13	Alginat-kitozan	Nil	144h	Kanmani i sur. (2011)
<i>L. gasseri</i>	Alginat-kitozan	7	120 min	Chavarri i sur. (2010)
<i>B. bifidum</i>	Alginat-kitozan			
<i>L. casei</i>	Alginat-kitozan	7,38	120 min	Li i sur. (2011)
<i>L. casei</i>	Alginat-kitozan- karboksimetil kitozan	7,91	120 min	Li i sur. (2011)
<i>B. Breve</i>	Alginat-kitozan i fluid bed sušenje	6,6	60 min	Cook i sur. (2011)
<i>B. Breve</i>	Poli-D,L-laktična-ko-glikolna kiselina sa dodanim probioticima, galaktosaharidi inkomponirani u alginat-kitozan matriks	>4	60 min	Cook i sur. (2014)
<i>S. bouladrii</i>	Kitozan/dekstran sulfat	7,19log CFU/100 mg	120 min	Thomas i sur. (2014)

E. faecium MC13 = *Enterococcus faecium* MC13, *B. bifidum* = *Bifidobacterium bifidum*; *B. breve* = *Bifidobacterium breve*; *L. casei* = *Lactobacillus casei*; *L. gasseri* = *Lactobacillus gasseri*. *S. bouladrii* = *Saccaromyces bouladrii*

Mikroinkapsuliranje probiotika u biokompatibilnim višeslojnim nosačima pomoću tehnike sloj-po-sloj vrlo je djelotvorno za poboljšanje zaštite i održivosti probiotika u gastrointestinalnom traktu. Oblaganje alginatnih mikrokapsula je znatno poboljšalo stabilnost tih kapsula u jako kiselom mediju. Ugrađivanje proteina sirutke i micelnog kazeina s alginatom imalo je značajan učinak na povećanje preživljavanje probiotika tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt zbog izrazitog puferskog kapaciteta. Osim toga, upotreba enzima kao što je transglutaminaza kao agense za geliranje tijekom inkubacije probiotika u mliječnim matricama pruža mnoge obećavajuće mogućnosti za povećanje zaštite probiotika u kiselim uvjetima.

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu korištena su dva soja bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus*, prikazana u tablici 4. Navedeni sojevi su izolirani iz dimljenog sira, te identificirani i selekcionirani u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

Tablica 4. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus brevis</i>	D6	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus fermentum</i>	D12	MRS, 37°C, anaerobno

3.1.2 Hranjive podloge

Za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline u ovom radu su korištene slijedeće podloge:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašičev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO₄x7H₂O 0,1; MnSO₄x7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

3.1.3 Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- agar, „Merck“, Njemačka
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma“, SAD
- alginat, „Fluka“, Švicarska
- amonij-perokosodisulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- biljno ulje, Zvijezda, Hrvatska
- Dcode dye solution „BioRad“, SAD
- EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix - (2x Premix) „Takara“, Japan
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mainheim
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- formamid „BioRad“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- inulin, „Difco“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- kalcijev klorid, „Fluka“, Švicarska
- kazein, „Sigma“, SAD
- k-karagenan, „Sigma“, SAD
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- kvašćev ekstrakt, „Difco“, SAD
- laktoza, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija
- manganov sulfat, „Merck“, Njemačka
- mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev citrat, „T.T.T.“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- „nuclease free“ voda, „Takara“, Japan
- obrano mlijeko, „Fluka“, Švicarska

- pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- pepton, „Biolife“, Malazija
- početnice „Invitrogen“, SAD
- Ringerova otopina, „Merck“, Njemačka
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- saharoza, Kemika“, Hrvatska
- sorbitol, Kemika“, Hrvatska
- TAE „BioRad“, SAD
- TEMED (N, N, N', N`-tetrametiletilen), „Sigma“, SAD
- transglutaminaza ACTIVA® YG (100 U/g), „Ajinomoto“, Njemačka
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- Tween 80, „Sigma“, SAD,
- urea „BioRad“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

3.1.4 Aparatura i pribor

- DGGE sustav, „BioRad“, SAD
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- bag mixer, „Interscience“, Francuska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- DNA-termoblok, Mastercyclerpersonal, „Eppendorf“
- elektroforetska kadica, „BioRad“, SAD
- ependorfice
- epruvete
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- magnetska mješalica, „IKA-Werke GmbH & Co“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta
- „power supply“, „BioRad“, SAD
- stalci za ependorfice

- stalci za epruvete
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNT“, Njemačka
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- vaga, „Sartorius“, Njemačka
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2 METODE RADA

3.2.1 Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi bakterija mliječne kiseline se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta odnosno pri 37°C.

3.2.2 Izolacija kromosomke DNA

Volumen od 1,5 mL prekonoćnih kultura bakterija mliječne kiseline centrifugira se 10 min pri 9000 o min⁻¹ i resuspendira u 1 mL GTE pufera (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500 µL otopine GTE pufera, lizozima (8 mg/500 µl) i RNA-ze (50 µlml⁻¹), i inkubiraju 30 minuta pri 37°C. Zatim se doda 250 µL SDS-a (2%) i vorteksira 1 min. Nakon toga se doda 100 µL neutralnog fenol-kloroforma, vorteksira 30 sekundi i centrifugira pri 13 000 o min⁻¹ tijekom 5 minuta. Supernatant, bez interfaze, se pomiješa s 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8) i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) slijedi centrifugiranje na 13 000 o min⁻¹ tijekom 10 minuta. Talog se resuspendira u 300 µL otopine 0,3 M NaAc i 10 mM MgCl₂ te vorteksira. Nakon dodatka 700 µL apsolutnog etanola (ohlađenog na -20°C), uzorak se inkubira preko noći pri -20°C. Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 14000 o min⁻¹ tijekom 20 minuta. Talog se suspendira u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na -20°C) i ponovno centrifugira pri 13 000 o min⁻¹ tijekom 5 minuta. Talog DNA se resuspendira u 25 µL TE (10mM Tris (pH 7,8) i 1mM EDTA) pufera, a koncentracija DNA se izmjeri pomoću BioSpec Nano uređaja. Koncentracija DNA za

uzorak *Lactobacillus brevis* D6 je iznosila 461, 28 ng μl^{-1} , a za *Lactobacillus fermentum* D12 460,96 ng μl^{-1} .

3.2.3 Nasumična amplifikacija polimorfne DNA (eng. Random Amplified Polymorphic - DNA Polymerase chain reaction (RAPD-PCR))

DNA izolirana iz sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 koristila se kao kalup za RAPD-PCR reakciju koja je provedena u DNA-termobloku, Mastercyclerpersonal, "Eppendorf" (Leboš Pavunc i sur., 2010). Reakcijska smjesa se sastojala od DNA, početnice M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3') (Martín-Platero i sur., 2009), pufera bez MgCl_2 (Biosystems, SAD), MgCl_2 (Biosystems, SAD), Dntp (Invitrogen, SAD) i Taq polimeraze (Biosystems, SAD). Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica, korišten je uzorak bez DNA. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD), a reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u tablici 5, nakon čega su dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 150 V tijekom 1 sata. Gel je obojan u etidijevom bromidu, koncentracije 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 5. Uvjeti provođenja RAPD reakcije s M13 početnicom

Broj ponavljanja	T [°C]	Vrijeme	Korak
1	94	1 min	Inicijalna denaturacija
35	94	1 min	denaturacija
	40	20 s	sparivanje
	72	80 s	polimerizacija
1	72	5 min	završna elongacija

3.2.4 Elektroforeza u denaturirajućem gradijentu - DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Izolacija kromosomske DNA iz odabranih izolata provedena je prema prethodno opisanoj metodi (3.2.2.) nakon čega je provedena PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) reakcija za DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) s univerzalnim bakterijskim početnicama HDA1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') i HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') u uvjetima prikazanim u tablici 6. U reakcijskoj smjesi se uz DNA i početnice nalazio EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix - (2x Premix) i voda. Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica korišten je uzorak bez DNA. Standard se sastojao od λ DNA HindIII i 100 bp DNA Ladder. Dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 200 V. Gel je obojan u etidijevom bromidu i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 6. Uvjeti provođenja PCR reakcije s univerzalnim HDA1 i HDA2 početnicama za DGGE

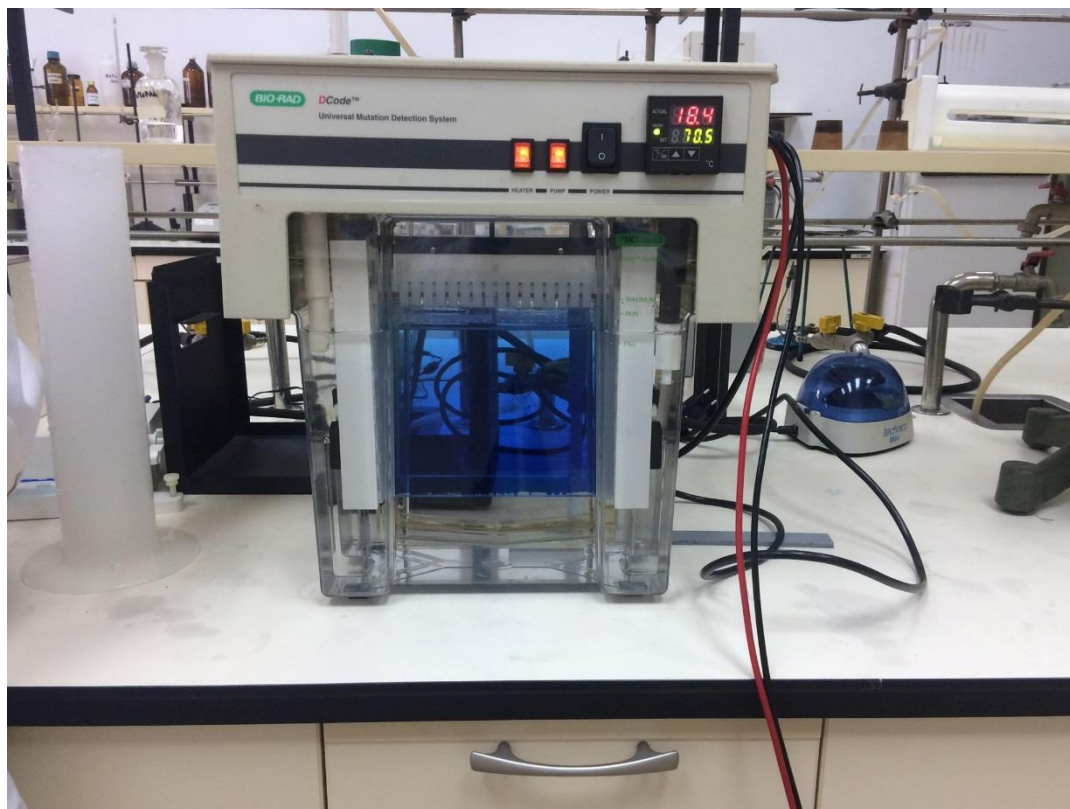
Broj ponavljanja	T (°C)	Vrijeme	Korak
1	95	3 min	inicijalna denaturacija
35	95	30 s	denaturacija
	58	30 s	sparivanje
	72	40 s	polimerizacija
1	72	5 min	završna elongacija

Nakon utvrđivanja prisutnosti PCR produkata provedena je DGGE elektroforeza na poliakrilamidnom gelu gradijenta denaturirajućeg agensa 30-70% koji je pripremljen miješanjem reagensa prema proračunu za različite gradijente kako je prikazano u tablici 7.

Neposredno prije nanošenja gela u suspenziju je dodano 130 μL 0,1 g mL^{-1} APS-a i 5,8 μL TEMED-a. U suspenziju gela višeg postotka dodana je plava boja Dcode dye solution (300 μL) kako bi se te dvije suspenzije razlikovale. Kao uzorci su korišteni PCR produkti svakog soja, a kao standard korišteni su združeni sojevi *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* i *Lactococcus lactis*. Nanošenje uzoraka je započelo pri 58°C, a sama elektroforeza je započela pri 60°C. DGGE elektroforeza se prvih 10 minuta provodila pri 30 V kako bi se uzorci spustili na dno jažica, a nakon toga 1 sat pri 220 V (slika 5). Nakon završene elektroforeze gel je obojan u etidijevom bromida koncentracije 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 7. Prikaz proračuna reagenasa potrebnih za dobivanje gela različitog gradijenta

PRIPREMA GELA ZA DGGE (volumena 34 mL)				
REAGENS	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	100 %	0 %
Urea		7 M	7,14 g	/
Formamid		40 %	6,8 mL	/
TAE	50x	1x	340 μL	34 μL
Akriamid/bisakrilamid	40 %	8 %	3,4 mL	3,4 mL
Voda			Nadopuniti do ukupnog volumena	
UKUPNI VOLUMEN			17 mL	17 mL



Slika 5. Prikaz aparature za DGGE elektroforezu

3.2.5 Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u alginatu

Prekonoćne kulture sojeva *L. brevis* D6 i *L. fermentum* D12 uzgojene su propagacijom u 300 ml MRS bujona pri 37°C. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o min⁻¹ (4°C), a zatim su isprane dva puta s 10 ml fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom, resuspendiran u istom volumenu 2%-tnog (v/w) natrijevog alginata. Smjesa bakterijskih stanica i alginata je postepeno dodana u 1%-tnu otopine kalcijevog klorida uz miješanje na magnetnoj miješalici, prilikom čega je došlo do formiranja mikrokapsula. Kuglice su ostavljene 1 sat na magnetnoj miješalici da očvrstu, zatim su isprane dva puta fiziološkom otopinom nakon čega je uslijedilo određivanje broja mikroinkapsuliranih stanica oslobađanjem iz mikrokapsula pomoću 2%-tnog (v/w) natrijevog citrata (prilagođeno prema Li i sur., 2009). Broj stanica je određen indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica.

3.2.6 Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u κ -karagenanu

Prekonoćne kulture sojeva *L. brevis* D6 i *L. fermentum* D12 uzgojene su propagacijom u 300 ml MRS bujona pri 37°C. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o min⁻¹ (4°C), a zatim su ispirane dva puta s 10 ml fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom, resuspendiran u istom volumenu 2%-tne (v/w) otopine κ -karagenana. Smjesa bakterijskih stanica i κ -karagenana je postepeno dodana u 1%-tnu otopine kalcijevog klorida uz miješanje na magnetnoj miješalici. Talog je ispran dva puta fiziološkom otopinom te je određen broj stanica indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (10 μ L) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica.

3.2.7 Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u kazeinu djelovanjem transglutaminaze

Prekonoćne kulture sojeva *L. brevis* D6 i *L. fermentum* D12 uzgojene su propagacijom u 300 ml MRS bujona pri 37°C. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o min⁻¹ (4°C), a zatim su ispirane dva puta s 10 ml fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom, resuspendiran u 15%-tnoj otopini kazeina (2 grama taloga/28 grama kazeina), a nakon toga je dodan enzim transglutaminaza (10 U transglutaminaze/g kazeina). Nakon dodatka transglutaminaze, smjesa stanica i kazeina je dodana u 150 ml temperiranog (40°C) biljnog ulja te je provedeno miješanje na magnetnoj miješalici uz grijanje (40°C) pri 900 g min⁻¹ tijekom 2 sata. Nastala suspenzija je odvojena od uljne faze centrifugiranjem pri 500 g min⁻¹ tijekom 1 minute. Dobivene mikrokapsule su resuspendirane u Ringerovoj otopini. Broj mikroinkapsuliranih stanica određen je indirektnom metodom resuspendiranjem u fiziološkoj otopini i razbijanjem u Bag-mixeru.

3.2.8 Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica uz dodatak različitih lioprotektora

S ciljem odabira najboljeg lioprotektora za postizanje što većeg broja preživjelih stanica tijekom liofilizacije mikroinkapsuliranih stanica, korišteni su različiti lioprotektori. Mikroinkapsulirane stanice su dodane u obrano mlijeko (10% w/v), inulin (10% w/v), saharozu (10% w/v), laktozu (10% w/v) i sorbitol (10% w/v), pojedinačno. Uzorci su zamrznuti na -80°C tijekom 2 sata, nakon čega je proveden proces liofilizacije u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“. Broj živih stanica je određen prije i poslije liofilizacije indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja u Petrijevim zdjelicama s MRS hranjivom podlogom.

3.2.9 Preživljavanje mikroinkapsuliranih i liofiliziranih sojeva bakterija mliječne kiseline tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta

3.2.9.1 Priprava simuliranoga želučanog soka i simuliranoga soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok je pripremljen suspendiranjem pepsina (3 g L^{-1}) u 0,5% otopini natrijevog klorida, kojoj je pH vrijednost podešena na 2,0 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom. Simulirani sok tankoga crijeva je pripremljen suspendiranjem pankreatina (1 g L^{-1}) i žučnih soli ($3,0\text{ mg mL}^{-1}$ goveđe žuči) u 0,5% otopini natrijeva klorida, kojoj je pH vrijednost podešena na 8,0 s natrijevom lužinom (Kos, 2001).

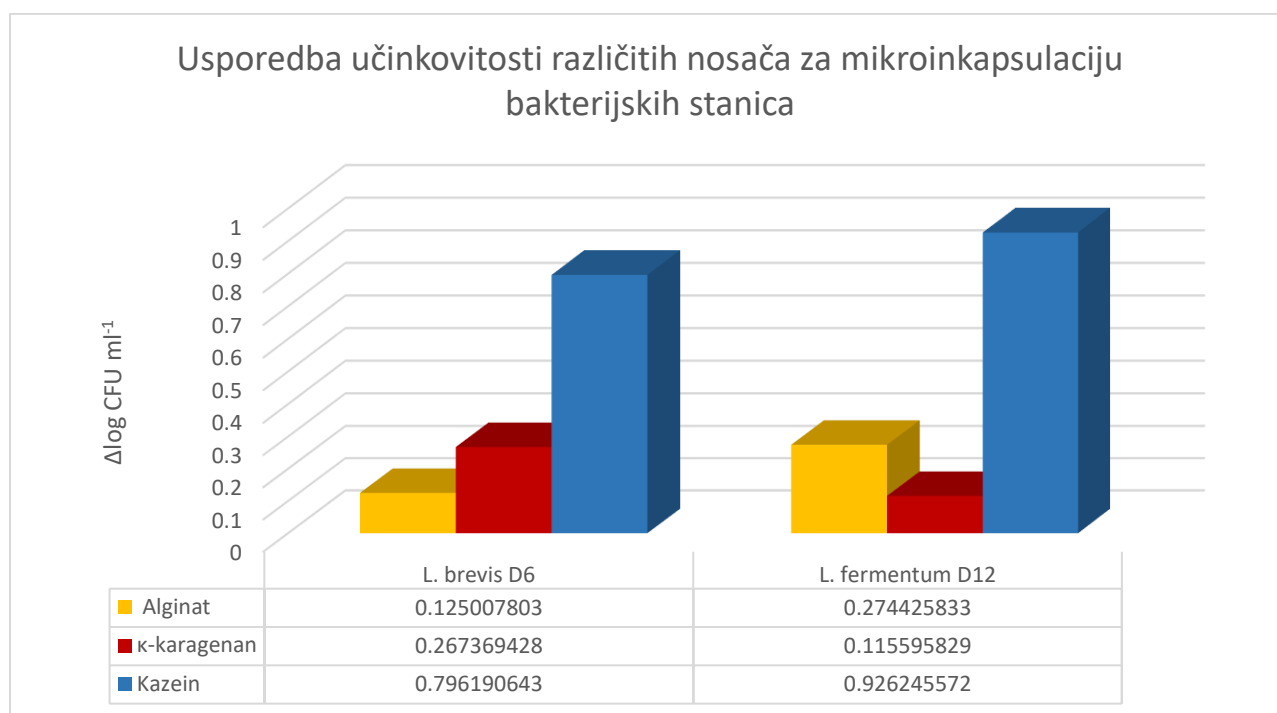
3.2.9.2 Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankoga crijeva na preživljavanje

Liofilizirane mikroinkapsulirane stanice bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12, su izložene djelovanju želučanog soka (pH=2) tijekom 2 sata, a zatim su centrifugirane pri 3500 o min^{-1} i resuspendirane u simuliranom soku tankoga crijeva (3 mg mL^{-1} goveđe žuči) tijekom 3 sata (Kos, 2001). Broj preživjelih stanica određen je indirektnom metodom.

4 REZULTATI I RASPRAVA

4.1 MIKROINKAPSULACIJA I LIOFILIZACIJA ODABRANIH SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

U ovom radu ispitivano je preživljavanje sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 procesom mikroinkapsulacije u različitim nosačima (slika 6). Kao nosači su korišteni alginat, κ -karagenan i kazein s djelovanjem enzima transglutaminaze. Alginat je prirodni polimer koji se uspješno primjenjuje kao nosač za mikroinkapsulaciju probiotičkih bakterija (Bakr Shori, 2017; Allan-Wojtas i sur., 2008). κ -karagenan je biopolimer koji se koristi za inkapsulaciju probiotika zbog dobre sposobnosti stvaranja gelova (Bakr Shori, 2017), dok je kazein također biopolimer koji pokazuje dobra svojstva za inkapsuliranje u mliječnim proizvodima (Picot i Lacroix, 2004).

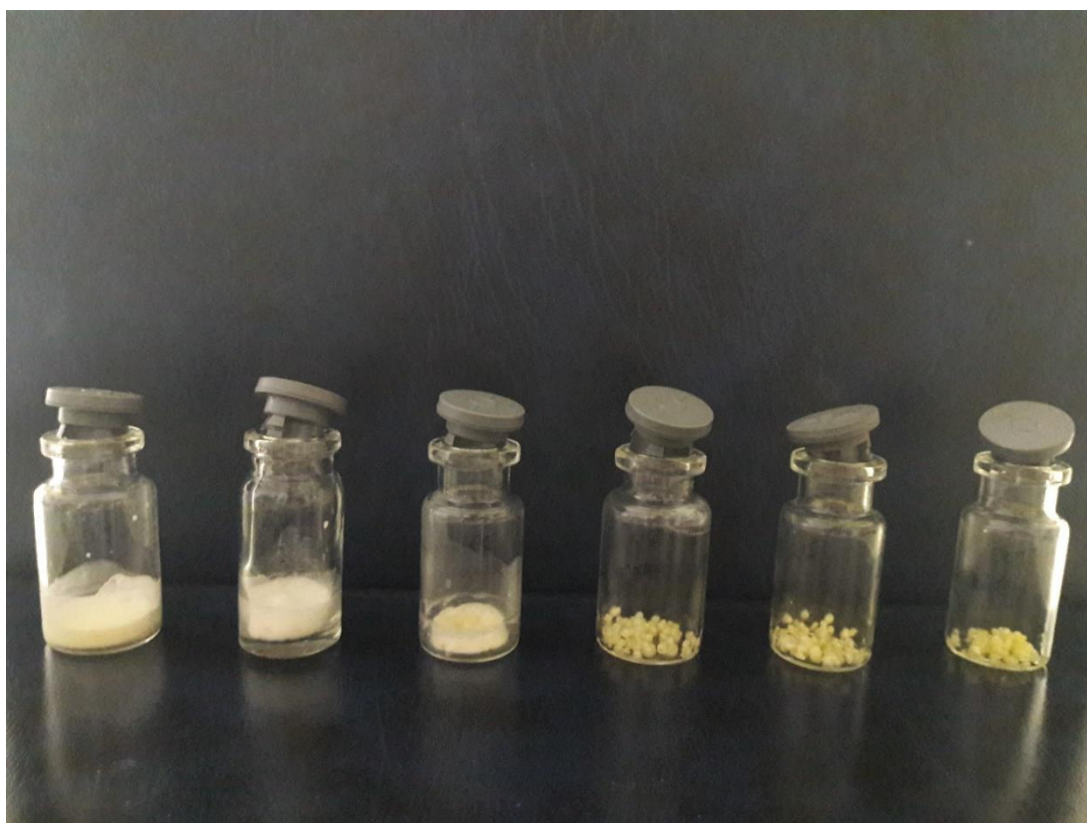


Slika 6. Usporedba učinkovitosti mikroinkapsulacije stanica odabranih sojeva BMK *L. brevis* D6 i *L. fermentum* D12, u različitim nosačima: alginatu, κ -karagenanu i kazeinu djelovanjem transglutaminaze izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta\log$ CFU ml⁻¹) prije i nakon postupka mikroinkapsulacije

Usporedba dobivenih rezultata za učinkovitost mikroinkapsulacije u različitim nosačima (slika 6) pokazuje kako je alginat najučinkovitiji nosač za bakterijski soj *Lactobacillus brevis* D6, dok je κ -karagenen najučinkovitiji nosač za bakterijski soj *Lactobacillus fermentum* D12. Smrtnost stanica ($\Delta \log$ CFU ml⁻¹) za soj *Lactobacillus brevis* D6, u slučaju kada je kao nosač korišten alginat iznosi 0,125, a za *Lactobacillus fermentum* (D12) 0,116 kada je kao nosač korišten κ -karagenan. No, alginat je pokazao i dobru učinkovitost za *Lactobacillus fermentum* D6 (smrtnost stanica iznosi 0,274 log jedinica), a κ -karagenan je pokazao dobru učinkovitost za *Lactobacillus brevis* D12 (smrtnost stanica iznosi 0,267 log jedinica). Nasuprot alginatu i κ -karagenanu kao učinkovitim nosačima, korištenjem kazeina uz djelovanje enzima transglutaminaze kao nosača su dobivene najveće vrijednosti za smrtnost stanica koja je iznosila 0,796 log jedinica za *Lactobacillus brevis* D6 i 0,926 log jedinica za *Lactobacillus fermentum* D12, čime se kazein uz djelovanje enzima transglutaminaze pokazao kao najmanje učinkovit nosač.

Iako Ca-alginatni nosač ne pokazuje toksičnost prema stanicama, poznato je da je kemijski nestabilan u prisutnosti kalcijevih kelatora kao što su fosfat, laktat ili citrat te uz katione kao što su Na⁺ i Mg²⁺, koji mogu zamijeniti kalcij. Uklanjanje fosfata iz MRS podloge ili dodavanje kalcijevog kationa u nosač je pokazalo da mu se poboljšava stabilnost. Međutim, promjena u sastavu medija rasta može utjecati na parametre rasta stanica. Kemijska stabilnost alginatnih nosača može se pojačati korištenjem barijevog kationa kao sredstva za geliranje. Međutim, barij može inducirati toksičnosti stanica (Wideroe i Danielsen, 2001). Alginat kao nosač se također može obložiti polikationima, kao što su kitozan i poli-L-lizin, kako bi mu se poboljšala stabilnost. U usporedbi s alginatom, Ca-pektinatni gel pokazuje manju osjetljivost na kemijske agense (Voo i sur., 2011). U istraživanju Voo i suradnika (2011) ocijenjena je stabilnost pektina i alginat/pektinata kao nosača za proizvodnju probiotičkih stanica. Ustanovljeno je da su kapsule temeljene na pektinu stabilnije od alginatnih kuglica, a njihova je stabilnost dodatno poboljšana oblaganjem s kitozonom. Koncentracija stanica u kapsulama na bazi pektina bila je uspoređena s alginatnim kuglicama. Kapsule bazirane na pektinu dale su znatno nižu koncentraciju stanica u mediju za početnih fermentacijskih ciklusa u usporedbi s alginatnim kapsulama. U provedenom istraživanju zaključno je da je pektin dobar potencijalni materijal za inkapsuliranje probiotičkih stanica zbog svoje stabilnosti i povoljnog okruženja za rast stanica.

Na temelju rezultata nakon provedene mikroinkapsulacije bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 u tri različita nosača (alginat, κ -karagenan i kazein) odlučeno je da će se daljnje istraživanje provoditi na stanicama mikroinapsuliranim u alginatu jer iako su i alginat i κ -karagenan pokazali zadovoljavajuće rezultate, ipak je odabran alginat kao najčešće korišten nosač u industrijskoj primjeni. Daljnji korak je bio istraživanje preživljavanja mikroinkapsuliranih stanica u alginatu tijekom procesa liofilizacije, uz dodatak različitih lioprotektora, u svrhu određivanja najboljeg lioprotektora (slika 7).

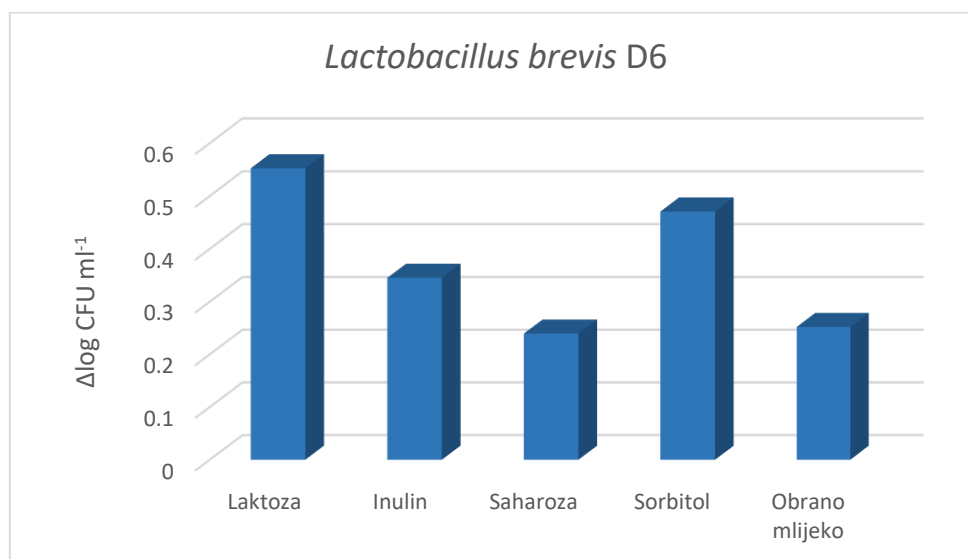


Slika 7. Prikaz bakterijskog soja *Lactobacillus brevis* D6 nakon provedene liofilizacije s različitim lioprotektorima

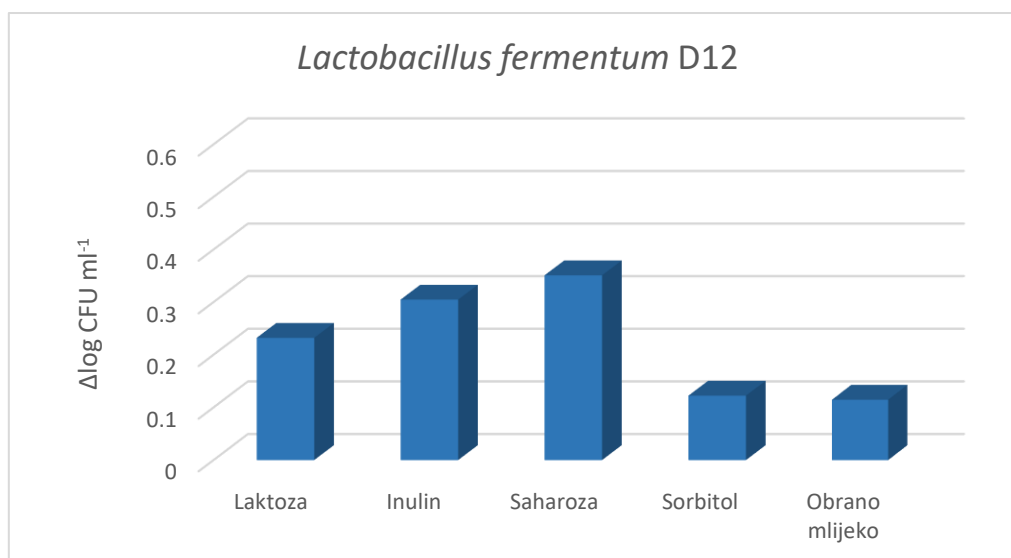
Liofilizacija je proces koji započinje zamrzavanjem mikroorganizama nakon koje slijedi sublimacija (primarno sušenje) i desorpcija (sekundarno sušenje) kako bi se smanjio sadržaj vode (Schoug Bergenholtz i sur., 2012). Ova tehnika se koristi za održavanje preživljavanja i funkcionalnih svojstava korisnih mikroorganizama koji se primjenjuju u različitim ekološkim nišama (Zhan i sur. 2012). Mnogi čimbenici utječu na preživljavanje bakterija mliječne kiseline

tijekom sušenja liofilizacijom, kao što su početna koncentracija stanica, medij rasta, način smrzavanja i temperatura skladištenja (Schoug Bergenholtz i sur., 2012). Za poboljšanje preživljavanja mikroorganizama tijekom sušenja zamrzavanjem i kasnijeg pohranjivanja koriste se različiti lioprotektori kao što su šećeri (saharoza, laktoza, trehaloza), proteinski spojevi (obrano mlijeko), aminokiseline (natrijev glutamat i aspartat) i antioksidansi (askorbinska kiselina) (Li i sur., 2011; Jurez Tomas i sur., 2009; Huang i sur., 2006).

U ovom radu su kao lioprotektori korišteni laktoza, inulin, saharoza, sorbitol i obrano mlijeko. Kao najučinkovitiji lioprotektor za bakterijski soj *Lactobacillus brevis* D6 su se pokazali saharoza i obrano mlijeko (slika 8), a za bakterijski soj *Lactobacillus fermentum* D12 sorbitol i obrano mlijeko (slika 9) jer je uz te lioprotektore bila najmanja smrtnost stanica.



Slika 8. Preživljavanja bakterijskog soja *Lactobacillus brevis* D6 tijekom procesa liofilizacije uz različite lioprotektore



Slika 9. Preživljavanja bakterijskog soja *Lactobacillus fermentum* D12 tijekom procesa liofilizacije uz različite lioprotektore

Kaewnopparat i suradnici su 2013. godine proveli istraživanje preživljavanja mikroinkapsuliranih bakterijskih stanica vrste *Lactobacillus fermentum* u alginatu tijekom procesa liofilizacije. Kao lioprotektori su korišteni inulin, galaktooligosaharidi (GOS) i obrano mlijeko u koncentracijama od 2, 4, 6, 8, i 10% (w/v). Pri nižim koncentracijama su se inulin i GOS pokazali kao učinkovitiji od obranog mlijeka, ali pri koncentraciji od 10% (w/v) kao najbolji lioprotektor se pokazalo obrano mlijeko, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu u kojem su svi ispitivani lioprotektori bili koncentracije 10% (w/v).

Gwak i suradnici su 2015. godine objavili slično istraživanje u kojem su ispitivali učinkovitost različitih lioprotektora (obrano mlijeko, trehaloza, sojin prah i kvašćev ekstrakt) za bakterijske vrste *Lactobacillus brevis* i *Lactococcus lactis*, mikroinkapsulirane u natrijevom alginatu. Kao najučinkovitiji lioprotektor se pokazala soja u prahu, a veliku učinkovitost su pokazali i obrano mlijeko te kvašćev ekstrakt. I ti rezultati su u skladu s rezultatima ovog rada s obzirom da je u oba istraživanja obrano mlijeko pokazalo dobro preživljavanje. U mnogim slučajevima dugotrajnog očuvanja bakterija mliječne kiseline, obrano mlijeko u prahu je pokazalo dobar zaštitni učinak tijekom postupka liofilizacije. Međutim, u današnje vrijeme je porasla potražnja za formulacijama bez mlijeka zbog povećanog broja potrošača koji imaju intoleranciju na laktozu ili su alergični na mlijeko (Savini i sur., 2010). Uz to, dodavanje laktoze može utjecati na osjetilnu kakvoću hrane. Kako bi se izbjeglo korištenje obranog mlijeka kao

lioprotektora, Gwak i suradnici predlažu dodatak praha soje, koji u njihovom istraživanju provedenom na kupusu nije imao utjecaja na senzoričku proizvodnju, ali je poticao rast bakterija mliječne kiseline u ranoj fazi fermentacije. Dodatak soje u prahu je pokazao snažan zaštitni učinak na održivost bakterija *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus lactis* jer je soja bogata biljnim bjelančevinama, šećerima i mineralima koji mogu pridonijeti zaštiti bakterija mliječne kiseline tijekom procesa liofilizacije (Gwak i sur., 2015).

4.2 PREŽIVLJAVANJE MIKROINKAPSULIRANIH I LIOFILIZIRANIH SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE TIJEKOM PROLASKA KROZ SIMULIRANE UVJETE GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Nakon odabira najučinkovitijeg nosača za mikroinkapsulaciju te najboljeg lioprotektora za bakterijske sojeve *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12, istraživanje je nastavljeno ispitivanjem preživljavanja mikroinkapsuliranih i liofiliziranih sojeva, u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta kao konačnog, željenog odredišta probiotika.

Kako bi bakterije imale korisne učinke na potrošača, moraju doći do debelog crijeva u dovoljnom broju, u koncentraciji od najmanje 10^6 - 10^7 CFU g⁻¹ (Bosnea i sur., 2009). Tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt, sojevi moraju biti otporni na prisutnost pepsina i niski pH želuca, prisutnost enzima u tankom crijevu i antimikrobnu aktivnost žučnih soli (Masco i sur., 2007). Budući da su to sve stresni uvjeti za bakterijske sojeve, u ovom radu je ispitana zaštitna uloga liofilizacije i mikroinkapsulacije tijekom izlaganja bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

Tablica 8. Usporedba preživljavanja mikroinkapsuliranih i liofiliziranih bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Bakterijski sojevi	Broj živih stanica (CFU mL ⁻¹):					
	Prije izlaganja simuliranom soku želuca (N ₀)	Nakon izlaganja simuliranom soku želuca (N)	Smrtnost stanica (Δlog N ₀ -N)	Prije izlaganja simuliranom soku želuca + simuliranom soku tankog crijeva (N ₀)	Nakon izlaganja simuliranom soku želuca + simuliranom soku tankog crijeva (N)	Smrtnost stanica (Δlog N ₀ -N)
<i>Lactobacillus brevis</i> D6	4,85 x 10 ¹⁰	8,31 x 10 ⁹	0,77	4,85 x 10 ¹⁰	6,72 x 10 ⁹	0,8583
<i>Lactobacillus fermentum</i> D12	3,02 x 10 ¹⁰	3,99 x 10 ⁹	0,88	3,02 x 10 ¹⁰	3,73 x 10 ⁹	0,91

Dobiveni rezultati pokazuju kako je veće preživljavanje bakterijskih sojeva samo nakon prolaska kroz želučani sok nego nakon izlaganja simuliranim uvjetima cijelog gastrointestinalnog trakta. Iz tablice 8 je vidljivo kako soj *Lactobacillus brevis* D6 bolje preživljava nepovoljne uvjete od soja *Lactobacillus fermentum* D12 kod kojeg je došlo do veće smrtnosti stanica.

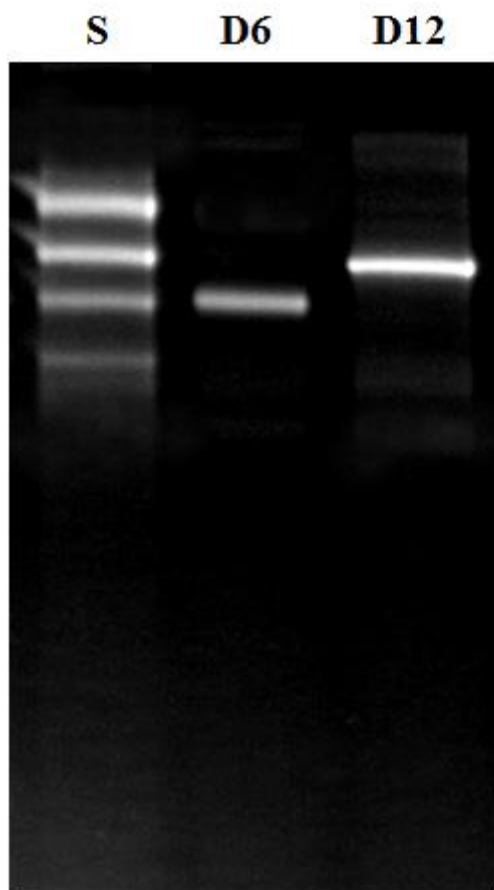
Dobiveni rezultati pokazuju visoko preživljavanje ispitivanih bakterijskih sojeva, što je u skladu s drugim, slično provedenim istraživanjima u kojima su bakterije iz roda *Lactobacillus* također pokazale visoki postotak preživljavanja (Turchi i sur., 2013; Ryu i Chang, 2013; Yu i sur., 2013).

Budući da će se ovi sojevi koristiti kao funkcionalne starter kulture u proizvodnji sireva u kombinaciji s drugim sojevima, potrebno je imati mogućnost potvrde prisutnosti korištenih sojeva te njihovo međusobno razlikovanje u gotovom proizvodu. U tu svrhu su u ovom radu

provedene DGGE i RAPD metode. Primjenom gel elektroforeze u denaturirajućem gradijentu (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) moguće je razlikovati bakterijske vrste unutar istog bakterijskog roda. Kako su u ovom diplomskom radu korištena 2 bakterijska soja iz roda *Lactobacillus*, pomoću DGGE metode su identificirani korišteni sojevi.

DGGE elektroforeza je provedena s dva gela koja imaju različite gradijente denaturirajućih agensa (30 do 70%; 40 do 60%). Tijekom odvijanja DGGE umnoženi su dijelovi DNA analiziranih sojeva, denaturirani i razdvojeni prema molekularnoj masi. Kao standard je korištena DNA svih ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline. Na slici 10 su prikazani rezultati na 30% do 70%-tnom gelu.

Kao standard su korišteni združeni sojevi *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus fermentum* D12, *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10. Uspoređivanjem bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12, koji su korišteni u ovom radu, vidi se da se njihove vrpce podudaraju s dvije vrpce iz standarda, čime se potvrđuje da uzorci propadaju različitim vrstama, odnosno da su to *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12.

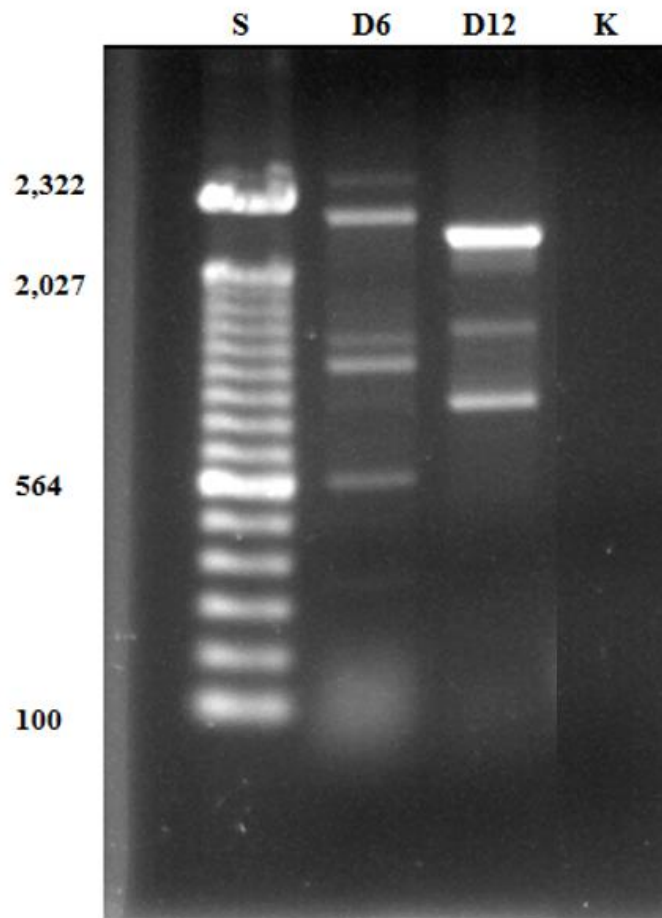


Slika 10. Usporedba PCR produkata dobivenih primjenom HDA1 i HDA2 početnica nakon provedene DGGE; S - standard; D6- *Lactobacillus brevis*; D12- *Lactobacillus fermentum*

RAPD metoda omogućava razlikovanje genetički različitih bakterijskih sojeva bez poznavanja njihove genomske sekvence. RAPD je tip PCR reakcije, u kojoj su dijelovi DNA nasumično umnoženi. Za provođenje RAPD reakcije se koriste proizvoljne, kratke početnice (8-12 nukleotida). Polimorfizmi u sekvencama DNA različitih bakterija se mogu detektirati zahvaljujući varijacijama u mjestima vezanja početnica na DNA te zbog razlika u duljinama amplicifiranih fragmenata. Na temelju položaja DNA vrpca na gelu nakon provedene RAPD metode, vidljive su razlike među pojedinim sojevima.

Na slici 11 su prikazani fragmenti DNA bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12, dobiveni RAPD metodom što pokazuje da se i ova metoda može koristiti za razlikovanje bakterijskih sojeva. Prema dobivenim rezultatima PCR reakcija vidljivo

je da u negativnoj kontroli ne dolazi do dimerizacije korištenih početnica pa su dobivene DNA vrpce pozitivan rezultat PCR reakcije.



Slika 11. Prikaz dobivenih rezultata nakon provedene RAPD-PCR elektroforeze; S- standard; D6- *Lactobacillus brevis*; D12- *Lactobacillus fermentum*; K- kontrola

Znanstveni doprinos ovog rada je razvijanje najpovoljnijeg načina biotehnoške proizvodnje bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 koji će se koristiti kao starter kulture za kontroliranu proizvodnju sireva. Dobiveni rezultat istraživanja je da proces mikroinkapsulacije s alginatom kao nosačem uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora rezultira s visokom stopom preživljavanja ispitivanih bakterijskih sojeva, te se ovakav biotehnoški proces proizvodnje ispitivanih sojeva može primijeniti za proizvodnju sireva.

5 ZAKLJUČCI

1. Alginat i κ -karagenan su se pokazali kao podjednako dobri nosači za mikroinkapsulaciju bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12
2. Kao najbolji lioprotektor za preživljavanje bakterijskih sojeva *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 tijekom procesa sušenja liofilizacijom se pokazalo obrano mlijeko
3. Mikroinkapsulirani liofilizirani sojevi *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus fermentum* D12 su preživjeli prolazak kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta u koncentraciji višoj od 10^9 CFU mL⁻¹, što ukazuje na nisku smrtnost stanica s obzirom da je početna koncentracija nemikroinkapsuliranih stanica bila 10^{10} CFU mL⁻¹
4. RAPD i DGGE analizama je moguće razlikovati vrste unutar roda *Lactobacillus*

6 LITERATURA

Agerholm-Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A.S., Manders, M., Astrup, A. (2000) Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur. J. Clin. Nutr.* **54**, 288–297.

Allan-Wojtas, P., Hansen, L.T., Paulson, A.T. (2008) Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT Food Sci. Technol.* **41**,101-8.

Anal, A. K., Singh, H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Sci.Tech.* **18(5)**, 240-251.

Annan, N.T., Borza, A.D., Hansen, L.T. (2008) Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.* **41**,184-93.

Bakr Shori, A. (2017) Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI J. Bioscience* **24**, 1-5.

Bosnea, L.A., Kourkoutas, Y., Albantaki, N., Tzia, C., Koutinas, A.A., Kanellaki, M. (2009) Functionality of freeze-dried *L. casei* cells immobilized on wheat grains. *LWT-Food Sci. Technol.* **42**, 1696–1702.

Burgain, J., Gaiani, C., Francius, G., Revol-Junelles, A.M., Cailliez-Grimal, C., Lebeer, S., Tytgat, H.L., Vanderleyden, J., Scher, J. (2013) In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy. *Coll. Surf. B. Biointer.* **104**,153-62.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011) Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* **104(4)**, 467-483.

Cai, S., Zhao, M., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G.O., Jiang, F. (2014) Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calciumsources. *Food Hydrocoll* **39**, 295-300.

Canani, R.B., Cirillo, P., Terrin, G., Cesarano, L., Spagnuolo, M.I., De Vincenzo, A., Albano, F., Passariello, A., De Marco, G., Manguso, F., Guarino, A. (2007) Probiotics for treatment of acute diarrhea in children: a randomized clinical trial of five different preparations. *British Med. J.* **335 (7615)**, 340–342.

Capela, P. (2006) Use of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation of bacterial cells in improving the viability of probiotic organisms in freeze-dried yoghurt, Research Master thesis, Victoria University: Victoria (Australia). str. 158.

Champagne, C. P., Fustier, P. (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotech.* **18(2)**, 184-90.

Chassard, C., Grattepanche, F., Lacroix, C. (2011) "Chapter 4 Probiotics and Health Claims: Challenges for Tailoring their Efficacy." U: Kneifel W, Salminen S (Ured.) Probiotics and Health Claims, Wiley-Blackwell, UK , 49-74.

Chatelet, C., Damour, O., Domard. A. (2001) Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* **22(3)**, 261-268.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibanez, F.C., Marzo, F., Villaran, M.C. (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **142**, 185-9.

Chávarri, M., Marañón, I., Villaran, M.C. (2012) Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria, *Probiotics* str. 503-540.

Chávez, B.E., Ledebor., A.M. (2007) Drying of Probiotics: Optimization of Formulation and Process to Enhance Storage Survival. *Dry. Techn.* **25(7-8)**, 1193-1201.

Chen, M.J., Chen, K.N. (2007) Applications of probiotic encapsulation in dairy products. U: Lakkis, Jamileh M. (Ured.), Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Wiley-Blackwell, USA, 83–107.

Conrad, P.B., Miller, D.P., Cielenski, P.R., de Pablo, J.J. (2000) Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology* **41**, 17–24.

Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V.V. (2011) Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules* **12**, 2834-2840.

Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V.V. (2014) Microencapsulation of a synbiotic into PLGA/alginate multiparticulate gels. *Int. J. Pharmaceut.* **466**, 400-8.

Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 1024–1039.

Crittenden, R., Laitila, A., Forssell, P., Matto, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T. (2001) Adhesion of Bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 3469-3475.

Desmond, C., Ross, R. P., O’Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C. (2002) Improved *J. Appl. Microbiol.* **93(6)**, 1003-11.

Gilliland, S.E. (1989) A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* **72**, 2483- 2494.

Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. (1999) *Bifidobacterium spp* and *Lactobacillus acidophilus*: biological and therapeutical revalant for use a probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **10**, 139-157.

Gotcheva, V., Hristozova, E., Hrostozova, T., Guo, M., Roshkova, Z., Angelov, A. (2002) Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. *Food Biotechnol.* **16**, 211–225.

Gouin, S. (2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Sci.Tech.* **15 (7–8)**, 330–347.

Gudmund, S.-B.(2006) Alginates, in Food Polysaccharides and Their Applications. CRC Press. str. 289-334.

Guimarães, R.R., Vendramini, A.L.D.A., Santos, A.C.D., Leite, S.G.F., Miguel, M.A.L. (2013) Development of probiotic beads similar to fish eggs. *J. Funct. Foods* **5**, 968-73.

- Gwak, H.J., Lee, J.H., Kim, T.W., Choi, H.J., Jang, J.Y., Sang II Lee, Park, H.W. (2015) Protective Effect of Soy Powder and Microencapsulation on Freeze-dried *Lactobacillus brevis* WK12 and *Lactococcus lactis* WK11 during Storage. *Food Sci. Biotechnol.* **24(6)**, 2155-2160.
- Haralampu, S.G. (2000) Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydr. Polym.* **41**, 285-292.
- Heidebach, T., Först P., Kulozik, U. (2009a) Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocoll* **23**, 1670-7.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2009b) Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *Int. Dairy J.* **19**,7-84.
- Huang, L., Lu, Z., Yuan, Y., Lu, F., Bie, X. (2006) Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* based on response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 55–61.
- Imasse, K., Tanaka, A., Tokunaga, K., Sugano, H., Ishida, H., Takahashi, S. (2007) *Lactobacillus reuteri* tablets suppress Helicobacter pylori infection on a double-blind randomised placebo-controlled cross-over clinical study Kansenshogaku zasshi. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* **81**, 387–393.
- Jeon, Y.-J. (2003) The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. *Food Res. Int.* **36(4)**, 349-355.
- Jones, P. J., Jew, S. (2007) Functional food development: concept to reality. *Trends in Food Sci. Tech.* **18**, 387-390.
- Juarez Tomas, M.S., Bru, E., Martos, G., Nader-Macas, M.E. (2009) Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. *Can. J. Microbiol.* **55**, 544–552.
- Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., Settharaksa, S. (2013) In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe* **22**, 6-13.

Kailasapathy, K., Chin, J. (2000) Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology* **78**, 80-88.

Kanmani, P., Kumar, R.S., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., Arul, V. (2011) Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochem. Eng. J.* **58-59**, 140-7.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Krasakoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *I. Dairy J.* **13 (1)**, 3–13.

Kritchevsky, D. (1995) Epidemiology of fiber, resistant starch and colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* **4**, 345-352.

Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Kos, B., Uroić, K., Blažić, M., Šušković, J. (2012) Characterization and Application of Autochthonous Starter Cultures for Fresh Cheese Production. *Food Technol. Biotech.* **50 (2)**, 141-151.

Li, Y., Sperry, J.S., Shaoa, M. (2009) Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environ. Exp. Bot.* **66**, 341–346.

Li, B., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2011) Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 609–616.

Liserre, A.M., Re, M.I., Franco, B.D.G.M. (2007) Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnol.* **21**, 1–16.

Livney, Y.D. (2010) Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opin. Colloid In.* **15 (1–2)**, 73–83.

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Truszkowska, K., Gomes, A. M., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (2005) Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *I. Dairy J.* **15**, 921-927.

Mangione, M.R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., Cavallaro, G., San Biagio, P.L. (2005) K⁺ and Na⁺ effects on the gelation properties of n-Carrageenan. *Biophys. Chem.* **113**, 129–135.

Mangione, M.R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., San Biagio, P.L. (2003) Thermoreversible gelation of n-Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophys. Chem.* **104**, 95–105.

Martín-Platero, M.A., Valdivia, E., Maqueda, M., Martín-Sánchez, I., Martínez-Bueno, M. (2009) Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiol.* **26(3)**, 294-304.

Masco, L., Crockaert, C., van Hoorde, K., Swings, J., Huys, G. (2007). In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolated of *Bifidobacterium*. *J. Dairy Sci.* **90**, 3572 – 3578.

Mortazavian, A.M., Azizi, A., Ehsani, M.R., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J.A. (2008) Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft* **63 (4)**, 427–429.

Mortazavian, A.M., Sohrabvandi, S. (2006) Probiotics and food Probiotic products. Eta Publication, Iran, (In Farsi).

Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C.I., Martínez-Bustos, F. (2009) Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J. Food Eng.* **91(3)**, 380-386.

Nag, A., Han K.S., Singh, H. (2011) Microencapsulation of probiotic bacteria using pH induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *Int. Dairy J.* **21**, 247-53.

Nahata, T. (2018), Pharmaceutical Technology Center, Cadila Healthcare Limited <<http://slideplayer.com/slide/12438104/>> pristupljeno 26 veljače 2018.

Nomoto, K. (2005) Review prevention of infections by probiotics. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 583–592.

Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. (1998) The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* **8**, 749-758.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 279–289.

Petrovic, T., Nedovic, V., Dimitrijevic-Brankovic, S., Bugarski, B., Lacroix, C. (2007). Protection of probiotic microorganism by microencapsulation. *CI CEQ* **13(3)**, 169-174.

Picot, A., Lacroix, C. (2004) Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy J.* **14**, 505-15.

Picot, A., Lacroix, C. (2003) Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. *Int. Dairy J.* **13**, 455-462.

Rafter, J. (2003) Probiotics and colon cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**, 849-859.

Round, J. L., Mazmanian, S. K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313-323.

Ryu, E.H., Chang, H.C. (2013) In vitro study of potentially probiotic lactic bacteria strains isolated from kimchi. *Annal. Microbiol.* **63(4)**, 1-9.

Sanders, M.E., Gibson, G., Gill, H.S., Guarner, F. (2007) Probiotics: their potential to impact human health. CAST issue paper No. 36, veljača 2018., <<http://www.castscience.org/publications.asp>>

Savini, M., Cecchini, C., Verdenelli, M.C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A. (2010) Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients* **2**, 330-339.

Schoug Bergenholtz, A.S., Wessman, P., Wuttke, A., Hakansson, S. (2012) A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. *Cryobiology* **64**, 152–159.

Selmer-Olsen, E., Sorhaug, T., Birkeland, S. E., Pehrson, R. (1999) Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **23**, 79-85.

Shah, N.P., Ravula, R.R. (2000) Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Aust. J. Dairy Technol.* **55**, 139-44.

Shah, N.P. (2007) Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* **17**, 1262-1277.

Shi, L.E., Li, Z.H., Li, D.T., Xu, M., Chen, H.Y., Zhang, Z.L., Tang, Z.X. (2013) Encapsulation of probiotics *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *J. Food Eng.* **117**, 99-104.

Stummer, S., Toegel, S., Rabenreither, M.-C., Unger, F.M., Wirth, M., Viernstein, H., Salar-Behzadi, S. (2012) Fluidized-bed drying as a feasible method for dehydration of *Enterococcus faecium* M74. *J. Food Eng.* **111**(1), 156-165.

Su, R., Zhu, X., Fan, D., Mi, Y., Yang, C., Jia, X. (2011) Encapsulation of probiotic *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920 with alginate-human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 979-84.

Šušćković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija. Prehrambeno-biotehnoški fakultet u Zagrebu.

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

Teixeira, P., Castro, H., Mohácsi-Farkas, C., Kirby, R. (2000) Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *J. Appl. Microbiol.* **62**, 47-55.

Thomas, M.B., Vaidyanathan, M., Radhakrishnan, K., Raichur, A.M. (2014) Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan-dextran sulfate polyelectrolytes. *J. Food Eng.* **136**, 1-8.

Thompson, D.B. (2000) Strategies for the manufacture of resistant starch. *Trends in Food Sci. Technol.* **11**, 245-253.

Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., Ebani, V.V., Cerri, D. (2013) Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. *World J Microbiol Biotechnol.* **10**, 1913-22.

Voo, W.P., Ravindra, P., Tey, B.T., Chan, E.S. (2011) Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. *J. Biosci. Bioeng.* **111(3)**, 294-9.

Widerøe, H., Danielsen, S. (2001) Evaluation of the use of Sr^{2+} in alginate immobilization of cells, *Naturwissenschaften.* **88(5)**, 224-8.

Yu, Z., Zhang, X., Li, S., Li, C., Li, D., Yang, Z. (2013) Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29(3)**, 489-98.

Zhan, Y., Xu, Q., Yang, M.M., Yang, H.T., Liu, H.X., Wang, Y.P., Guo, J.H. (2012) Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Lett Appl. Microbiol.* **54**, 10–17.



Ema Balić
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika,
enzima, probiotika i starter kultura

Zagreb, 15.03.2018.

Fakultetskom vijeću

putem Odbora za znanost PBF-a i
Zavoda za biokemijsko inženjerstvo

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da su svi moji radovi na koje se pozivam u postupku izbora u zvanje odnosno na radno mjesto izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istih radova nisam koristio drugim izvorima osim onih koji su u njima navedeni.

Ema Balić