

Utjecaj različitih prebiotika na biotehnošku proizvodnju bakterijskog soja *Lactobacillus fermentum* D12

Iličić, Lea

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:159:374919>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 29. listopada 2018.

Lea Iličić

961/BPI

**UTJECAJ RAZLIČITIH
PREBIOTIKA NA
BIOTEHNOLOŠKU
PROIZVODNJU BAKTERIJSKOG
SOJA *Lactobacillus fermentum* D12**

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc te uz pomoć asistentica Martine Banić, mag. ing. biotechn. i Katarine Butorac, 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, doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc na stručnom vodstvu tijekom izrade diplomskog rada te asistenticama Martini Banić, mag. ing. biotechn. i Katarini Butorac, mag. ing. biotechn. na svom trudu, savjetima i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

Hvala i mojoj obitelji i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom studiranja i izrade diplomskog rada.

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

UTJECAJ RAZLIČITIH PREBIOTIKA NA BIOTEHNOLOŠKU PROIZVODNJU BAKTERIJSKOG SOJA *Lactobacillus fermentum* D12

Lea Iličić, 961/BPI

Sažetak: Iskazivanju funkcionalnih učinaka probiotika u gastrointestinalnom traktu (GIT), može doprinijeti i primjena različitih prebiotika koji selektivno potiču rast poželjnih bakterija *in situ*. Stoga je cilj ovog rada bio istražiti dodatak 3 različita prebiotika: inulina s fruktooligosaharidima, manitola i laktuloze na učinkovitost mikroinkapsulacije bakterijskih stanica soja *Lactobacillus fermentum* D12 u alginatu. *Lb. fermentum* D12 je autohtona bakterija mliječne kiseline koja se istražuje kao potencijalna probiotička starter kultura, stoga je za biotehnošku proizvodnju ovog soja važno i definirati tehnološka svojstva primjerice preživljavanje tijekom procesa mikroinkapsulacije i liofilizacije. Nastavno je u ovom radu provedena i liofilizacija mikroinkapsuliranih bakterijskih stanica soja D12 uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora. Prema rezultatima, dodatak prebiotika tijekom mikroinkapsulacije bakterijskih stanica D12 u alginatu ima povoljan učinak na preživljavanje *Lb. fermentum* D12, što proizlazi iz većeg broja preživjelih bakterijskih stanica u usporedbi s kontrolom. Prisutnost čiste kulture bakterijskog soja D12 u mikroinkapsuliranim i liofiliziranim pripravcima potvrđena je RAPD metodom. U konačnici, liofilizirane i mikroinkapsulirane stanice soja *Lb. fermentum* D12 preživljavaju u visokom broju (CFU/ml) simulirane uvjete GIT, što ukazuje na zaštitni učinak primjenjenih procesa čime se ujedno doprinosi funkcionalnosti probiotičkog soja *in vivo*.

Ključne riječi: *Lactobacillus fermentum*, prebiotički supstrati, mikroinkapsulacija, liofilizacija

Rad sadrži: 40 stranica, 12 slika, 2 tablice, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Jasna Novak
2. Doc.dr.sc. Andreja Leboš Pavunc
3. Prof.dr.sc. Anita Slavica
4. Prof.dr.sc. Ksenija Markov (zamjena)

Datum obrane: 29.10.2018.

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

THE INFLUENCE OF DIFFERENT PREBIOTICS ON THE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF BACTERIAL STRAIN *Lactobacillus fermentum* D12

Lea Iličić 961/BPI

Abstract: The application of various prebiotics, that selectively promote the growth of desired bacteria *in situ*, may also contribute to the functional properties of probiotics in the gastrointestinal tract (GIT). Therefore, the aim of this thesis was to determine the influences of 3 different prebiotics: inulin with fructo-oligosaccharides, mannitol and lactulose on the efficiency of the microencapsulation of *Lb. fermentum* D12 bacterial cells in alginate. *Lb. fermentum* D12 is an autochthonous lactic acid bacterium that has been explored as a potential probiotic starter culture, so for the biotechnological production of this strain it is important to define its technological properties, such as survival during the microencapsulation and lyophilization. In this work, the lyophilization of microencapsulated bacterial cells of strain D12, with the addition of skim milk as a lioprotector, was also carried out. According to the results, the addition of prebiotics during the microencapsulation of bacterial cells D12 in the alginate has a positive effect on the survival of *Lb. fermentum* D12, resulting from a higher number viable bacterial cells compared to the control. The presence of pure culture of bacterial strain D12 in microencapsulated and lyophilized formulations was confirmed by the RAPD method. Finally, lyophilized and microencapsulated *Lb. fermentum* D12 cells survive in high viable cell counts (CFU/ml) in simulated conditions of the GIT, what implies on the protective effect of the applied processes, thereby also contributing to the functionality of the probiotic strain *in vivo*.

Keywords: *Lactobacillus fermentum*, prebiotic substrates, microencapsulation, lyophilization

Thesis contains: 40 pages, 12 figures, 2 tables, 65 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. Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor*

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

Reviewers:

1. PhD. *Jasna Novak*, Associate professor
2. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor
3. PhD. *Anita Slavica*, Full professor
4. PhD. *Ksenija Markov*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 29.10.2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1 KARAKTERISTIKE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA.....	3
2.1.1 Probiotičke bakterije roda <i>Lactobacillus</i>	5
2.1.2 Mehanizam djelovanja probiotika.....	6
2.2 MIKROINKAPSULACIJA BAKTERIJSKOG SOJA <i>Lactobacillus</i>	7
2.2.1 Metode mikroinkapsulacije probiotičkih bakterija	8
2.2.1.1 Sušenje raspršivanjem	9
2.2.1.2 Liofilizacija.....	10
2.2.2 Izbor nosača za mikroinkapsulaciju	12
2.2.2.1 Alginat	13
2.2.3 Otpornost mikroinkapsuliranih probiotičkih bakterija na uvjete u GI traktu.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1 MATERIJALI.....	17
3.1.1 Radni mikroorganizam.....	17
3.1.2 Hranjive podloge	17
3.1.3 Kemikalije	17
3.1.4 Aparatura i pribor	19
3.2 METODE RADA	20
3.2.1 Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	20
3.2.2 Izolacija kromosomske DNA	20
3.2.3 Identifikacija soja <i>Lb. fermentum</i> D12 primjenom sekvencioniranja cijelog genoma.....	20
3.2.4 Mikroinkapsulacija soja <i>Lb. fermentum</i> D12 u alginatu uz dodatak različitih prebiotika	21
3.2.5 Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica <i>Lb. fermentum</i> D12 u alginatu uz dodatak različitih prebiotika i obranog mlijeka kao lioprotektora.....	22
3.2.5.1 Detekcija prisutnosti soja <i>Lb. fermentum</i> D12 u mikrokapsulama RAPD-PCR metodom.....	22
3.2.6 Preživljavanje <i>Lb. fermentum</i> D12 mikroinkapsuliranog u alginatu uz dodatak različitih prebiotika i liofiliziranog u obranom mlijeku tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta	24
3.2.6.1 Priprava simuliranoga želučanog soka i simuliranoga soka tankog crijeva ...	24

3.2.6.2	Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankoga crijeva na preživljavanje <i>Lb. fermentum</i> D12 mikroinkapsuliranog u alginatu uz dodatak različitih prebiotika i liofiliziranog uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora	24
4.	REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1	Identifikacija soja <i>Lb. fermentum</i> D12 primjenom sekvencioniranja cijelog genoma.....	25
4.2	Mikroinkapsulacija i liofilizacija soja <i>Lb. fermentum</i> D12	26
4.3	Preživljavanje mikroinkapsuliranog i liofiliziranog soja <i>Lb. fermentum</i> D12 tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta	31
5.	ZAKLJUČCI.....	33
6.	LITERATURA.....	34

1. UVOD

Probiotici su živi mikroorganizmi koji iskazuju brojne zdravstvene učinke na domaćina kada se primjenjuju u odgovarajućim količinama tako što doprinose funkciji crijevne mikrobiote. Definiraju se kao pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji primijenjeni u ljudi ili životinja blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore (Šušković, 1996). Bakterijski sojevi iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Bacillus* su detaljno istraživani kao i korišteni za proizvodnju pripravaka spremnih za konzumaciju. S ciljem definiranja novih probiotičkih sojeva, najčešće se provode istraživanja poželjnih funkcionalnih učinaka bakterijama mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus*. Ipak, fizikalno - kemijska stabilnost i biodostupnost potrošaču su predstavljali izazov za ove rodove bakterija tijekom mnogih godina, osobito u hranjivim pripravcima koji se čuvaju pri sobnoj temperaturi. Mikroinkapsulacijom se poboljšava preživljavanje ovih bakterija jer ih nosač za mikroinkapsulaciju štiti od nepovoljnih uvjeta okoliša, poput visoke temperature, pH vrijednosti ili saliniteta, tijekom pripreve konačnih prehrambenih proizvoda kao i njihovim naknadnim prolaskom kroz gastrointestinalni trakt. Nosači koji se koriste za mikroinkapsuliranje moraju biti sigurni materijali koji se mogu koristiti u prehrani. Najčešći materijali za nosače korišteni kod mikroinkapsulacije probiotika su ionski polisaharidi, mikrobnii egzopolisaharidi i proteini iz mlijeka, koji pokazuju različite fizikalno - kemijske karakteristike kao i mogućnost adhezije. Strukturno, preživljavanje bakterija ovisi o količini i jačini funkcionalnih skupina koje su locirane na bakterijskoj staničnoj stijenci, materijalu nosača kao i izvedbi poprečnih vezivnih struktura. Liofilizacija je metoda sušenja kod koje se procesom dehidratacije postiže zamrzavanje proizvoda. Tijekom procesa liofilizacije često se dodaju lioprotektori koji različitim mehanizmima sprječavaju oštećenja stanica tijekom zamrzavanja, sušenja i skladištenja.

Cilj ovog rada je bio ispitati učinkovitost procesa mikroinkapsulacije, odnosno broj živih stanica prije i poslije mikroinkapsulacije bakterijskog soja *Lactobacillus fermentum* D12 u alginatu uz dodatak različitih prebiotika (inulin uz fruktooligosaharide, manitol, laktuloza). Soj D12 je izoliran iz autohtonog dimljenog sira i okarakteriziran u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo u okviru probiotičkog koncepta. Kao nosač za mikroinkapsulaciju je korišten alginat jer najbolje omogućava preživljavanje navedenog soja tijekom procesa proizvodnje, skladištenja i

primjene. Također, provedena je i liofilizacija mikroinkapsuliranih bakterijskih stanica uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora. Ispitivanje broja preživjelih mikroinkapsuliranih stanica provedeno je tjedan dana nakon postupka mikroinkapsulacije te nakon 1, 2 i 3 mjeseca. U svrhu utvrđivanja prisutnosti probiotičkog soja *Lb. fermentum* D12 u dobivenim mikrokapsulama, provedena je RAPD-PCR metoda. Na kraju je ispitano preživljavanje liofiliziranog i mikroinkapsuliranog soja *Lb. fermentum* D12 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 KARAKTERISTIKE PROBIOTIČKIH BAKTERIJA

Probiotik je pojam koji znači „za život“ (Fuller, 1989), a koristi se kod opisa grupe bakterija koje prilikom unošenja u organizam u određenoj količini doprinose zdravlju ljudi i životinja. Koncept probiotičkih bakterija je vrlo star, a povezuje se uz fermentiranu hranu koja se konzumirala prije više od tisuću godina. Pozitivan učinak fermentirane hrane poznat je još od davnina. Još od antičkih vremena, čovjek je napravio i konzumirao funkcionalnu hranu koja sadrži probiotičke bakterije. Najstarija vrsta probiotičke hrane bili su sirevi i fermentirani mliječni proizvodi, kao i prirodno fermentirana hrana zbog djelovanja bakterija mliječne kiseline, kao i drugih fermentiranih proizvoda dobivenih od kvasca. Hipokrat i drugi drevni znanstvenici, primijetili su da se poremećaji probavnog trakta mogu izliječiti konzumiranjem fermentiranog mlijeka, kao i Pinusov, rimski znanstvenik, koji je zaključio da se fermentirano mlijeko može koristiti za liječenje gastroenteritisa. U kasnijem, modernom dobu, povećan je interes za razumijevanjem mehanizma djelovanja probiotičkih bakterija na ljudsko zdravlje. Početkom dvadesetog stoljeća ruski mikrobiolog Elie Metchnikoff identificirao je bakterije koje ostvaruju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje i zaključio da je ljudsko zdravlje u funkciji ravnoteže između "dobrih" probiotičkih bakterija i "loših", patogenih bakterija koje uzrokuju različite bolesti probavnog trakta. Princip njegove teorije se temelji na inhibitornom djelovanju bakterija mliječne kiseline na toksine mikroorganizama koji su normalno prisutni u crijevima, što rezultira produženim životom. Bakterije mliječne kiseline (BMK) se smatraju najvažnijim predstavnicima probiotika s pozitivnim učinkom na humani gastrointestinalni trakt (Burgain i sur., 2013). Također, BMK inhibiraju rast i toksičnost anaerobnih spora mikroorganizama.

Termin „probiotik“ prvi put je definiran 1960. godine kao tvar nastala djelovanjem mikroorganizama, a koja potiče rast drugih mikroorganizama. Fuller je 1989. definirao probiotike kao "žive mikroorganizme koji se dodaju hrani radi održavanja ravnoteže intestinalne mikroflore". Kasnije, probiotici su definirani kao dijetetsko pomoćno sredstvo koje blagotvorno utječe na domaćina, moduliranjem mukoznog i sustavnog imuniteta, kao i poboljšanjem nutritivne i mikrobiološke ravnoteže u probavnom traktu (Naidu i sur., 1999). Po trenutno službenoj definiciji, "probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se unesu u adekvatnoj količini u organizam ostvaruju svoja pozitivna djelovanja" (FAO / WHO, 2001). Bakterije mliječne kiseline s probiotičkim karakteristikama su uglavnom dio enterične

mikroflora probavnog trakta, a vjeruje se da imaju značajnu ulogu u ekosustavu ljudskog gastrointestinalnog (GI) trakta. U današnje vrijeme, probiotičke bakterije prisutne na tržištu su humanog podrijetla. Međutim, novija istraživanja pokazala su da se i iz tradicionalnih proizvoda mogu izolirati autohtone BMK s probiotičkim svojstvima. Spekter probiotičke aktivnosti može se podijeliti na nutritivnu, fiziološku i antimikrobnu aktivnost. Ova zapažanja su doprinijela razvoju funkcionalne hrane koja sadrži BMK s probiotičkim karakteristikama koje doprinose zdravlju ljudi i životinja. Neki od različitih nutritivnih i terapijskih efekata koji su propisani probiotičkim karakteristikama BMK mogu se prikazati na slijedeći način (Naidu i sur., 1999):

- unapređenje nutritivne kvalitete hrane i hrane za životinje,
- metabolički stimulans sinteze vitamina i proizvodnje enzima,
- stabilizacija gastrointestinalne mikroflora inhibicijom patogenih mikroorganizama,
- smanjenje razine kolesterola mehanizmom asimilacije,
- smanjenje opasnosti od raka debelog crijeva detoksikacijom kancerogenih stanica,
- potiskivanje tumora.

Pored probiotika, u proizvodnji prehrambenih proizvoda koriste se i različiti prebiotici u koje se ubrajaju oligosaharidi, poput fruktooligosaharida, laktuloze, rafinoze, inulina, itd. Pod pojmom prebiotici se podrazumijevaju neprobavljeni sastojci hrane (obično polisaharidi), koji selektivno stimuliraju rast probiotičkih bakterija u crijevima. Na taj način prebiotici potiču sposobnost kolonizacije GI trakta probiotičkim bakterijama, čime se povećava i njihovo inhibitorno djelovanje prema patogenim bakterijama (Cummings i sur., 2002). U ovom radu s ciljem što duljeg preživljavanja mikroinkapsuliranog i liofiliziranog probiotičkog soja *Lactobacillus fermentum* D12, dodane su različite vrste prebiotika; inulin uz fruktooligosaharide (FOS), manitol te laktuloza. Inulin je složeni ugljikohidrat iz skupine fruktana (fruktooligosaharidi ili FOS) koji se dobiva iz korijena cikorijske. Vlakna inulina su netopljiva i otporna na enzimsku razgradnju u tankom crijevu pa nerazgrađena dopijevaju u debelo crijevo gdje ga razlažu bakterije debelog crijeva te tako pomažu održavanju zdrave funkcije crijeva. Inulin služi kao izvor hrane korisnim bakterijama (prebiotik), potiče rast zdrave crijevne bakterijske flore u smislu povećanja broja korisnih bakterija, što ima učinak na zdravlje tankog i debelog crijeva. Također, inulin povećava količinu bakterijskih sojeva *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* što za posljedicu ima jačanje imunološkog sustava u tijelu, smanjenje broja patogenih bakterija u crijevima i povećanu apsorpciju hranjivih tvari u

crijevima. Laktuloza je šećer, disaharid koji se sastoji od fruktoze i galaktoze. Ne apsorbira se u debelom crijevu, već veže na sebe vodu i elektrolite te tako potiče pražnjenje crijeva. Laktuloza ima također i prebiotičko djelovanje, potiče rast korisnih bakterija u debelom crijevu.

Iako je u svijetu primjena probiotika i prebiotika široko zastupljena u proizvodnji raznih vrsta namirnica biljnog i životinjskog porijekla (proizvodi od mlijeka, proizvodi od mesa, „snack“ obroci, margarin, sladoledi, preljevi za salate, sokovi, dječja hrana i dr.) u RH je primjena probiotika ograničena uglavnom na fermentirane proizvode od mlijeka.

2.1.1 Probiotičke bakterije roda *Lactobacillus*

Probiotičke bakterije predstavljaju žive mikroorganizme, koji primijenjeni u odgovarajućim količinama imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje.

Rod *Lactobacillus* sadrži više od 90 različitih vrsta i podvrsta. Ovaj rod bakterija mliječne kiseline uglavnom dominira u tradicionalnoj fermentiranoj hrani, gastrointestinalnom traktu, itd. Laktobacili su štapićastog oblika, nepokretni su i ne formiraju spore. Na temelju prisustva ili odsustva određenih enzima tijekom fermentacije ugljikohidrata, laktobacili se mogu podijeliti u tri grupe (Kandler i sur., 1986):

1. *Obligatno homofermentativni laktobacili* koji fermentiraju heksoze (putem fruktoza-1,6-bifosfata) do mliječne kiseline, ali ne fermentiraju pentoze i glukonat. U ovu grupu pripadaju *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. cripatus*, *Lb. gasseri*, *Lb. amylovarus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, i drugi.
2. *Fakultativno heterofermentativni laktobacili*, koji fermentiraju heksoze do mliječne kiseline, ali mogu proizvoditi plinove. Predstavnici ove grupe su *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus casei*.
3. *Obligatno heterofermentativni laktobacili*, koji vrše fermentaciju heksoza do mliječne i octene kiseline, CO₂ i etanola. Ovoj grupi pripadaju *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, itd.

Filogenetski, *Lactobacillus* je heterogen rod s guanin + citozin (G+C) sastavom koji varira u intervalu od 32-53%. Taksonomski su filogenetske veze među laktobacilima uspješno

savladane primarno zahvaljujući analizi 16S rRNA sekvence, ali su još bolje ispitani analizom cjelokupnog genoma sojeva laktobacila (Kandler i sur., 1986). Analize sekvenciranja su pokazale odstupanje pojedinih vrsta od roda *Lactobacillus*, ali su podržale i priznavanje nekih novih vrsta, što je dovelo do nove podjele *Lactobacillus* u nekoliko grupa. Na temelju sekvenciranja, nastale su tri nove grupe koje nisu potpuno usuglašene s podjelom koja je izvršena na temelju fermentacije šećera (Molin, 2013):

- „*Lb. delbrueckii*” grupa (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* i *Lactobacillus gasseri*),
- „*Lactobacillus casei*” grupa (*Lactobacillus* vrste, koje se nalaze u sve tri fermentativne grupe, kao i neke *Pediococcus* vrste)
- „*Leuconostoc*” grupa (*Leuconostoc* vrste, kao i neke obligatorno homofermentativne *Lactobacillus* vrste i *Weissella* vrste).

2.1.2 Mehanizam djelovanja probiotika

Glavni mehanizam djelovanja probiotika putem kojeg se poboljšava zaštita sluznice gastrointestinalnog trakta, uključuje:

- a) Antimikrobnu aktivnost: Probiotici sprječavaju kolonizaciju patogenih bakterija smanjenjem luminalne pH vrijednosti, inhibicijom bakterijske invazije i adhezije na stanice epitela i proizvodnjom antimikrobnih spojeva poput bakteriocina i defenzina, organskih kiselina i vodikovog peroksida. Interakcija BMK s mukoznim epitelnim stanicama u gastrointestinalnom traktu i limfoidnim stanicama u intestinalnom traktu pojačava imunološki odgovor usmjeren protiv unesenih patogena (Bourlioux i sur., 2003).
- b) Poboljšanje funkcije mukozne barijere u borbi protiv patogena: Navedeno se postiže povećanjem proizvodnje mukusa. Probiotičke bakterije se natječu s patogenim bakterijama za mjesta vezivanja na crijevnom epitelu i na taj način inhibiraju kolonizaciju sojeva poput *Salmonella sp.* i *E. coli* (Sherman i sur., 2005). Probiotičke bakterije dolaze u interakciju s epitelnim stanicama crijeva direktno (putem sastojaka stanice poput DNA, lipoteihonske kiseline kao i polisaharida na površini stanice) ili indirektno (proizvodnjom bioaktivnih metabolita) (O' Shea i sur., 2012).

- c) Imunomodulacija: Specifični sojevi probiotika mogu utjecati na urođenu i stečenu imunost i stoga imaju važnu ulogu u liječenju različitih oboljenja ljudi. Probiotici mogu utjecati na epitelne stanice, dendritičke stanice, monocite/makrofage i na različite tipove limfocita.

2.2 MIKROINKAPSULACIJA BAKTERIJSKOG SOJA *Lactobacillus*

Mikroinkapsulacijske tehnike imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji, gdje se mogu koristiti u stabilizaciji komponenata hrane, kontroli oksidacijskih reakcija, održavanju ili kontroliranom otpuštanju aktivnih sastojaka hrane (minerali, vitamini, fitosteroli, itd.), maskiranju neugodnih okusa i mirisa, itd. (Đorđević i sur., 2015). Mikroinkapsulacija je tehnologija koja je razvijena za uporabu u prehrambenoj industriji u različitim proizvodima, ali se također može koristiti i za zaštitu bakterijskih stanica od nepovoljnih uvjeta okoline (Borgogna i sur., 2010). Cilj mikroinkapsulacije je stvoriti mikrookoliš u kojem će bakterije preživjeti tijekom obrade, skladištenja i otpuštanja na željenom mjestu u gastrointestinalnom traktu. Ispitivanja ukazuju da probiotičke bakterije slabo preživljavaju u proizvodima u kojima se nalaze kao slobodne stanice (De Vos i sur., 2010). Preživljavanje probiotičkih bakterija je od izuzetnog značaja, s obzirom na to da probiotici moraju preživjeti vrlo nepovoljne uvjete, od procesa proizvodnje, skladištenja tijekom određenog vremenskog razdoblja pa do preživljavanja gastrointestinalnih uvjeta, da bi na kraju opstali u velikom broju i ostvarili svoje pozitivne učinke na zdravlje domaćina. Zbog toga postoji veliko zanimanje za razne metode mikroinkapsulacije koje mogu osigurati odgovarajuću zaštitu probiotičkim bakterijama, u cilju što boljeg preživljavanja (Kailasapathy, 2009). Vijabilnost inkapsuliranih probiotika ovisi o fizičko - kemijskim osobinama kapsule, odnosno nosača. Nosači u mikroinkapsulaciji mogu biti različite vrste polisaharida, proteina i enzima, ovisno o tvari koju trebaju zaštititi. Vrsta i koncentracija nosača pruža odgovarajuću zaštitu probiotičkim bakterijama, veličina inkapsuliranih tvari i početni broj probiotičkih stanica, samo su neki od parametara koji utječu na preživljavanje probiotika (Chen i sur., 2005).

Mikroinkapsulacija probiotičkih bakterija (slika 1) također igra ulogu u zaštiti bioloških svojstava koja se postižu pri transportu probiotika kroz duodenum, što je uvjet za daljnji transport i postizanje visokog broja probiotičkih stanica u jejunumu i ileumu. Budući da je pronađeno da mikroinkapsulacija osigurava zaštitu probiotičkim bakterijama u GI traktu,

kapsulirane čestice također trebaju biti testirane za preživljavanje simuliranih uvjeta želuca i tankog crijeva, prije njihove primjene u prehrambenoj industriji (Manojlović i sur., 2010).



Slika 1. Shematski prikaz mikroinkapsulacije probiotičke bakterije (Corona-Hernandez i sur., 2013)

2.2.1 Metode mikroinkapsulacije probiotičkih bakterija

Postoje razne metode mikroinkapsulacije koje uključuju tehnike sušenja (liofilizacija, sušenje raspršivanjem), tehnike emulgiranja, tehnike prevlačenja i tehnike ekstruzije (Manojlović i sur., 2010). Probiotičke bakterije najčešće se koriste u proizvodnji hrane u smrznutom ili sušenom obliku, kao što su liofilizirani prašci (Holzapfel i sur., 2001). Sušenje zamrzavanjem ili liofilizacijom postiže se zamrzavanjem probiotika u prisutnosti lioprotektora, nakon čega se provodi sublimacija vode pod vakuumom. Lioprotektori imaju ulogu u zaštiti probiotičkih svojstava tijekom procesa liofilizacije, ali i tijekom pohrane liofilizirane kulture. Neki od spojeva koji se koriste kao zaštitne komponente u liofilizaciji su fruktoza, laktoza, manoza, sorbitol, trehaloza, maltodekstrin ili razne kombinacije komponenata (Carvalho i sur., 2002).

Proces mikroinkapsuliranja, koji ima slične karakteristike kao i proces liofilizacije, je sušenje vakuumom. Proces sušenja vakuuma traje 30 minuta, do nekoliko sati, na temperaturi od 0-40°C. Velika prednost ovog postupka je velika brzina, kao i temperatura krajnjeg proizvoda, jer nema temperature zamrzavanja proizvoda, što je rezultiralo brojnim oštećenjima (Manojlović i sur., 2010). Probiotici se također mogu inkapsulirati u gel (alginat) ili polimerne matrične kapsule, gdje su probiotici obloženi vanjskim omotačem koji pod određenim uvjetima

omogućuje oslobađanje probiotika (Anal i sur., 2007). Polimerni matriksi se koriste u ekstruzijskim tehnikama za zaštitu probiotičkih bakterija u nepovoljnim uvjetima GI trakta, odnosno u uvjetima niske pH vrijednosti i visoke koncentracije žučnih soli. Osim toga, ekstruzijske tehnike olakšavaju primjenu probiotika u prehrambenoj industriji. Kod emulzifikacijskih tehnika ili ekstruziji, alginat se najviše koristi kao inkapsulacijski matriks za mikroinkapsulaciju probiotičkih bakterija, gdje se kao krajnji proizvod dobivaju polimerne kuglice promjera 0,3-3 mm (Mandal i sur., 2006).

Također, u današnje vrijeme sve su popularnije tehnike mikroinkapsuliranja u kojima nastaje višeslojna prevlaka, u kojoj se koristi kombinacija višestrukih tehnika kapsuliranja. Primjer je inkapsulirani probiotik s tri sloja, gdje je prvi sloj liofilizirani oblik u tekućoj masti, nakon čega slijedi tvrdi omotač i na kraju omotač u kombinaciji želatin-pektin. Prve kapsule ove tehnike izrađene su u mlaznici (kombinirane s tehnikama ekstruzije). Međutim, veliki nedostatak ove metode je visoka cijena. Sve tehnike mikroinkapsuliranja zadovoljavaju najvažniji parametar probiotičkih bakterija, tj. čine zaštitni omotač koji omogućuje kvalitetniju životnu sposobnost probiotičkih bakterija u GI traktu, ali i tijekom proizvodnje prehrambenih proizvoda. Ipak, ekonomska održivost tehnike ima značajnu ulogu u izboru odgovarajuće tehnike mikroinkapsuliranja. Stoga je kao jedna od najrasprostranjenijih korištenih mikroinkapsulacijskih tehnika u prehrambenoj industriji, ali i mikroinkapsuliranja probiotičkih bakterija, tehnika sušenja raspršivanjem.

2.2.1.1 Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem je metoda koja se uvelike koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj tehnologiji. Temelji se na raspršivanju vodene ili organske otopine, emulzije, suspenzije ili disperznog sustava u sitne kapljice u struji vrućega zraka pri čemu je aktivni sastojak otopljen u mikroinkapsulacijskom mediju.

Sušenje raspršivanjem je 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. Kao otapalo se najčešće koristi hidroklorid poput želatine, biljne gume, modificiranog škroba, dekstrina ili nekih neželatinizirajućih proteina. 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. Većina probiotičkih sojeva ne može preživjeti visoke temperature i dehidrataciju tijekom procesa sušenja raspršivanjem. Nizak postotak preživljavanja je uzrokovan uglavnom oštećenjem citoplazmatske membrane, ali isto tako stanična stjenka, ribosomi i DNA mogu biti oštećeni pri višim temperaturama (Teixeira i sur., 2000). Kako bi se osiguralo bolje preživljavanje probiotika, tijekom sušenja se dodaju zaštitna sredstva. Ugradnjom zaštitnih sredstava kao što su trehaloza, krute tvari bez masti, faktora koji potiču rast, uključujući razne probiotičke / prebiotičke kombinacije mogu poboljšati održivost kulture tijekom sušenja i skladištenja (Picot i Lacroix, 2003).

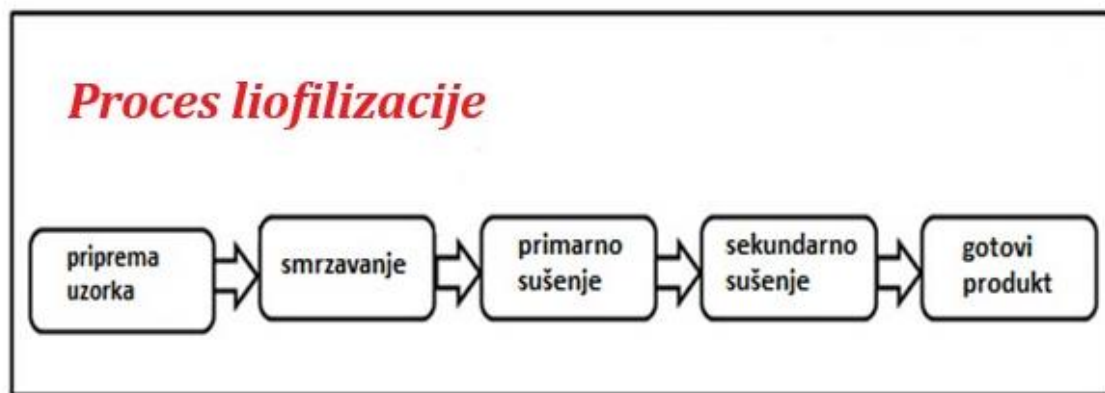
2.2.1.2 Liofilizacija

Liofilizacija je postupak sušenja proizvoda koji se provodi u tri faze: smrzavanje materijala, primarno sušenje (sublimacija) i sekundarno sušenje (desorpcija) (slika 2). Uklanjanjem vode iz uzorka mogu se poboljšati fizička i kemijska stabilnost uzorka. Sam proces liofilizacije može biti vrlo nepoželjan za uzorak te je stoga potrebno optimirati formulacijske i procesne parametre, kako bi se dobio liofilizat željenih svojstava. Liofilizirani produkt odlikuje se većom i dugotrajnijom stabilnošću što omogućava njegovo skladištenje pri sobnoj temperaturi kroz dulji vremenski period.

Proces liofilizacije sastoji se od tri koraka. Prvi korak odnosi se na smrzavanje uzorka do temperature od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Drugi korak je primarno sušenje zamrznutog uzorka koje se temelji na sublimaciji tj. prelasku leda u vodenu paru pri uvjetima sniženog tlaka i temperature. Naime, u komori za sušenje se snižava tlak do vakuuma i dovede tek toliko topline koliko je potrebno za sublimaciju leda. Nakon primarnog sušenja slijedi sekundarno sušenje, tj. desorpcija zaostale vode koja tijekom smrzavanja nije prešla u led. Sekundarno sušenje provodi se pri sobnoj ili povišenim temperaturama, dok se ne dobije produkt s prihvatljivim sadržajem vlage.

Liofilizacijom su stanice 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 nepoželjne uvjete 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 Waalsove 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.



Slika 2. Shematski prikaz procesa liofilizacije (prilagođeno prema Nireesha i sur., 2013)

2.2.2 Izbor nosača za mikroinkapsulaciju

Prilikom mikroinkapsulacije probiotika je također potrebno razmotriti kemijsku prirodu materijala za prekrivanje tj. nosača. Nosači za mikroinkapsulaciju se mogu koristiti pojedinačno ili u kombinaciji kako bi stvorili monoslojni materijal. Istraživanjem je dokazano kako mikroinkapsulacijske tehnike povećavaju vijabilnost probiotika unutar namirnica kao i tijekom njihovog prolaska kroz gastrointestinalni trakt (Chandramouli i sur., 2004). Također, učinkovitost bilo kojeg materijala ne ovisi samo o mogućnosti tvorbi kapsula, čvrstoći kao i poboljšanju održivosti mikroba, već i o njegovoj cijeni, dostupnosti i biokompatibilnosti. Mnogi materijali su korišteni za imobilizaciju bakterija, poput polisaharidnih gelova (škrob, celuloza, alginat, pektin, karagenan i kitozan), proteina (soja, proteini sirutke, kazein, želatina i β – laktoglobulin) i lipida (vosak) (Imran i sur., 2010; Rokka i Rantamäki, 2010; Reid i sur., 2007). 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 tvore gel na temelju ionske izmjene s kalcijevim ionima, dok karagenan i ksantan tvore gelove promjenom temperature. U tablici 1 je prikazan zaštitni učinak mikroinkapsulacije različitih probiotičkih sojeva korištenjem nosača na bazi alginata, tijekom izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (Bakr Shori, 2017).

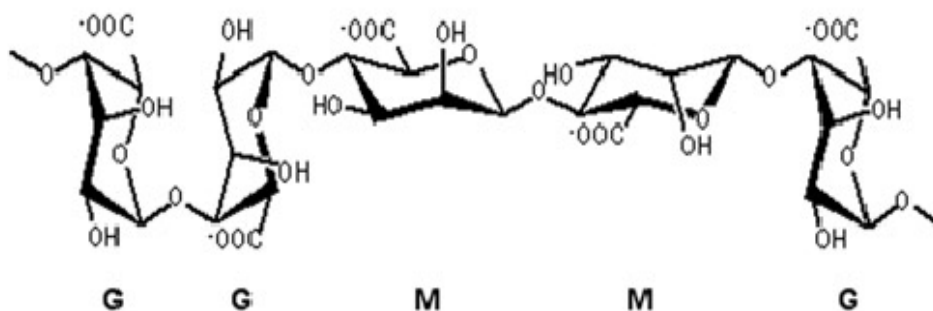
Pored zaštitnog utjecaja materijala nosača putem kojeg se sprječava bakterijska degradacija u gastrointestinalnom traktu, poželjno je izabrati materijal s prikladnim biokemijskim karakteristikama. Na primjer, odlične adhezivne karakteristike su tipične za hidrofilne polimere poput alginata i kitozana i ove karakteristike su važne za poboljšanje *in situ* preživljavanja bakterija u gastrointestinalnom traktu (Chen i sur., 2013; Gombotz i Wee, 2012). Hidrofilni polimeri imaju nabijene i neinonske funkcionalne skupine sposobne za formiranje vodikovih veza s mukoznom površinom (Khutoryanskiy, 2011; Dhawan i sur., 2004).

Tablica 1. Prikaz učinka mikroinkapsulacije, s nosačima na bazi alginata, na preživljavanje probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (Bakr Shori, 2017)

Probiotik	Vrsta inkapsulacijskog materijala	Postotak preživljavanja (%)	Vrijeme inkubacije u GIT-u (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	51	120	Su i sur., 2011
<i>B. adolescentis</i> 15703T	Želatinizirane mikrokapsule s alginatom	30	120	Annan i sur., 2008

2.2.2.1 Alginat

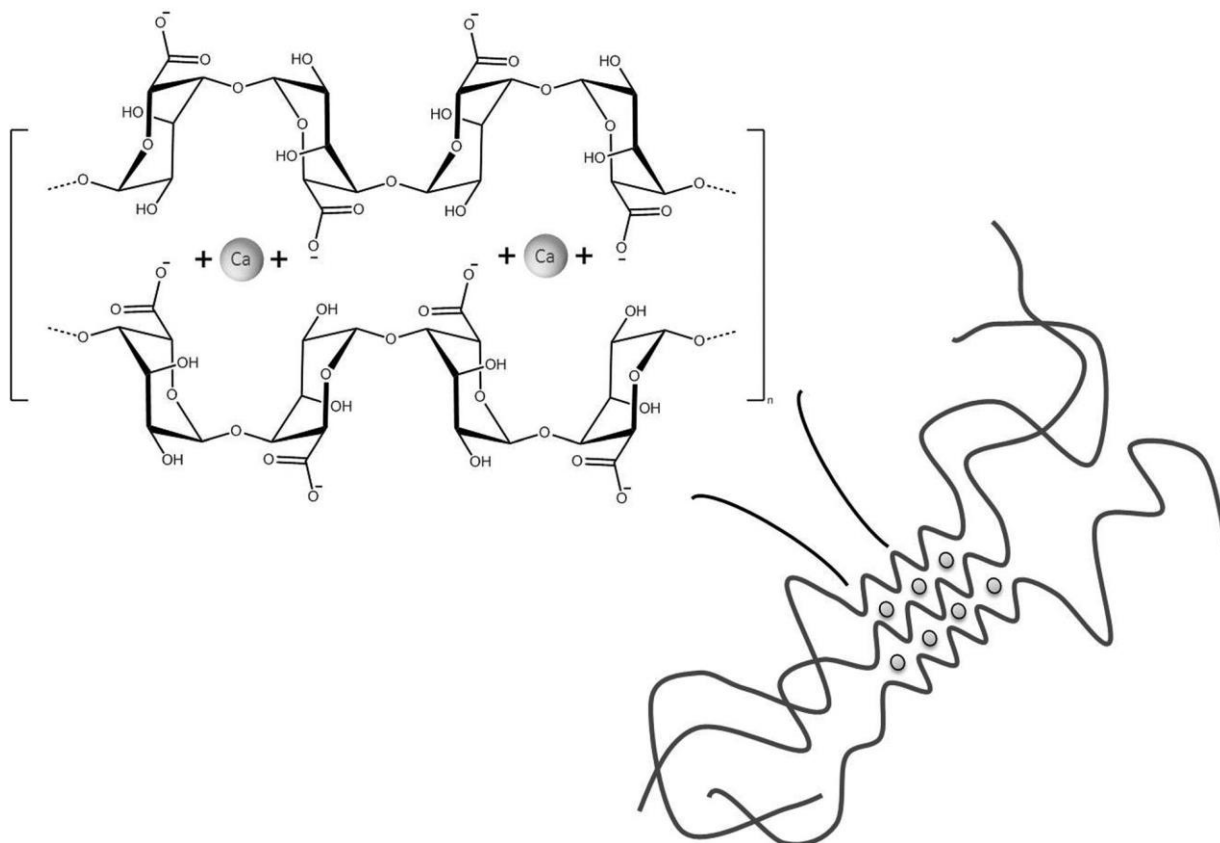
Alginat je linearni, nerazgranati polisaharid čije građevne blokove čine β-D-manuronska kiselina (M) i njezin C-5 epimer α-L-guluronska kiselina (G), povezane 1,4 glikozidnom vezom. Građevni šećerni ostaci organizirani su u homopolimerne poli(β-D-manusiluronat) i poli(α-L-gulosiluronat) i heteropolimerne blokove (slika 3). Kopolimerna struktura dokazana je parcijalnom kiselim hidrolizom alginatnog lanca kojom su dobivene tri frakcije od kojih su dvije sadržavale homopolimerne strukture (G i M blokovi) dok je treća sadržavala veliki broj dimernih struktura (MG blokovi) (Draget i sur., 2005).



Slika 3. Primjer građevnih blokova biopolimernog lanca alginata (Draget i sur., 2005)

Kemijski sastav alginata ovisi o vrsti smeđe alge te o njezinom mikrokolišu, ali i o tkivu alge iz koje je izoliran. Ovisno o duljini, udjelu i raspodjeli građevnih jedinica, razlikuju se fizička svojstva alginata. MM i MG građevni blokovi pridonose fleksibilnosti polisaharidnog lanca i to redom $GG < MM < MG$, dok se porastom udjela G blokova povećava sposobnost geliranja te čvrstoća samoga gela (Murillo-Álvarez i Hernández-Carmona, 2007). Viskoznost otopine najvećim je dijelom ovisna o duljini polimernog lanca, dok gelirajuća svojstva i sposobnost vezivanja vode ovisni o udjelu α -L-guluronske kiseline (Ertesvåg i Valla, 1998). Alginat, kao i ostali polisaharidi, nemaju točno definiranu molekulsku masu stoga se ona izražava kao prosjek ukupne raspodjele molekulskih masa polimera (Draget, 2009).

Sve građevne jedinice alginatnog lanca su polianionske te stvaraju intermolekularne ionske veze s dvovalentnim kationima kao što su Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , itd. Pored svojstva stvaranja intermolekularnih ionskih veza, guluronatni ostaci alginatnog lanca imaju i svojstvo keliranja metalnih iona zbog prostornog rasporeda hidroksilnih skupina šećera. Zbog toga poliguluronatne strukture stvaraju mnogo čvršće veze s metalnim ionima te posljedično tvore i gelove jače strukture. Naime, kalcijevi ioni uliježu u prostorne strukture poliguluronatnih blokova (engl. "egg box" struktura; slika 4). Svaki Ca^{2+} ion koordiniran je s hidroksilnim i karboksilnim skupinama s dva GG bloka dva susjedna alginatna lanca, što dovodi do stvaranja dimera koji su zbog elektrostatskog odbijanja karboksilnih skupina postavljeni jedan prema drugome pod kutom od približno 90° . Na taj se način polimerni lanci prostorno približavaju te tvore zone povezivanja što rezultira geliranjem otopine alginata (Onsøyen, 2001).



Slika 4. Shematski prikaz formiranja alginatnog gela po modelu "egg box"
(Corona-Hernandez i sur., 2013)

2.2.3 Otpornost mikroinkapsuliranih probiotičkih bakterija na uvjete u GI traktu

Rezistentnost različitih probiotičkih bakterija, sa ili bez mikroinkapsulacije, na simultane promjene pH vrijednosti kao i njihovo ponašanje u prisustvu želučanog soka je također istraženo. Mokarram i sur. (2009) su istraživali utjecaj brojnih, nanesenih slojeva alginata na preživljavanje *Lactobacillus* sojeva pri simuliranim GI uvjetima. U tom istraživanju, prilikom mikroinkapsulacije s dvostrukim slojem alginata (približne debljine 100 μm) je utvrđeno kako alginat omogućuje najbolju zaštitu bez gubitka preživljavanja za bakterije prilikom utjecaja želučanog soka (pH vrijednost 1,5 tijekom 2 sata) i u instestinalnim uvjetima (pH vrijednost 7,25 tijekom 2 sata). Chandramouli i sur. (2004) te Kim i sur. (2008) su također pokazali kako mikroinkapsulacija s alginatom povećava mogućnost preživljavanja *Lactobacillus* sojeva u GI uvjetima. Lyer i Kailasapathy (2005) su pokazali kako se broj živih stanica mikroinkapsuliranih laktobacila s 1 ili 2 sloja kitozana i rezistentnog škroba u simuliranim GI uvjetima smanjio u

rasponu od 1×10^2 do 3×10^3 CFU / g, dok je gubitak kod nekapsuliranog laktobacila iznosio 1×10^5 CFU / g.

Ding i Shah (2009) su ispitali učinak kiseline (pH 2,0) na preživljavanje (10^{10} CFU / g) laktobacila. Bakterije iz roda *Lactobacillus* su pokazale najveću tolerantnost (10^5 do 10^8 CFU / g) na kisele uvjete (pH 2,0 tijekom 2 sata) i žučne soli (tauroholične kiseline), osobito one mikroinkapsulirane u alginatu.

Otpornost bakterija na utjecaj žučnih soli također ovisi o tipu primijenjenog nosača za mikroinkapsulaciju. Murata i sur. (1999) su prekrili kitozan sa alginatom i uočili kako kitozan ima mogućnost vezivanja za žučne soli. Ovaj podatak može indicirati kako se učinkovitost alginata prilikom zaštite probiotika unutar njegovog matriksa može sniziti zbog nepravilne selekcije drugog materijala, kao što je bio slučaj prilikom izbora kitozana. Ipak, formiranje netopljivog kompleksa između kitozana i žučnih soli se odvija na površini mikročestica kitozana i alginata. Stoga, moguće je ograničiti difuziju žučnih soli u srž matriksa, pri čemu se štite probiotičke bakterije od njihovog međudjelovanja sa žučnim solima (Koo i sur., 2001; Yu i sur., 2001). Lucinda – Silva i Evangelista (2005) su pripremili mikrokapsule alginata i kitozana i uočili sniženje njihove električne provodljivosti, što ukazuje na visoku razinu koordiniranosti između ovih materijala, pri omjerima od 1 : 1,5 do 1 : 1,7. Ovim, uravnoteženi omjer prekrivnog materijala postaje ključan kako bi se snizio broj nekonjugiranih funkcionalnih skupina, a koje su slobodne vezati bakterijsku staničnu stijenu.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Radni mikroorganizam:

Lactobacillus fermentum D12

3.1.2 Hranjive podloge

U radu je korištena hranjiva podloga za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašчев 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
- Agaroza, „Appligane“, Francuska
- Alginat, „Fluka“, Švicarska
- Destilirana voda
- dNTP, „Invitrogen“, SAD
- Etanol, „Kemika“, Hrvatska
- Etidijev bromid, „Boehringer Mannheim gmbh“, Mainheim
- Fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- Genomic Wizard kit za izolaciju DNA, „Promega“, SAD
- Glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- Goveda žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- Inulin uz fruktooligosaharide (FOS), „Magdis d.o.o.“, Hrvatska

- Izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- Kalcijev klorid, „Fluka“, Švicarska
- Klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- Kvaščev ekstrakt, „Difco“, SAD
- Laktuloza, „Calbiochem“, SAD
- Lizozim, „Eurobio“, Francuska
- Magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija
- Manitol, „Difco“, SAD
- Mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija
- $MgCl_2$ „Biosystems“, SAD
- Natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev citrat, „T.T.T.“, Hrvatska
- Natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- Natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- 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
- Pufer bez $MgCl_2$ „Biosystems“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- Taq polimeraza, „Biosystems“, SAD
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- Tween 80, „Sigma“, SAD
- „Nuclease free“ voda, „Ambion“, SAD
- λ DNA hindiii standard, „Fermentas“, Kanada

3.1.4 Aparatura i pribor

- Autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- Automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- Centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- DNA-termoblok, Mastercyclerpersonal, „Eppendorf“
- Elektroforetska kadica, „BioRad“, SAD
- Ependorfe
- 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 ependorfe
- 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
- Zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2 METODE RADA

3.2.1 Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Soj *Lactobacillus fermentum* D12 čuvan je pri -80°C (New Brunswick Scientific, SAD) u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola (Alkaloid, Makedonija). Dan prije eksperimenta soj je inokuliran u svježu hranjivu podlogu te inkubiran pri optimalnoj temperaturi rasta (37°C).

3.2.2 Izolacija kromosomske DNA

Volumen od 1,5 mL prekonoćne kulture *Lactobacillus fermentum* D12 je centrifugiran 10 min pri 9000 o/min i resuspendiran u 1 mL GTE pufera (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice su resuspendirane u 500 μL otopine GTE pufera, lizozima (8 mg/500 μl) i RNA-ze (50 $\mu\text{l/ml}$), i inkubirane 30 minuta pri 37°C . Zatim je dodano 250 μL SDS-a (2%) i vorteksirano 1 min. Nakon toga je dodano 100 μL neutralnog fenol-kloroforma, vorteksirano 30 sekundi i centrifugirano pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Supernatant, bez interfaze, je pomiješan s 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8), i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) je slijedilo centrifugiranje na 13 000 o/min tijekom 10 minuta. Talog je resuspendiran u 300 μL otopine 0,3 M NaAc i 10 mM MgCl_2 te vorteksiran. Nakon dodatka 700 μL apsolutnog etanola (ohlađenog na -20°C), uzorak je inkubiran preko noći pri -20°C . Nakon toga je slijedilo centrifugiranje pri 14000 o/min tijekom 20 minuta. Talog je suspendiran u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na -20°C) i ponovno centrifugiran pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Talog DNA je resuspendiran u 25 μL TE (10 mM Tris (pH 7,8) i 1 mM EDTA) pufera.

3.2.3 Identifikacija soja *Lb. fermentum* D12 primjenom sekvencioniranja cijelog genoma

Sekvencioniranje genoma probiotičkog soja *Lb. fermentum* D12 provedeno je u tvrtki IGA Technology, Udine, Italija. Uzorci za sekvencioniranje su pripremljeni prema uputama proizvođača i sekvencionirani na uređaju MiSeq2500 (Illumina, SAD). Za procesiranje podataka korištena je verzija CASAVA 1.8.2. Anotacija sekvenci provedena je primjenom RAST servera (Aziz i sur., 2008).

3.2.4 Mikroinkapsulacija soja *Lb. fermentum* D12 u alginatu uz dodatak različitih prebiotika

Prekonoćna kultura soja *Lb. fermentum* D12 inokulirana je u 300 ml MRS bujona pri 37°C. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min (4°C), a zatim isprane dva puta s 10 ml fiziološke otopine. Talog stanica nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom resuspendiran je u istom volumenu 2%-tne (v/w) otopine natrijeva alginata (Fluka, Švicarka). S ciljem što duljeg preživljavanja mikroinkapsuliranog i liofiliziranog probiotičkog soja D12, u 2%-tnu (v/w) otopinu natrijeva alginata dodane su različite vrste prebiotika; inulin uz fruktooligosaharide (FOS) (Magdis d.o.o., Hrvatska), manitol (Difco, SAD) i laktuloza (Calbiochem, SAD) u konačnoj koncentraciji od 5% (w/v). Kao kontrola je korišten mikroinkapsulirani soj *Lb. fermentum* D12 u koji nije dodan niti jedan od navedenih prebiotika. Smjesa bakterijskih stanica i alginata (i prebiotika) postepeno je dodana u 1%-tnu otopinu kalcijeva klorida uz miješanje na magnetnoj mješalici (IKA-Werke GmbH & Co, Njemačka), prilikom čega dolazi do formiranja mikrokapsula. Kuglice su ostavljene 1 sat na tresilici (New Brunswick Scientific, SAD) da očvrstnu, nakon čega je uslijedilo ispiranje dva puta sa fiziološkom otopinom i određivanja broja mikroinkapsuliranih stanica oslobađanjem iz mikrokapsula pomoću 2%-tnog (v/w) Na-citrata (T.T.T., Hrvatska) (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, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica.

Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (eng. Encapsulation Yield, EY), odnosno broj živih stanica prije i poslije mikroinkapsulacije je izračunat prema dolje navedenoj formuli, gdje je N broj živih mikroinkapsuliranih stanica, a N₀ broj slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks (alginat):

$$EY = \frac{N}{N_0} \times 100$$

3.2.5 Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica *Lb. fermentum* D12 u alginatu uz dodatak različitih prebiotika i obranog mlijeka kao lioprotektora

Provedena je liofilizacija uzoraka mikroinkapsuliranih u alginatu uz dodatak različitih prebiotika (inulin uz FOS, manitol, laktuloza) i dodatak obranog mlijeka (10% w/v) (Fluka, Njemačka) kao lioprotektora. Kao kontrole su korišteni mikroinkapsulirani uzorak u koji nije dodan niti jedan prebiotik, liofiliziran uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora i mikroinkapsulirani uzorak u koji nije dodan niti jedan prebiotik, liofiliziran bez dodatka lioprotektora, odnosno u koji je dodana fiziološka otopina. Uzorci su zamrznuti na -80°C preko noći, nakon čega je proveden proces liofilizacije u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“. Ispitivanje broja preživljenih mikroinkapsuliranih stanica provedeno je tjedan dana nakon postupka mikroinkapsulacije, te nakon 1, 2 i 3 mjeseca skladištenja na 4°C . Oslobođanje stanica iz liofiliziranih mikrokapsula provedeno je pomoću 2%-tnog (v/w) Na-citrata (T.T.T., Hrvatska) (prilagođeno prema Li i sur., 2009). Broj stanica je određen indirektnom metodom, odnosno nacjeppljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi ($10\ \mu\text{L}$) 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 i liofiliziranih stanica.

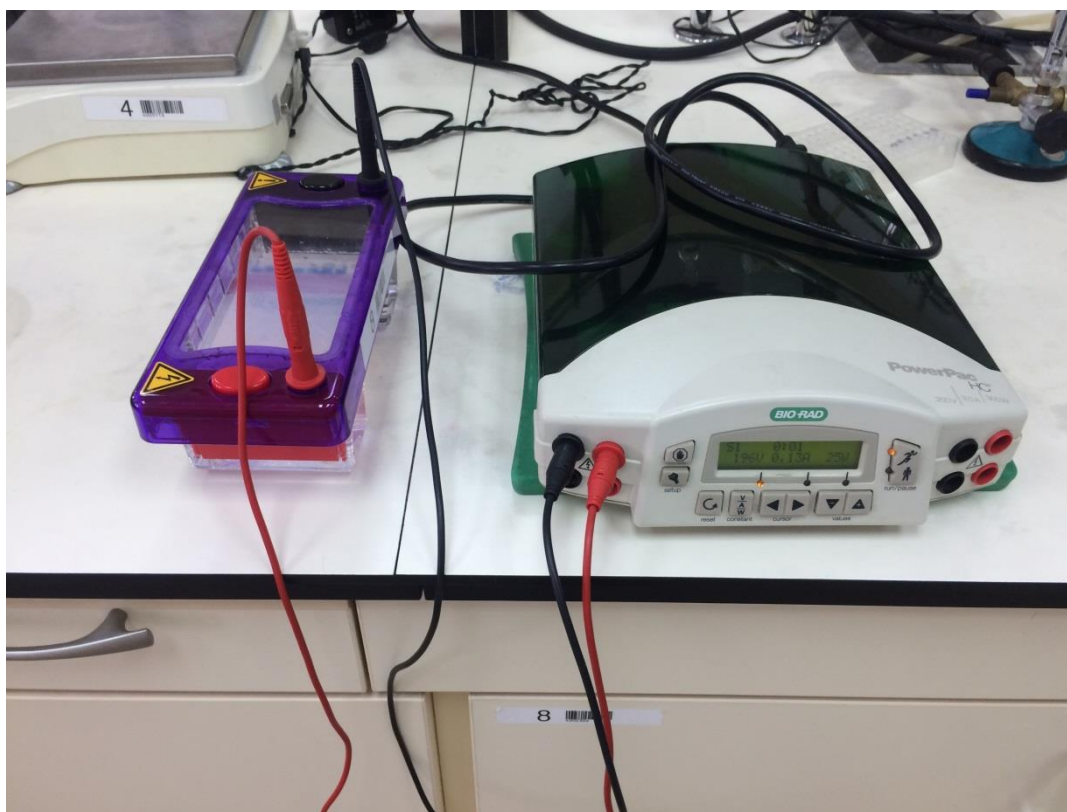
3.2.5.1 Detekcija prisutnosti soja *Lb. fermentum* D12 u mikrokapsulama RAPD-PCR metodom

U svrhu utvrđivanja prisutnosti čiste kulture bakterijskih stanica probiotičkog soja *Lb. fermentum* D12 u dobivenim mikrokapsulama, provedena je izolacija DNA iz kolonija poraslih na MRS pločama pomoću Genomic Wizard kita (Promega, SAD) koja je poslužila kao kalup za RAPD-PCR reakciju s početnicom M13 ($5'$ -GAGGGTGGCGGTTCT- $3'$) (Martín-Platero i sur., 2008). Reakcijska smjesa sastojala se od DNA, početnice M13, pufera bez MgCl_2 (Biosystems, SAD), MgCl_2 (Biosystems, SAD), dNTP (Invitrogen, SAD), Taq polimeraze (Biosystems, SAD) i „nuclease free“ vode (Ambion, SAD). Kao kontrola je korišten DNA kalup soja *Lb. fermentum* D12 (1.2.2.), a 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 2 u DNA-termobloku, Mastercyclerpersonal, „Eppendorf“, nakon čega su dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 150 V tijekom 1 sata (slika 5). Gel je obojan u

etidijevom bromidu, koncentracije 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 2. Uvjeti provođenja PCR reakcije s M13 početnicom za RAPD-PCR

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



Slika 5. Prikaz aparature za elektroforezu

3.2.6 Preživljavanje *Lb. fermentum* D12 mikroinkapsuliranog u alginatu uz dodatak različitih prebiotika i liofiliziranog u obranom mlijeku tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta

3.2.6.1 *Priprava simuliranoga želučanog soka i simuliranoga soka tankog crijeva*

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) (Sigma, SAD) u 0,5% otopini natrijevog klorida (Kemika, Hrvatska), kojoj je pH vrijednost podešena na 2,0 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom (Sigma-Aldrich, SAD). Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) (Fluka, Švicarska) i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) (Difco, SAD) u 0,5% otopini natrijeva klorida, kojoj je pH vrijednost podešena na 8,0 s natrijevom lužinom (Kemika, Hrvatska) (Kos, 2001).

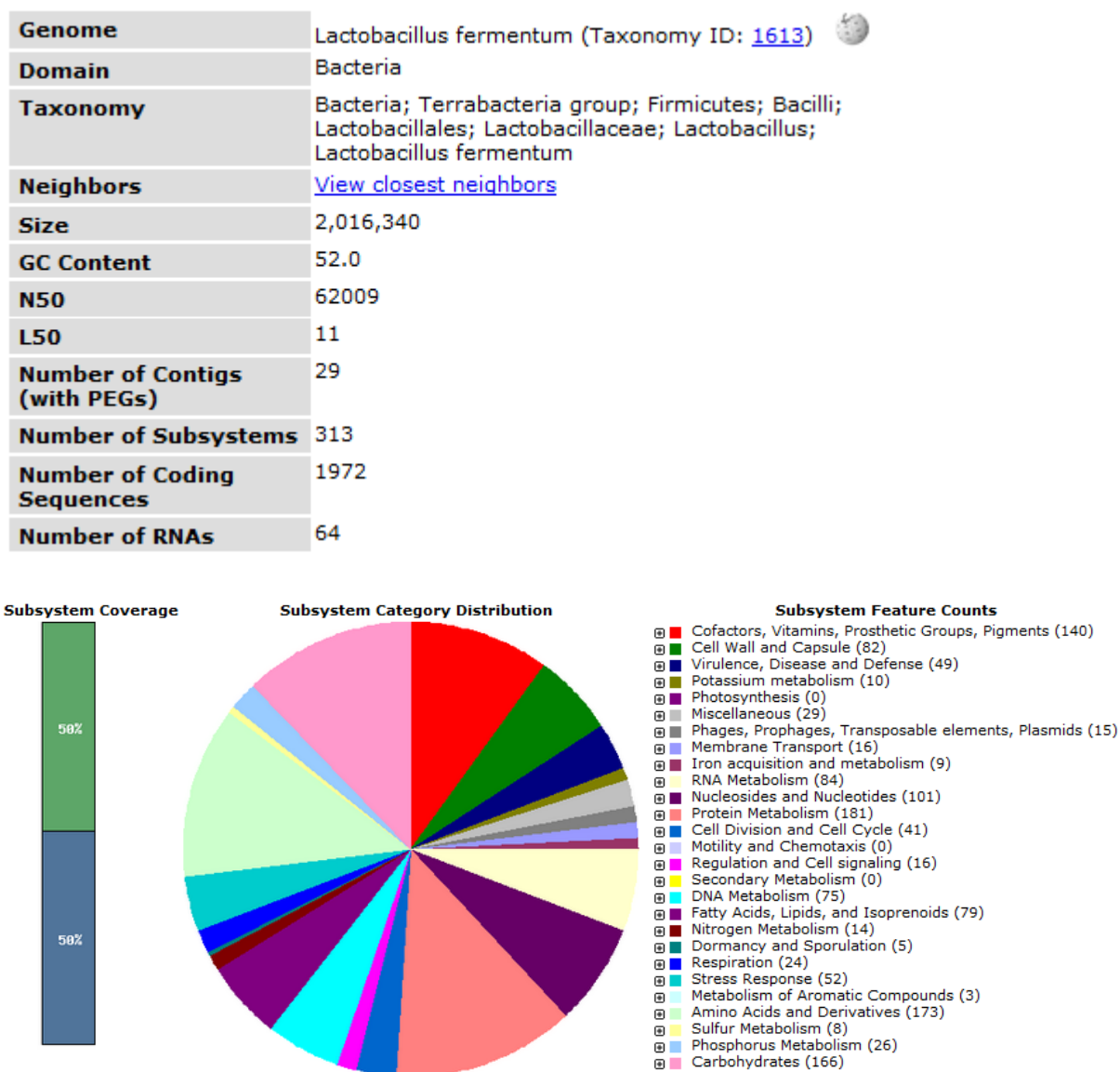
3.2.6.2 *Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankoga crijeva na preživljavanje *Lb. fermentum* D12 mikroinkapsuliranog u alginatu uz dodatak različitih prebiotika i liofiliziranog uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora*

Stanice soja *Lb. fermentum* D12, mikroinkapsulirane u alginatu uz dodatak različitih prebiotika (inulin uz fruktooligosaharide, manitol te laktuloza) i liofilizirane uz dodatak obranog mlijeka (10%) kao lioprotektora, su izložene djelovanju želučanog soka (pH=2) tijekom 2 sata, a zatim su centrifugirane pri 3500 o/min i resuspendirane u simuliranom soku tankoga crijeva (3 mg/mL goveđe žuči) tijekom 3 sata (Kos, 2001). Oslobođanje stanica iz liofiliziranih mikrokapsula provedeno je pomoću 2%-tnog (v/w) Na-citrata (T.T.T., Hrvatska) (prilagođeno prema Li i sur., 2009). Isti postupak je napravljen i s kontrolama, odnosno s mikroinkapsuliranim uzorkom u koji nije dodan niti jedan prebiotik, liofiliziran uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora i nemikroinkapsuliranim uzorkom, liofiliziran bez dodatka lioprotektora, odnosno uz dodatak fiziološke otopina. Broj stanica je određen 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 i liofiliziranih stanica.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Identifikacija soja *Lb. fermentum* D12 primjenom sekvencioniranja genoma

Anotacija sekvence analiziranog *Lb. fermentum* D12 soja provedena je primjenom RAST servera, na kojem su pohranjeni i dostupni podaci o sekvencioniranom genomu. Pregled informacija o distribuciji te kategorizaciji svih sekvencioniranih gena nalazi se na slici 6.



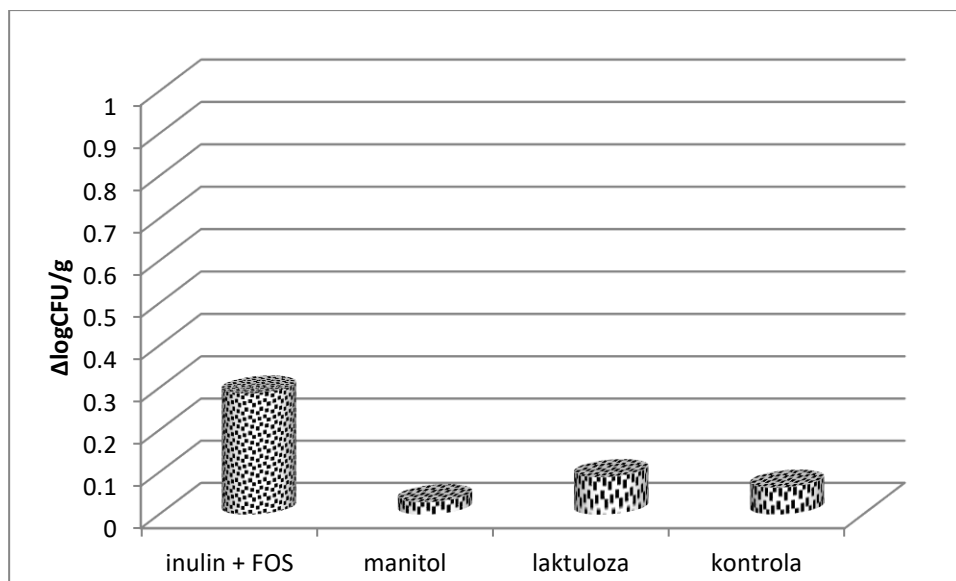
Slika 6. Pregled informacija o distribuciji te kategorizaciji sekvencioniranih gena soja *Lactobacillus fermentum* D12

Sekvencioniranje genoma probiotičkog soja, *Lb. fermentum* D12 provedeno je u tvrtki IGA Technology, Udine, Italija.

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine grupu bakterija koje previranjem različitih izvora ugljika proizvode mliječnu kiselinu (Šušković i sur., 1998). DNA bakterije mliječne kiseline sadržava manje od 55% udjela G+C parova baza. Na slici 6 je vidljivo da ispitivani probiotički soj *Lb. fermentum* D12 sadrži 52% G+C parova baza.

4.2 Mikroinkapsulacija i liofilizacija soja *Lactobacillus fermentum* D12

U ovom radu ispitano je preživljavanje soja *Lb. fermentum* D12 procesom mikroinkapsulacije u alginatu uz dodatak različitih prebiotika (inulin uz FOS, manitol, laktuloza) (slike 7 i 8). Alginat je prirodni polimer koji se uspješno primjenjuje kao nosač za mikroinkapsulaciju probiotičkih bakterija (Bakr Shori, 2017). Također on je najčešće korišten nosač u industrijskoj primjeni.



Slika 7. Usporedba učinkovitosti mikroinkapsulacije *Lactobacillus fermentum* D12 u alginatu uz dodatak različitih prebiotika (inulin uz FOS, manitol, laktuloza) i kontrole u koju nije dodan niti jedan prebiotik, izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log \text{CFU/g}$) prije i nakon postupka mikroinkapsulacije

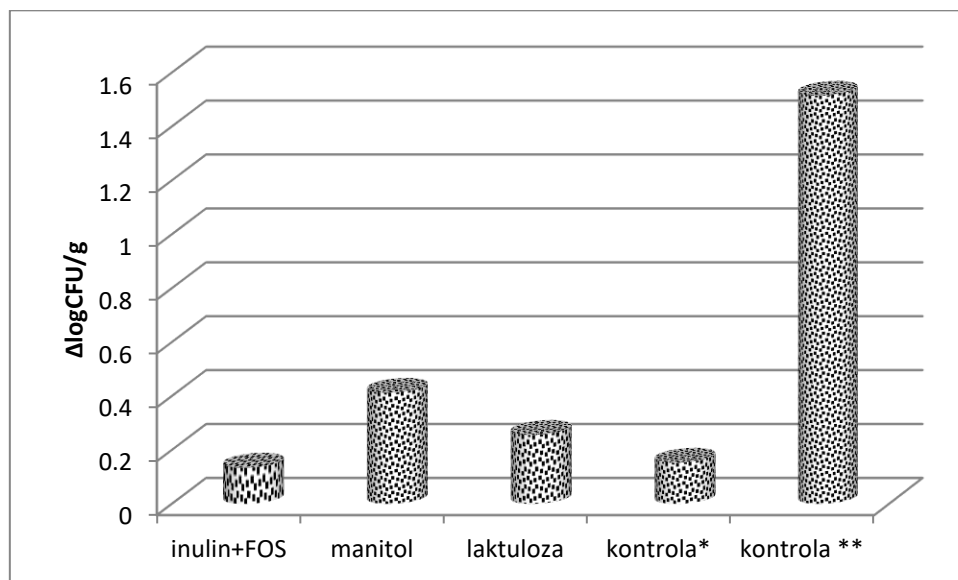
Nakon provedene mikroinkapsulacije probiotičkog soja *Lb. fermentum* u alginatu može se zaključiti da je jako dobra učinkovitost mikroinkapsulacije uz dodatak bilo kojeg od gore navedenih prebiotika. Učinkovitost, izražena kao postotak (%) dijeljenja logaritamskih vrijednosti triju paralela broja živih mikroinkapsuliranih stanica (N) i broja slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks alginat (N₀) uz dodatak različitih prebiotika, iznosila je preko 97%. Time je i dokazana jako dobra učinkovitost alginata kao nosača za mikroinkapsulaciju.



Slika 8. Prikaz mikroinkapsuliranog soja *Lactobacillus fermentum* D12 (uz dodatak različitih prebiotika)

Alginat je vrlo često korišteni biopolimer za mikroinkapsulaciju. Posjeduje svojstva zadržavanja vode, stvaranja gelova i filmova, sposobnost stabilizacije emulzija i disperzija te brojne druge poželjne karakteristike (Draget i sur., 2005). 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). Ipak, ti nedostaci

se mogu nadoknaditi miješanjem alginata s drugim polimernim spojevima. Primjer miješanje alginata s drugim polimerima je korištenje u kombinaciji s kitozanom.



Slika 9. Usporedba preživljavanja mikroinkapsuliranog probiotičkog soja *Lb. fermentum* D12 u alginatu, uz dodatak različitih prebiotika (inulin uz FOS, manitol, laktuloza), nakon procesa liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora. Kontrola* - mikroinkapsuliran soj D12 bez dodatka prebiotika, liofiliziran uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora i kontrola** - mikroinkapsuliran soj D12 bez dodatka prebiotika, liofiliziran bez dodatka lioprotektora, odnosno uz dodatak fiziološke otopine. Rezultati su prikazani kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta\log$ CFU/g) prije i nakon procesa liofilizacije.

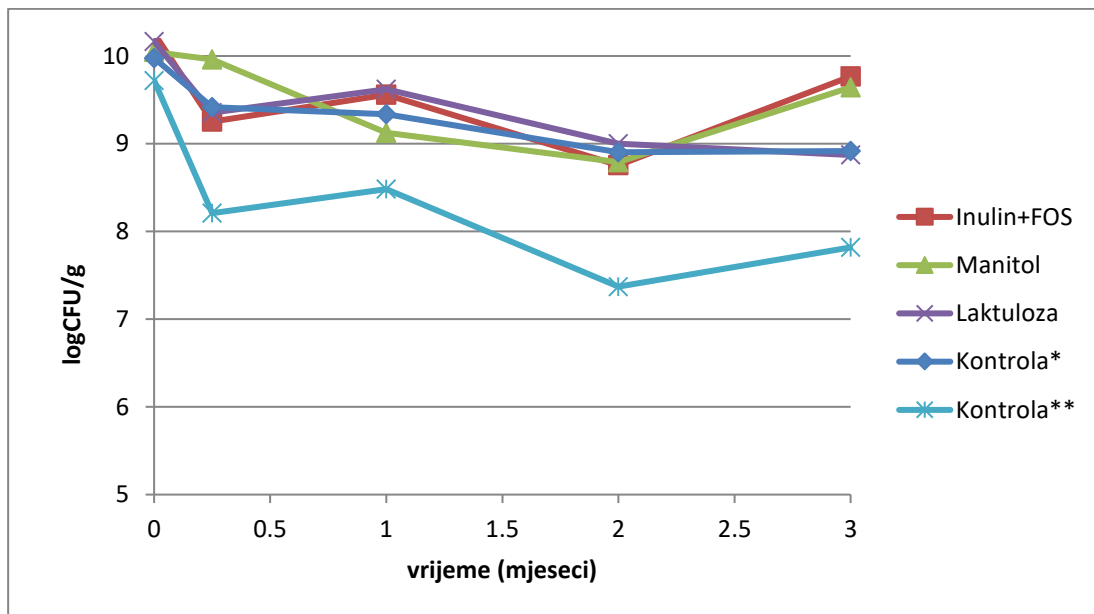
Na slici 9 je prikazan učinak liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora. Dokazan je protektivni učinak lioprotektora zato što su stanice probiotičkog soja *Lb. fermentum* D12 jako dobro preživjele proces liofilizacije, a kontrola** koja je liofilizirana bez dodatka lioprotektora prikazuje veću smrtnost stanica.

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).

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). Proces liofilizacije potrebno je

optimirati. Naime, tijekom postupaka smrzavanja i sušenja dolazi do naprezanja sustava pa da bi se bakterijski pripravak zaštitio od nepoželjnih uvjeta tijekom liofilizacije, koriste se različiti lioprotektori. Kao najčešći lioprotektori sa svrhom krio/lioprotekcije koriste se 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 je kao lioprotektor za bakterijski soj *Lb. fermentum* D12 korišteno obrano mlijeko jer je u prijašnjim istraživanjima uz taj lioprotektor bila najmanja smrtnost stanica. Dobiveni rezultat istraživanja je da proces mikroinkapsulacije s alginskom kiselinom kao nosačem uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora rezultira s visokom stopom preživljavanja ispitivanog bakterijskog soja.

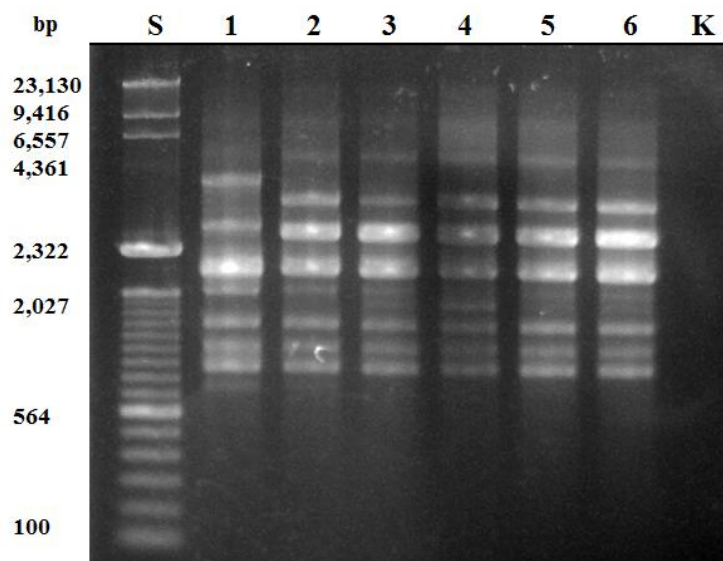


Slika 10. Određivanje broja živih bakterijskih stanica u mikroinkapsuliranim liofiliziranim pripravcima soja *Lb. fermentum* D12 neposredno nakon proizvodnje te nakon 1, 2 i 3 mjeseca čuvanja. Kontrola* - mikroinkapsulirane bakterijske stanice soja D12 u alginatu, nakon liofilizacije u obranom mlijeku i kontrola** - mikroinkapsulirane bakterijske stanice soja D12 u alginatu, liofilizirane uz dodatak fiziološke otopine.

Slika 10 prikazuje utjecaj inulina uz dodatak FOS, zatim manitola i konačno laktuloze na preživljavanje bakterijskih stanica u mikroinkapsuliranim i liofiliziranim pripravcima soja *Lb.*

fermentum D12. Ispitano je preživljavanje neposredno nakon proizvodnje te nakon 1, 2 i 3 mjeseca čuvanja bakterijskih pripravaka. Prema rezultatima, broj poraslih bakterijskih kolonija (CFU/ml) određen u uzorcima gdje je mikroinkapsulacija bakterijskih stanica D12 provedena uz dodatak pojedinih prebiotika bio je veći u usporedbi s kontrolnim uzorcima bez dodatka prebiotika i kada su bakterijske stanice liofilizirane bez lioprotektora. Ovakvi rezultati ukazuju na pozitivan učinak prebiotika koji možda ima ulogu selektivnog prebiotičkog supstrata, te na zaštitni učinak obranog mlijeka kao lioprotektora koji štiti bakterijske stanice od štetnog utjecaja liofilizacije. Naime tijekom procesa liofilizacije bakterijske stanice se izlažu naglim promjenama okolišnih uvjeta, jer se bakterijska suspenzija naglo zamrzava u tankom sloju pri temperaturi od -15°C do -70°C i zatim suši u vakuumu pri vrlo niskim temperaturama (sublimacija).

Broj stanica je određen indirektnom metodom, odnosno naciepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u dvije paralele. Nakon 48 sati inkubacije pri 37°C u aneobnim uvjetima, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica po gramu (CFU/g) mikroinkapsuliranih stanica.



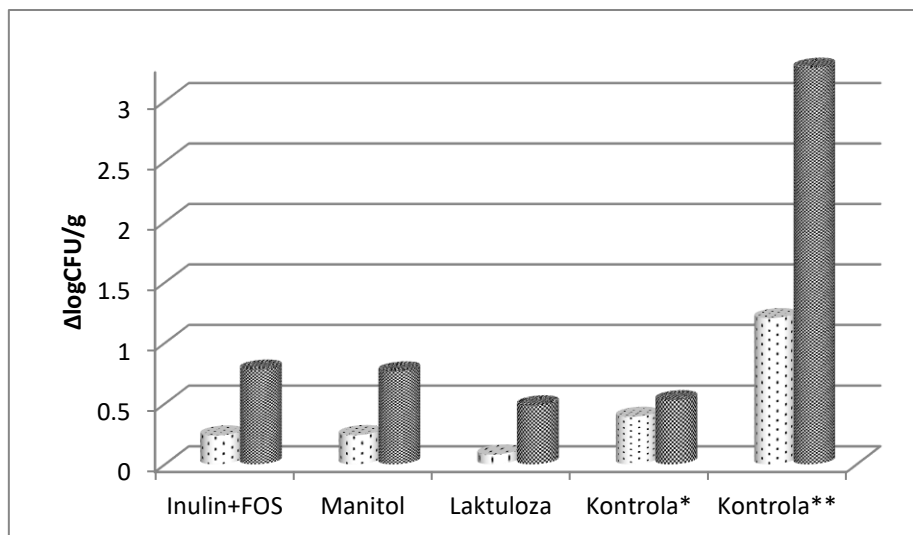
Slika 11. DNA elektroforeza PCR produkata dobivenih RAPD metodom s početnicom M13. **S** – standard, **1** – *L. fermentum* D12, **2** – pripravak mikroinkapsuliran u alginatu i liofiliziran u fiziološkoj otopini, **3** - pripravak mikroinkapsuliran u alginatu i liofiliziran u obranom mlijeku, **4** - pripravak mikroinkapsuliran u alginatu (inulin +FOS) i liofiliziran u obranom mlijeku, **5** - pripravak mikroinkapsuliran u alginatu (laktuloza) i liofiliziran u obranom mlijeku, **6** - pripravak mikroinkapsuliran u alginatu (manitol) i liofiliziran u obranom mlijeku, **K**-kontrola.

RAPD metoda omogućava razlikovanje genetički različitih bakterijskih sojeva bez poznavanja njihove genomske sekvence. Za provođenje RAPD reakcije se koriste proizvoljne, kratke početnice veličine od 8 do 12 nukleotida. Polimorfizmi u sekvencama DNA različitih bakterija se mogu detektirati zahvaljujući varijacijama u mjestima vezanja početnica na DNA te zbog razlika u duljinama ampliciranih fragmenata. Na temelju položaja DNA vrpce na gelu nakon provedene RAPD metode, mogu se vidjeti razlike među pojedinim sojevima. Za potvrdu prisutnosti čiste kulture D12 u priređenim pripravcima korištena je RAPD metoda. Na slici 11 su prikazani fragmenti DNA bakterijskog soja *Lb. fermentum* D12. 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. Također, vidljiv je jednak profil svih elektroforetskih bendova i to je pokazatelj da se u svakom mikroinkapsuliranom uzorku nalazi ispitivani soj *Lb. fermentum* D12.

4.3 Preživljavanje mikroinkapsuliranog i liofiliziranog soja *Lb. fermentum* D12 tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta

Istraživanje je nastavljeno ispitivanjem preživljavanja mikroinkapsuliranog i liofiliziranog soja, u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta kao ciljno mjesto djelovanja probiotičkih sojeva.

Da bi probiotičke 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, soj mora biti otporan na prisutnost pepsina i niskih pH vrijednosti u želucu, prisutnost enzima u tankom crijevu i antimikrobnu aktivnost žučnih soli (Masco i sur., 2007). Budući da su to sve nepoželjni uvjeti za bakterijske stanice, u ovom radu je ispitana zaštitna uloga liofilizacije i mikroinkapsulacije tijekom izlaganja bakterijskog soja *Lb. fermentum* D12 simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.



Slika 12. Usporedba smrtnosti mikroinkapsuliranih stanica *Lactobacillus fermentum* D12 u alginatu uz dodatak različitih prebiotika (inulin uz FOS, manitol, laktuloza), nakon izlaganja simuliranim uvjetima želučanog soka (•••) i simuliranim uvjetima cijelog gastrointestinalnog trakta (želučani sok i tanko crijevo) (■). Kontrola* - mikroinkapsulirani soj D12 bez dodatka prebiotika, liofiliziran uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora i kontrola** - ne-mikroinkapsulirani soj D12 liofiliziran bez dodataka lioprotektora, odnosno uz dodatak fiziološke otopine.

Rezultati pokazuju kako je veće preživljavanje bakterijskog soja samo nakon prolaska kroz želučani sok nego nakon izlaganja simuliranim uvjetima cijelog gastrointestinalnog trakta. Kontrola** tj. slobodne stanice soja D12 liofilizirane bez dodatka lioprotektora prikazuje najveću smrtnost stanica ispitivanog soja i time opet dokazujemo kumulativni učinak postupka mikroinkapsulacije i obranog mlijeka kao lioprotektora.

Mikroinkapsulacija zapravo služi kao način zaštite bakterija od nepovoljnih uvjeta okoline. Glavni stres kojim probiotici mogu biti izloženi je prolazak kroz gastrointestinalni trakt tj. kiselinški stres i izlaganje tvarima koje izlučuje gušterača, kao što su žučne soli i probavni enzimi.

Dobiveni rezultat istraživanja je da proces mikroinkapsulacije s alginatom kao nosačem uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora rezultira s visokom stopom preživljavanja ispitivanog bakterijskog soja.

5. ZAKLJUČCI

1. Proces mikroinkapsulacije s alginatom kao nosačem uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora rezultira s visokom stopom preživljavanja ispitivanog bakterijskog soja *Lactobacillus fermentum* D12.
2. Učinkovitost mikroinkapsulacije uz dodatak prebiotika inulina i fruktooligosaharida, manitola te laktuloze je iznosila preko 97%.
3. Mikroinkapsuliran i liofiliziran soj *Lactobacillus fermentum* D12 je preživio prolazak kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta u visokoj koncentraciji i time je dokazan kumulativni učinak postupka mikroinkapsulacije i obranog mlijeka kao lioprotektora.
4. RAPD-PCR metodom je utvrđena prisutnost čiste kulture soja *Lactobacillus fermentum* D12 u mikrokapsulama.

6. LITERATURA

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

Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., De Jongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formosa, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, **9**:75, 1-15.

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

Borgogna, M., Bellich, B., Zorzini, L., Lapasin, R., Cesàro, A. (2010) Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. *Food Chem.* **122**, 416–423.

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.

Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco (2003) The Intestine And Its Microflora Are Partners For The Protection Of The Host: Report In Danone Symposium The Intelligent Intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 675-683.

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.

- 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 calcium sources. *Food Hydrocoll* **39**, 295-300.
- Carvalho, A. S., Silvia, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2002) Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnol. Lett.* **24**, 1587–1591.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M. (2004) An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J. Microbiol. Methods.* **56(1)**, 27-35.
- Chen, S., Cao, Y., Ferguson, L.R., Shu, Q., Garg, S. (2013) Evaluation of mucoadhesive coatings of chitosan and thiolated chitosan for the colonic delivery of microencapsulated probiotic bacteria. *J. Microencapsul.* **30(2)**, 103–115.
- Chen, K. N., Chen, M. J., Liu, J. R., Lin, C. W., Chiu, H. Y. (2005) Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *J. Food Sci.* **70**, 260-266.
- Corona-Hernandez, R. I., Alvarez-Parilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., de la Rosa, L. A. (2013) Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **12(6)**, 614-628.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. (2002) Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br. J. Nutr.* **87**, 145-151.
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojević, M., Sikkema, J., (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int. Dairy J.* **20**, 292–302.
- Dhawan, S., Singla, A. K., Sinha, V. R. (2004) Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *Pharm. Sci. Technol.* **5(4)**, 122–28.
- Ding, W. K., Shah, N. P. (2009) Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J. Food Sci.* **74(2)**, 100-7.

Draget, K. I. (2009) Alginates. *Woodhead Publ. Ser. Food Sci. Technol. Nutr.* **173**, 807–828.

Draget, K. I., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G. (2005) Alginates from algae. U: *Pollysaccharides and Plyamides in the Food Industry. Properties, Production, and Patents.* Steinbuchel, A., Rhee, S.K., Weinheim, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA, str. 1–30.

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015) Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng. Rev.* **7**, 452-490.

Ertesvåg, H., Valla, S. (1998) Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stab.* **59**, 85–91.

Food and Agriculture Organization of the United Nation/World Health Organization (2001) Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina.

Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.

Gombotz, W. R., Wee, S. F. (2012) Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **64**, 194–205.

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.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 365-373.

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.

Imran, M., Revol-Junelles, A. M., Martyn, A., Tehrany, E. A., Jacquot, M., Linder, M., Desobry, S. (2010) Active food packing evolution: transformation from micro-to nanotechnology. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **50(9)**, 799–821.

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.

Kailasapathy, K. (2009) Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. **4**, 1-19.

Kandler, O., Weiss, N. (1986) Regular, non-sporing Gram-positive rods. U: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2. Williams and Wilkins, Baltimore, str. 1208-1234.

Khutoryanskiy, V. V. (2011) Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.* **11(6)**, 748–64.

Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, S. (2008) Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT – Food Sci. Technol.* **41**, 493–500.

Koo, S., Cho, Y., Huh, C., Baek, Y., Park, J. (2001) Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11(3)**, 376–83.

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

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. Biotechnol.* **50(2)**, 141-151.

- 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.
- Li, X.Y., Chen, X.G., Cha, D.S., Park, H.J., Liu, C.S. (2009) Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. *J. Microencapsul.* **26**, 315-324.
- Lucinda-Silva, R.M., Evangelista, R.C. (2005) Studies on the formation of complex coacervates between chitosan and alginate during microparticles preparation. *Acta Farm. Bonaerense* **24(3)**, 366–70.
- Lyer, C., Kailasapathy, K. (2005) Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *J. Food Sci.* **70(1)**, 18–23.
- Mandal, S., Puniya, A. K., Singh, K. (2006) Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *Int. Dairy J.* **16**, 1190–1195.
- Manojlović, V., Nedović, V., Kailasapathy, K., Zuidam, N. (2010) Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. U: Zuidam, N. J., Nedović, V., Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer Science+Business Media, London, str. 269-302.
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martín-Sánchez, I., Martínez-Bueno, M. (2008) Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. *App. Environ. Microbiol.* **74**, 5662-5673.
- 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.
- Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Habibi, N.M.B., Shahidi, F. (2009) The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Res. Intl.* **42(8)**, 1040–5.

Molin, G. (2013) Lectures in probiotics, physiologic & psychopathologic effect on the human microbiota. University of Lund, Sweden.

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.

Murata, Y., Toniwa, S., Miyamoto, E., Kawashima, S. (1999) Preparation of alginate gel beads containing chitosan salt and their function. *Intl. J. Pharm.* **176**(2), 265–268.

Murillo-Álvarez, J.I., Hernández-Carmona, G. (2007) Monomer composition and sequence of sodium alginate extracted at pilot plant scale from three commercially important seaweeds from Mexico, *J. Appl. Phycol.* **19**, 545-548.

Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens, R. A. (1999) Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* **39**, 13-126.

Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjan Babu, M., Lavakumar, V. (2013) Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *Inter. J. Nove. Tren. Pharm. Sci.* **3**, 87-98.

Onsøyen, E. (2001) Alginate: production, composition, physicochemical properties, physiological effects, safety and food applications. U: Cho, S.S., Dreher, M.L., editors. *Handbook of dietary fiber.* New York: Marcel Dekker, Inc. 659-74.

O’Shea, E.F., Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P., Hill (2012) Production Of Bioactive Substances By Intestinal Bacteria As A Basis For Explaining Probiotic Mechanisms: Bacteriocins And Conjugated Linoleic Acid. *Int. J. Food Microbiol.* **152**, 189-205.

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

Reid, A.A., Champagne, C.P., Gardner, N., Fustier, P., Vuilleumard, J.C. (2007) Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. *J. Food Sci.* **72(1)**, 31–37.

Rokka, S., Rantamäki, P. (2010) Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur. Food Res. Technol.* **231(1)**, 1–12.

Schoug Bergholtz, 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.

Sherman, P. M., Johnson-Henry, K. C., Yeung, H. P., Ngo, P. S. C., Goulet, J., Tompkins, T. A. (2005) Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- And Enteropathogenic *E. coli* O127:H6-Induced Changes In Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers By Reducing Bacterial Adhesion And Cytoskeletal Rearrangements. *Infect. Immun.* **73**, 5183-5188.

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.

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

Šušković, J., Kos, B., Matošić, S. (1998). Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend?. *Mljekarstvo* **48**, 165 – 176.

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.

Yu, W., Yim, T., Lee, K. Heo, T. (2001) Effect of skim milk alginate beads on survival rate of bifidobacteria. *Biotechnol. Biop. Eng.* **6(2)**, 133–8.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Lea Iličić