

Optimiranje mikroinkapsulacije probiotičkog soja *Lactiplantibacillus plantarum* MB18 primjenom zaštitnih matriksa

Frece, Nino

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:016484>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Nino Frece

0058218981

**OPTIMIRANJE MIKROINKAPSULACIJE
PROBIOTIČKOG SOJA *Lactiplantibacillus plantarum*
MB18 PRIMJENOM ZAŠTITNIH MATRIKSA
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: dr. sc. Katarina Butorac

Zagreb, 2023.

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 dr. sc. Katarine Butorac, uz pomoć Nine Čuljak, mag. ing. biotechn. Rad je izrađen u sklopu projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

Nakon izrade ovog završnog rada želio bih se zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Katarini Butorac koja je imala želje prenijeti mi svoje znanje i iskustvo te njezinoj nesebičnoj pomoći kako bi ovaj rad uspješno završio.

Također veliko hvala Nini Čuljak mag. ing. biotechn. koja je svojim savjetima, podršci i pozitivnom energijom u labosu doprinijela u izradi ovog rada.

Zahvaljujem se svima iz Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura u kojem je ovaj rad i izrađen.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Optimiranje mikroinkapsulacije probiotičkog soja *Lactiplantibacillus plantarum* MB18 primjenom zaštitnih matriksa

Nino Frece, 0058218981

Sažetak:

Do danas su dokumentirani višestruki korisni učinci probiotika na zdravlje domaćina. Jedan od glavnih kriterija za izbor probiotičkog soja je preživljavanje u gastrointestinalnom sustavu te adhezija na crijevni epitel kako bi se na ciljanom mjestu iskazali korisni učinci. Obzirom da je nužno da probiotici u što većem broju prežive stresne uvjete, često se koriste tehnike koje štite stanice od nepovoljnih uvjeta. Primjer primjene takvih matriksa je mikroinkapsulacija u alginatu i želatini. Također, pripravljenim proizvodima važno je maksimalno produljiti trajnost pa se koriste tehnike liofilizacije koje omogućavaju dulje skladištenje. U ovom radu je, optimiranjem tehnika mikroinkapsulacije, odabran najučinkovitiji način zaštite odabranog probiotičkog soja *Lactiplantibacillus plantarum* MB18. Dokazana je visoka učinkovitost mikroinkapsulacije za svaki omjer korištenih matriksa. Alginat i želatina bili su jednako prikladni nosači probiotičkog soja povećavajući mu preživljavanje u *in vitro* uvjetima želučanog soka i tankog crijeva. Kod svih mikroformulacija dokazana je uspješna fermentacijska aktivnost soja *L. plantarum* MB18, zbog čega se pripravljene liofilizirane mikrokapsule mogu koristiti kao potencijalne probiotičke funkcionalne starter kulture.

Ključne riječi: mikroinkapsulacija, liofilizacija, probiotici

Rad sadrži: 31 stranica, 6 slika, 3 tablice, 43 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Katarina Butorac

Pomoć pri izradi: Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 08. rujna 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of biochemical engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Optimization of microencapsulation of the probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* MB18
using protective matrices

Nino Frece, 0058218981

Abstract:

To date, numerous beneficial effects of probiotics on host health have been documented. One of the main criteria for the selection of a probiotic strain is its survival in the gastrointestinal tract and its adhesion in the intestinal epithelium to exert beneficial effects at the target site. Since it is necessary for probiotics to survive the stressful conditions in as large number as possible, various techniques are often used to protect cells from adverse conditions. An example of the application of such matrices is microencapsulation in alginate or gelatin carriers. In addition, it is important to extend the shelf life of the prepared products as much as possible, so freeze-drying techniques are used to allow longer storage period. In this work, by optimizing microencapsulation techniques, the most effective method for protecting the selected probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* MB18 was chosen. The high efficiency of microencapsulation was demonstrated for each ratio of matrices used. Alginate and gelatin were equally suitable as carriers for the probiotic strain and increased its survival under *in vitro* conditions in gastric juice and small intestine. Successful fermentation activity of *L. plantarum* MB18 strain was demonstrated in all microformulations, therefore the produced lyophilized microcapsules can be used as potential probiotic functional starter cultures.

Keywords: microencapsulation, lyophilization, probiotics

Thesis contains: 31 pages, 6 figures, 3 tables, 43 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Katarina Butorac, PhD

Technical support and assistance: Nina Čuljak, MSc

Thesis defended: September 8, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	3
2.1.1. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3
2.2. PROBIOTICI	4
2.2.1. Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva	5
2.2.2. Liofilizacija probiotičkih sojeva	7
2.2.3. Mikroinkapsulacija probiotičkih sojeva	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. MATERIJALI	12
3.1.1. Radni mikroorganizam	12
3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije	12
3.1.3. Aparatura i pribor	13
3.2. METODE RADA	14
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizma	14
3.2.2. Mikroinkapsulacija probiotičkog soja	14
3.2.3. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica	16
3.2.4. Preživljavanje mikroinkapsuliranih stanica u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	16
3.2.5. Procjena stabilnosti mikrokapsula mjerenjem apsorpcije vode	16
3.2.6. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti mikroinkapsuliranih stanica	17
3.2.7. Statistička analiza podataka	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. TEHNOLOŠKI KRITERIJ ZA IZBOR PROBIOTIČKOG SOJA	19
4.2. FUNKCIONALNI KRITERIJ ZA IZBOR PROBIOTIČKOG SOJA	23
4.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA PROIZVEDENIH MIKROKAPSULA	24
5. ZAKLJUČCI	26
6. LITERATURA	27

1. UVOD

Posljednjih godina velika se pozornost posvećuje primjeni probiotika u svrhu poboljšanja ljudskog zdravlja na prirodan način. Probiotički sojevi uglavnom pripadaju bakterijama mliječne kiseline rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koji su prirodno prisutni u ljudskom probavnom sustavu. Tradicionalno se koriste u svrhu proizvodnje fermentiranih mliječnih proizvoda, s mogućnosti primjene u proizvodnji funkcionalne hrane i drugih, za zdravlje korisnih proizvoda (Peng i sur., 2020).

Ljudski gastrointestinalni sustav sastoji se od kompleksnog mikrobnog ekosustava kojeg čini nekoliko stotina različitih bakterijskih vrsta, čija je uloga u održavanju homeostaze važna ne samo zbog apsorpcije hrane nego i regulacije metabolizma te jačanja imunološkog sustava. Pri navedenom, važnu ulogu imaju i probiotici (Eslami i sur., 2019), koji se definiraju kao jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u životinja ili ljudi djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture domaćina (Šušković i sur., 1996). Da bi probiotici iskazali svoj pozitivan učinak na zdravlje domaćina, moraju preživjeti nepovoljne uvjete gastrointestinalnog trakta nakon oralne primjene, dakle preživjeti prolazak kroz želudac u kojem prevladava niska pH vrijednost te tanko crijevo u kojem prevladavaju žučne soli kako bi u dovoljnom broju stigle do mjesta kolonizacije (Chen i sur., 2017; Harel i Tang, 2014). Također, probiotici moraju zadržati aktivnost tijekom skladištenja. S obzirom na navedene prepreke minimalna količina probiotika u proizvodu do isteka roka trajanja trebala bi biti 10^8 do čak 10^{11} stanica/g proizvoda (Binda i sur., 2020). Prema tome, razvijene su različite metode zaštite probiotičkih bakterija, među kojima je mikroinkapsulacija (Corona-Hernandez i sur., 2013). Mikroinkapsulacija je proces imobilizacije željenog supstrata unutar odgovarajućeg matriksa u svrhu zaštite tijekom različitih nepovoljnih uvjeta. Svrha mikroinkapsulacije kod probiotičkih pripravaka je osiguravanje zaštite stanica tijekom procesa proizvodnje, skladištenja i prolaska kroz želudac te kontrolirano otpuštanje *in situ* u gastrointestinalnom traktu kao ciljnom mjestu djelovanja (Arslan-Tontul i Erbas, 2017; Harel i Tang, 2014; Sobel i sur., 2014). Za dugoročno čuvanje bakterijskih kultura često se koristi liofilizacija, proces uklanjanja vode smrzavanjem i sušenjem pri čemu se usporavaju kemijske i fizikalne reakcije unutar stanice što za posljedicu ima bolje očuvanje i produljenu stabilnost pripravka (Siow i sur., 2016; Kasper i Friess, 2011; Reddy i sur., 2009).

Cilj ovog rada bio je optimirati postupak mikroinkapsulacije bakterije *Lactiplantibacillus plantarum* MB18 primjenom različitih omjera alginata i želatine kao potencijalno prikladnih

matriksa u svrhu učinkovite dostave probiotičkog soja *in situ* do debelog crijeva kao ciljnog mjesta djelovanja. Nadalje, s ciljem očuvanja visokog broja metabolički aktivnih stanica soja MB18, proveden je postupak liofilizacije, pri čemu se kao optimalan pokazao matriks koji je sadržavao 70 % alginata i 30 % želatine. Sve liofilizirane mikrokapsule su pokazale potencijal zaštite soja MB18 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava, dok se ispitivanjem fizikalno-kemijskih svojstava mikrokapsula kao najučinkovitiji pokazao uzorak koji je sadržavao jednak udio alginata i želatine. Proizvedenim mikroformulacijama je dokazan potencijal primjene kao funkcionalne starter kulture, ispitivanjem sposobnosti razgradnje kazeina iz obranog mlijeka i mjerenjem acidifikacijskog kapaciteta nakon prekonoćnog uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine skupinu Gram-pozitivnih, nesporogenih bakterija koje procesom fermentacije proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji produkt metabolizma ugljikohidrata. Prema morfološkim karakteristikama stanice, BMK se dijele na koke (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*) i štapiće (*Lactobacillus*) u koje se ubraja i rod *Bifidobacterium* sa specifičnom bifid morfologijom odnosno oblikom slova X ili Y. Izvori bakterija mliječne kiseline su hrana (mliječni proizvodi, fermentirano meso, kiselo tijesto, fermentirano povrće, silaža, bezalkoholna pića, probiotički proizvodi) biljke i otpadne vode, ali nalaze se i u genitalnom, intestinalnom i respiratornom traktu ljudi i životinja (Zielińska i sur., 2018; Othman i sur., 2017). BMK su prokarioti, heterotrofni i kemoorganotrofni organizmi te tvore filogenetsko heterogenu bakterijsku skupinu koja se smatra sigurnom za korištenje te nosi GRAS (*engl.* Generally Recognized as Safe) status (Burgain i sur., 2014), odnosno QPS (*engl.* Qualified Presumption of Safety) status prema regulativi Europske unije. BMK mogu djelovati antagonistički zbog sniženja pH vrijednosti uslijed nakupljanja organskih kiselina, proizvedenog vodikovog peroksida (u aerobnim uvjetima), proizvedenog diacetila i proizvedenih specifičnih molekula s inhibicijskim djelovanjem, primjerice bakteriocina. BMK su neizostavan dio predstavnika mikrobiote ljudskog gastrointestinalnog trakta te imaju mnoge povoljne učinke na zdravlje ljudi kao što su održavanje zdrave mikroflore crijeva, stimulacija imunološkog sustava, inhibicija rasta patogenih organizama, snižavanje razine kolesterola, poboljšanje iskorištavanja laktoze, sprječavanje dijareje i konstipacije, apsorpcija kalcija i sinteza vitamina (Li i sur., 2009).

2.1.1. *Lactiplantibacillus plantarum*

Lactiplantibacillus plantarum široko je rasprostranjena bakterijska vrsta koja pripada skupini BMK. Gram-pozitivna je vrsta štapićastog oblika, prosječne duljine 3 – 8 µm (Landete i sur., 2010). Ova bakterijska vrsta može rasti pri pH vrijednostima 3,4 – 8,8 te pri temperaturi 12 – 40 °C. Optimalna temperatura rasta je 30 °C, minimalna 10 °C, a maksimalna 40 °C (Matejčeková i sur., 2016). Pojavljuju se samostalno, u parovima ili u kratkim lancima. Ova bakterijska vrsta ima jedan od najvećih genoma iz skupine BMK. Može se naći u mnogim prehrambenim proizvodima kao što su pekarski proizvodi, mlijeko, meso, fermentirano povrće

te u ljudskom i životinjskom probavnom traktu kao i slini. Desetljećima se koristi u proizvodnji sireva i maslina, kao i mnogih drugih fermentiranih proizvoda zbog pozitivnog utjecaja na organoleptička svojstva, teksturu i okus (Behera i sur., 2018). Vrsta *Lactiplantibacillus plantarum*, bilo da se radi o sojevima iz okoliša ili o onima koji se koriste kao starter kulture u mnogim biotehnološkim procesima, posjeduje mnoga poželjna svojstva za primjenu u procesu fermentacije (fermentiranoj hrani) te se zato često koristi u svrhu poboljšanja kvalitete određenih prehrambenih namirnica. Probiotičko djelovanje očituje se u stimulaciji probavnog sustava, borbi protiv nepoželjnih bakterijskih vrsta i poticanju proizvodnje vitamina. Posljedično, ova bakterijska vrsta održava ravnotežu probavnog sustava te sudjeluje u jačanju imuniteta. Zbog velikog broja površinskih proteina *L. plantarum* ima potencijal povezivanja s mnogim različitim površinama i potencijalnim supstratima za rast te relativno veliki broj gena koji kodiraju regulatorne funkcije što ukazuje na sposobnost prilagodbe na različite uvjete (De Vries i sur., 2006). Pored organskih kiselina, bakterije mliječne kiseline mogu proizvesti i brojne druge inhibitorne spojeve poput bakteriocina, koji djeluju antagonistički prema drugim mikroorganizama zbog čega se najčešće koriste kao biokonzervansi u očuvanju hrane. Bakteriocini su ribosomski sintetizirani proteini ili peptidi koji inhibiraju rast drugih srodnih bakterijskih vrsta. Sojevi *L. plantarum* koji proizvode bakteriocine izolirani su iz hrane biljnog i životinjskog porijekla poput žitarica, kiselog kupusa, vina, mesa, mliječnih proizvoda, a u novije vrijeme i iz majčinog mlijeka (Banić i sur., 2022; Butorac i sur., 2020; Uroić i sur., 2014).

2.2. PROBIOTICI

Pretjerana upotreba antibiotika dovela je do stvaranja rezistencije bakterija na primjenjene antibiotike, što je dovelo do kolonizacije crijevnog trakta nepoželjnom bakterijskom populacijom. Istraživanja kojima je cilj bio ponovno uspostavljanje crijevne ravnoteže na prirodan način, primjenom bakterija mliječne kiseline kao živih mikrobnih kultura ili primjenom mliječnih proizvoda, može se smatrati početkom razvoja probiotika. Rezistencija bakterija na antibiotike postala je važan problem u današnjoj medicini, u što su se uključile i eminentne institucije u Hrvatskoj želeći upozoriti na odgovorno korištenje ovih lijekova kako bi se njihova djelotvornost sačuvala i za buduće generacije. WHO (*engl.* World Health Organization) je odavno prepoznala taj problem te se uključila u borbu protiv antibiotske rezistencije nudeći koncept funkcionalne hrane, odnosno probiotički i prebiotički koncept s ciljnim mjestom djelovanja (gastrointestinalni trakt), odnosno na crijevnu mikrofloru

(Šušković i sur., 2009). Riječ probiotik potječe od grčke riječi pro bios što znači „za život“ i tijekom godina poprimala je različita značenja. Prema definiciji, probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u životinja ili ljudi djeluju korisno na zdravlje domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava (Šušković i sur., 1996).

2.2.1. Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva

Bakterijski sojevi za probiotičku primjenu trebaju zadovoljiti tzv. opće, tehnološke i funkcionalne izborne kriterije. U opće kriterije pripada podrijetlo, zdravstvena sigurnost te otpornosti prema niskim pH vrijednostima, želučanom soku, soku gušterače i žučnim solima. Nadalje, tehnološki kriteriji su preživljavanje i zadržavanje aktivnosti tijekom pripreme i čuvanja probiotičkog proizvoda, a u funkcionalne kriterije pripada adhezija na crijevni epitel, antimikrobno djelovanje, posebno prema patogenim mikroorganizmima i promjene mikrobnog metabolizma u probavnom traktu. Dodatno se može postaviti “specifičan izborni kriterij” ako je probiotički soj namijenjen za specifičnu zdravstvenu primjenu (de Melo Pereira i sur., 2018). Probiotička svojstva koja pokazuje određeni bakterijski soj ne mogu se pripisati drugom soju, bez obzira pripadaju li istim ili različitim bakterijskim vrstama (Kos, 2001). Poželjno je da probiotički soj bude humanog podrijetla, te da se suvremenim genetičkim metodama odredi kojem rodu i vrsti pripada. Najbolji dokaz o zdravstvenoj sigurnosti BMK je duga tradicija njihove primjene bez štetnog utjecaja na zdravlje čovjeka, zbog čega su i dobile GRAS status. Odabir potencijalnih probiotičkih sojeva temelji se na *in vitro* istraživanjima koji su dobar pokazatelj za utvrđivanje probiotičkih svojstava koja će bakterijski sojevi pokazati u *in vivo* uvjetima. Pri tome se koriste različiti statički i dinamički modeli koji simuliraju uvjete u humanom gastrointestinalnom traktu (Mailville i sur., 2005). Glavnu prepreku preživljavanja potencijalnih probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu predstavljaju niska pH vrijednost u želucu, žučne soli i probavni enzimi, kao što su lizozim, pepsin i enzimi gušterače. Bakterije roda *Lactobacillus* pokazale su uglavnom veću otpornost prema niskim pH vrijednostima od sojeva *Bifidobacterium* vrste. Visok stupanj preživljavanja probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu je preduvjet za adheziju, tj. vezanje na crijevni epitel, antimikrobno djelovanje i stimulaciju imunološkog sustava. Neki sojevi proizvode S-sloj na površini svojih stanica koji ima dokazanu imunomodulacijsku aktivnost (Banić i sur., 2018). Probiotičko djelovanje koje nije uvjetovano aktivnošću stanica odnosi se na poboljšanje metabolizma laktoze i neke imunološke modifikacije (Oak i Jha, 2019; Azad i sur., 2018). Utvrđivanje

antagonističkog djelovanja potencijalnih probiotičkih sojeva prema patogenim i drugim mikroorganizmima provodi se različitim *in vitro* metodama. Posebna pozornost daje se bakteriocinskoj aktivnost BMK koja se u posljednje vrijeme detaljno istražuje (Banić i sur., 2022; Butorac i sur., 2020). Nadalje, važno je osigurati i optimalne uvjete tijekom pripreme i čuvanja probiotika (sastav hranjive podloge, temperatura rasta, trajanje fermentacije, miješanje, homogenizacija itd.) radi mikrobiološke stabilnosti proizvoda. Dodatkom lioprotektora, inkapsuliranjem i mikroinkapsuliranjem probiotičkih sojeva tijekom zamrzavanja, sušenja ili čuvanja, može se bitno povećati broj živih stanica po gramu pripravka (Butorac i sur., 2021). Nakon provedenih *in vitro* istraživanja za izbor probiotičkih sojeva, slijede istraživanja na pokusnim životinjama i klinička istraživanja (de Melo Pereira, 2018). Dnevno potrebna, minimalna količina živih mikrobnih stanica, koje bi trebao sadržavati probiotički pripravak, još je uvijek predmet mnogih rasprava. Općenito se uzima da bi trebala biti od 10^8 do čak 10^{11} stanica/g proizvoda (Binda i sur., 2020). Popis kriterija za izbor probiotičkih sojeva (prilagođeno prema Binda i sur., 2020; Šušković i sur., 2009):

1. točna taksonomska identifikacija
2. humano podrijetlo za humane probiotike
3. netoksičnost i nepatogenost
4. genetička stabilnost
5. sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u „ciljanom“ području primjene u organizmu
6. sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela
7. stabilnost poželjnih značajki tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke
8. visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu ($10^8 - 10^{11}$ CFU/mL ili CFU/g)
9. proizvodnja antimikrobnih supstancija, uključujući bakteriocine, vodikov peroksid i organske kiseline
10. antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama
11. mogućnost kompeticije sa sudionicima autohtone mikroflore, obuhvaćajući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje proizvodi autohtona mikroflora
12. otpornost prema žučnim kiselinama
13. otpornost prema niskim pH vrijednostima
14. imunostimulacijski učinak
15. sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje

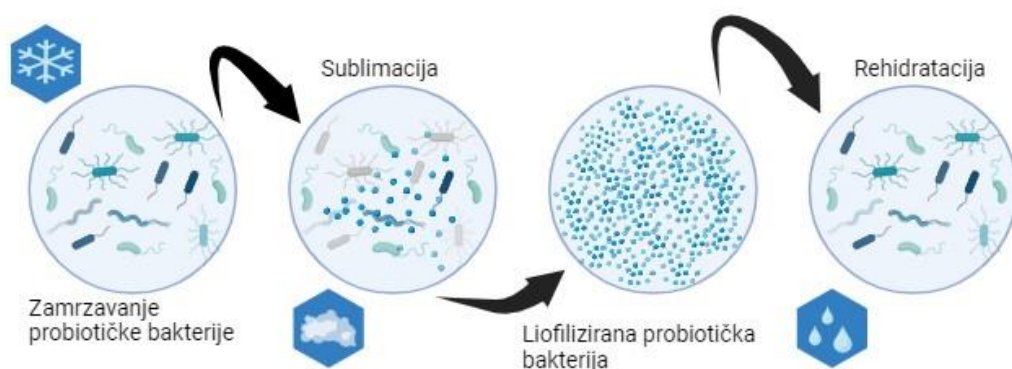
16. brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, zamrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja tijekom čuvanja i distribucije
17. dobivanje željenih organoleptičkih svojstava proizvoda kad sudjeluju u fermentacijskim procesima

2.2.2. Liofilizacija probiotičkih sojeva

Razvoj prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani koji sadrže probiotičke mikroorganizme u znatnom su porastu. Tijekom proteklih desetljeća prehrambena industrija koristi taj koncept i plasira na tržište mnoštvo novih proizvoda temeljenih na probiotičkim bakterijama u obliku funkcionalne hrane i dodataka prehrani (Burgain i sur., 2014). Da bi iskazali svoj povoljan učinak na zdravlje domaćina, probiotici moraju zadržati aktivnost tijekom skladištenja, a nakon unosa u organizam preživjeti prolazak kroz želudac i tanko crijevo kako bi u dovoljnom broju stigle do mjesta kolonizacije. Na tom putu glavnu prepreku predstavljaju želučana kiselina te žučne soli i probavni enzimi (Chen i sur., 2017; Harel i Tang, 2014). Uz navedeno, veliki problem predstavljaju uvjeti proizvodnje i skladištenja ovakvih proizvoda jer većina probiotika zahtijeva posebne uvjete poput hlađenja pri skladištenju i distribuciji što povećava troškove u komercijalnoj upotrebi. Potreba za hladnim lancem se može uvelike smanjiti korištenjem suhih prahova koji sa svojom sterilnošću i stabilnošću potencijalno nadmašuju proizvode u tekućem i smrznutom stanju (Reddy i sur., 2009). Potencijal u rješavanju navedenih problema preživljavanja u stresnim uvjetima proizvodnje, ali i prolaska kroz gastrointestinalni sustav nakon konzumacije imaju često korištene tehnike liofilizacije i mikroinkapsulacije.

Liofilizacija ili sušenje smrzzavanjem je metoda sušenja kojom se uklanja voda procesima sublimacije i desorpcije u svrhu očuvanja i produljenja stabilnosti hrane, bioloških i farmaceutskih proizvoda (Siow i sur., 2016; Kasper i Friess, 2011). Inhibiraju se ili dovoljno usporavaju kemijske i fizikalne reakcije razgradnje, što rezultira poboljšanom stabilnošću i jednostavnim rukovanjem tijekom otpreme i skladištenja. Proces se sastoji od tri koraka: zamrzavanje, primarno sušenje i sekundarno sušenje. Tijekom zamrzavanja, tekuća faza se hladi, formiraju se kristali leda što uzrokuje izdvajanje slobodne vode u kristale (Kasper i Friess, 2011) i koncentriranje otopljene tvari u otopini (Broeckx i sur., 2016). Primarno sušenje označava uklanjanje nastalog leda sublimacijom i traje dok se udio vode u pripravku ne smanji na 7 – 8 %. Potrebno je da tlak koji se primjenjuje u uređaju bude niži od tlaka pare na površini pripravka koji se liofilizira. Sekundarnim sušenjem se izdvaja vezana voda procesom

desorpcije, obično pri povišenoj temperaturi i niskom tlaku kako bi se omogućio željeni niski udio vlage (Broeckx i sur., 2016; Siow i sur., 2016; Kasper i Friess, 2011). Kako bi se probiotičke bakterije zaštitile od mehaničkog i osmotskog stresa, mogu se dodati krioprotektori i lioprotektori. Krioprotektori su topljivi u vodi i snižavaju temperaturu leđišta vode. Prilikom nastanka kristala stanice se zbijaju u nezamrznutu frakciju koja se dodatkom krioprotektora povećava što daje više prostora probioticima i smanjuje mogućnost mehaničkog oštećenja. Lioprotektori štite stanice tijekom faze sušenja čuvajući integritet stanične membrane (Broeckx i sur., 2016). Liofilizacija, smrzavanje i sušenje raspršivanjem neke su od najkorisnijih tehnika konzerviranja hrane, poljoprivrednih proizvoda i lijekova s time da je liofilizacija najprikladnija metoda za dugotrajno čuvanje bakterijskih kultura (slika 1.) i često se koristi za očuvanje starter kultura koje pripadaju BMK uključenih u fermentaciju mlijeka i hrane (Reddy i sur., 2009). U prehrambenoj industriji najčešće se koriste metode sušenja raspršivanjem, sušenja u dehidratorima, sušarama i konvekcijskim pećima što je ekonomski isplativo, ali se provode pri visokim temperaturama što je štetno za komponente osjetljive na toplinu poput proteina, pa se u farmaceutskoj industriji češće provodi liofilizacija zbog nužne visoke kvalitete proizvoda. Prednosti liofilizacije nad drugim metodama sušenja su stabilnost i dobro otapanje liofiliziranog pripravka, korištenje niskih temperatura i minimalna oštećenja stanica uzrokovana temperaturom te poboljšanje mehaničkih svojstava liofiliziranog pripravka (Siow i sur., 2016). Glavni nedostaci liofilizacije su vrijeme koje je potrebno za provođenje postupka i visoka cijena (Broeckx i sur., 2016).



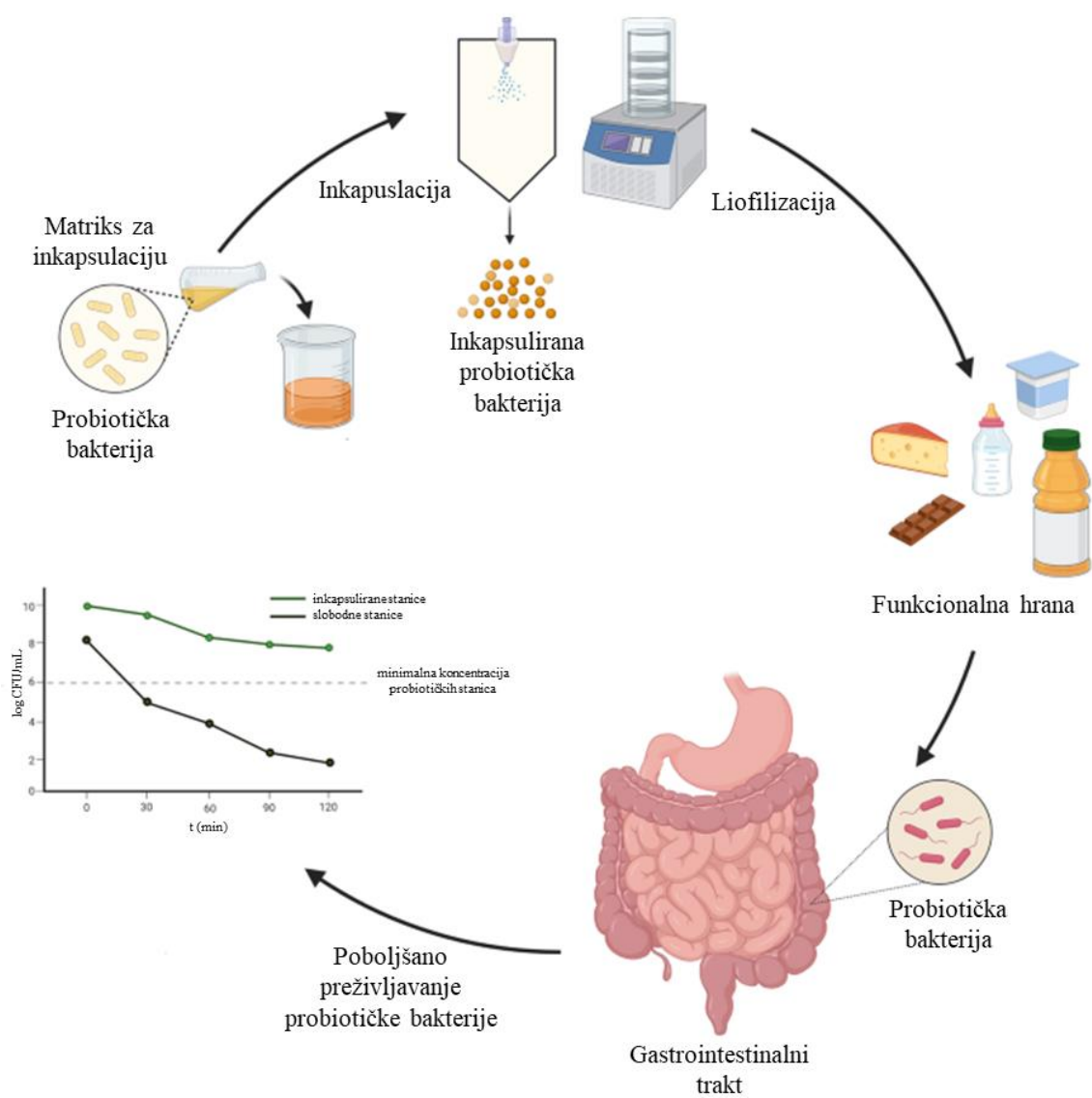
Slika 1. Postupak liofilizacije probiotičkih bakterija (kreirano primjenom Biorender.com)

2.2.3. Mikroinkapsulacija probiotičkih sojeva

Inkapsulacija je proces pakiranja čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala unutar drugog materijala tijekom kojeg nastaju kapsule. Veličina kapsula varira od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara. S obzirom na veličinu razlikuju se nanočestice (10 –1000 nm), mikročestice (2 – 2000 µm) i makročestice (> 2000 µm) (Singh i sur., 2010). Tehnikom inkapsulacije postiže se bolja stabilnost komponenti, maskiranje okusa i mirisa, raznolikost aroma te povećanje biodostupnosti. Metode inkapsulacije se dijele na: fizikalne (sušenje raspršivanjem, centrifugalna ekstruzija, sferizacija ekstruzijom, procesi koji koriste superkritične fluide), fizikalno-kemijske (ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, ekstrakcija otapala isparavanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija) i kemijske (granična polimerizacija, umrežavanje, *in situ* polimerizacija itd.) (Gallo i Carbo, 2010). Proces inkapsulacije omogućuje prekrivanje nepoželjenih okusa i mirisa, kontrolu svojstava aktivnih komponenti, mogućnost kontroliranog otpuštanja, povećanu stabilnost u konačnom proizvodu i tijekom proizvodnje te dulji rok trajanja.

Tijekom procesiranja i skladištenja hrane probiotičke bakterije su izložene oksidativnom stresu, promjenama temperature i pH vrijednosti (Corona-Hernandez i sur., 2013) što utječe na smanjenje broja bakterija pa Međunarodna mljekarska federacija preporučuje da bi minimalna količina probiotika u proizvodu do isteka roka trajanja trebala biti $10^8 - 10^{11}$ stanica/g proizvoda (Binda i sur., 2020). Fermentirani mliječni proizvodi su jako osjetljivi na kvarenje zbog visokog aktiviteta vode (*aw*) i dostupnosti hranjivih tvari (Corona-Hernandez i sur., 2013). Kako bi se poboljšalo preživljavanje BMK, predloženi su različiti pristupi koji povećavaju otpornost tih osjetljivih mikroorganizama na nepovoljne uvjete, uključujući odgovarajući izbor sojeva otpornih na kiseline i žuči, korištenje spremnika koji ne propuštaju kisik, prilagodbe stresu, uključivanje mikronutrijenata kao što su peptidi i aminokiseline te mikroinkapsulacija (Li i sur., 2009). Zbog nekoliko fizikalno-kemijskih promjena koje se događaju tijekom pripreme i skladištenja probiotičke hrane i zbog složenog metabolizma koji ima svaki soj, potrebno je primijeniti nekoliko prehrambenih tehnologija kako bi se jamčilo preživljavanje probiotika. Tehnologija imobilizacije stanica, poput mikroinkapsulacije, može smanjiti izloženost bakterija fizikalno-kemijskim stresorima (Corona-Hernandez i sur., 2013). Inkapsulacijom se probiotici štite u različitim nepovoljnim uvjetima, osiguravajući zaštitu stanica tijekom procesa proizvodnje, skladištenja i prolaska kroz želudac te kontrolirano otpuštanje duž crijeva (Arslan-Tontul i Erbas, 2017; Harel i Tang, 2014). Provodi se prevlačenjem sloja materijala preko drugog čvrstog, tekućeg ili plinskog materijala. U

prehrambenoj industriji različiti sastojci hrane mogu se pohraniti unutar prevlake ili matrice u cilju zaštite, kontroliranja oslobađanja, produljenja roka trajanja namirnice, kontroliranja reakcija oksidacije te maskiranja okusa, boja i mirisa. Inkapsulacije u rasponu od 100 do 1000 nm klasificiraju se kao mikroinkapsulacije dok se komponente između 1 i 100 nm nazivaju nanokapsulama (Arslan-Tontul i Erbas, 2017; Sobel i sur., 2014). Nužno je da unutarnja faza i prevlaka međusobno ne reagiraju niti se otapaju jedna u drugoj, stoga se za hidrofobne tvari poput jestivog ulja i masti koristi hidrofilni materijal za inkapsulaciju, a to mogu biti različiti polisaharidi (šećer, škrob, dekstrin, celuloza, guma arabika, alginat, karagenan i pektin), proteini (proteini soje, pšenice i kukuruza, želatina i kazein) te polimeri. Analogno, u sustavima u kojima je potrebno inkapsulirati hidrofilnu tvar, kao matrica ili prevlaka se koriste hidrofobni materijal odnosno lipidi (mast, hidrogenizirane masti, gliceridi, fosfolipidi, masne kiseline i biljni steroli), voskovi (pčelinji vosak i parafin) te polimeri. Kontrolirano otpuštanje se postiže primjenjujući saznanja o okidačima koji dovode do pokretanja mehanizma otpuštanja, a to mogu biti korištenje različitih otapala, promjena temperature, udjela vlage, tlaka i pH vrijednosti te primjena enzima. Enzimi i promjena pH vrijednosti koriste se kao okidači za oslobađanje kada se neka tvar mora isporučiti u određenom dijelu gastrointestinalnog trakta (usta, želudac, tanko crijevo ili debelo crijevo) (Sobel i sur., 2014). Mikroinkapsulacija i liofilizacija su najčešće primjenjene tehnike koje se koriste za poboljšano preživljavanje u gastrointestinalnom traktu i produljenu trajnost probiotičkih sojeva (slika 2.).



Slika 2. Mikroinkapsulacija i liofilizacija probiotičkih bakterija (prilagođeno prema Rajam i Subramanian, 2022)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Probiotički soj *Lactiplantibacillus plantarum* MB18, korišten u postupcima mikroinkapsulacije i liofilizacije, izoliran je iz majčinog mlijeka (Banić i sur., 2022) i dio je Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije

3.1.2.1. Hranjive podloge

Za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline u ovom radu korištene su sljedeće podloge:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Na-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, no bez dodatka agara.

3.1.2.2. Kemikalije

- destilirana voda, „PBF“, Hrvatska
- etanol, 70 %, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- fenoftalein, „Kemika“, Hrvatska
- fiziološka otopina, „PBF“, Hrvatska
- kalcijev klorid, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- kalijev klorid, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- koncentrirana kloridna kiselina, „Carlo Erba Reagents“, Španjolska
- mononatrijev fosfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- natrijev alginat, „Sigma“, St. Louis, SAD
- natrijev citrat dihidrat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

- natrijev dihidrogenfosfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- želatina, „Fischer Chemical“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- natrijev hidrogenkarbonat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- natrijev sulfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- obrano mlijeko, „Milipore“, Njemačka
- pankreatin, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- pepsin, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- urea, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- želatina, „Fischer Chemical“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- žučne soli, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD

3.1.3. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete i odgovarajući nastavci, „Eppendorf“, Enfield, SAD
- bireta, „Gram-mol“, Hrvatska
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- Eppendorf kivete (1 i 2 mL), „Eppendorf“, SAD
- igle, „B. Braun“, Njemačka
- kivete za centrifugiranje 15 mL i 50 mL, „Falcon“, Engleska, „Eppendorf“, Enfield, SAD
- laboratorijske čaše, „Gram-mol“, Hrvatska
- laboratorijske epruvete i stalci, „Gram-mol“, Hrvatska
- lijevak za odjeljivanje, „Gram-mol“, Hrvatska
- liofilizator, model Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Osterode am Harz, Njemačka
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- menzure (10, 50, 100 i 1000 mL), „Gram-mol“, Hrvatska
- mikrotitarske pločice (s 96 jažica)

- petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska, „Mettler Toledo“, Zürich, Švicarska
- pincete, „Isolab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- sterilna gaza, „Konstill“, Slovenija
- šprice, „Chirana“, Slovačka
- termostati, „Sutjeska“, Beograd, Srbija
- uređaj za centrifugu Z 206 A „Hermle“, Njemačka
- vaga analitička „Sartorius“, Göttingen, Njemačka
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vibro-mješač EV-102, „Tehtnica“ Podplat, Slovenija
analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, Njemačka

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizma

Soj *Lactiplantibacillus plantarum* MB18 čuvan je pri -80 °C u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta soj je inokuliran u optimalnu podlogu, te inkubiran anaerobno pri 37 °C.

3.2.2. Mikroinkapsulacija probiotičkog soja

Prekonoćna kultura soja *L. plantarum* MB18 uzgojena je u 18 x 5 mL tekuće MRS podloge. Stanice su podijeljene na 6 uzoraka po 3 paralele, centrifugirane 10 min pri 4200 o/min (4 °C), a zatim isprane dva puta s 15 mL fiziološke otopine. Iz uzorka koji sadrži bakterijske stanice pripremljena su decimalna razrjeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi. MRS hranjiva podloga u Petrijevoj zdjelici nacijepljena je s dva puta po 10 µL šestog, sedmog i osmog decimalnog razrjeđenja. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka (CFU/mL).

$$\text{CFU/mL} = (\text{broj poraslih kolonija} \cdot \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}) / \text{volumen upotrijebljenog uzorka (mL)}$$

Priprema polimera za mikroinkapsulaciju:

- *Priprema natrijevog alginata*

Pripremljeno je 100 mL 3 % w/v Na-alginata u sterilnoj destiliranoj vodi pri sobnoj temperaturi, miješanjem na magnetnoj mješalici uz zagrijavanje do dobivanja homogene smjese.

- *Priprema želatine*

Pripremljeno je 100 mL 3 % w/v želatine u sterilnoj destiliranoj vodi zagrijavanjem pri 60 °C do dobivanja homogene smjese.

- *Priprema smjese alginata i želatine*

Otopine alginata i želatine su pomiješane u različitim omjerima do dobivanja konačnog volumena od 20 mL:

1. 100/0 % (20 mL/0 mL)
2. 90/10 % (18 mL/2 mL)
3. 80/20 % (16 mL/4 mL)
4. 70/30 % (14 mL/6 mL)
5. 60/40 % (12 mL/8 mL)
6. 50/50 % (10 mL/10 mL)

Talog stanica nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom suspendiran je u istom volumenu odgovarajućih smjesa alginata i želatine u tri paralele. Smjesa bakterijskih stanica i smatriksa postepeno je dodana u 2 %-tnu otopinu kalcijeva klorida uz miješanje na magnetnoj mješalici, prilikom čega dolazi do formiranja mikrokapsula (Banić i sur., 2018; Nooeaid i sur., 2017).

Kuglice su ostavljene 1 sat na tresilici da očvrstnu, nakon čega je uslijedilo ispiranje dva puta sa sterilnom destiliranom vodom i određivanje broja mikroinkapsuliranih stanica oslobađanjem iz mikrokapsula pomoću 2 %-tnog (v/w) Na-citrata (prilagođeno prema Li i sur., 2009), te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica indirektnom metodom.

Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (*engl.* encapsulation yield, EY), odnosno broj živih stanica prije i poslije mikroinkapsulacije izračunat je prema navedenoj formuli, gdje je N broj živih mikroinkapsuliranih stanica, a N₀ broj slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks (Vaziri i sur., 2018):

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

3.2.3. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica

Priređene mikroinkapsulirane stanice soja *L. plantarum* MB18 suspendirane su u obranom mlijeku (10 % w/v), zamrznute na -80 °C preko noći nakon čega su podvrgnute procesu liofilizacije. Preživljavanje mikroinkapsuliranih stanica nakon liofilizacije određeno je indirektnom metodom.

3.2.4. Preživljavanje mikroinkapsuliranih stanica u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Priprava simuliranog želučanog i soka tankog crijeva:

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5 % otopini natrijevog klorida, kojoj je pH vrijednost podešena na 2,0 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom.

Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) i žučnih soli (3,0 g/L) u 0,5 % otopini natrijeva klorida, kojoj je pH vrijednost podešena na 8,0 s natrijevom lužinom (Kos, 2001).

Liofilizati nemikroinkapsuliranog i mikroinkapsuliranog soja *L. plantarum* MB18 izloženi su djelovanju simuliranog želučanog soka tijekom 2 sata, nakon čega je proveden postupak centrifugiranja tijekom 10 minuta pri 4200 o/min (4 °C) i suspendiranja u simuliranom soku tankog crijeva tijekom iduća 4 sata (Kos, 2001).

Broj živih stanica određen je indirektnom metodom nakon djelovanja želučanog soka te nakon djelovanja želučanog soka i tankog crijeva. Stanice iz mikrokapsula su oslobođene pomoću 2 %-tnog (v/w) Na-citrata (prilagođeno prema Li i sur., 2009).

3.2.5. Procjena stabilnosti mikrokapsula mjerenjem apsorpcije vode

Određena je stabilnost proizvedenih mikrokapsula tijekom izlaganja simuliranim uvjetima GIT-a (želučani sok i sok tankog crijeva pripremljeni kako je opisano pod točkom 3.2.4.). Nakon mikroinkapsulacije provedene kako je opisano pod točkom 3.2.2., 1 g kuglica svakog uzorka mikrokapsule formirane različitim smjesama alginata i želatine, inkubiran je u 10 mL simuliranog soka želuca tijekom 2 h pri 37 °C. Nakon inkubacije tijekom koje se periodički pratila masa kuglica, kuglice su prebačene u simulirani sok tankog crijeva te inkubirane tijekom 4 h uz periodička mjerenja mase.

Apsorpcija vode (%) je izračunata prema navedenoj formuli:

$$\text{Apsorpcija vode (\%)} = [(W_t - W_0) / W_0] \cdot 100$$

gdje je W_0 početna masa kuglica, a W_t masa nabubrenih kuglica tijekom vremena u odgovarajućem mediju.

3.2.6. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti mikroinkapsuliranih stanica

Priprema obranog mlijeka:

Pripremljeno je 150 mL 10 %-tnog obranog mlijeka. Za pripremu istog korišten je prah obranog mlijeka koji je odvagano te suspendiran u manjoj količini sterilne deionizirane vode kako bi se dobila konzistencija paste, nakon čega je dodan ostatak sterilne vode do ukupnog volumena od 150 mL. Otopina je miješana na magnetnoj mješalici uz zagrijavanje i miješanje do vrenja.

Po 1 g mikroinkapsuliranih i liofiliziranih kuglica soja *L. plantarum* MB18 suspendiran je u 20 mL obranog mlijeka (10 %) i inkubiran anaerobno pri 37 °C tijekom 24 sata.

Nakon inkubacije, zabilježeno je da li je došlo do formiranja gruš, izmjerena je pH vrijednost i postotak proizvedene mliječne kiseline. Uranjanjem pH elektrode u uzorak određena je pH vrijednost, a postotak mliječne kiseline određen je razrijeđivanjem 1 mL uzorka s 19 mL destilirane vode te titriranjem s 0,1 M NaOH uz fenoftalein kao indikator do pojave ružičaste boje.

Postotak proizvedene mliječne kiseline izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^\circ SH \cdot 0,0225$$

Gdje je:

$$^\circ SH = a \cdot 20 \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 2$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

$$f_{\text{NaOH}} = 1$$

$$(^{\circ} SH \sim 0,0225 \text{ g mliječna kiseline (\%)})$$

$$^\circ SH \rightarrow \text{stupanj kiselosti}$$

3.2.7. Statistička analiza podataka

Za statističku obradu podataka korišten je Microsoftov program Excel. Eksperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri nezavisna uzorka $\pm$ standardna devijacija (SD), koja služi kao mjera odstupanja podataka od srednje vrijednosti, prema sljedećim formulama:

$$\bar{x} = \sum \frac{x_i}{n}$$
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

gdje je $\bar{x}$ srednja vrijednost uzoraka, x_i vrijednost uzorka, n veličina uzorka, a σ standardna devijacija.

4. REZULTATI I RASPRAVA

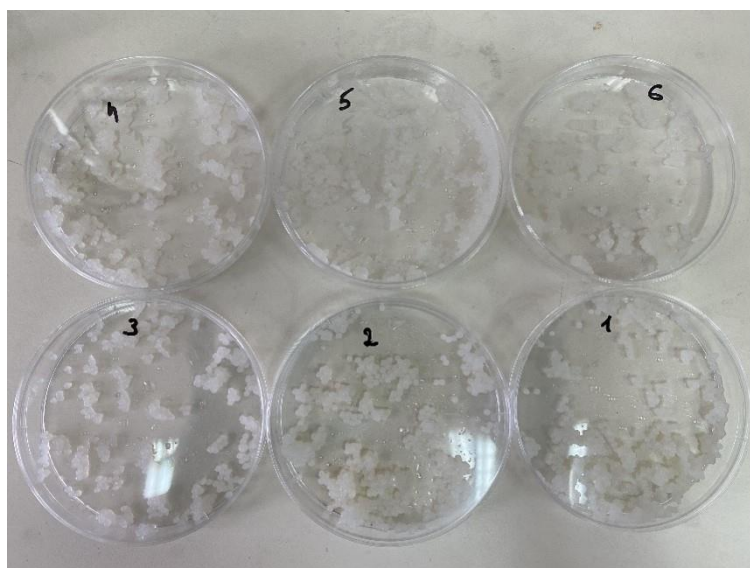
4.1. TEHNOLOŠKI KRITERIJ ZA IZBOR PROBIOTIČKOG SOJA

S ciljem ispitivanja tehnološkog aspekta primjene soja *L. plantarum* MB18 kao probiotičkog pripravka, provedeni su biotehnološki procesi mikroinkapsulacije i liofilizacije, u svrhu preživljavanja u stresnim uvjetima i zadržavanja aktivnosti tijekom priprave i čuvanja probiotičkog proizvoda te konačne primjene kao potencijalne funkcionalne starter kulture. U ovom radu probiotički soj *L. plantarum* MB18 inkapsuliran je u sloju alginata i želatine u različitim omjerima u svrhu zaštite tijekom prolaska kroz simulirani gastrointestinalni sustav domaćina.

Nakon mikroinkapsulacije određen je početni broj živih stanica (N_0) i broj bakterijskih stanica nakon mikroinkapsulacije svježe biomase u alginatu i želatini u različitim omjerima (N), te je izračunata učinkovitost mikroinkapsulacije (EY, %) (tablica 1). Prema dobivenim rezultatima uspješnost mikroinkapsulacije u različitim omjerima alginata i želatine je iznad 95 %, a broj stanica po gramu mikrokapsule zadovoljava tehnološke probiotičke kriterije. Mikrokapsule su prikazane na slici 3. Usporedive vrijednosti ostvarili su i Zanjani i sur. (2014) provodeći alginatnu i kitozansku dvoslojnu mikroinkapsulaciju probiotičkih bakterija *Lactobacillus casei* i *Bifidobacterium bifidum* uz uspješnost mikroinkapsulacije iznad 90 % što se smatra izuzetno uspješnim u usporedbi s ostalim istraživanjima u kojima je korištena ova metodologija postižući uspješnost mikroinkapsulacije od 50 % i 70 % (Song i sur., 2013; Zou i sur., 2011). Mikroinkapsulacija u smjesi alginata i kitozana i ranije je pokazala uspješnost u zaštiti i ostalih biološki aktivnih molekula (Nooeaid i sur., 2017). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je ispitivani probiotički soj pogodan za tehnike mikroinkapsulacije u svim omjerima alginata i želatine, omogućavajući zaštitu stanica uz visoku uspješnost mikroinkapsulacije.

Tablica 1. Učinkovitost mikroinkapsulacije (EY, %) soja *L. plantarum* MB18 u uzorcima: 1 - 100 % alginata i 0 % želatine, 2 - 90 % alginata i 10 % želatine, 3 - 80 % alginata i 20 % želatine, 4 - 70 % alginata i 30 % želatine, 5 - 60 % alginata i 40 % želatine, 6 - 50 % alginata i 50 % želatine

Uzorak	N ₀ (CFU/mL)	N (CFU/mL)	log N ₀	log N	EY (%)
1	$(1,85 \pm 0,92) \times 10^9$	$(1,28 \pm 0,39) \times 10^9$	9,24 $\pm$ 0,23	9,10 $\pm$ 0,13	98,45 $\pm$ 0,26
2	$(2,03 \pm 1,38) \times 10^9$	$(2,65 \pm 2,04) \times 10^9$	9,25 $\pm$ 0,32	9,17 $\pm$ 0,31	99,13 $\pm$ 0,45
3	$(3,83 \pm 2,37) \times 10^9$	$(2,28 \pm 1,03) \times 10^9$	9,54 $\pm$ 0,29	9,33 $\pm$ 0,20	97,87 $\pm$ 0,35
4	$(1,20 \pm 0,28) \times 10^9$	$(1,30 \pm 0,28) \times 10^9$	9,07 $\pm$ 0,10	9,11 $\pm$ 0,10	99,61 $\pm$ 0,14
5	$(3,78 \pm 1,73) \times 10^9$	$(3,30 \pm 1,75) \times 10^9$	9,55 $\pm$ 0,21	9,35 $\pm$ 0,27	97,92 $\pm$ 0,34
6	$(2,73 \pm 0,39) \times 10^9$	$(2,43 \pm 2,23) \times 10^9$	9,43 $\pm$ 0,06	9,06 $\pm$ 0,38	96,01 $\pm$ 0,38



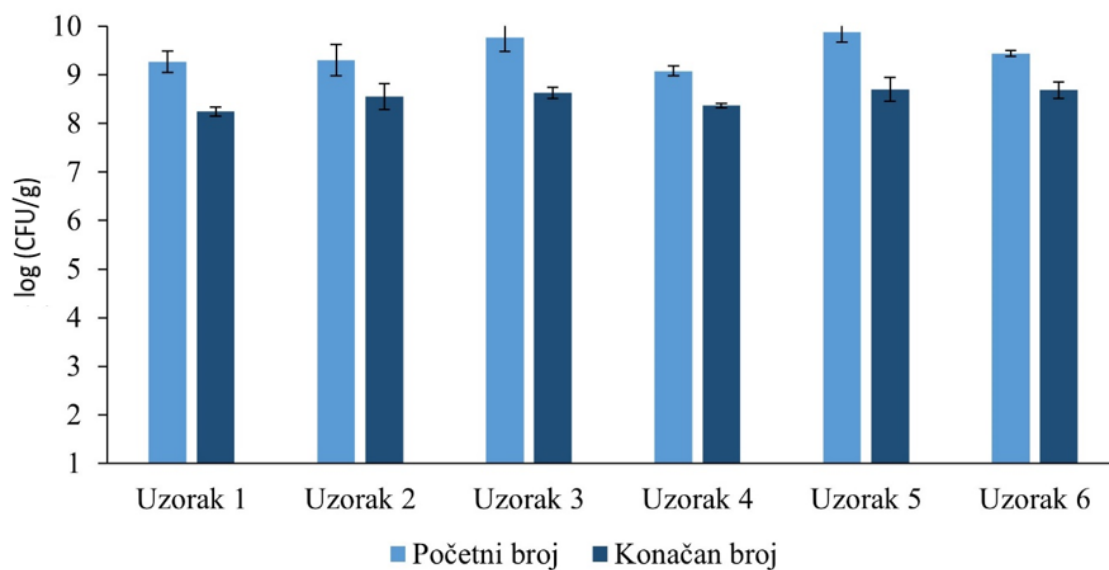
Slika 3. Mikrokapsule različitih omjera alginata i želatine soja *L. plantarum* MB18 korištene u eksperimentu. Uzorci: 1 - 100 % alginata i 0 % želatine, 2 - 90 % alginata i 10 % želatine, 3 - 80 % alginata i 20 % želatine, 4 - 70 % alginata i 30 % želatine, 5 - 60 % alginata i 40 % želatine, 6 - 50 % alginata i 50 % želatine

Dobivene mikrokapsule probiotičkog soja *L. plantarum* MB18 su podvrgnute procesu liofilizacije kako bi se zadržao visoki broj metabolički aktivnih stanica tijekom skladištenja (slika 4). Kod svih liofilizata određeno je preživljavanje nakon rehidracije radi izračuna uspješnosti procesa.

Prema dobivenim rezultatima soj *L. plantarum* MB18 uspješno je liofiliziran u mikroinkapsuliranom obliku uz minimalan gubitak stanica za sve uzorke različitih omjera alginata i želatine (slika 5). Najmanji gubitak stanica od 0,71 logaritamske jedinice postignut je u uzorku 4 koji je sadržavao 70 % alginata i 30 % želatine. Zbog stresnih uvjeta za stanicu, liofilizacija BMK često se provodi uz dodatak lioprotektora. Uspješna liofilizacija omogućava visok stupanj preživljavanja korisnih mikroorganizama i dulje vrijeme skladištenja. Uspješnost varira obzirom na zaštitni medij tijekom liofilizacije. Rezultati istraživanja Bolla i sur. (2011) pokazali su značajne razlike u preživljavanju BMK nakon liofilizacije u prisutnosti različitih lioprotektora. Rezultati ovog istraživanja pokazuju visok stupanj preživljavanja mikroinkapsuliranih bakterija te ukazuju na sinbiotičku protektivnu ulogu obranog mlijeka te alginata i želatine što je usporedivo s rezultatima De Giulio i sur. (2005) gdje je dokazan protektivan učinak kalcijevog alginata tijekom liofilizacije bakterija mliječne kiseline.



Slika 4. Liofilizirane mikroformulacije različitih omjera alginata i želatine soja *L. plantarum* MB18. Uzorci: 1 - 100 % alginata i 0 % želatine, 2 - 90 % alginata i 10 % želatine, 3 - 80 % alginata i 20 % želatine, 4 - 70 % alginata i 30 % želatine, 5 - 60 % alginata i 40 % želatine, 6 - 50 % alginata i 50 % želatine

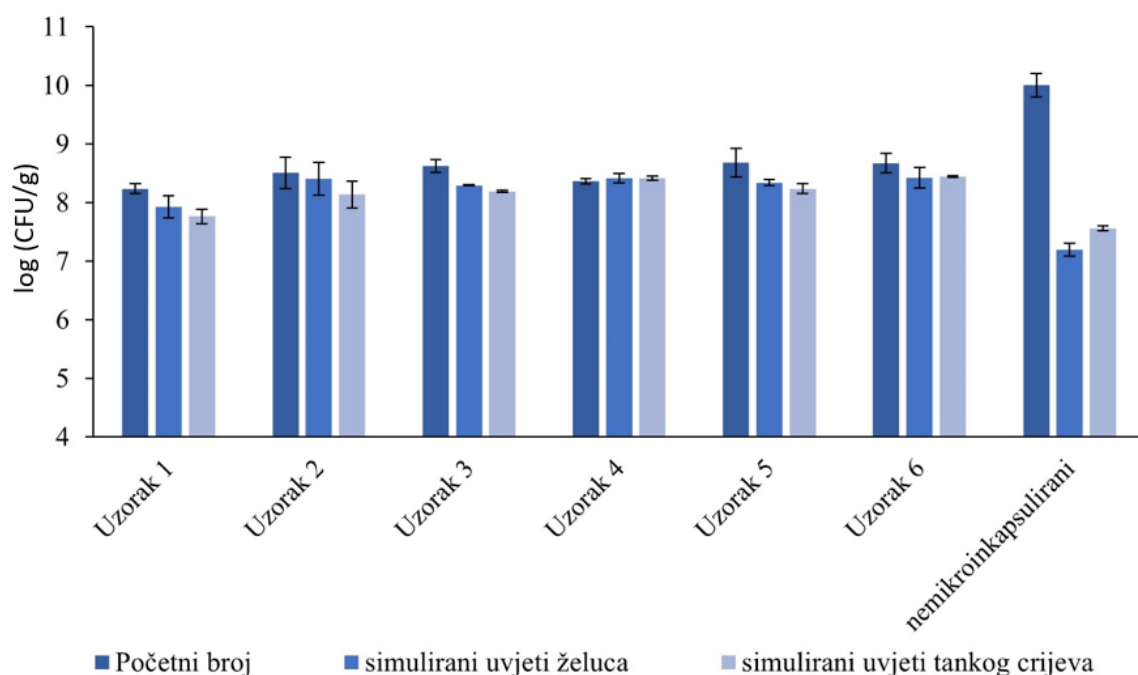


Slika 5. Broj živih stanica mikroinkapsuliranog soja *L. plantarum* MB18 prije i nakon liofilizacije. Uzorci: 1 - 100 % alginata i 0 % želatine, 2 - 90 % alginata i 10 % želatine, 3 - 80 % alginata i 20 % želatine, 4 - 70 % alginata i 30 % želatine, 5 - 60 % alginata i 40 % želatine, 6 - 50 % alginata i 50 % želatine

4.2. FUNKCIONALNI KRITERIJ ZA IZBOR PROBIOTIČKOG SOJA

Kako se preživljavanje u stresnim uvjetima gastrointestinalnog trakta smatra jednim od najvažnijih funkcionalnih kriterija za izbor probiotičkog soja, ispitano je *in vitro* preživljavanje liofiliziranih mikrokapsula soja *L. plantarum* MB18, u simuliranom želučanom soku te u simuliranom soku tankog crijeva.

Prema dobivenim rezultatima, mikroinkapsulirani soj *L. plantarum* MB18 pokazao je visoki stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava uz minimalan gubitak stanica. U usporedbi s nemikroinkapsuliranim stanicama soja *L. plantarum* MB18 vidljiv je protektivni učinak primjenjenih polimera za mikroinkapsulaciju, kod kojih je uočen gubitak stanica od 3 logaritamske jedinice (slika 6). Kako je za funkcionalnost probiotičkih bakterija preporučena minimalna količina od 10^6 CFU/mL (Chen i sur., 2017), ukupno preživljavanje soja *L. plantarum* MB18 predstavlja zadovoljavajuću količinu za probiotičku primjenu.



Slika 6. Preživljavanje soja *L. plantarum* MB18 nakon izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava, mikroinkapsuliranog primjenom različitih omjera alginata i želatine. Uzorci: 1 - 100 % alginata i 0 % želatine, 2 - 90 % alginata i 10 % želatine, 3 - 80 % alginata i 20 % želatine, 4 - 70 % alginata i 30 % želatine, 5 - 60 % alginata i 40 % želatine, 6 - 50 % alginata i 50 % želatine

4.3. FIZIKALNO-KEMIJSKA SVOJSTVA PROIZVEDENIH MIKROKAPSULA

Nakon što su uspješno dokazani tehnološko i funkcionalni kriteriji za izbor soja *L. plantarum* MB18 kao probiotičkog, ispitana su fizikalno kemijska svojstva formiranih mikrokapsula. Fizikalna svojstva ispitana su u cilju učinkovitog otpuštanja *in situ* na ciljnom mjestu djelovanja, mjerenjem apsorpcije vode u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. U simuliranim uvjetima želučanog soka dokazana je stabilnost formiranih mikrokapsula, dok je u simuliranom soku tankog crijeva dokazana apsorpcija vode i to do 8,53 % za uzorak 6 koji je sadržavao jednaki udio alginata i želatine (tablica 2). Prema tome, primjena alginata i želatine može se koristiti kao optimalan nosač za zaštitu probiotičkog soja u stresnim simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, kao i za njegovu dostavu i učinkovito otpuštanje u bazičnim uvjetima debelog crijeva, što je u skladu s literaturnim podacima (Afzaal i sur., 2020).

Tablica 2. Postotak apsorpcije i reapsorpcije vode bakterijskog soja *L. plantarum* MB18 u stimuliranim uvjetima želuca i tankog crijeva. Uzorci: 1 - 100 % alginata i 0 % želatine, 2 - 90 % alginata i 10 % želatine, 3 - 80 % alginata i 20 % želatine, 4 - 70 % alginata i 30 % želatine, 5 - 60 % alginata i 40 % želatine, 6 - 50 % alginata i 50 % želatine

Uzorak	Želučani sok (%)	Tanko crijevo (%)
1	-21,06	-1,15
2	-10,50	6,48
3	-16,57	2,86
4	-26,81	2,65
5	-28,24	2,72
6	-21,96	8,53

Nadalje, kako bi se ispitao potencijal primjene soja *L. plantarum* MB18 kao starter kulture u formi liofiliziranog mikroinkapsuliranog pripravka, ispitana su kemijska svojstva dobivenih formulacija mjerenjem fermentacijske aktivnosti inkapsuliranog soja MB18. Fermentacijska aktivnost određena je nakon prekonoćne inkubacije u obranom mlijeku, mjerenjem pH vrijednosti i postotka proizvedene mliječne kiseline. Prema Villegas i sur. (2015), proteolitička aktivnost BMK je u izravnoj korelaciji s formiranjem gruš, stoga je ispitana sposobnost koagulacije obranog mlijeka tijekom prekonoćne inkubacije. Prema dobivenim rezultatima svi primjenjeni polimeri su pokazali vrlo dobru poroznost i sposobnost dostave mliječnog šećera

laktoze, proteina i ostalih hranjivih tvari prisutnih u obranom mlijeku do soja inkapsuliranog u matriksu, kao i otpuštanje proizvedenih metabolita poput mliječne kiseline, uslijed čega je snižena pH vrijednost u okolišnom mediju mikroformulacija (tablica 3).

Tablica 3. Fermentacijska aktivnost bakterijskog soja *L. plantarum* MB18. Uzorci: 1 - 100 % alginata i 0 % želatine, 2 - 90 % alginata i 10 % želatine, 3 - 80 % alginata i 20 % želatine, 4 - 70 % alginata i 30 % želatine, 5 - 60 % alginata i 40 % želatine, 6 - 50 % alginata i 50 % želatine

Uzorak	pH vrijednost	Koagulacija			Mliječna kiselina (%)
1	6,46 ± 0,06	+	+/-	+/-	0,17 ± 0,03
2	6,41 ± 0,39	+	+/-	+/-	0,24 ± 0,03
3	6,51 ± 0,04	+	+/-	+/-	0,18 ± 0,00
4	6,43 ± 0,16	+	+	+/-	0,25 ± 0,03
5	6,46 ± 0,24	+	+/-	+/-	0,25 ± 0,04
6	6,56 ± 0,23	+	+/-	+/-	0,23 ± 0,06

Legenda: (+) izvrsna koagulacija; (+/-) dobra koagulacija; (-) nema koagulacije

5. ZAKLJUČCI

1. Mikroinkapsulacija u različitim omjerima alginata i želatine i liofilizacija uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora uspješno je primijenjena za soj *L. plantarum* MB18, uz visok broj metabolički aktivnih stanica koji zadovoljava tehnološke probiotičke kriterije, pri čemu se kao najučinkovitiji nosač pokazala smjesa 70 % alginata i 30 % želatine.
1. Zadovoljen je funkcionalni kriteriji preživljavanja mikroinkapuliranih pripravaka soja *L. plantarum* MB18 u *in vitro* simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava i dostave probiotičkog soja *in situ* do ciljnog mjesta djelovanja.
2. Ispitivanjem fizikalno-kemijskih svojstava proizvedenih mikrokapsula, optimalna se pokazala primjena alginata i želatine u jednakim omjerima.
3. Dokazan je potencijal primjene liofiliziranog mikroinkapsuliranog pripravka kao probiotičke funkcionalne starter kulture.

6. LITERATURA

Afzaal M, Khan AU, Saeed F, Arshad MS, Khan MA, Saeed M, i sur. (2020) Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Sci Nutr* **17**, 1649-1656. doi: 10.1002/fsn3.1451

Arslan-Tontul S, Erbas M (2017) Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *Lwt-Food Sci Technol* **81**, 160-169. doi: 10.1016/j.lwt.2017.03.060

Azad M A K, Sarker M, Wan D (2018). Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *BioMed Res Int* 8063647. doi: 10.1155/2018/8063647

Banić M, Butorac K, Čuljak N, Leboš Pavunc A, Novak J, Bellich B, i sur. (2022) The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Biomolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *Int J Mol Sci*, **23**, 14382. <https://doi.org/10.3390/ijms232214382>

Banić M, Uroić K, Leboš Pavunc A, Novak J, Zorić K, Durgo K, i sur. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT*, **93**, 257-267

Behera SS, Ray RC, Zdolec N (2018) *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *Biomed Res Int* 9361614. doi: 10.1155/2018/9361614

Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, i sur. (2020) Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements. *Front Microbiol* **11**, 1662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>

Bolla PA, De los Angeles Serradell M, De Urraza PJ, De Antoni GL (2011) Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *J Dairy Res* **78**, 15-22. doi: 10.1017/S0022029910000610

Broeckx G, Vandenheuvel D, Claesb IJJ, Lebeerb S, Kiekens F (2016) Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int J Pharm* **505**, 303-318. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.002

Burgain J, Scher J, Francius G, Borges F, Corgneau M, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C, Gaiani C (2014) Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Adv Colloid Interfac* **213**, 21-35. doi: 10.1016/j.cis.2014.09.005

Butorac K, Banić M, Novak J, Leboš Pavunc A, Uroić K, Durgo K, i sur. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microb Cell Fact* **19**, 106. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01365-6>

Butorac K, Novak J, Bellich B, Teran LC, Banić M, Leboš Pavunc A, i sur. (2021) Lyophilized alginate-based microspheres containing *Lactobacillus fermentum* D12, an exopolysaccharides producer, contribute to the strain's functionality *in vitro*. *Microb Cell Fact* **20**, 85. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01575-6>

Chen L, Yang T, Song Y, Shu G, Chen H (2017) Effect of xanthan-chitosan-xanthan double layer encapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB01 in simulated gastrointestinal conditions, bile salt solution and yogurt. *Lwt-Food Sci Technol* **81**, 274-280. doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.005

Corona-Hernandez RI, Alvarez-Parrilla E, Lizardi-Mendoza J, Islas-Rubio AR, De la Rosa LA, Wall-Medrano A (2013) Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **12**, 614-628. doi: 10.1111/1541-4337.12030

De Giulio B, Orlando P, Barba G, Coppola R, De Rosa M, Sada A, i sur. (2005) Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World J Microb Biot* **21**, 739-746. doi: 10.1007/s11274-004-4735-2

De Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Júnior AIM, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv* **36**, 2060-2076. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.09.003

De Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezema M, De Vosa WM (2006) *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J* **16**, 1018-1028. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.09.003

Eslami M, Yousefi B, Kokhaei P, Hemati M, Nejad ZR, Arabkari V, Namdar A (2019) Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *J Cell Physiol* **234**, 1-17. doi: 10.1002/jcp.28473

Gallo M, Corbo MR (2010) Microencapsulation as a new approach to protect active compounds in food. U: Bevilacqua A, Rosaria M, Sinigaglia M (ured.) Application of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability. Bentham Science Publisher. str. 188-195.

Harel M, Tang Q (2014) Protection and Delivery of Probiotics for Use in Foods. U: Gaonkar A G, Vasisht N, Khare A R, Sobel R (ured.) Microencapsulation in the Food Industry, Elsevier, San Diego, London, str. 469-482.

Kasper JC, Friess W (2011) The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur J Pharm Biopharm* **78**, 48-63. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.03.010

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

Landete JM, Rodríguez H, Curiel JA, De Las Rivas B, De Felipe FL, Muñoz R (2010). "Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains". Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. str. 387-396. doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00043-7

Li XY, Chen XG, Cha DS, Park HJ, Liu CS (2009) Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate–gelatin and its properties. *J Microencapsul* **26**, 315–324. doi: 10.1080/02652040802328685

Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER (2005) A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol* **99**, 287-296. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020

- Matejčková Z, Liptáková D, Spodniaková S, Valík L (2016) Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. *Acta Chim Slov* **9**, 104-108.
- Nooeaid P, Chuysinuan P, Techasakul S (2017) Alginate/gelatine hydrogels: Characterisation and application of antioxidant release. *Green Materials* **5**, 153-164.
- Oak SJ, Jha R (2019) The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Crit Rev Food Sci* **59**, 1675-1683. doi: 10.1080/10408398.2018.1425977.
- Othman M, Ariff AB, Rios-Solis, L, Halim, M (2017) Extractive Fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: A review. *Front Microbiol* **8**, 2285. doi: 10.3389/fmicb.2017.02285
- Peng M, Tabashsum Z, Anderson M, Truong A, Houser AK, Padilla J, Akmel A, Bhatti J, Rahaman SO, Biswas D (2020) Effectiveness of probiotics, prebiotics, and prebiotic-like components in common functional foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **19**, 1908-1933. doi: 10.1111/1541-4337.12565
- Rajam R, Subramanian P (2022) Encapsulation of probiotics: past, present and future. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* **11**, 46. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00228-w>
- Reddy KBPK, Awasthi SP, Madhu AN, Prapulla SG (2009) Role of Cryoprotectants on the Viability and Functional Properties of Probiotic Lactic Acid Bacteria during Freeze Drying. *Food Biotechnol* **23**, 243–265. doi: 10.1080/08905430903106811
- Singh MN, Hemant KSY, Ram M, Shivakumar HG (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *J Res PharmSci* **5**, 65–77.
- Siow CRS, Heng PWS, Wah Chan LW (2016) Application of freeze-drying in the development of oral drug delivery systems. *Expert Opin Drug Del* **13**, 1595-1608. doi: 10.1080/17425247.2016.1198767
- Sobel R, Versic R, Gaonkar AG (2014) Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. U: Gaonkar AG, Vasisht N, Khare AR, Sobel R, (ured.) Microencapsulation in the Food Industry, Elsevier, San Diego, London, str. 3-11.

Song H, Yu W, Gao M, Liu X, Ma X (2013) Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydr Polym* **96**, 181-189. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.068

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

Šušković J, Kos B, Frece J, Beganović J, Leboš Pavunc A (2009) Probiotički koncept - probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **4**, 77-84.

Uroić K, Nikolić M, Kos B, Leboš Pavunc A, Beganović J, Lukić J, i sur. (2014) Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Croatian Fresh Soft Cheese and Serbian White Pickled Cheese. *Food Technol Biotechnol* **52**, 232–241.

Vaziri AS, Alemzadeh I, Vossoughi M (2018) Improving survivability of *Lactobacillus plantarum* in alginate-chitosan beads reinforced by Na-tripolyphosphate dual cross- linking. *LWT* **97**, 440-447. doi: 10.1016/j.lwt.2018.07.037

Villegas JM, Brown L, Savoy de Giori G, Hebert EM (2015) Characterization of the mature cell surface proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 4277-4286. doi: 10.1007/s00253-014-6258-6

Zanjani MAK, Tarzi BG, Sharifan A, Mohammadi N (2014) Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iran J Pharm Res* **13**, 843-852.

Zielińska D, Kolozyn-Krajewska D (2018) Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties: Review. *Biomed Res Int* 5063185. doi: 10.1155/2018/5063185

Zou Q, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H, Zhang H, i sur. (2011) Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *Int J Food Sci Tech* **46**, 1672-1678. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02685.x

Izjava o izvornosti

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

Nino Frece

Vlastoručni potpis