

# Mikroinkapsulacija probiotičkog soja *Lactobacillus fermentum* D12 nakon uzgoja uz dodatak različitih prebiotika

---

Ursić, Tino

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:123338>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2021-05-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studiji Biotehnologija**

**Tino Ursić**  
7126/BT

**Mikroinkapsulacija probiotičkog soja *Lactobacillus fermentum*  
D12 nakon uzgoja uz dodatak različitih prebiotika**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

**Mentor:** prof. dr. sc. Jagoda Šušković

**Zagreb, 2018.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jagode Šušković, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009).

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studiji Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Mikroinkapsulacija probiotičkog soja *Lactobacillus fermentum* D12 nakon uzgoja uz dodatak različitih prebiotika**  
*Tino Ursić, 0058207325*

**Sažetak:** Tema ovog rada je mikroinkapsulacija probiotičkog soja *Lactobacillus fermentum* D12 u alginatu uz dodatak prebiotika inulina i fruktooligosaharida, te liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora. Cilj rada bio je utvrditi štite li prebiotici i obrano mlijeko mikroinkapsulirane stanice tijekom procesa sušenja, skladištenja i izlaganja stanica nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Vrlo je važno da se stanice probiotičkih sojeva zaštite na odgovarajući način kako bi se što veći broj tih stanica dostavio do ciljnog mjesta kao što je gastrointestinalni trakt i kako bi tamo započele svoje korisno djelovanje. Određivanjem preživljavanja stanica mikroinkapsuliranih uz dodatak prebiotika i liofiliziranih uz dodatak lioprotektora, nakon procesa liofilizacije i nakon izlaganja stanica nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta i usporedbom preživljavanja u odnosu na kontrolu, utvrđeno je kako alginat kao sredstvo za mikroinkapsulaciju i dodatak prebiotika i lioprotektora štite stanice od nepovoljnih i stresnih uvjeta.

**Ključne riječi:** *Lactobacillus fermentum* D12, liofilizacija, mikroinkapsulacija, prebiotici, probiotici

**Rad sadrži:** 22 stranice, 5 slika, 1 tablicu, 25 literaturnih 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:** prof. dr. sc. Jagoda Šušković

**Pomoć pri izradi:** Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

**Datum obrane:** 10. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Antibiotics, Enzymes, Probiotics and Starter Cultures Technology**  
**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Microencapsulation of probiotic strain *Lactobacillus fermentum* D12 after cultivation with addition of different prebiotics**

***Tino Ursić, 0058207325***

**Abstract:** The topic of this study is the microencapsulation of the *Lactobacillus fermentum* D12 probiotic strain in alginate with the addition of prebiotics (inuline and fructo-oligosaccharide), and the lyophilization of microencapsulated cells with the addition of skimmed milk as a lyoprotectant. The aim of the study was to determine whether will prebiotics and skim milk protect microencapsulated cells during the process of drying, storage and exposing cells to unfavourable conditions of the gastrointestinal tract. It is very important that probiotic cells are adequately protected so that as many of these cells are delivered to the target site in the gastrointestinal tract and to begin their beneficial effects. Determination of survival of the microencapsulated cells with addition of prebiotics and lyophilized with addition of lyoprotectant after the lyophilization process and post-exposure of the cells to unfavorable conditions of the gastrointestinal tract and comparison of survival to the control sample, showed that the alginate as a microencapsulating medium and addition of prebiotics and lyoprotectant protect cells from adverse and stressful conditions.

**Keywords:** *Lactobacillus fermentum* D12, lyofilization, microencapsulation, prebiotics, probiotics

**Thesis contains:** 22 pages, 5 figures, 1 table, 25 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD Jagoda Šušković, Full Professor

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

**Defence date:** 10<sup>th</sup> September, 2018.

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Bakterije mliječne kiseline i probiotici.....	2
2.2. Mehanizam djelovanja probiotika .....	4
2.3. Humani gastrointestinalni trakt .....	5
2.4. Mikroinkapsulacija probiotičkih bakterija .....	6
2.5. Liofilizacija probiotičkih bakterija.....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Radni mikroorganizam .....	12
3.1.2. Hranjive podloge .....	12
3.1.3. Kemikalije.....	12
3.1.4. Aparatura i pribor .....	13
3.2. METODE RADA.....	14
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama .....	14
3.2.2. Mikroinkapsulacija soja <i>Lactobacillus fermentum</i> D12 u alginatu i u alginatu uz dodatak prebiotika (inulin + FOS).....	14
3.2.3. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica <i>L. fermentum</i> D12 uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora .....	15
3.2.4. Preživljavanje mikroinkapsuliranog i liofiliziranog soja <i>L. fermentum</i> D12 tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta .....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	17
4.1. Mikroinkapsulacija soja <i>Lactobacillus fermentum</i> D12 u alginatu i u alginatu uz dodatak prebiotika (inulin + FOS).....	17
4.2. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica <i>L. fermentum</i> D12 uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora.....	18
4.3. Preživljavanje mikroinkapsuliranog i liofiliziranog soja <i>L. fermentum</i> D12 tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta .....	19
5. ZAKLJUČCI.....	20
6. POPIS LITERATURE .....	21

## 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su Gram-pozitivne, nesporogene, katalaza negativne, nemaju citokrom, anaerobne su ili aerotolerantne te acidotolerantne čiji je konačni proizvod fermentacije šećera mliječna kiselina (Šušković i sur., 2010). BMK velika su skupina mikroorganizama, industrijski važne jer imaju GRAS (Generally Regarded as Safe) status, zbog svoje prisutnosti u hrani i doprinosa zdravlju mikroflore ljudske sluznice. Primjenjuju se u biomedicinskom liječenju i kao probiotici jer sudjeluju u metabolizmu laktoze, snižavaju razinu kolesterola u krvi, snižavaju krvni tlak, smanjuju rizik od nastanka raka debelog crijeva i pojave urogenitalnih infekcija, djeluju imunomodulirajuće, itd. (Mattu i Chauhan, 2013).

Probiotici su pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama, koji primijenjeni kod ljudi ili životinja, djeluju korisno, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković i sur., 1997). Probiotici se prema načinu primjene mogu podijeliti na bioterapeutike i funkcionalne dodatke hrani.

S tehnološkog aspekta proizvodnje probiotika kao živih lijekova važno je osigurati optimalne uvjete tijekom pripreme i čuvanja probiotika radi mikrobiološke stabilnosti proizvoda. Dodatkom krioprotektora i lioprotektora te mikroinkapsuliranjem probiotičkih sojeva tijekom zamrzavanja, sušenja ili čuvanja, može se bitno povećati broj živih stanica po gramu probiotičkog pripravka.

Mikroinkapsulacija je tehnološki postupak imobilizacije probiotičkih bakterija unutar ograničenog prostora s ciljem njihove zaštite tijekom proizvodnje i primjene kao bioterapeutika. Učinkovitost mikroinkapsulacije, vlažne biomase probiotičkih bakterija, u odnosu na mikroinkapsulaciju liofiliziranih stanica pokazala se uspješnijom. Mikroinkapsulirane probiotičke stanice bolje preživljavaju simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta od stanica koje nisu mikroinkapsulirane. Mikroinkapsulacija stanica u alginatu pokazala se kao obećavajuća metoda koja doprinosi boljem preživljavanju simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta pa bi se mogla primjenjivati u biotehnološkoj proizvodnji probiotika kao živih lijekova (Šušković i sur., 2009).

Cilj ovog rada bio je optimirati biotehnološku proizvodnju probiotičkog soja *Lactobacillus fermentum* D12 u laboratorijskom mjerilu, odnosno proces mikroinkapsulacije i liofilizacije. Soj *Lactobacillus fermentum* D12 izoliran je u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu iz domaćeg sira, a ima sposobnost biosinteze egzopolisaharida.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Bakterije mliječne kiseline i probiotici

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su mikroorganizmi koji proizvode mliječnu kiselinu kao glavni nusproizvod fermentacije šećera. BMK mogu biti štapići ili koki, često se susreću u prirodi i povezani su s biljnim materijalom. Također, prisutne su i u ljudskoj mikroflori i mikroflori sisavaca (usna šupljina, gastrointestinalni trakt i sl.). BMK su najpoznatije u industriji mliječnih proizvoda po svom korištenju kao starter kulture i u fermentaciji mliječnih proizvoda. Kao starter kulture, dodaju se u mlijeko i dopušta im se da rastu pod kontroliranim uvjetima kako bi proizvele kiseline i/ili poboljšale okus i strukturu sira i kultiviranih proizvoda. BMK mogu rasti u mliječnim proizvodima kao kontaminanti uzrokujući nepoželjne promjene, kao npr. kiseljenje mlijeka ili mogu proizvesti plinove u kultiviranim proizvodima ili siru koji onda utječu na izgled pakiranja ili uzrokuju promjene u okusu proizvoda.

BMK se s obzirom na nusproizvod fermentacije šećera (npr. glukoza) mogu podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK fermentiraju glukozu do mliječne kiseline kao glavnog nusproizvoda fermentacije. Homofermentativne BMK u koje spada *Lactococcus* spp. primjenjuju se kao starter kulture za mliječne proizvode jer je tu potrebna njihova sposobnost brze proizvodnje mliječne kiseline i snižavanja pH vrijednosti. Ostale homofermentativne BMK uključuju štapičaste sojeve koji se koriste u proizvodnji jogurta (*Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*, *Lb. acidophilus*) i koke (*Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*) te termofilne sojeve koji se mogu koristiti u proizvodnji sira (*Lb. helveticus*). Heterofermentativne BMK fermentiraju glukozu do mliječne kiseline, etanola/octene kiseline i CO<sub>2</sub> kao nusproizvoda fermentacije. U heterofermentativne BMK spadaju *Leuconostoc* spp. (Gram-pozitivni koki), Gram-pozitivni štapići kao *Lactobacillus brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*.

Ostale *Lactobacillus* vrste se smatraju fakultativno heterofermentativnima jer proizvode CO<sub>2</sub> i ostale nusproizvode samo pod određenim uvjetima i iz specifičnih supstrata (npr. *Lb. plantarum*) (Anonymus).

U pogledu funkcionalne hrane sve je veći interes za probiotike koji sadržavaju bakterije mliječne kiseline. Takvi sojevi bakterija mliječne kiseline moraju biti pažljivo odabrani po točno definiranim kriterijima kako bi preživjeli prolaz kroz gastrointestinalni trakt i kolonizirali



intestinalni trakt dovoljno dug vremenski period u cilju izazivanja željenih zdravstvenih učinka (Šušković i sur., 2010).

Izraz probiotik odnosi se na proizvode koji:

1. sadržavaju žive mikroorganizme, kao npr. liofilizirane stanice ili u fermentiranim proizvodima,
2. poboljšavaju zdravstveno stanje ljudi i životinja (može uključivati poticanje rasta životinja), ili
3. mogu djelovati u ustima ili probavnom traktu (u hrani ili u obliku kapsula), u gornjem respiratornom traktu (aerosol) ili u urogenitalnom traktu (lokalna primjena) (Šušković i sur., 1997).

Teorijska osnova za izbor probiotičkih mikroorganizama uključuje sigurnost, funkcionalne aspekte (preživljavanje, vezanje na epitel, kolonizacija, proizvodnja antimikrobnih supstanci, imunomodulirajuće djelovanje, antigenotoksična aktivnost i prevencija patogena) i tehnološke aspekte (rast u mlijeku, pogodna senzorska svojstva, stabilnost, rezistencija na fage, održivost u procesu). Naravno, sigurnost probiotičkih sojeva od primarne je važnosti. Važnost humanog podrijetla probiotičkih sojeva dugo se raspravljala, a većina probiotika koji se trenutno uspješno koriste su humanog podrijetla. I sposobnost kolonizacije ljudskog gastrointestinalnog trakta jedno je vrijeme bila upitna. Međutim, većina trenutnih sojeva označena je da ima sposobnost privremene kolonizacije intestinalnog trakta, a određena je mjerenjem broja probiotičkih stanica u fecesu nakon unosa hranom. Kod nekih sojeva su utvrđena specifična svojstva koja uključuju vezanje na određene stanice intestinalnog trakta i mogućnost izazivanja imuno odgovora. Stabilnost pri niskom pH i u prisutnosti žuči očigledna su svojstva za bilo koji soj za koji se očekuje djelovanje u gastrointestinalnom traktu. Proizvodnja antimikrobnih supstanci često se smatra jednim od načina sprječavanja rasta patogenih mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu (Salminen i sur., 1996). Adhezija probiotičkih sojeva za stanice intestinalnog trakta i daljnja kolonizacija trakta važni su preduvjeti za probiotičko djelovanje. Adhezija pruža potencijal stanicama da nasele intestinalni trakt i rastu u uvjetima koji u njemu vladaju. Adhezija također osigurava interakciju s površinom sluznice olakšavajući kontakt s limfnim tkivom povezanim s crijevima posredujući tako lokalni i sistematski imunosni učinak.

## 2.2. Mehanizam djelovanja probiotika

Jedna od najvažnijih karakteristika probiotika je zaštita domaćina od patogena u intestinalnom traktu, a što se postiže na nekoliko načina:

### I. Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama

BMK koje se primjenjuju kao probiotici mogu djelovati antagonistički zbog:

- a) sniženja pH zbog nakupljanja organski kiselina (npr. mliječna i octena kiselina)
- b) proizvedenog  $H_2O_2$  u aerobnim uvjetima
- c) proizvedenog diacetila
- d) proizvedenih specifičnih inhibicijskim supstanci poput bakteriocina

### II. Natjecanje za hranjive tvari

Intestinalni trakt ponaša se kao kontinuirani reaktor, a populacijski kontrolni mehanizmi u skladu su s teorijom kemostata tj. bakterije se u mješovitoj i kontinuiranoj kulturi natječu za nužne hranjive tvari. Freter i sur. (1983) su u svojim istraživanjima pokazali da je razmnožavanje *Escherichia coli*, *Fusobacterium sp.* i *Eubacterium sp.* jako inhibirano kada se one inokuliraju u fekalni filtrat mišje intestinalne flore.

### III. Natjecanje za mjesta vezanja

Poznato je da se BMK mogu vezati na crijevni epitel, što je vrlo poželjna osobina probiotičkih sojeva, a upravo je natjecanje za mjesto vezanja na crijevni epitel jedan od mehanizama suzbijanja rasta patogena.

### IV. Toksični metaboliti i nepovoljni uvjeti okoline

Također, probiotički organizmi mogu modificirati procese metabolizma domaćina pomoću nekoliko mehanizama:

- a) zaustavljanje reakcija čiji rezultat je proizvodnja toksičnih ili kancerogenih metabolita
- b) stimulacija enzimskih reakcija uključenih u detoksikaciju potencijalnih toksičnih supstancija

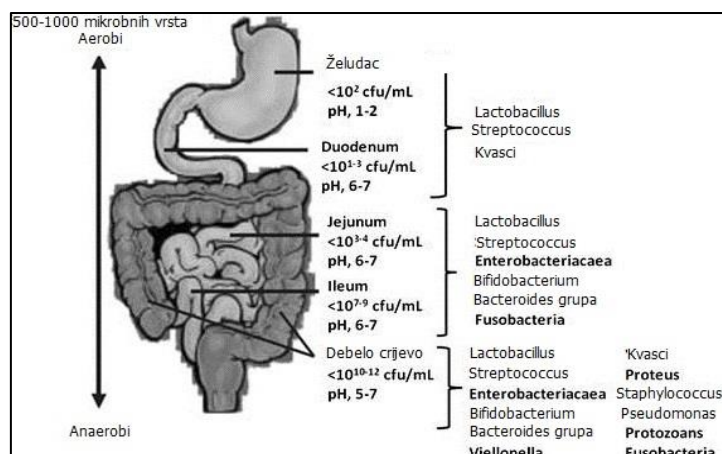
- c) stimulacija enzima sisavaca uključenih u razgradnju kompleksnih hranjivih tvari, ili takvih enzima koji su odsutni (nasljedno ili zbog bolesti), osiguravajući bakterijski izvor tih enzima
- d) sintetiziranje enzima i drugih esencijalnih hranjivih tvari koje prehranom nisu osigurane u dovoljnim količinama (Šušković i sur., 1997)

Treća bitna uloga probiotičkih sojeva BMK je stimulacija imuno-sustava domaćina tako što povećanje koncentracije protutijela preko humoralnog i celularnog imuno-sustava crijevne sluznice prenosi imuno-odgovor na druga mjesta prekrivena sluznicom (respiratorni i urogenitalni sustav) te translokacija stanica probiotičkog mikroorganizma iz probavnog sustava u limfne čvorove crijevne opne i druge organe, otežava translokaciju patogenih mikroorganizama (Šušković i sur., 1998).

### **2.3. Humani gastrointestinalni trakt**

Pojam gastrointestinalni trakt općenito se odnosi na probavne strukture od usta do anusa i ne uključuje organe s funkcijom žlijezda (jetra, gušterača i žučni trakt) (U.S. National Library of Medicine, 2004).

Poznato je kako je gastrointestinalni trakt domaćin trilijuna bakterija, od čega se samo u crijevima zdrave jedinke nalazi otprilike  $10^{14}$  stanica tj. 4 000 različitih sojeva koji čine crijevnu mikrofloru (slika 1). Poremećaji mukozne tolerancije kod ljudi uzrokuju poremećaje kao što su upalna bolest crijeva, Chronova bolest i kolitis (Lin i Zhang, 2017). Jedan od najuvjerljivijih pokazatelja o ulozi crijevne mikroflore u otpornosti prema bolesti dali su Collins i Carter 1978. godine. Oni su naime dokazali da se pokusni kunić uzgojen „bez klica“ može ubiti sa svega 10 stanica bakterije *Salmonella enteritidis*, ali je za razliku od toga potrebno  $10^9$  stanica te iste bakterije da se usmrti kunić s normalnom crijevnom mikroflorom (Šušković i sur., 1998).



**Slika 1.** Mikrobni sadržaj u gastrointestinalnom traktu zdravog čovjeka (Govender i sur., 2013).

## 2.4. Mikroinkapsulacija probiotičkih bakterija

Mikroinkapsulacija je proces kojim se jedna tvar zatvara unutar druge tvari. Također, definira se i kao tehnologija pakiranja čvrstih, tekućih i plinovitih materijala u male kapsule koje otpuštaju svoj sadržaj tijekom produženog razdoblja pod specifičnim uvjetima. Promjer kapsula je obično od nekoliko nanometara do nekoliko milimetara. Mikroinkapsulacija je u biotehnologiju uvedena kako bi se proizvodni procesi učinili učinkovitijima jer matriks oko stanica omogućuje brzo i efikasno odvajanje proizvodnih stanica i metabolita. Mikroinkapsulacija je korisna metoda za poboljšanje dopreme aktivnih biomolekula (npr. antioksidansi, vitamini, minerali, fitosteroli) i živih stanica (npr. probiotici) u hranu. Posljednjih godina prehrambena industrija zahtijeva dodatak funkcionalnih sastojaka u proizvode. Takvi sastojci često su visoko osjetljivi na okolišne, proizvodne i uvjete u gastrointestinalnom traktu, a mikroinkapsulacija je omogućila njihovu učinkovitu zaštitu, tako što je usporila razgradne procese ili spriječila razgradnju dok produkt nije dostavljen na ciljano mjesto. Mikroinkapsulacija se može koristiti kako bi se lakše rukovalo aktivnim sastojcima, pomoglo odvojiti komponente smjese koje bi inače reagirale jedna s drugom ili osigurala odgovarajuća koncentracija i jednolika raspodjela aktivnog sastojka.

Materijali koji se koriste za mikroinkapsulaciju u prehrambenoj industriji moraju imati GRAS status, biti biorazgradivi i formirati barijeru između inkapsuliranog sastojka i njegove okoline. Većina materijala koji se koriste za mikroinkapsulaciju u prehrambenoj industriji su biomolekule. Materijali, osim što moraju biti prirodnog porijekla, trebaju osigurati maksimalnu zaštitu aktivnog sastojka od okolišnih uvjeta, držati sastojke unutar strukture kapsule tijekom prerade i skladištenja pod različitim uvjetima, ne reagirati s inkapsuliranim

sastojkom, imati dobra reološka svojstva pri visokim koncentracijama kada je to potrebno i biti jednostavni za rukovanje pri mikroinkapsulaciji. Pored svih materijala najširu upotrebu pri mikroinkapsulaciji imaju polisaharidi poput škroba i njegovih derivata – amiloza, amilopektin, dekstrini, maltodekstrini i celuloza i njezini derivati, biljne izlučevine i ekstrakti, spojevi iz morskih organizama poput karagenana i alginata.

Postoji nekoliko tehnika mikroinkapsulacije koje se danas koriste poput sušenja raspršivanjem, raspršivanje hlađenjem, te sušenja raspršivanjem u tankom sloju. Sušenje raspršivanjem jedna je od najstarijih i najraširenijih tehnika mikroinkapsulacije, a karakterizira ga fleksibilnost, kontinuiranost i ekonomičnost. Proizvedene kuglice promjera su manjeg od 40 mikrometara i dobre kvalitete. Proces ima i neke nedostatke kao kompleksnost opreme, nejednoliki uvjeti sušenja u komori za sušenje i ponekad nije lako kontrolirati veličinu kuglica. Metode ekstruzije temelje se na ispuštanju kapljica vodene otopine polimera i aktivne tvari u kupelj. Alat za kapanje može biti pipeta, šprica, vibrirajuća mlaznica, rezač mlaza i sl.

Često korištena tehnika je i stvaranje emulzije koja se koristi za hranjive tvari topljive u vodi, a postoje dvije vrste emulzija, voda/ulje i ulje/voda ili voda/ulje/voda dvostruka emulzija. Emulzija ulje u vodi može se sušiti različitim metodama poput sušenja raspršivanjem ili sušenja smrzavanjem i tako proizvesti prašak. Jedan od najvažnijih razloga primjene mikroinkapsulacije aktivnih sastojaka je osiguranje stabilnosti proizvoda tijekom obrade i konačnog proizvoda. Probiotičke bakterije su živi mikroorganizmi s ozbiljnim korisnim zdravstvenim učincima na domaćina ako su primijenjeni u odgovarajućoj količini. Probiotici su visoko osjetljivi na promjene pH vrijednosti, mehanički stres, uvjete transporta, probavne enzime želuca, a trebaju preživjeti obradu hrane, skladištenje i unos hrane prije nego postanu korisni pa se njihovom mikroinkapsulacijom ne povećava samo njihova biodostupnost nego i funkcionalnost.

Mikroinkapsulacija se može koristiti i kao metoda za zaštitu spojeva koji su sastavni dio arome od isparavanja ili razgradnje, maskiranja neugodnih okusa koji se javljaju prilikom konzumiranja hrane kao što su gorčina polifenola i ostalih spojeva s visokom antioksidativnom aktivnošću. Također, primjenom mikroinkapsulacije može se spriječiti reakcija aktivnih spojeva iz hrane s ostalim sastojcima u hrani poput vode ili kisika, a što je posebno bitno u slučaju esencijalnih ulja.

Sve značajnija primjena mikroinkapsulacije je imobilizacija stanica ili enzima koji se onda koriste u biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji u različitim fermentacijskim procesima i

procesima proizvodnje metabolita. Imobilizacija se postiže hvatanjem stanica u zamku od prirodnih ili sintetskih polimera ili adsorpcijom na čvrsti organski ili anorganski nosač. Imobilizacija stanica omogućuje lakše odvajanje biomase i njenu obnovu, bolje korištenje opreme, smanjuje mogućnost kontaminacija i tako osigurava veću produktivnost i iskorištenje procesa. Prednosti procesa s imobiliziranim stanicama u odnosu na one sa slobodnim stanicama su veća gustoća stanica, kraće vrijeme reakcije, manji kapacitet bioreaktora i samim time niži kapitalni troškovi, ponovno korištenje istog biokatalizatora, razvoj kontinuiranih procesa, smanjena mogućnost kontaminacija, ujednačenija kvaliteta proizvoda i sl. Ipak, dva u bitna nedostatka primjene ove tehnologije: kompleksnost proizvodnog postupka i ograničenje troškova (Nedovic i sur., 2011).

Kao sredstvo za mikroinkapsulaciju se, zbog svoje jednostavne manipulacije, niske cijene i neškodljivosti, mogućnosti upijanja vode, stvaranja gela, stabiliziranja i zgušnjavanja, te povećane viabilnosti inkapsuliranih stanica u usporedbi s neinkapsuliranima, često koristi alginat. Takav polimer, prehrambeni aditiv u obliku bijelog ili žućkasto smeđeg praha, bez okusa i mirisa i najkorišteniji je polisaharid za mikroinkapsulaciju bakterija mliječne kiseline. Uglavnom se sastoji od natrijeve soli alginatne kiseline ili smjesa poliuronske kiseline sastavljene od ostataka D-manuronske i L-guluronske kiseline. Mikročestice kalcijeva alginata se pripremaju na dva načina: kapanjem otopine natrijeva alginata u otopinu kalcijeve soli čime dolazi do vanjske ionske gelacije ili metodom emulgiranja za unutarnju ionsku gelaciju alginata u voda/ulje emulziji. Do vanjske ionske gelacije dolazi primjenom ekstruzijske tehnike. Mikroorganizmi se dodaju u otopinu alginata i odmah inkorporiraju u obliku kapljica u otopini kalcijeva klorida. Interakcija iona, poput  $\text{Ca}^{2+}$  iona, s karboksinskim grupama polimera rezultira stvaranjem netopljivog gela. Tako nastale kuglice obično su promjera od 500  $\mu\text{m}$  do 3 mm (Etchepare i sur., 2015).

Gibson i Roberfroid su prebiotike definirali kao neprobavljive sastojke hrane koji korisno djeluju na domaćina selektivno stimulirajući rast i/ili aktivnost određenog broja bakterija u crijevu. Ova se definicija manje ili više preklapa s definicijom dijetalnih vlakana s iznimkom njihove selektivnosti za određene vrste. Ta je selektivnost pokazana prema bifidobakterijama, koje su unaprijeđene unošenjem tvari kao što su inulin, fruktooligosaharidi, transglikozilirani oligosaharidi i oligosaharidi iz soje (Schrezenmeir i de Vrese, 2001).

Inulinski fruktani su sastavljeni od  $\beta$ -D-fruktofuranoznih ostataka povezanih  $\beta$ -2-1 vezom. Prvi monomer u lancu je ili  $\beta$ -D-glukopiranozil ili  $\beta$ -D-fruktopiranozil. Oni sačinjavaju grupu oligosaharida izvedenih iz saharoze, a izolirani su iz prirodnog bilja. Proizvod sa stupnjem polimerizacije od 2 do  $\geq 60$  izoliran iz korijena cikorijske naziva se inulin (Roberfroid, 2001). Fruktooligosaharidi su široko rasprostranjeni u biljkama poput luka, jestivog čička, pšenice itd., u ljudskoj i životinjskoj intestinalnoj flori. Komercijalno se proizvode iz saharoze uz pomoć enzima  $\beta$ -fruktofuranozidaze iz plijesni *Aspergillus niger*. Otkriveno je kako se fruktooligosaharidi ne mogu hidrolizirati nijednim probavnim enzimom ljudi i životinja. Klinička ispitivanja su pokazala kako prisutnost fruktooligosaharida poboljšava sastav intestinalne flore, pomaže kod konstipacije, smanjuje krvne lipide kod hiperlipidemije i smanjuje stvaranje otrovnih tvari u intestinalnom traktu (Hidaka i sur., 1986). Kombinacija alginata i prebiotika pruža povećanu zaštitu probiotika zbog simbiotskog odnosa. To se može objasniti činjenicom kako prebiotici stvaraju trodimenzionalnu mrežu mikrokristala koji uzajamno djeluju formirajući male agregate koji pridonose boljoj zaštiti bakterijskih stanica. Dodatak prebiotika tijekom mikroinkapsulacije osigurava bolju zaštitu probiotičkih bakterija poboljšavajući rast stanica u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta i održavajući broj probiotičkih bakterija iznad minimalne ( $10^7$  CFU  $g^{-1}$ ) preporučene terapijske vrijednosti (Etchepare i sur., 2015).

## **2.5. Liofilizacija probiotičkih bakterija**

Liofilizacija se definira kao proces stabilizacije u kojem se tvar prvo zamrzava, a zatim se količina otapala smanjuje procesom sublimacije, a onda desorpcije do vrijednosti koja onemogućuje daljnji biološki rast ili kemijske reakcije. Materijal za liofilizaciju može biti bilo koji sustav koji sadrži otapalo, a čije će uklanjanje povećati stabilnost proizvoda. Većina materijala koji se liofiliziraju su biološki, biotehnološki, dijagnostički, farmaceutski ili veterinarski proizvodi (slika 2).

Osnovna uloga procesa zamrzavanja je odvajanje otapala od otopljene tvari. Temperatura potreban da bi se postiglo potpuno zamrzavanje materijala ovisi o prirodi otapala i ostalim prisutnim tvarima u materijalu. U vodenim otopinama, voda će formirati kristale leda, a otopljena tvar bit će zatvorena između kristala leda. Kada je materijal potpuno zamrznut, smanjuje se tlak u liofilizatoru i počinje se uvoditi toplina kako bi došlo do sublimacije kristala leda, čije pare izlaze kroz otvore na posudi. Ta se faza naziva fazom primarnog sušenja i u

njoj se uklanja prvenstveno slobodna voda, a završava kada u materijalu ostane otprilike 6-8 % vode tj. kada je sav led sublimirao. Konačna desorpcija preostale vode postiže se povećanjem temperature i smanjenjem parcijalnog tlaka vodene pare u posudi. Ta se faza naziva fazom sekundarnog sušenja i predstavlja završnu fazu liofilizacije. U fazi sekundarnog sušenja uklanja se kapilarna (vezana) voda ili voda koja nije bila uklonjena u obliku leda. Sustav s vakuum pumpom osigurava niske tlakove potrebne za provođenje procesa liofilizacije, a uređaj je opremljen i sustavom za kondenzaciju vodene pare (Jennings, 1999; Lovrić, 2003).



**Slika 2.** Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD PLUS

Liofilizacijom se probiotici stabiliziraju kako bi bili upotrebljiviji tijekom duljeg perioda čuvanja te tijekom primjene kao bioterapeutika i u proizvodnji funkcionalne hrane.

Tijekom liofilizacije dolazi do inaktivacije stanica, koje dvaput moraju prijeći smrtonosnu temperaturnu zonu između  $-15^{\circ}\text{C}$  i  $-60^{\circ}\text{C}$ , odnosno jednom tijekom zamrzavanja, a drugi put tijekom grijanja stanica. Citoplazma stanice općenito ostaje nezamrznuta do temperature od  $-10^{\circ}\text{C}$  do  $-15^{\circ}\text{C}$ , pa se prvo formiraju ekstracelularni kristali leda, a otopljene tvari se koncentriraju jer se količina nezamrznute vode smanjuje. Kako temperatura sve više pada, otopljene tvari su sve koncentriranije. Povećani ekstracelularni tlak dovodi do difuzije vode iz stanice odnosno stanice pokušavaju održati osmotsku ravnotežu između vanjskog i unutarnjeg staničnog prostor ako je brzina zamrzavanja niska. Zbog toga dolazi do dehidracije stanica i njihovog oštećenja. Za razliku od toga, ako je brzina zamrzavanja velika, stanice neće gubiti vodu difuzijom zbog održavanja osmotske ravnoteže pa će se formirati



intracelularni kristali leda. Na taj način osmotska ravnoteža ostaje održana (Santivarangkna i sur., 2008).

Sušenjem bakterijske stanice dolazi do oštećenja stanica jer uklanjanje vezane vode dovodi do oštećenja strukture proteina, stanične stijenke i membrane. Tijekom sušenja najčešće dolazi do oštećenja lipida u membrani zbog njihove oksidacije, te do destabilizacije sekundarne strukture DNA i RNA što dovodi do manje učinkovitosti replikacije, transkripcije i translacije DNA molekule (Meng i sur., 2008).

Tijekom čuvanja BMK također dolazi do oštećenja stanica što se pripisuje promjenama u sastavu masnih kiselina (omjer zasićenih i nezasićenih masnih kiselina) citoplazmine membrane čiji je glavni uzrok oksidacija lipida. Oksidacija lipida može uzrokovati promjene u strukturi membrane i njezinoj funkciji (Santivarangkna i sur., 2008).

Kako bi se izbjegla neželjena oštećenja stanica i postigli visoki prinosi, u mediji se prije liofilizacije dodaju lioprotektori. Lioprotektori mogu biti disaharidi (saharoza, laktoza, trehaloza), poliolli (manitol, sorbitol) i polimeri (maltodekstrin, dekstran, inulin), a mogu se primijeniti i obrano mlijeko u prahu, proteini sirutke i glicerol. Uloga lioprotektora je osigurati zaštitu stanica tijekom cijelog procesa proizvodnje (zamrzavanja, primarnog i sekundarnog sušenja), ali i tijekom skladištenja. Lioprotektori posjeduju sljedeće zaštitne mehanizme: preferencijalna hidratacija, zamjena vode i stvaranje staklastog matriksa (Aschenbrenner i sur., 2015).

Kao mediji za sušenje, kod BMK koje se primjenjuju kao funkcionalne starter kulture ili probiotici, najčešće se koristi obrano mlijeko u prahu jer: sprječava oštećenja stanice tako što stabilizira komponente citoplazmine membrane, stvara poroznu strukturu u proizvodu koji se liofilizira te tako olakšava rehidrataciju i sadrži proteine koji štite stanice.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Radni mikroorganizam**

###### **SOJ:**

- 1) *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; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 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**

- Agar, „Merck“, Njemačka
- Destilirana voda
- Fiziološka otopina (0,9% NaCl)
- Glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- Kvašćev ekstrakt, „Difco“, SAD
- Mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija,
- Natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Tween 80, „Sigma“, SAD
- alginat, „Fluka“, Švicarska
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- inulin + fruktooligosaharidi (FOS), „Magdis d.o.o.“, Hrvatska
- klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kalcijev klorid, „Fluka“, Švicarska
- magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija

- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev citrat, „T.T.T.“, Hrvatska
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- obrano mlijeko, „Fluka“, Švicarska
- pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- pepton, „Biolife“, Malazija

#### **3.1.4. Aparatura i pribor**

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- ependorfice
- epruvete
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- magnetska mješalica, „IKA-Werke GmbH & Co“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- 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 bakterija mliječne kiseline, *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 ekperimenta soj je inokuliran u svježju hranjivu podlogu te inkubiran pri optimalnoj temperaturi rasta (37°C).

### 3.2.2. Mikroinkapsulacija soja *Lactobacillus fermentum* D12 u alginatu i u alginatu uz dodatak prebiotika (inulin + FOS)

Prekonoćna kultura soja *L. fermentum* D12 uzgojena je propagacijom 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 probiotičkog soja D12, u 2%-tnu (v/w) otopinu natrijeva alginata dodani su prebiotici inulin i fruktooligosaharid (FOS) (Magdis d.o.o., Hrvatska) u konačnoj koncentraciji od 5% (w/v). Kao kontrola je korišten mikroinkapsulirani soj *L. fermentum* D12 bez dodatka prebiotika. Smjesa bakterijskih stanica i alginata (i prebiotika, inulin + FOS) postepeno je dodana u 1%-tnu otopinu kalcijeva klorida uz miješanje na magnetnoj mješalici (IKA-Werke GmbH & Co, Njemačka), prilikom čega je došlo do formiranja mikrokapsula. Kuglice su ostavljene 1 sat na tresilici (New Brunswick Scientific, SAD) da očvrstu, nakon čega je uslijedilo ispiranje dva puta 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 N<sub>0</sub> broj slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks (alginat):

$$EY = \frac{N}{NO} \times 100$$

### **3.2.3. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica *L. fermentum* D12 uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora**

Provedena je liofilizacija soja *L. fermentum* D12 mikroinkapsuliranog u alginatu dodatkom prebiotika (FOS+inulin) uz 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 vijabilnih mikroinkapsuliranih stanica provedeno je nakon postupka mikroinkapsulacije. 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 određen je indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih i liofiliziranih stanica.

### **3.2.4. Preživljavanje mikroinkapsuliranog i liofiliziranog soja *L. fermentum* D12 tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta**

#### **3.2.4.1. 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 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).

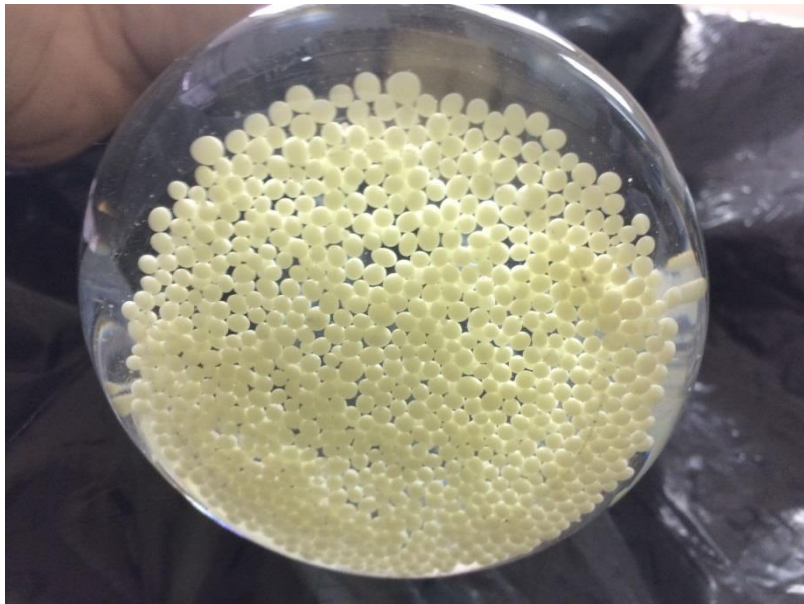
### **3.2.4.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankoga crijeva na preživljavanje *Lactobacillus fermentum* D12 mikroinkapsuliranog u alginatu uz dodatak različitih prebiotika i liofiliziranog uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora**

Stanice soja *L. fermentum* D12, mikroinkapsulirane u alginatu uz dodatak prebiotika (inulin i fruktooligosaharid) i liofilizirane uz dodatak obranog mlijeka (10%) kao lioprotektora izložene su djelovanju želučanog soka (pH=2) tijekom 2 sata, a zatim 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, nakon djelovanja želučanog soka i želučanog soka i tankog crijeva, 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 otopine. Broj stanica je određen indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih i liofiliziranih stanica.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Mikroinkapsulacija soja *Lactobacillus fermentum* D12 u alginatu i u alginatu uz dodatak prebiotika (inulin + FOS)

Stanice soja *Lactobacillus fermentum* D12 mikroinkapsulirane su u alginatu uz dodatak inulina i FOS-a kao prebiotika (slika 3). Nakon provedenog procesa izračunata je učinkovitost mikroinkapsulacije stanica *L. fermentum* D12 u alginatu uz dodatak prebiotika i kontrole odnosno stanica probiotičkog soja mikroinkapsuliranih bez dodatka prebiotika i vidi se kako je učinkovitost mikroinkapsulacije veća kod kontrole (tablica 1).



**Slika 3.** Stanice soja *L. fermentum* D12 mikroinkapsulirane u alginatu

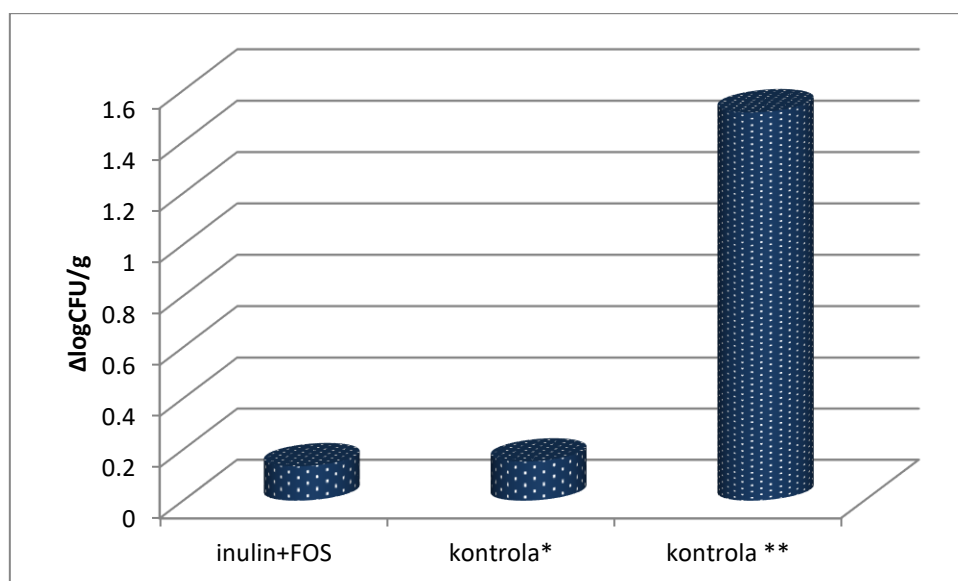
**Tablica 1.** Usporedba učinkovitosti mikroinkapsulacije (Encapsulation Yield, EY) stanica *L. fermentum* D12 u alginatu uz dodatak različitih prebiotika (inulin+FOS, manitol, laktuloza) i kontrole, izražene kao postotak (%) dijeljenja logaritamskih vrijednosti triju paralela broja živih mikroinkapsuliranih stanica (N) i broja slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks alginat ( $N_0$ ) uz dodatak različitih prebiotika

Soj:	Matriks	
	EY <sub>inulin+FOS</sub> (%)	EY <sub>kontrola</sub> (%)
<i>L. frementum</i> D12	97,32	99,37

## 4.2. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica *L. fermentum* D12 uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora

Soj *L. fermentum* D12 mikroinkapsuliran u alginatu sa i bez dodatka prebiotika (inulin+ FOS) povdrnut je procesu liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora s ciljem ispitivanja njihovog zaštitnog učinka. Kao kontrola, korišten je mikroinkapsulirani uzorak u koji nije dodan niti jedan prebiotik i lioprotektor, odnosno u koji je dodana fiziološka otopina. Slika 4. pokazuje smanjenje broja aktivnih bakterijskih stanica izražene razlikom logaritma koncentracije živih stanica prije i nakon procesa liofilizacije, pri čemu je kao početna vrijednost uzeta koncentracija stanica nakon procesa mikroinkapsulacije u alginatu. Dobiveni rezultati ukazuju na to da obrano mlijeko kao lioprotektor ima zaštitni učinak tijekom liofilizacije, s obzirom da njegov dodatak doprinosi povećanom preživljavanju ispitanih sojeva tijekom tog procesa, u usporedbi s kontrolom, odnosno s uzorkom u koji nije dodan lioprotektor. Također, može se primijetiti kako i dodatak prebiotika ima zaštitni učinak tijekom procesa liofilizacije jer je preživljenje stanica mikroinkapsuliranih u alginatu uz dodatak prebiotika i liofiliziranih uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora nešto veće nego kod kontrole (mikroinkapsulirani soj bez dodatka prebiotika, liofiliziran uz dodatak obranog mlijeka).

Cody i sur. (2008) u svojim su istraživanjima utvrdili da obrano mlijeko povećava dugoročnu održivost stanica i štiti stanice pri povišenim temperaturama. Obrano mlijeko utječe na sadržaj masnih kiselina stanične membrane čime se mijenja njena fluidnost ili kalciji može doprinijeti stabilnosti staničnih enzima.





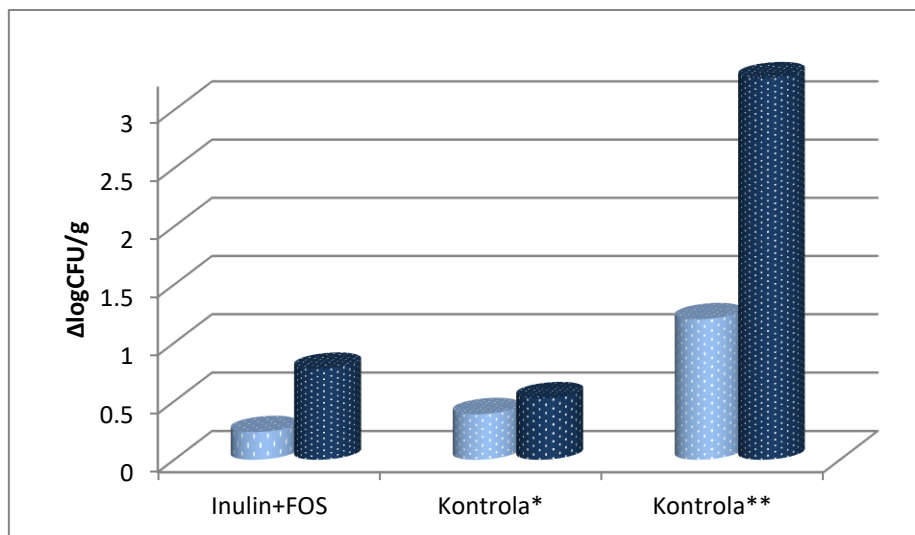
**Slika 4.** Usporedba preživljavanja mikroinkapsuliranog probiotičkog soja *L. fermentum* D12 u alginatu, uz dodatak prebiotika (inulin+FOS), nakon procesa liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora. Kontrola\* - mikroinkapsulirani soj D12 bez dodatka prebiotika, liofiliziran uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora i kontrola\*\* - mikroinkapsulirani soj D12 bez dodatka prebiotika, liofiliziran bez dodataka lioprotektora, odnosno uz dodatak fiziološke otopine. Rezultati su prikazani kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta \log$  CFU/g) prije i nakon procesa liofilizacije.

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

Mikroinkapsulirani soj stanica *L. fermentum* D12 u alginatu uz dodatak prebiotika (inulin+FOS) izložen je simuliranim uvjetima želučanog soka i simuliranim uvjetima cijelog gastrointestinalnog trakta. Kao kontrola, korišten je nemikroinkapsulirani soj stanica liofiliziran bez dodatka lioprotektora, odnosno uz dodatak fiziološke otopine. Kao početna vrijednost uzeta je koncentracija stanica nakon procesa liofilizacije. Dobiveni rezultati ukazuju na to da alginat i prebiotici (inulin+FOS) pokazuju zaštitni učinak tijekom izlaganja stanica simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta tj. povećavaju preživljenje izloženih stanica u usporedbi s kontrolom koja nije mikroinkapsulirana, a liofilizirana je uz dodatak fiziološke otopine (slika 5).

Tehnologija mikroinkapsulacije stanica u alginatu se pokazala kao održiva alternativa, održavajući bitno stabilnost probiotičkih bakterija tijekom skladištenja i prolaska stanica kroz gastrointestinalni trakt (Etchepare i sur., 2015).

Kolida i sur. (2002) navode kako su inulini i FOS jedni od najistraživanijih i najpoznatijih prebiotika te kako su njihova prebiotička svojstva potvrđena u *in vivo* i *in vitro* istraživanjima.



**Slika 5.** Usporedba smrtnosti mikroinkapsuliranih stanica *Lactobacillus fermentum* D12 u alginatu uz dodatak prebiotika (inulin+FOS), 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\*\* - nemikroinkapsulirani soj D12 liofiliziran bez dodataka lioprotektora, odnosno uz dodatak fiziološke otopine.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Mikroinkapsulacija u alginatu uspješno je primijenjena za probiotički soj *Lactobacillus fermentum* D12.
2. Alginat je pogodno sredstvo za mikroinkapsulaciju jer štiti stanice od nepovoljnih uvjeta gastrointestinalnog trakta.
3. Obrano mlijeko je pogodan lioprotektor jer njegov dodatak prije procesa liofilizacije povećava preživljavanje stanica tijekom liofilizacije.
4. Dodatak prebiotika (inulin i FOS) štiti stanice od nepovoljnih uvjeta temperature i gastrointestinalnog trakta.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Anonymus <https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/mqip/information-sheets/>.  
Pristupljeno 29. kolovoza 2018.
2. Aschenbrenner M., Foerst P., Kulozik U. (2015) Freeze-drying of Probiotics. *Advances in Probiotic Technology*. str. 225.
3. Cody W. L., Wilson J. W., Hendrixson D. R., McIver K. S., Hagman K. E., Ott C. M., Schurr M. J. (2008) Skim milk enhances the preservation of thawed –80 °C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods* **75**: 135–138.
4. Etchepare M. de A., Barin J. S., Cichoski A. J., Jacob-Lopes E., Wagner R., Fries L. L. M., de Menezes C. R. (2015) Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Ciência Rural* **45**: 1319–1326.
5. Freter R., Stauffer E., Celeven D. (1983) Continuous flow cultures as *in vitro* models of the ecology of large intestinal flora. *Infect. Immun.* **39**: 666-675.
6. Govender M., Choonara Y. E., Kumar P., du Toit L. C., van Vuuren S., Pillay V. (2013) A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation. *AAPS PharmSciTech* **15**: 29–43.
7. Hidaka H., Eida T., Takizawa T., Tokunaga T., Tashiro Y. (1986) Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobacteria and Microflora* **5**: 37–50.
8. Jennings T. A. (1999) Lyophilization: Introduction and Basic Principles, 1. izdanje, Informa Healthcare, str. 6-8.
9. Kolida S., Tuohy K., Gibson G. R. (2002) Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* **87**: 193-197.
10. Kos B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
11. 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.
12. Lin L., Zhang J. (2017) Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology* **18**: 1-25.
13. Lovrić T. (2003) Proces u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, str. 212-214.

14. Mattu B., Chauhan A. (2013) Lactic Acid Bacteria and Its Use in Probiotics. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* **4**: e140.
15. Meng X. C., Stanton C., Fitzgerald G. F., Daly C., Ross R. P. (2008) Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry* **106**: 1406–1416.
16. Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Levic S., Bugarski B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* **1**: 1806–1815.
17. Roberfroid M. B. (2001) Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**: 406–409.
18. Salminen S., Laine M., von Wright A., Vuopio-Varkila J., Korhonen T., Mattila-Sandholm T. (1996) Development of Selection Criteria for Probiotic Strains to Assess Their Potential in Functional Foods: A Nordic and European Approach. *Bioscience and Microflora* **15**: 61–67.
19. Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. (2008) Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 1–13.
20. Schrezenmeir J., de Vrese M. (2001) Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**: 361–364.
21. Šušković J., Brkić B., Matošić S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**: 57-73.
22. Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S. (2010) Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol* **48**: 296–307.
23. 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.
24. Šušković J., Kos B., Matošić S. (1998) Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend? *Mljekarstvo* **48**: 165-176.
25. U.S. National Library of Medicine (2004), <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?name=Gastrointestinal%20tract>. Pristupljeno 1. kolovoza 2018.

Izjava o izvornosti

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

Timo Ušić

Ime i prezime studenta