

# Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti probiotičkih bakterija iz jagode (*Fragaria ananassa* × *Duch.*) u kombinaciji s ekstraktom maginje (*Arbutus unedo* L.)

---

Dolenec, Filip

Master's thesis / Diplomski 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:159:438723>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivs 3.0 Unported](#)/[Imenovanje-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Filip Dolenc

**ISPITIVANJE  
ANTIOKSIDACIJSKE  
AKTIVNOSTI PROBIOTIČKIH  
BAKTERIJA IZ JAGODE (*Fragaria  
ananassa* × Duch.) U KOMBINACIJI  
S EKSTRAKTOM MAGINJE  
(*Arbutus unedo* L.)**

Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju voća i povrća na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo i Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Bursać Kovačević te uz pomoć dr. sc. Denija Kostelca i Anice Bebek Markovinović, mag. ing..



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta „Tehnologija preprekama i 3D printanje za ekološki prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova (3D-SustJuice)“ (IP-2019-04-2105), voditeljice izv. prof. dr. sc. Danijele Bursac Kovačević.

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Bursać Kovačević i dr. sc. Deniju Kostelcu na uloženom vremenu i trudu te svim savjetima i pomoći koju su mi pružili prilikom izrade i pisanja ovoga diplomskog rada.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI PROBIOTIČKIH BAKTERIJA IZ JAGODE  
(*Fragaria ananassa* × Duch.) U KOMBINACIJI S EKSTRAKTOM MAGINJE (*Arbutus unedo* L.)

Filip Dolenec, univ. bacc. nutr. 0006032429

**Sažetak:** Primjenom probiotičkih bakterija izoliranih iz voća u fermentaciji voćnih ekstrakata nastoji se razviti inovativne funkcionalne proizvode koji bi svojim izgledom, okusom te biološkom vrijednošću bili privlačniji potrošačima, a pritom osigurali dobrobit za njihovo zdravlje. U ovome radu provedena je probiotička karakterizacija dvaju sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz ploda jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) sorte 'Albion'. Na temelju visokog preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava i visoke sposobnosti formacije biofilmova, soj *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 odabran je za fermentaciju vodenog ekstrakta maginje (*Arbutus unedo* L.), koji je potom mikroinkapsuliran i liofiliziran s ciljem produljenja trajnosti i očuvanja funkcionalnih svojstava. Oba ispitivana soja pokazala su se sigurnim za upotrebu. Fermentacija vodenog ekstrakta maginje je uspješno provedena pri čemu je zadržana antioksidacijska aktivnost dobivenog fermenta (80 %). Nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije održano je oko 50 % antioksidacijske aktivnosti u slučaju nefermentiranog ekstrakta te oko 20 % u slučaju fermentiranog ekstrakta.

**Ključne riječi:** fermentacija, probiotici, jagoda, maginja, liofilizacija

**Rad sadrži:** 53 stranice, 8 slika, 8 tablica, 94 literaturnih navoda, 00 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Deni Kostelac; Anica Bebek Markovinović, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof.dr.sc. Ksenija Markov (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Danijela Bursać Kovačević (mentor)
3. doc. dr. sc. Predrag Putnik, Sveučilište Sjever (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 26. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Chemistry and Technology of Fruits and Vegetables**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

ANTIOXIDANT ACTIVITY EVALUATION OF PROBIOTIC BACTERIA FROM STRAWBERRY  
(*Fragaria ananassa* × Duch.) IN COMBINATION WITH STRAWBERRY TREE FRUIT EXTRACT  
(*Arbutus unedo* L.)

*Filip Dolenec*, univ. bacc. nutr. 0006032429

**Abstract:** The use of probiotic bacteria isolated from fruits in fermentation of fruit extracts attempts to develop innovative functional products that are attractive to consumers due to their appearance, taste and biological value, while providing health benefits. In this work, probiotic characterization of two strains of lactic acid bacteria from strawberry (*Fragaria ananassa* × Duch.) cultivar 'Albion' was performed. Due to its high survival rate under simulated gastrointestinal conditions and high ability to form biofilms, strain *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 was selected for fermentation of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo* L.) water extract, which was microencapsulated and freeze-dried to extend shelf life and preserve functional properties. Both strains were found to be safe. Fermentation of strawberry tree fruit water extract was successfully performed, while antioxidant activity of obtained ferment was maintained (80 %). Microencapsulated and freeze-dried extracts of strawberry tree fruit showed significant antioxidant activity, 50 % for unfermented and 20 % for fermented extract.

**Keywords:** *fermentation, probiotics, strawberry, strawberry tree fruit, freeze-drying*

**Thesis contains:** 53 pages, 8 figures, 8 tables, 93 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor*

**Technical support and assistance:** *Deni Kostelac, PhD, Research Associate; Anica Bebek Markovinović, mag. ing.*

**Reviewers:**

1. Ksenija Markov, PhD, Full professor (president)
2. Danijela Bursać Kovačević, PhD, Associate professor (mentor)
3. Predrag Putnik, PhD, Assistant professor, University North (member)
4. Jasna Mrvčić, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** September 26<sup>th</sup>, 2023



## Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>2.1. FUNKCIONALNA HRANA .....</b>   | <b>2</b>  |
| 2.1.1. Zdravstveni učinci funkcionalne hrane .....   | 2         |
| 2.1.2. Kategorije funkcionalnih proizvoda.....   | 4         |
| 2.1.2.1. Funkcionalni proizvodi na bazi voća .....   | 5         |
| <b>2.2. PROBIOTICI KAO FUNKCIONALNI DODATAK.....</b>   | <b>6</b>  |
| 2.2.1. Izbor probiotičkih sojeva.....  | 8         |
| 2.2.2. Bakterije mliječne kiseline.....  | 9         |
| 2.2.3. Bakterije mliječne kiseline u fermentiranim proizvodima.....  | 9         |
| <b>2.3. VOĆNI SUPSTRATI KAO IZVORI PROBIOTIKA .....</b>  | <b>11</b> |
| 2.3.1. Bakterije roda <i>Lactobacillus</i> .....   | 12        |
| <b>2.4. PROBIOTIČKI PROIZVODI NA BAZI VOĆA.....</b>  | <b>13</b> |
| 2.4.1. Stabilnost probiotika u voćnim proizvodima .....  | 14        |
| 2.4.2. Razvojni pravci probiotičkih proizvoda na bazi voća.....  | 15        |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>3.1. MATERIJALI .....</b>   | <b>17</b> |
| 3.1.1. Mikroorganizmi i biljni uzorci .....  | 17        |
| 3.1.2. Hranjive podloge .....  | 17        |
| 3.1.4. Aparatura i pribor .....  | 18        |
| 3.1.5. Kemikalije .....  | 19        |
| <b>3.2. METODE RADA .....</b>  | <b>20</b> |
| 3.2.1. Priprema vodenog ekstrakta ploda maginje ( <i>Arbutus unedo</i> L.) .....   | 20        |
| 3.2.2. Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DB1 i <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DB2..... | 20        |
| 3.2.3. Uzgoj <i>Lpb. plantarum</i> DB1 i <i>Lpb. plantarum</i> DB2 uz dodatak vodenog ekstrakta maginje i fetalnog goveđeg seruma.....                 | 21        |
| 3.2.4. Antimikrobna aktivnost sojeva <i>Lpb. plantarum</i> DB1 i <i>Lpb. plantarum</i> DB2 prema odabranim patogenima .....                            | 21        |
| 3.2.5. Ispitivanje osjetljivosti sojeva <i>Lpb. plantarum</i> DB1 i <i>Lpb. plantarum</i> DB2 na antibiotike disk difuzijskom metodom.....             | 22        |
| 3.2.6. Hemolitička aktivnost sojeva <i>Lpb. plantarum</i> DB1 i <i>Lpb. plantarum</i> DB2 .....  | 22        |
| 3.2.7. Preživljavanje sojeva <i>Lpb. plantarum</i> DB1 i <i>Lpb. plantarum</i> DB2 u simuliranim uvjetima probavnog sustava .....                      | 23        |
| 3.2.8. Sposobnost formiranja biofilмова sojeva <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DB1 i <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DB2 .....               | 23        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.9. Određivanje autoagregacijske sposobnosti soja <i>Lpb. plantarum</i> DB2 .....  | 24        |
| 3.2.10. Određivanje sposobnosti koagregacije soja <i>Lpb. plantarum</i> DB2 s odabranim patogenima .....  | 24        |
| 3.2.11. Određivanje hidrofobnosti stanične površine soja <i>Lpb. plantarum</i> DB2.....   | 25        |
| 3.2.12. Uzgoj soja <i>Lpb. plantarum</i> DB2 u vodenom ekstraktu maginje pri različitim uvjetima.....   | 25        |
| 3.2.12.1. Određivanje sposobnosti rasta.....  | 25        |
| 3.2.12.2. Uzgojni uvjeti za postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti .....  | 26        |
| 3.2.13. Mikroinkapsulacija fermentiranog i nefermentiranog vodenog ekstrakta maginje  | 26        |
| 3.2.14. Liofilizacija sojeva <i>Lpb. plantarum</i> DB1 i <i>Lpb. plantarum</i> DB2 te mikroinkapsuliranih fermentiranih i nefermentiranih vodenih ekstrakata maginje..... | 26        |
| 3.2.15. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala mikroinkapsuliranog i liofiliziranog vodenog ekstrakta maginje prije i nakon fermentacije.....                      | 27        |
| 3.2.16. Obrada podataka.....  | 28        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>  | <b>41</b> |
| <b>6. LITERATURA.....</b>   | <b>42</b> |

# 1. UVOD

Voće i povrće, zbog svoga nutritivnog sastava, čini jedan od osnovnih stupova zdrave prehrane te predstavlja veliki potencijal u prevenciji razvoja brojnih kroničnih bolesti, poput kardiovaskularnih bolesti i pretilosti koje su u stalnom porastu (Ritchie i sur. 2018). Obzirom na činjenicu da je unos voća i povrća u svježem obliku u velikom dijelu populacije ispod preporučenih dnevnih vrijednosti, postoji potreba za razvojem novih funkcionalnih proizvoda na bazi voća i povrća koji bi svojim izgledom, okusom i cijenom bili pristupačni širokom spektru potrošača te pritom očuvali ili obogatili nutritivnu vrijednost polazne sirovine (Eurostat, 2022). Fermentirani proizvodi na bazi voća i povrća, dobiveni primjenom bakterija mliječne kiseline, ističu se kao dobra alternativa svježem voću i povrću, a antioksidacijsko, antikancerogeno i antimikrobno djelovanje samo su neki od dosada potvrđenih zdravstvenih benefita koje takvi proizvodi pružaju (Shibamoto i sur., 2008). Implementacijom probiotičkih bakterija izoliranih iz biljnog materijala u matrice na bazi voća i povrća nastoji se ostvariti optimalne uvjete rasta i razvoja probiotika kako bi se dobio proizvod željenih tehnoloških i funkcionalnih svojstava. Veliku ulogu prilikom razvoja ovakvih proizvoda čini njihova sigurnost i stabilnost tijekom proizvodnje i skladištenja te mogućnost manifestiranja njihovog pozitivnog djelovanja u uvjetima gastrointestinalnog (GI) sustava, stoga je ključan čimbenik prilikom razvoja funkcionalnih proizvoda primjena inovativnih proizvodnih procesa poput liofilizacije, mikroinkapsulacije i 3D ispisa. Cilj ovoga rada bio je provesti fermentaciju vodenog ekstrakta ploda maginje (*Arbutus unedo* L.) koristeći bakterijske sojeve *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 prethodno izolirane iz ploda jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) sorte 'Albion' te ispitati učinak liofilizacije i mikroinkapsulacije na antioksidacijsku aktivnost dobivenog fermenta. Prije same fermentacije provedena je probiotička karakterizacija ispitivanih bakterijskih izolata koja je uključivala sljedeće tehnološke, funkcionalne i sigurnosne kriterije: antimikrobnu aktivnost, osjetljivost na antibiotike, hemolitičku aktivnost, preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava, sposobnost formiranja biofilmova, autoagregaciju, koagregaciju i hidrofobnost stanične površine. Nakon toga je provedeno ispitivanje sposobnosti preživljavanja izolata u vodenom ekstraktu maginje te mikroinkapsulacija i liofilizacija dobivenog ekstrakta. Kao mjera uspješnosti provedenih procesa mjerena je antioksidacijska aktivnost.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FUNKCIONALNA HRANA

Pojam funkcionalne hrane, od svoga nastanka u Japanu 80-ih godina prošloga stoljeća, korišten je vrlo liberalno u svrhu opisivanja različitih kategorija hrane kojima se nastojalo utjecati na poboljšanje ljudskoga zdravlja. Prema Granato i sur. (2020) danas se pod funkcionalnom hranom smatra „prirodna i/ili industrijski prerađena hrana koja uz svoju osnovnu nutritivnu vrijednost pokazuje i potencijalne dodatne benefite na ljudsko zdravlje, kada se redovito konzumira u sklopu raznovrsne prehrane“. Na porast interesa i potražnje za ovakvim namirnicama ukazuje činjenica da je u 2021. godini globalno tržište funkcionalne hrane doseglo vrijednost od 280,7 milijardi američkih dolara te se predviđa daljnji rast tržišta od 8,5 % godišnje (GVR, 2022).

Zbog njihovog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje, različite biološki aktivne tvari predmet su brojnih istraživanja kako bi se utvrdio cjelokupni aspekt njihovog djelovanja. Granato i sur. (2020) ističu kako su trenutna istraživanja funkcionalne hrane fokusirana na sljedeće skupine biološki aktivnih komponenata: probiotike, prebiotike i sinbiotike, antioksidanse, polinezasićene masne kiseline te fitosterole. Osim probiotika, prebiotika i sinbiotika, u novije vrijeme istražuje se i zdravstveni utjecaj paraprotiotika, tj. inaktiviranih probiotičkih mikroorganizama (de Almada i sur., 2016), te postbiotika, tj. metaboličkih produkata koje pojedine bakterije, primjerice iz rodova *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* i druge) i *Bifidobacterium*, otpuštaju tijekom života ili nakon bakteriolize, u koje spadaju enzmi, peptidi, endo i egzopolisaharidi, kratkolančane masne kiseline i drugo (Aguilar-Toalá i sur., 2018).

#### 2.1.1. Zdravstveni učinci funkcionalne hrane

S ciljem utvrđivanja pozitivnih učinaka funkcionalne hrane i pojedinih komponenata na ljudsko zdravlje te formulacije novih funkcionalnih proizvoda provode se brojna znanstvena istraživanja, dok su antioksidacijsko, antikancerogeno, antimikrobno, imunomodulatorno i protuupalno djelovanje te pozitivan utjecaj na smanjenje simptoma depresije samo neki od do sada dokazanih pozitivnih učinaka (Shibamoto i sur., 2008).

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju ozbiljan globalni problem te se godinama nalaze u samom vrhu uzročnika smrtnosti (Ritchie i sur. 2018), stoga je velik broj istraživanja i proizvodnje funkcionalne hrane usmjeren upravo na prevenciju razvoja kardiovaskularnih bolesti. Hasler i sur. (2000) navode kako se protektivno djelovanje funkcionalne hrane na smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti temelji na smanjenju razine lipida u krvi, smanjenju oksidacije lipoproteina, antioksidacijskom djelovanju te smanjenju formacije plaka i inhibiciji agregacije trombocita. Jedan od značajnih rizičnih faktora za razvoj kardiovaskularnih bolesti je pretilost, a prehrambena vlakna, kao jedan od sastojaka funkcionalne hrane, predstavljaju potencijalno rješenje ovoga problema prvenstveno zbog toga što povećavaju osjećaj sitosti i tako smanjuju unos hrane, a uzrokuju i promjene u crijevnoj mikrobioti što također pokazuje pozitivan učinak na prevenciju razvoja pretilosti (Dayib i sur., 2020). Bioaktivni sastojci funkcionalne hrane, poput probiotika, prebiotika i polifenolnih spojeva, pokazuju značajan utjecaj na gastrointestinalni sustav i crijevnu mikrobiotu te posljedično na ljudsko zdravlje, tako što djeluju na poboljšanje funkcije intestinalne barijere, moduliraju sekreciju mukoznih i antimikrobnih peptida, djeluju imunomodulatorno i protuupalno te zato pomažu u prevenciji upalnih bolesti crijeva (Wan i sur., 2021; Ashaolu, 2020).

Za antikancerogeno djelovanje funkcionalne hrane prvenstveno su zaslužne fitokemikalije prisutne u hrani biljnog porijekla, dok je mehanizam njihovog djelovanja kompleksan te obuhvaća različite čimbenike poput: antioksidacijskog djelovanja, djelovanja na diferencijaciju stanica, smanjenje proliferacije stanica, povećanje apoptoze tumorskih stanica, inhibiciju formacije N-nitrozamina i drugih (Liu, 2004; Surh, 2003).

Alkhatib i sur. (2017) navode da funkcionalna hrana može pomoći u prevenciji razvoja šećerne bolesti tipa 2 jer djeluje pozitivno na inzulinsku rezistenciju te pokazuje antioksidacijsko i protuupalno djelovanje, pritom ističući namirnice poput voća, povrća, ribe, orašastih plodova i maslinovog ulja koje sadrže obilje polifenola, alkaloida, sterola, nezasićenih masnih kiselina te drugih bioaktivnih komponenata koje pokazuju značajnu ulogu u prevenciji razvoja ove bolesti.

Funkcionalni proizvodi, poput mlijeka obogaćenog vitaminom D i voćnog soka obogaćenog kalcijem, djeluju pozitivno na zdravlje kostiju i prevenciju osteoporoze te osteomalacije; žitarice obogaćene vlaknima smanjuju konstipaciju i djeluju pozitivno na kontrolu glukoze u krvi, dok žitarice bogate folnom kiselinom pridonose smanjenju rizika za nastanak defekta neuralne cijevi (Gul i sur., 2016). Navedeni podaci dio su dokazanih pozitivnih učinaka funkcionalne hrane koji ukazuju na prednosti konzumiranja ovakvih proizvoda.

## 2.1.2. Kategorije funkcionalnih proizvoda

Američko društvo dijetetičara (engl. *American Dietetic Association, ADA*) klasificiralo je funkcionalnu hranu u četiri kategorije proizvoda koje su prikazane u tablici 1. Prva skupina je konvencionalna hrana, odnosno nemodificirane prehrambene namirnice poput voća i povrća koje same po sebi pokazuju pozitivan utjecaj na zdravlje zbog prirodno prisutnih bioaktivnih komponenata. Iduća skupina je modificirana hrana u koju se ubrajaju proizvodi kojima je povećan udio pojedinih sastojaka, poput soka od naranče obogaćenog kalcijem, zatim proizvodi kojima su dodani sastojci koji se inače ne dodaju u takve proizvode, poput estera biljnih sterola dodanih u margarin. Treću skupinu čini hrana za medicinske potrebe namijenjena osobama s određenim bolestima, poput fenilketonurije. Zadnju skupinu čine proizvodi za posebne prehrambene potrebe i u nju se ubraja hrana za dojenčad, proizvodi bez glutena, laktoze i slično (Hasler i Brown, 2009).

**Tablica 1.** Kategorije funkcionalne hrane. Preuzeto i prilagođeno prema Hasler i Brown (2009)

| <b>Kategorija funkcionalne hrane</b> |                                | <b>Primjeri</b>                                       |
|--------------------------------------|--------------------------------|---|
| Konvencionalna (cjelovita) hrana     |                                | Orašasti plodovi, češnjak, rajčica                    |
| Modificirana hrana                   | <i>Obogaćena („Fortified“)</i> | Sok od naranče s povećanim udjelom kalcija            |
|                                      | <i>Obogaćena („Enriched“)</i>  | Kruh obogaćen folatom                                 |
|                                      | <i>Poboljšana („Enhanced“)</i> | Margarin s dodatkom biljnih sterola                   |
| Hrana za medicinske potrebe          |                                | Proizvodi bez fenilalanina kod fenilketonurije        |
| Hrana za posebne prehrambene potrebe |                                | Hrana za dojenčad, proizvodi bez glutena, bez laktoze |

Unutar Europske unije postoji nekoliko dodatnih podjela funkcionalnih proizvoda, pa se oni tako mogu klasificirati prema prehrambenoj skupini kojoj pripadaju (npr. mliječni proizvodi, napitci, žitarice, konditorski proizvodi, ulja i masti, pekarski proizvodi), prema vrsti bioaktivne komponente koju sadrže (npr. probiotici, prebiotici, prehrambena vlakna, peptidi, terpeni, polifenoli i drugo), prema ciljanoj bolesti koju se nastoji prevenirati (npr. osteoporozna, dijabetes) ili fiziološkom djelovanju (npr. imunomodulatorno, protutumorsko) (Stein i Rodriguez-Cerezo, 2008).

### 2.1.2.1. Funkcionalni proizvodi na bazi voća

Unatoč tome što je dobrobit voća za ljudsko zdravlje općepoznata činjenica, njegova konzumacija je u velikom dijelu populacije nedostatna, čemu svjedoče podaci Eurostata prema kojim je u 2019. godini samo 12 % populacije Europske unije konzumiralo preporučenih 5 porcija voća i povrća dnevno, dok 33 % populacije ne konzumira niti jednu porciju dnevno (Eurostat, 2022). Jedan od načina kojim se nastoji povećati konzumacija voća i/ili povrća i bioaktivnih komponenata koje sadrži je proizvodnja inovativnih funkcionalnih proizvoda koji bi bili pristupačniji i zanimljiviji kupcima. Trenutna istraživanja uglavnom su usmjerena na razvoj funkcionalnih napitaka, odnosno voćnih sokova te na iskorištenje različitih nusprodukata prerade voća poput komine, kore i sjemenki (Zhu i sur., 2020).

Izotonični napitak baziran na soku od grožđa jedan je od primjera ovakvih proizvoda, a njegovo funkcionalno djelovanje temelji se na bogatstvu polifenolnih spojeva i pozitivnom djelovanju na antioksidacijsku aktivnost te na smanjenju oksidativnog oštećenja i upale tijekom sportske aktivnosti (Bendaali i sur., 2022). Uz to, autori navode kako groždani sok, zbog prirodno prisutnog šećera te antocijana, smanjuje potrebu za dodatkom sladila, odnosno umjetnih bojila u takav napitak.

Velik broj istraživanja usmjeren je na razvoj fermentiranih funkcionalnih proizvoda na bazi voća, poput pasterizirane kaše papaje fermentirane dodatkom bakterija mliječne kiseline s ciljem povećanja biodostupnosti polifenolnih spojeva te posljedično antioksidacijske aktivnosti u odnosu na nefermentirane proizvode (Mashitoa i sur., 2021). Li i sur. (2019) navode da je prilikom fermentacije soka od jabuke pomoću bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus plantarum* ATCC14917) došlo do značajne promjene u sastavu polifenolnih spojeva i povećanja antioksidacijske aktivnosti u odnosu na nefermentirani sok od jabuke, stoga ističu kako fermentacija pomaže u povećanju biodostupnosti aktivnih komponenata te zaštiti od oksidativnog oštećenja.

Nusprodukte zaostale u preradi voća moguće je primijeniti u raznim granama prehrambene industrije; primjerice upotreba kore nara u pekarskoj industriji prilikom izrade kruha i keksa gdje je pokazano da obogaćeni proizvodi pokazuju povećanu antioksidacijsku aktivnost uslijed povećanja udjela polifenola te je u istima zabilježen i veći sadržaj vlakana (Ismail i sur., 2014; Altunkaya i sur., 2013). Dodatak komine grožđa u jogurte i preljeve za salatu također je pozitivno utjecao na povećanje udjela vlakana te antioksidacijsku aktivnost, bez značajnih negativnih posljedica na senzorske karakteristike takvih proizvoda (Tseng i Zhao,

2013). Koštice ili sjemenke različitog voća, primjerice jabuke, nara, šljive, avokada ili bobičastog voća, bogate su brojnim bioaktivnim komponentama s dokazanim benefitima za ljudsko zdravlje, poput polifenolnih spojeva koji pokazuju antioksidacijsko djelovanje, fitosterola koji pomažu u regulaciji razine kolesterola u krvi, nezasićenih masnih kiselina koje smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, a mogu biti i dobar izvor proteina te različitih vitamina i minerala, stoga se istražuje njihova primjena u funkcionalnim proizvodima (Fidelis i sur., 2019).

Osim samog razvoja novih proizvoda, proučavaju se i novi tehnološki postupci njihove proizvodnje te metode ekstrakcije bioaktivnih komponentata iz polazne sirovine, odnosno voća, kako bi se dobili proizvodi veće kvalitete s većim udjelom bioaktivnih komponentata. Novim metodama ekstrakcije nastoji se očuvati što više prirodnih sastojaka voća i smanjiti njihova degradacija, uzrokovana primjerice upotrebom visoke temperature, a neke od metoda koje se istražuju su: ekstrakcija superkritičnim fluidom, ekstrakcija pomoću mikrovalova, ultrazvuka ili visokog tlaka, ekstrakcija pomoću enzima te korištenje pulsirajućeg električnog polja (Ruiz Rodríguez i sur., 2021). Kao metoda održive proizvodnje inovativnih funkcionalnih proizvoda ističe se 3D ispis, jer omogućava izradu proizvoda željenog oblika i sastava, uz dodatak ciljanih bioaktivnih komponentata, odabranih prema osobnim potrebama pojedinca, uz smanjen utrošak energije i visoku efikasnost (Tomašević i sur., 2021).

## **2.2. PROBIOTICI KAO FUNKCIONALNI DODATAK**

Zbog njihove mogućnosti da moduliraju crijevnu mikrobiotu domaćina te pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje, kao jedan od najzastupljenijih dodataka funkcionalnoj hrani ističu se probiotici, koji se definiraju kao „živi mikroorganizmi koji, primijenjeni u adekvatnim količinama, pokazuju zdravstvenu korist za domaćina“ (Hill i sur., 2014). U probiotike ubrajamo bakterije mliječne kiseline, bakterije iz rodova *Bifidobacterium* (npr. *B. animalis*, *B. longum*, *B. bifidum*) i *Bacillus* (npr. *B. subtilis*) te kvasci (npr. *Saccharomyces boulardii*) (de Melo Pereira i sur., 2018).

Kao osnova za razvoj probiotičkih proizvoda prvenstveno se koriste mlijeko i mliječni proizvodi, poput jogurta, sira ili sladoleda, stoga su takvi proizvodi najviše istraženi i sveprisutni na tržištu, no u novije vrijeme sve se više istražuju probiotički proizvodi bazirani na drugim skupinama namirnica, kao što su voće i povrće u obliku fermentiranih i nefermentiranih voćnih sokova, fermentiranog povrća i minimalno procesiranog povrća, zatim žitarice koje su zbog



sadržaja esencijalnih nutrijenata dobra podloga za rast probiotika te meso i mesne prerađevine poput fermentiranih kobasica (Behare i sur., 2021; Min i sur., 2019).

Korisni učinci probiotika na zdravlje očituju se putem njihovog antioksidacijskog, antikancerogenog, antimikrobnog i imunomodulatornog djelovanja; preventivnog djelovanja na nastanak kardiovaskularnih bolesti te infekcije urogenitalnog i respiratornog trakta, a pomažu i u liječenju gastrointestinalnih bolesti poput dijareje, upalne bolesti crijeva i sindroma iritabilnog crijeva, smanjuju rizik od intolerancije na laktozu, pokazuju potencijal u prevenciji nastanka pretilosti i dijabetesa tipa 2; uz niz drugih pozitivnih učinaka na zdravlje domaćina (Behare i sur., 2021; Ouwehand i Röytiö, 2015).

Antimikrobno djelovanje probiotika temelji se na njihovom antagonističkom djelovanju prema patogenima, putem kompetencije za hranjivim tvarima i mogućnosti pojedinih probiotika da proizvode bakteriocine i druge biološki aktivne molekule s antibiotskim djelovanjem te na taj način štite organizam (osobito gastrointestinalni, dišni i urogenitalni trakt) od kolonizacije patogenima (Behare i sur., 2021). Jedno od istraživanja koje ukazuje na antimikrobnu aktivnost proveli su Sikorska i Smoragiewicz (2013), a rezultati pokazuju da različiti sojevi iz roda *Lactobacillus*, poput *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. casei* i drugih, djeluju inhibitorno na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*. Behare i sur. (2021) navode da se antitumorsko djelovanje probiotika potencijalno ostvaruje putem inhibicije rasta nepoželjnih mikroorganizama koji sintetiziraju enzime poput  $\beta$ -glukuronidaze, nitroreduktaze i azoreduktaze koji prevode prokarcinogene u aktivne karcinogene.

Antioksidacijska aktivnost probiotika ostvaruje se kroz nekoliko mehanizama djelovanja, među kojima su: mogućnost kelacije metalnih iona (poput  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$ ) koji mogu katalizirati oksidaciju, stimulacija antioksidacijskog sustava domaćina, prisutnost antioksidacijskih enzima (poput superoksid dismutaze) u probioticima, regulacija enzima povezanih s nastankom reaktivnih kisikovih vrsta (NADPH oksidaza, ciklooksigenaza), produkcija različitih metabolita s antioksidacijskim djelovanjem (npr. folat, glutation) te regulacija intestinalne mikrobiote koja može biti uzrokom povećanog oksidativnog stresa (Wang i sur., 2017).

### 2.2.1. Izbor probiotičkih sojeva

Obzirom na veliki porast broja istraživanih i novootkrivenih potencijalnih probiotičkih sojeva izoliranih iz različitih izvora te činjenicu da probiotička svojstva značajno ovise o soju, vrlo važan korak u formulaciji probiotičkih proizvoda je pravilan izbor probiotika koji će ispoljiti korisne učinke u gastrointestinalnom sustavu te pritom biti siguran za konzumaciju i stabilan tijekom industrijskih procesa prerade. Stoga su postavljeni različiti kriteriji koji se provjeravaju prilikom odabira probiotika, a tablica 2 pokazuje kriterije Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization, WHO*) i Organizacije za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food And Agriculture Organization, FAO*). Osim njih, bitno je da probiotički soj prođe i klinička ispitivanja kako bi se utvrdila njegova sigurnost i efikasnost.

**Tablica 2.** WHO/FAO kriteriji za odabir probiotika. Preuzeto i prilagođeno prema de Melo Pereira i sur. (2018)

| <b>Tolerancija na stres u gastrointestinalnom sustavu</b> | <b>Sposobnost adhezije</b>              | <b>Antipatogena aktivnost</b>        | <b>Sigurnosni kriteriji</b>         |
|---|---|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Enzimi sline  | Autoagregacija                          | Proizvodnja antimikrobnih produkata  | Taksonomska identifikacija          |
| Želučani enzimi   | Stupanj hidrofobnosti stanične površine | Kompetencija s patogenim organizmima | Odsutnost virulencije               |
| Tjelesna temperatura                                      |   |                                      | Produkcija enterotoksina            |
| Nizak pH  | Adhezija na epitelne stanice sisavaca   | Koagregacija s patogenima            | Hemolitička aktivnost               |
| Želučani sok  |   |                                      | Geni za rezistenciju na antibiotike |
| Žučne soli  |   |                                      |                                     |

Uz prethodno navedene kriterije, važan je i izbor probiotika obzirom na njihovo funkcionalno djelovanje na ljudsko zdravlje, stoga se ispituje njihovo antikancerogeno djelovanje, regulacija kolesterola, utjecaj na smanjenje rizika za razvoj pretilosti i dijabetesa, potencijalna primjena za smanjenje simptoma depresije i anksioznosti, imunostimulativno djelovanje te sekrecija funkcionalnih molekula poput enzima, antioksidansa, peptida, vitamina i minerala. Također je važno da probiotik ispunjava određene tehnološke, odnosno industrijske kriterije, što znači: da mora preživjeti industrijske procese proizvodnje kao što su fermentacija,

sušenje zamrzavanjem, promjene u temperaturi, pH vrijednosti i oksidativnom stresu tijekom proizvodnje i skladištenja; da ne smije imati negativan utjecaj na okus i aromu proizvoda niti povećavati njegovu kiselost (de Melo Pereira i sur., 2018).

### 2.2.2. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su skupina gram pozitivnih, anaerobnih bakterija, u obliku koka ili bacila, koje ne stvaraju spore, dobro podnose nizak pH, uglavnom su katalaza negativne te kao glavni produkt fermentacije ugljikohidrata proizvode mliječnu kiselinu, a u njih se ubrajaju rodovi: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Axelsson, 2004). Ove bakterije mogu biti homofermentativne i kao produkt metabolizma ugljikohidrata stvarati samo mliječnu kiselinu ili heterofermentativne, pri čemu osim mliječne kiseline stvaraju i druge produkte (octena kiselina ili alkohol i ugljikov dioksid). Nalazimo ih u mliječnim proizvodima, fermentiranom mesu i ribi, fermentiranim napitcima, ukiseljenom povrću, žitaricama, trulom biljnom materijalu i drugdje, a osim toga nastanjuju ljudski i životinjski organizam, ponajviše usnu šupljinu, ileum, debelo crijevo te vaginu (Mokoena, 2017). Većina bakterija mliječne kiseline sigurna je za ljudsko zdravlje kada se primjenjuje na pravilan način u adekvatnim količinama, tj. imaju GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) i QPS status (engl. *Qualified Presumption of Safty*), što je jedan od razloga njihove široke primjene u prehrambenoj industriji.

### 2.2.3. Bakterije mliječne kiseline u fermentiranim proizvodima

Počeci proizvodnje i konzumacije fermentiranih proizvoda sežu daleko u prošlost, na što nam ukazuju dokazi o konzumaciji fermentiranog povrća i riže u Kini 7000 godina prije nove ere te proizvodnji sira 6500 godina pr. n. e. (Leeuwendaal i sur., 2022). Kao osnova za dobivanje tradicionalnih fermentiranih proizvoda koristile su se gotovo sve skupine namirnica, odnosno mlijeko, povrće, žitarice, mahunarke, meso i riba, a odabir namirnica za fermentaciju i razvoj različitih proizvoda je značajno ovisio o zemljopisnoj regiji, što se može vidjeti u tablici 3.

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su nosioci mliječno-kiselog vrenja, procesa glikolize u kojem iz ugljikohidratnih izvora kao konačni produkt nastaje laktat. Prilikom tradicionalne proizvodnje fermentacija se provodila putem bakterija prirodno prisutnih u polaznoj namirnici, no u današnje vrijeme, zbog velikih potreba tržišta, u komercijalnoj proizvodnji uglavnom se

koriste starter kulture bakterija mliječne kiseline dobivene iz različitih izvora, koje su optimalno odabrane za proizvodnju željenog proizvoda.

**Tablica 3.** Primjeri tradicionalnih fermentiranih proizvoda dobivenih pomoću bakterija mliječne kiseline, razvrstanih prema polaznoj sirovini i geografskom području. Preuzeto i prilagođeno prema Tamang i sur. (2020)

| Kategorija namirnica         | Fermentirani proizvod | Polazna sirovina                          | Najčešći rodovi BMK  | Geografsko područje             |
|------------------------------|-----------------------|---|--|---------------------------------|
| Mlijeko i mliječni proizvodi | Sir                   | Životinjsko mlijeko                       | <i>Lactococcus</i>   | Cijeli svijet                   |
|                              | Jogurt                | Životinjsko mlijeko                       | <i>Lactobacillus</i> ,<br><i>Streptococcus</i>                       | Europa, Australija, SAD         |
|                              | Kefir                 | Kravlje, ovčje, kozje mlijeko             | <i>Lactobacillus</i> ,<br><i>Leuconostoc</i> ,<br><i>Lactococcus</i> | Rusija                          |
|                              | <i>Dahi</i>           | Kravlje, bivolje mlijeko                  | <i>Lactobacillus</i>   | Indija                          |
|                              | <i>Airag</i>          | Magareće ili devino mlijeko               | <i>Lactobacillus</i>   | Mongolija                       |
| Povrće                       | Kiseli kupus          | Kupus                                     | <i>Leuconostoc</i> ,<br><i>Lactobacillus</i>                         | Europa, SAD, Kanada, Australija |
|                              | <i>Kimchi</i>         | Kupus, mladi luk, ljute papričice, đumbir | <i>Leuconostoc</i> ,<br><i>Weissella</i> ,<br><i>Lactobacillus</i>   | Koreja                          |
|                              | <i>Mesu</i>           | Bambusov izdanak                          | <i>Lactobacillus</i> ,<br><i>Pediococcus</i>                         | Indija, Butan, Nepal            |
| Žitarice                     | <i>Pozol</i>          | Kukuruz                                   | <i>Lactobacillus</i> ,<br><i>Leuconostoc</i>                         | Meksiko                         |
|                              | Kiselo tijesto        | Pšenica, raž                              | <i>Lactobacillus</i>   | Europa, SAD, Australija         |
| Meso i riba                  | <i>Sucuk</i>          | Svinjsko, goveđe meso                     | <i>Lactobacillus</i>   | Turska                          |
|                              | <i>Salchichon</i>     | Svinjsko, goveđe meso                     | <i>Pediococcus</i> ,<br><i>Lactococcus</i>                           | Španjolska                      |
|                              | <i>Ngari</i>          | Riba <i>Puntius sophore</i>               | <i>Lactobacillus</i> ,<br><i>Lactococcus</i>                         | Indija                          |

Bakterije mliječne kiseline u prehrambenoj industriji se prvenstveno koriste radi poboljšanja okusa hrane i pića (stvaranjem tvari arome poput acetaldehida, acetoina, diacetila i drugih), smanjenja udjela štetnih komponenata (poput mikotoksina i fitinske kiseline) i produljenja trajnosti te povećanja nutritivne vrijednosti proizvoda (proizvodnjom vitamina, polisaharida, bioaktivnih peptida, kratkolančanih masnih kiselina), a sve više raste njihova upotreba kao probiotika (Wang i sur., 2021). Svojim metabolizmom, bakterije mliječne kiseline smanjuju udio ugljikohidrata i pH vrijednost namirnice (zbog nastanka mliječne kiseline) što pozitivno utječe na inhibiciju rasta različitih patogena te produljenje trajnosti namirnice (Mozzi, 2016).

Proizvodnja organskih kiselina, proizvodnja bakteriocina koji inhibiraju rast i reprodukciju brojnih bakterija, proizvodnja egzopolisaharida te raznih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem čine osnovu za korištenje bakterija mliječne kiseline kao probiotika (Wang i sur., 2021).

### 2.3. VOĆNI SUPSTRATI KAO IZVORI PROBIOTIKA

Mikroorganizmi koji se koriste u proizvodnji probiotičkih proizvoda često su humanog porijekla, zbog toga što se isprva smatralo da su bolje adaptirani na gastrointestinalne uvjete ljudskog organizma. Navedena preporuka ljudskog porijekla je napuštena zbog nagomilanih dokaza da probiotička svojstva ovise i specifična su za pojedini soj, a ne izvor izolacije. Danas se često koriste sojevi dobiveni iz mlijeka i mliječnih proizvoda (obzirom na to da su takvi proizvodi najčešći) koji su sposobni preživjeti u uvjetima koje pružaju takvi proizvodi (De Albuquerque i sur., 2018). Porastom proizvodnje probiotičkih proizvoda koji nisu bazirani na mlijeku već na drugim sirovinama (osobito voću), raste i potreba za izolacijom i identifikacijom probiotičkih sojeva iz takvih izvora, koji bi bili adaptirani na rast u takvim uvjetima kako bi nakon konzumacije proizvoda do izražaja došla njihova probiotička svojstva.

S ciljem identifikacije probiotičkih sojeva iz voća, Rodrigues i sur. (2021) su analizirali različite izolate dobivene iz nekoliko vrsta svježeg voća (banana, grožđe, naranča i jabuka), provjeravajući njihovu *in vitro* sigurnost te tehnološka i funkcionalna svojstva. Identificirano je ukupno 93 izolata bakterija mliječne kiseline iz rodova *Lactobacillus* i *Enterococcus*, od kojih je 9 odabrano kao potencijalni probiotici. Daljnjom analizom utvrđeno je da 4 od njih, koji su identificirani kao *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus* spp., pokazuju najbolji potencijal, stoga autori ističu kako je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo jesu li adekvatni za upotrebu kao probiotici.

Garcia i sur. (2016) su analizirali različite sojeve bakterija mliječne kiseline dobivene iz nusprodukata prerade voćne pulpe (acerola, graviola, jagoda i mango), koji su uglavnom sadržavali koru, sjemenke i mali dio samog mesa voća. Većina identificiranih sojeva je pripadala rodu *Lactobacillus*, od kojih je odabrano 5 (*L. brevis* 59, *L. pentosus* 129, *L. paracasei* 108, *L. plantarum* 49 i *L. fermentum* 111) koji su dalje analizirani s ciljem utvrđivanja tehnoloških svojstava i probiotičkog djelovanja. Na temelju rezultata, autori navode kako voće i voćni nusprodukti predstavljaju izvor novih probiotičkih sojeva.

Gore navedena istraživanja samo su dio dokaza koji upućuju na to da su voćni supstrati dobar izvor novih probiotika, koji su zbog svoje prirodne prisutnosti u voću dobar izbor pri kreiranju novih funkcionalnih proizvoda na bazi voća jer su prilagođeni na uvjete rasta (pH, nutrijenti i drugo) koji prevladavaju u takvim proizvodima. Među izoliranim potencijalnim probioticima iz voća, velik dio čine bakterije iz roda *Lactobacillus*.

### 2.3.1. Bakterije roda *Lactobacillus*

Među bakterijama mliječne kiseline najveću i najznačajniju skupinu čine bakterije roda *Lactobacillus*, koje su zbog svoga GRAS statusa stekle široku primjenu u prehrambenoj industriji u obliku starter kultura u proizvodnji fermentiranih proizvoda te kao probiotici, a osim toga pridonose i okusu hrane. To su gram pozitivne, katalaza negativne, aerotolerante ili anaerobne, nesporoformne štapičaste bakterije koje kao glavni produkt fermentacije proizvode mliječnu kiselinu, a kao sporedne produkte mogu proizvoditi acetat, etanol, CO<sub>2</sub>, sukcinat i metanoat (Salveti i sur., 2012). Za rast su im, osim ugljikohidrata, potrebne aminokiseline, masne kiseline ili esteri masnih kiselina, vitamini i soli, a optimalni uvjeti rasta su pri temperaturi 30 – 40 °C i pH vrijednosti 5,5 – 6,2.

Rod *Lactobacillus* se prvenstveno dijeli prema putu fermentacije ugljikohidrata na tri skupine: obligatni homofermentativni laktobacili, fakultativni heterofermentativni laktobacili i obligatni heterofermentativni laktobacili; dok se u novije vrijeme podjele temelje na filogenetskim obilježjima dobivenim sekvencioniranjem 16S rRNA, koje svrstavaju laktobacile u sljedeće grupe: *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei* i *Lactobacillus salivarius* (De Angelis i Gobbetti, 2011).

Jagode predstavljaju potencijalan izvor novih probiotičkih sojeva roda *Lactobacillus*, a pojedina istraživanja bave se njihovom izolacijom i identifikacijom. Chen i sur. (2020) su iz ploda jagode izolirali 13 izolata bakterija mliječne kiseline te ispitivali njihovu antagonističku aktivnost prema patogenu *Botrytis cinerea*, a kao najbolji se pokazao soj identificiran kao *Lactobacillus plantarum* CM-3. Fevria i Hartanto (2019) su izolirali dva soja bakterija iz fermentiranih jagoda, koji su kasnije identificirani kao *Lactobacillus bulgaricus*, dok su Garcia i sur. (2016) izolirali i identificirali *Lactobacillus plantarum* iz pulpe jagode dobivene kao nusprodukt industrijske prerade. Manjak potpuno okarakteriziranih funkcionalnih probiotičkih sojeva izoliranih iz ploda jagode predstavlja veliki potencijal za buduća istraživanja.

## 2.4. PROBIOTIČKI PROIZVODI NA BAZI VOĆA

Iako su mlijeko i mliječni proizvodi odličan izbor za proizvodnju probiotičkih proizvoda, razlozi poput intolerancije na laktozu, vegetarijanstva te želje potrošača za novitetima na tržištu potaknuli su industriju na razvoj probiotičkih proizvoda baziranih na drugim namirnicama. Zbog visokog udjela bioaktivnih komponenata i njihovog sinergističkog djelovanja s probioticima te intestinalnom mikrobiotom, kao jedna od alternativa ističe se voće i povrće čija fizikalno-kemijska svojstva, poput niskog pH, te kratka trajnost tijekom skladištenja mogu predstavljati problem za stabilnost probiotika i razvoj ovakvih proizvoda.

U tablici 4, koja prikazuje neke primjere probiotičkih proizvoda na bazi voća, vidljivo je da se za njihovu proizvodnju uglavnom koriste voćni sokovi, dok se svježe voće te ostali produkti njegove prerade koriste znatno rjeđe. Kao potencijalna podloga za probiotičke proizvode istražuju se i ekstrakti voća. Hap i Gutierrez (2012) su proučavali utjecaj ekstrakata različitog voća (borovnica, fejoa, kivi, jagoda) na rast odabranih probiotika i inhibiciju pojedinih patogenih bakterija te su zaključili kako ispitivani ekstrakti pokazuju dobar potencijal za razvoj probiotičkih proizvoda. Cilj istraživanja koje su proveli Mahmoudi i sur. (2021) bio je proizvesti probiotički napitak temeljen na ekstraktu žižule (*Ziziphus jujube*) fermentacijom pomoću bakterija *Lactobacillus delbrueckii* i *Lactobacillus plantarum*. Autori navode kako je, prema rezultatima istraživanja, ekstrakt žižule nakon fermentacije imao veći udio polifenolnih spojeva i veću antioksidacijsku aktivnost u odnosu na nefermentirani ekstrakt.

**Tablica 4.** Primjeri komercijalnih probiotičkih proizvoda na bazi voća. Preuzeto i prilagođeno prema Dey (2018)

|    | <b>Matrica</b>       | <b>Komercijalni naziv</b>                 | <b>Zemlja porijekla</b> | <b>Probiotička kultura</b>   |
|----|----------------------|---|-------------------------|--|
| 1. | Voćni sok            | Biola                                     | Norveška                | <i>Lb. rhamnosus</i>   |
| 2. | Voćni sok            | Valio Bioprofit                           | Finska                  | <i>Lb. rhamnosus</i>   |
| 3. | Voćni napitak        | Danone - ProViva                          | Švedska, Finska         | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i>  |
| 4. | Suhe smokve          | Mariani Premium                           | SAD                     | <i>B. coagulans</i>  |
| 5. | Voćni sok            | GoodBelly                                 | SAD                     | <i>Lb. plantarum</i> 299v  |
| 6. | Svježe voće i povrće | Garden of Life RAW Organic Kids Probiotic | SAD                     | <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> |

Potencijalnu podlogu za razvoj novih probiotičkih proizvoda na bazi voća čini maginja, plod biljke planike (*Arbutus unedo* L.) kojeg karakterizira visok sadržaj ugljikohidrata (pretežno fruktoza i glukoza) i vlakana te nezasićenih masnih kiselina, proteina, vitamina (ponajviše vitamini C i E) i minerala (kalcij, kalij, magnezij, natrij, fosfor) (Bebek Markovinović i sur., 2022). Osim navedenog, ovaj plod te njegovi ekstrakti sadrže obilje drugih bioaktivnih komponenata, posebice polifenolnih spojeva kao što su fenolne kiseline, antocijani, flavonoidi, kumarini, kondenzirani tanini i drugi (Bebek Markovinović i sur., 2023), stoga je sve više istraživanja usmjereno na utvrđivanje njihovog antioksidacijskog, antitumorskog, hipoglikemijskog, antimikrobnog i drugih potencijalnih pozitivnih djelovanja na ljudsko zdravlje (Morales, 2022).

#### 2.4.1. Stabilnost probiotika u voćnim proizvodima

Ključan čimbenik u proizvodnji probiotičkih proizvoda je njihova stabilnost koja značajno ovisi o vrsti odabranog mikroorganizma, vrsti i sastavu voća koje se koristi kao baza proizvoda, pH vrijednosti, koncentraciji kisika, prisutnosti antimikrobnih spojeva, provedenim tehnološkim postupcima, upotrebi umjetnih bojila i aroma te uvjetima i trajanju skladištenja (Horáčková i sur., 2018). Neke od metoda kojima se nastoji povećati stabilnost probiotika su: dodavanje prebiotika, upotreba antioksidansa, mikroinkapsulacija, liofilizacija te izlaganje probiotika subletalnom stresu koji uzrokuje adaptaciju i povećanje rezistentnosti (Perricone i sur., 2015).

Dodatkom prebiotika potencijalno bi se poboljšao rast, razmnožavanje i preživljavanje probiotika u proizvodu, a najčešći prebiotici koji se koriste su oligosaharidi (inulin, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi). Khezri i sur. (2018) proučavali su učinak inulina na sok smokve fermentiran bakterijom *Lactobacillus delbruecki*, a rezultati su pokazali kako je sok fermentiran uz dodatak inulina imao bolja probiotička i antioksidacijska svojstva te bolje preživljavanje stanica nakon skladištenja u odnosu na sok fermentiran bez dodatka inulina. S druge strane, White i Hekmat (2018) tvrde kako dodatak inulina prilikom fermentacije voćnih sokova pomoću *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 nije imao značajan utjecaj na poboljšanje rasta i preživljavanje korištenog probiotičkog soja, ali je poboljšao senzorska svojstva takvog proizvoda.



Mikroinkapsulacija je metoda u kojoj se pojedini nutrijenti ili bioaktivne tvari oblažu različitim polimernim ili ne-polimernim tvarima s ciljem nastanka zaštitnog sloja koji će štititi aktivnu komponentu od nepovoljnih uvjeta te omogućiti njeno otpuštanje u određeno vrijeme na ciljanom mjestu kako bi se ispoljio željeni učinak (Choudhury i sur., 2021). Uz to, mikroinkapsulacija može maskirati negativan okus i aromu, a materijali koji se najčešće koriste u ovome postupku su: škrob, modificirani škrob, maltodekstrin, ciklodekstrin, celuloza, kitozan, gume (akacija, agar, karagenan), proteini, lipidi (vosak, parafin). Istraživanje koje su proveli Gandomi i sur. (2016) pokazalo je kako je inkapsulacija probiotičkog soja *Lactobacillus rhamnosus* GG pomoću alginata i kitozana povećala njegovo preživljavanje u soku od jabuke tijekom 90 dana skladištenja pri 4 °C i 25 °C te u uvjetima gastrointestinalnog sustava, u usporedbi sa slobodnim bakterijskim stanicama istoga soja.

Liofilizacija je postupak sušenja kojim se uklanja voda putem procesa sublimacije, a koristi se za poboljšanje stabilnosti različitih bioloških materijala, komponenata hrane i farmaceutika uz očuvanje njihovih bioloških, nutritivnih i organoleptičkih svojstava (Nowak i Jakubczyk, 2020). Garcia i sur. (2018) su istraživali utjecaj liofilizacije na preživljavanje 5 potencijalnih probiotičkih sojeva roda *Lactobacillus* izoliranih iz voća tijekom skladištenja u smrznutom obliku te nakon njihovog dodatka u različite voćne sokove (jabuka, grožđe, naranča). Prema rezultatima istraživanja, svih 5 sojeva je bilo stabilno nakon 30 dana skladištenja u smrznutom obliku, no nakon duljeg perioda skladištenja dolazi do smanjenja broja preživjelih stanica. Preživljavanje bakterijskih stanica u voćnim sokovima značajno je variralo između ispitivanih sojeva ovisno o vrsti soka, a *L. paracasei* 108 i *L. plantraum* 49 su pokazali najbolje rezultate. Autori navode kako je za uspješnost procesa liofilizacije i preživljavanje probiotičkih kultura potrebno odabrati pravilan krioprotektant.

#### 2.4.2. Razvojni pravci probiotičkih proizvoda na bazi voća

Proizvodnja i razvoj trenutnih, ali i budućih probiotičkih proizvoda na bazi voća prvenstveno se temelji na voćnim napicima, no velik potencijal krije se u novim proizvodima u obliku sirovog ili suhog voća te *snack* pločica i sličnih proizvoda. Primjeri poput probiotičkih kockica suhe jabuke s dodatkom *Lactobacillus casei* NRRL B-442 pokazuju kako suho voće predstavlja dobar potencijal za budućnost (Rodrigues i sur., 2018), kao i probiotičke pločice od datulja fermentirane različitim sojevima roda *Lactobacillus* kod kojih je fermentacija utjecala na povećanje nutritivne vrijednosti (Maisto i sur., 2021).

Budućnost razvoja novih proizvoda orijentirana je na iskorištenje nusprodukata prerade voća koji, zbog visokog sadržaja nutrijenata i bioaktivnih tvari (poput polifenola, karotenoida, tokoferola i vlakana), povećavaju nutritivnu vrijednost proizvoda te predstavljaju dobru podlogu za rast i razvoj probiotičkih bakterija, a njihovom primjenom dolazi do smanjenja količine industrijskog otpada (Keša i sur., 2021). Bogatstvo nutrijentima i bioaktivnim komponentama također su razlog za korištenje fermentiranih voćnih ekstrakata u proizvodnji probiotičkih proizvoda, a njihovi brojni korisni učinci na ljudsko zdravlje (poput smanjenja rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, karcinoma i neurodegenerativnih poremećaja) idu u prilog povećanju njihove upotrebe (Veiga i sur., 2020).

Važnu ulogu u budućnosti svakako igra povećanje brige za očuvanjem okoliša i smanjenje potrošnje prirodnih resursa, stoga se fokus stavlja na istraživanje novih održivih tehnologija koje bi povećale iskorištenje proizvodnih procesa te smanjile troškove, energetske potrošnju i količinu nastalog otpada, kao što su ranije navedene metode poput metode pulsirajućeg električnog polja ili ekstrakcije mikrovalovima. Kako bi se unaprijedio proizvodni proces istražuju se i nove metode stabilizacije probiotičkih sojeva poput različitih vrsta mikroinkapsulacije (vakuum sušenje, mikrovalno sušenje, fluidizirano sušenje i druge) (Misra i sur., 2022).

Veliki potencijal za razvoj probiotičkih proizvoda na bazi voća predstavlja metoda 3D ispisa koja pruža mogućnost korištenja voća i ostataka njegove prerade za izradu proizvoda željenih karakteristika u koje je moguće ugraditi različite komponente poput vitamina, biološki aktivnih tvari ili probiotika, na način da se pri tome očuva nutritivna vrijednost takvih proizvoda te ispolje pozitivni učinci na ljudsko zdravlje. Jedno od istraživanja koje ide tome u prilog pokazalo je kako nije došlo do značajnog pada vijabilnosti probiotika prilikom 3D ispisa inkapsuliranog probiotika *Lactiplantibacillus plantarum* NCIM 2083 (Yoha i sur., 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Mikroorganizmi i biljni uzorci

U istraživanju su korišteni sojevi bakterija mliječne kiseline *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 prethodno izolirani iz ploda jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) sorte 'Albion' te preuzeti iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica.

Plodovi jagoda su nabavljeni putem tvrtke Jagodar-HB d.o.o (Donja Lomnica, Zagrebačka županija). Nakon dopremanja u laboratorij, odstranjene su im peteljke te su oprane, posušene staničevinom, zapakirane u plastične vrećice i skladištene pri -18 °C. Za potrebe izolacije BMK, plodovi jagode su odmrznuti na sobnoj temperaturi.

Korištena maginja (*Arbutus unedo* L.) ubrana je na Malom Lošinj te je odmah dopremljena u laboratorij. Plodovi su oprani, osušeni staničevinom te upakirani u plastične vrećice te skladišteni na -18 °C. Za potrebe provedbe ekstrakcije, plodovi maginje prethodno su odmrznuti na sobnoj temperaturi.

Test-mikroorganizmi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti i sposobnosti koagregacije preuzeti su iz komercijalnih zbirki mikroorganizama DSMZ (engl. *The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*) i ATCC (engl. *American Type Culture Collection*), a korišteni su sljedeći test-mikroorganizmi: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ i *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™.

##### 3.1.2. Hranjive podloge

Tijekom izrade ovog rada korištene su sljedeće hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama:

###### a) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- ❖ MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava: pepton 10,0 g/L; goveđi ekstrakt 10,0 g/L; ekstrakt kvasca 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g/L; natrijev acetat 5,0 g/L; amonijev citrat 2,0 g/L; magnezijev sulfat 0,2 g/L;

manganov sulfat 0,05 g/L; agar 15,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija pri 121 °C/15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promiješan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.

- ❖ MRS bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodanog agara. Sterilizacija se provela pri 121 °C/15 min.

#### b) Podloga za određivanje hemolitičke aktivnosti

- ❖ Columbia krvni agar (Biolife, Italija) sastava: pepto-kompleks 10 g/L; triptoza 10 g/L; pepton 3 g/L; kukuruzni škrob 1 g/L; natrijev klorid 5 g/L; agar 12 g/L. pH vrijednost podloge je 7,3. Podloga sadrži 5 % defibrirane ovčje krvi.

#### c) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj patogenih mikroorganizama

- ❖ HA (hranjivi agar) (Biolife, Italija) sastava: pepton 15,0 g/L; mesni ekstrakt 3,0 g/L; NaCl 5,0 g/L; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g/L; agar 18,0 g/L; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min.
- ❖ HB (hranjivi bujon) (Biolife, Italija) - istog sastava kao i hranjivi agar, ali bez dodanog agara.
- ❖ BHI (brain heart infusion) bujon (Biolife, Italija) sastava: dekstroza 0,002 g/L; NaCl 0,005 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0025 g/L; pepton 0,1 g/L; ekstrakt telećeg mozga 200 g/L; ekstrakt goveđeg srca 250 g/L. Konačan pH podloge pri 25 °C je 7,4.
- ❖ BHI (brain heart infusion) agar (Biolife, Italija) istog je sastava kao BHI bujon ali sadrži agar (2,5 %).

#### 3.1.4. Aparatura i pribor

- ❖ analitička vaga, Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ antibiotski diskovi (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italija)
- ❖ autoklav (Sutjeska, Beograd, Srbija)
- ❖ automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ❖ centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- ❖ čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- ❖ Eppendorf tubice (2 mL)
- ❖ Erlenmeyerove tikvice staklene (100 mL i 300 mL)
- ❖ filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0.22 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)

- ❖ plastične kivete (15 i 50 mL)
- ❖ kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- ❖ laboratorijske čaše (100 mL i 200 mL)
- ❖ laboratorijske menzure (50 i 100 mL)
- ❖ laboratorijski stalci
- ❖ liofilizatoru Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ, Osterode, Njemačka)
- ❖ magnetna miješalica (Domel, Železniki, Slovenija)
- ❖ magnetska miješalica, Lab Stir (Gilson, Middleton, WI, SAD)
- ❖ medicinske šprice (5 i 10 mL)
- ❖ mikrobiološka ušica
- ❖ mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- ❖ mikrotitarske pločice s 96, 24 i 12 jažica Falcon (Corning, Corning, SAD)
- ❖ sterilni pamučni štapići
- ❖ Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- ❖ pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ❖ plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- ❖ spektrofotometar, Helios β UV-Vis ( Unicam, Cambridge, UK)
- ❖ tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ uređaj za ultrazvučno procesiranje UP400St, 400 W, DN22, 24 Hz (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Njemačka)
- ❖ vibracijska miješalica, V<sup>-1</sup> plus (Biosan, Riga, Latvija)

### 3.1.5. Kemikalije

- ❖ 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ alginat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ butan-1-ol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ dikalijev fosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ etanol, 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ fetalni goveđi serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD)
- ❖ kalijev hidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ kristal-violet 1 %-tna otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)

- ❖ *p*-ksilen (Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- ❖ limunska kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ magnezijev fosfat (Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- ❖ metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ mononatrijev fosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev hidrogenkarbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ octena kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- ❖ pankreatin (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ pepsin (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ toluen (Alkaloid, Skoplje, Sjeverna Makedonija)
- ❖ urea (Biolife, Milano, Italija)
- ❖ žučne soli (Merck, Darmstadt, Njemačka)

### 3.2. METODE RADA

#### 3.2.1. Priprema vodenog ekstrakta ploda maginje (*Arbutus unedo* L.)

Za pripremu vodenog ekstrakta maginje korištena je tehnologija ultrazvuka visoke snage (engl. *High Power Ultrasound*, HPU) putem uređaja za ultrazvučno procesiranje UP400St, 400 W, DN22, 24 Hz (Hielscher Ultrasonics GmbH, Njemačka). Odabrani su parametri ekstrakcije: amplituda 50 %, puls 100 % te vrijeme ekstrakcije 5 min pri čemu je ukupna energija ultrazvuka iznosila 6,869 Wh, snaga 96 W i temperatura ekstrakta 80 °C. Postupak ekstrakcije je proveden u odvaganom uzorku kaše maginje (10 g ± 0,0001) u koji je nadodano 60 mL destilirane vode. Nakon provedene ekstrakcije ekstrakt je profiltriran u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopunjen ekstrakcijskim otapalom do oznake.

#### 3.2.2. Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2

Bakterijski sojevi uzgojeni su u MRS bujonu tijekom 24 h u aerobnim uvjetima na 37 °C. Nakon inkubacije, bakterijske stanice odvojene su od hranjivog medija centrifugiranjem na 6000 okretaja/min kroz 10 minuta. Nakon centrifugiranja, istaložene stanice su nakon

dekantiranja supernatanta resuspendirane u sterilnoj deioniziranoj vodi te ponovno centrifugirane pri istim uvjetima. Nakon ispiranja stanice su resuspendirane u određenom volumenu sterilne deionizirane vode. Tako priređene suspenzije su homogenizirane i korištene u daljnjim eksperimentima.

### 3.2.3. Uzgoj *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 uz dodatak vodenog ekstrakta maginje i fetalnog goveđeg seruma

Nakon prekonocnog uzgoja u MRS bujonu, stanice sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 odvojene su od medija centrifugiranjem na 6000 okretaja/min te resuspendirane u sterilnoj deioniziranoj vodi. Tako pripremljena suspenzija nacijepljena je u slijedeće medije: 1. MRS bujon, 2. vodeni ekstrakt maginje, 3. vodeni ekstrakt maginje uz dodatak 1 % fetalnog goveđeg seruma, 4. vodeni ekstrakt maginje uz dodatak 5 % fetalnog goveđeg seruma. Pripremljene suspenzije bakterija mliječne kiseline zatim su inkubirane kroz 24 h na 37 °C u aerobnim uvjetima.

### 3.2.4. Antimikrobna aktivnost sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 prema odabranim patogenima

Bakterijske stanice sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 dobivene prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3. odvojene se od medija centrifugiranjem na 6000 okretaja/min kroz 10 minuta, a dobiveni supernatanti korišteni su u daljnjem postupku određivanja antimikrobne aktivnosti.

Određivana je antimikrobna aktivnost tako dobivenih supernatanata prilagođenom metodom prema Frece i sur. (2011) i Ratsep (2014) na polistirenskim pločicama s 96 jažica, prema sljedećim test-mikroorganizmima: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ i *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™. U jažice mikrotitarskih pločica otpipetirano je 200 µL ispitivanog supernatanta, 70 µL hranjivog bujona te 10 µL prethodno uzgojenog ispitivanog test-mikroorganizma. Pločice su inkubirane tijekom 24 h na 37 °C u aerobnim uvjetima. Sposobnost inhibicije rasta je određena na temelju mjerenja apsorbancije pri 620 nm prije i nakon inkubacije, prema izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100 \quad [1]$$

gdje je

$A_t$  – apsorbancija u vremenu  $t$

$A_0$  – apsorbancija u vremenu 0

### 3.2.5. Ispitivanje osjetljivosti sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 na antibiotike disk difuzijskom metodom

Određivanje osjetljivosti bakterija na odabrane antibiotike provedeno je prema smjernicama Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST). Metoda je minimalno izmijenjena radi prilagodbe ispitivanim sojevima.

Bakterijske kulture *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i DB2 uzgojene na MRS hranjivoj podlozi odvojene su od medija centrifugiranjem pri 6000 okretaja/min tijekom 10 min te resuspendirane u sterilnoj vodi. Suspenzija stanica nanesa je na MRS hranjivi agar jednolikim razmazivanjem u tri smjera pomoću pamučnog štapića, koji je prethodno uronjen u suspenziju. Nakon naciepljivanja, na inokulirani MRS agar stavljeni su diskovi ispitivanih antibiotika. Ploče su stavljene na inkubaciju pri 37 °C te je na nakon 24 sata promatrano je li došlo do pojave zona inhibicije koje ukazuju na to da je ispitivani soj osjetljiv na testirani antibiotik. U slučaju da je došlo do pojave zona inhibicije, mjeri se njihov promjer te izražava u milimetrima. U ovome radu ispitivana je osjetljivost izolata bakterija mliječne kiseline na navedene antibiotike: ampicilin, eritromicin, gentamicin, kanamicin, klindamicin, kloramfenikol, streptomycin, tetraciklin i vankomicin.

### 3.2.6. Hemolitička aktivnost sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2

Hemolitička aktivnost izolata bakterija mliječne kiseline određena je prema metodi opisanoj u Halder i sur. (2017). Bakterijske kulture dobivene prekonoćnim uzgojom u MRS bujonu naciepljene su na Columbia krvni agar te inkubirane na 37 °C kroz 24 do 48 h, nakon čega je promatrana prisutnost ili odsutnost hemolitičkih zona na krvnom agaru. Zelene zone oko kolonija ukazuju na  $\alpha$ -hemolizu, prozirne zone oko kolonija ukazuju na  $\beta$ -hemolizu, dok odsutnost zona oko kolonija ukazuje na odsutnost hemolitičke aktivnosti, tj.  $\gamma$ -hemolizu.



### 3.2.7. Preživljavanje sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 u simuliranim uvjetima probavnog sustava

Stupanj preživljavanja ispitivanih bakterijskih sojeva u simuliranim uvjetima želuca i crijeva određen je koristeći otopine pripremljene na način opisan u Frece (2007).

Određen je stupanj preživljavanja izolata bakterija mliječne kiseline u simuliranim uvjetima želuca i crijeva. Navedeni uvjeti simulirani su pripremom otopina kao što je opisano u radu prema Frece (2007):

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 g/L), KCl (0,8946 g/L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8878 g/L), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,680 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (1,680 g/L), CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,1981 g/L). pH otopine podešen je na 3 pomoću koncentrirane kloridne kiseline.

Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) i žučnih soli (3,0 g/L) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 g/L), KCl (0,8946 g/L), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8878 g/L), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,680 g/L), NaHCO<sub>3</sub> (1,680 g/L), CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (0,1981 g/L). pH otopine podešen je na 7 pomoću koncentrirane kloridne kiseline.

Nakon izlaganja ispitivanih sojeva uvjetima želuca (2 h) i crijeva (4 h) određena je CFU (engl. *colony forming unit*) vrijednost metodom naciepljivanja na MRS agar.

### 3.2.8. Sposobnost formiranja biofilmova sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2

Sposobnost formiranja biofilmova ispitivanih izolata bakterija mliječne kiseline određena je prema modificiranoj metodi opisanoj u Kostelac i sur. (2022). Metoda se temelji klasifikaciji jačine formiranih biofilmova u polistirenskim mikrotitarskim pločicama nakon inkubacije.

U polistirenske mikrotitarske pločice s 12 jažica dodano je 3 mL MRS bujona te je naciepljeno sa 100 µL suspenzije prethodno uzgojenih bakterijskih kultura. Pločice su zatim inkubirane na 37 °C tijekom 24 h, odnosno 48 h, nakon čega je pažljivim pipetiranjem ispražnjen sadržaj jažica, bez grebanja po dnu jažica. Talog bakterijskih stanica je ispran s 2 mL sterilne deionizirane vode uz lagano miješanje, a dodatkom 2 mL metanola i inkubacijom tijekom 15 minuta fiksirane su stanice adhezirane u biofilmu. Nakon fiksiranja, metanol je uklonjen, a pločice osušene na zraku. Adhezirane stanice su obojene dodatkom 1 %-tnog kristal violeta tijekom 5 minuta. Temeljitim ispiranjem deioniziranom vodom uklonjen je višak boje, a vezana

boja je otpuštena dodatkom 2 mL 33 %-tne octene kiseline. Zatim je pomoću spektrofotometra izmjerena optička gustoća (engl. *optical density*, OD) pri 595 nm. Kao negativna kontrola korišteni su neinokulirani uzorci.

Dobivene vrijednosti optičke gustoće uspoređene su s optičkom gustoćom negativne kontrole te je sposobnosti formacije biofilмова klasificirana prema Borges i sur. (2012) i klasifikaciji prikazanoj u tablici 5.

**Tablica 5.** Klasifikacija formacije biofilмова usporedbom optičke gustoće uzorka i negativne kontrole prema Borges i sur. (2012)

| Usporedba OD i ODK vrijednosti | Klasifikacija proizvodnje biofilмова |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| OD < ODK                       | Nema                                 |
| ODK < OD < 2×ODK               | Slaba                                |
| 2×ODK < OD ≤ 4×ODK             | Umjerena                             |
| 4×ODK < OD                     | Jaka                                 |

OD-optička gustoća; ODK-optička gustoća kontrole

### 3.2.9. Određivanje autoagregacijske sposobnosti soja *Lpb. plantarum* DB2

Bakterijske suspenzije pripremljene su prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2., pri čemu su u zadnjem koraku stanice resuspendirane u 10 mL sterilne deionizirane vode. Stupanj autoagregacije određen je prema Kos i sur. (2003) prilagodbom metode prema Kostelac (2022), mjerenjem apsorbancije (pri 620 nm) gornjeg sloja suspenzije koja je mirovala tijekom 24 h, u intervalima od 1, 2, 3, 4 i 24 sata. Stopa autoagregacije je izračunata prema izrazu:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100 \quad [2]$$

gdje je:

$A_t$  – apsorbancija u vremenu t

$A_0$  – apsorbancija u vremenu 0

### 3.2.10. Određivanje sposobnosti koagregacije soja *Lpb. plantarum* DB2 s odabranim patogenima

Stupanj koagregacije određen je ekvivalentno postupku za određivanje stupnja autoagregacije, opisanom u poglavlju 3.2.9., na način da je pomiješan jednak volumen radne

suspenzije bakterijskih stanica dobivene prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. i suspenzije odabranih test-mikroorganizama (*Escherichia coli* ATCC®25922™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™ i *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™). Mjerena je apsorbancija pri 620 nm pažljivo uklonjenog gornjeg sloja pripremljenih suspenzija u mirovanju tijekom 24 h, u intervalima od 1, 2, 3, 4 i 24 sata.

### 3.2.11. Određivanje hidrofobnosti stanične površine soja *Lpb. plantarum* DB2

Kao mjera hidrofobnosti stanične površine bakterija mliječne kiseline određivana je sposobnost njihove adhezije na ugljikovodike prema prilagođenoj metodi opisanoj u Mishra i Prasad (2005). Nakon prekonoćnog uzgoja u MRS bujonu, bakterije mliječne kiseline odvojene su od hranjive podloge centrifugiranjem pri 6000 okretaja/min u trajanju od 10 minute, zatim dva puta isprane sterilnom deioniziranom vodom te resuspendirane u 10 mL fosfat urea magnezij sulfatnog pufera (PUM). U epruvete je dodano 3 mL pripremljene bakterijske suspenzije i 1 mL ispitivanog ugljikovodika te su uzorci inkubirani tijekom jednog sata na 37 °C. Nakon inkubacije došlo je do odvajanja faza te je mjerena apsorbancija na 620 nm donje faze. Ispitivani ugljikovodici bili su butan-1-ol, *p*-ksilen i toluen. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunat je postotak hidrofobnosti prema sljedećem izrazu:

$$\text{Hidrofobnost (\%)} = (A - A_0)/A \cdot 100 \quad [3]$$

gdje je:

$A$  – početna apsorbancija

$A_0$  – konačna apsorbancija

### 3.2.12. Uzgoj soja *Lpb. plantarum* DB2 u vodenom ekstraktu maginje pri različitim uvjetima

#### 3.2.12.1. Određivanje sposobnosti rasta

Inokulum soja *Lpb. plantarum* DB2 pripremljen je prema postupku opisanom u 3.2.2.

U set sterilnih epruveta priređen je niz uzoraka ukupnog volumena 5 mL koji su sadržavali: 1. ekstrakt maginje, 2. ekstrakt maginje i 5 % seruma, 3. ekstrakt maginje i glukozu (koncentracija glukoze 10 i 20 g/L), 4. ekstrakt maginje, 5 % seruma i glukozu (10 i 20 g/L). U uzorke je otpipetirano 100 µL inokuluma bakterija te su uzorci inkubirani na 37 °C kroz 24 h pri aerobnim, odnosno anaerobnim uvjetima. Kao mjera uspješnosti rasta bakterija u ekstraktu

maginje, mjerena je optička gustoća uzoraka pri 620 nm. Kontrolni uzorci pripremljeni su na jednak način, bez dodatka inokuluma.

#### 3.2.12.2. Uzgojni uvjeti za postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

Nakon prekonocnog uzgoja bakterijske stanice kulture *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 odvojene su od hranjivog medija centrifugiranjem pri 6000 okretaja/min tijekom 10 minuta te isprane sterilnom deioniziranom vodom i ponovo centrifugirane pri istim uvjetima. Dobivene bakterijske stanice resuspendirane su u 4 mL vodenog ekstrakta maginje. U sterilne epruvete stavljeno je po 1 mL dobivene suspenzije bakterijskih stanica i 9 mL vodenog ekstrakta maginje te 10 % fetalnog goveđeg seruma. Epruvete su stavljene na inkubaciju u trajanju od 24 h na 37 °C u aerobnim uvjetima.

#### 3.2.13. Mikroinkapsulacija fermentiranog i nefermentiranog vodenog ekstrakta maginje

Fermentirani ekstrakt maginje dobiven je prema postupku opisanom u 3.2.12.2. Nakon 24-satne fermentacije pri 37 °C, centrifugiranjem pri 6000 okretaja/min tijekom 15 minuta odvojen je supernatant od biomase te je ponovno centrifugiran pri jednakom broju okretaja u trajanju od 10 minuta. Dobiveni supernatant korišten je u daljnjem postupku.

U 18 mL prethodno dobivenog supernatanta fermentiranog ekstrakta maginje otopljen je alginat (2 %) uz miješanje na magnetskoj miješalici. Koristeći medicinsku špricu, dobivena otopina je postepeno dodavana u 50 mL 2,5 %-tne otopine CaCl<sub>2</sub> uz miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon 30 minuta formirani mikroinkapsulati su odvojeni od otopine CaCl<sub>2</sub> te osušeni na zraku. Identičan postupak je ponovljen s jednakim volumenom nefermentiranog ekstrakta maginje.

#### 3.2.14. Liofilizacija sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 te mikroinkapsuliranih fermentiranih i nefermentiranih vodenih ekstrakata maginje

Nakon uzgoja na MRS hranjivoj podlozi, bakterijske kulture odvojene su od medija centrifugiranjem pri 6000 okretaja/min kroz 10 min te isprane sterilnom deioniziranom vodom i resuspendirane u obranom mlijeku (10 %). Suspenzije su zamrznute na -80 °C preko noći te kao takve liofilizirane u liofilizatoru Christ Alpha 1-2 LD plus. Kako bi se odredila uspješnost postupka i sposobnost stanica da prežive proces liofilizacije, indirektnom metodom je određen broj živih stanica prije i nakon liofilizacije te uspoređene dobivene vrijednosti.

Mikroinkapsulirani nefermentirani i fermentirani vodeneni ekstrakt maginje dobiveni su prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.12.2. te je odvagano po 0,5 g takvih uzoraka. Uzorci su zamrznuti na -80 °C te kao takvi liofilizirani u liofilizatoru Christ Alpha 1-2 LD plus.

### 3.2.15. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala mikroinkapsuliranog i liofiliziranog vodenog ekstrakta maginje prije i nakon fermentacije

Jedna od mjera ukupne antioksidativne aktivnosti je sposobnost uklanjanja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnih radikala te je ona određena prema prilagođenoj metodi prema Kostelac i sur. (2023).

U 5 mL etanolne otopine DPPH dodano je 100 µL vodenog ekstrakta maginje, odnosno 100 µL fermentiranog vodenog ekstrakta maginje dobivenog prema postupku opisanom u 3.2.12.2. te su uzorci homogenizirani. Nakon inkubacije uzoraka u mraku kroz 30 minuta, mjerenja je apsorbancija pri 517 nm. Kontrolni uzorci sadržavali su 5 mL etanolne otopine DPPH i 100 µL sterilne vode.

Odvagano je po 0,5 g mikroinkapsulata fermentiranog te nefermentiranog vodenog ekstrakta maginje dobivenih prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.13., kojima je zatim dodano po 4 mL etanolne otopine DPPH. Uzorci su kratko homogenizirani te stavljeni na inkubaciju u mraku kroz 45 minuta, nakon čega je mjerena apsorbancija pri 517 nm. Postupak je ponovljen s liofiliziranim inkapsulatima dobivenim prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.14., gdje je apsorbancija mjerena pri 492 nm. Kontrolni uroci sadržavali su etanolnu otopinu DPPH i sterilnu deioniziranu vodu.

Na temelju provedenih mjerenja izračunat je postotak uklanjanja DPPH slobodnih radikala, prema izrazu:

$$\text{Uklanjanje radikala (\%)} = [1 - (A - A_{bl})/A_c] \cdot 100 \quad [4]$$

gdje je:

$A$  – apsorbancija uzorka

$A_{bl}$  – apsorbancija slijepe probe

$A_c$  – apsorbancija kontrolnog uzorka

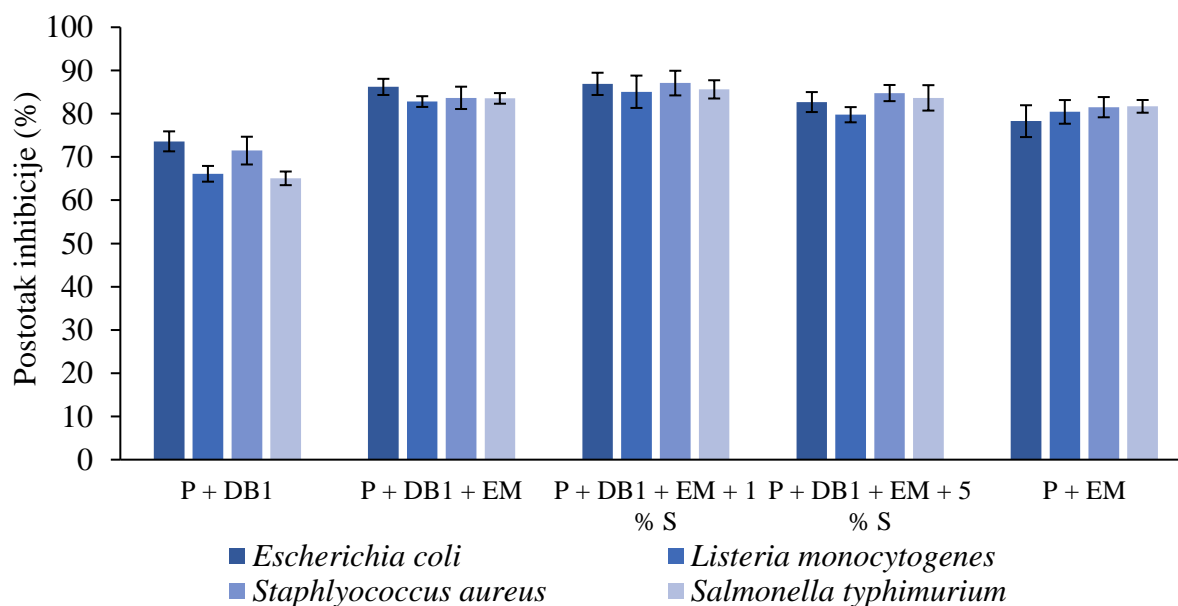
### 3.2.16. Obrada podataka

Rezultati dobiveni u istraživanju pripremljeni su i uređeni pomoću programa Microsoft Office Excel 2013. Statistička obrada podataka provedena je u programu STATISTICA v.7.1. za Windows 10 (Stat-Soft, Tulsa, OK, SAD). Sposobnost formiranja biofilma određena je u 4 paralele; antimikrobna aktivnost i antioksidacijska aktivnost nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije određene su u triplikatu; sposobnosti preživljavanja u simuliranim uvjetima želuca i crijeva određena je u trostrukom pokusu; određivanje sposobnosti rasta bakterija u ekstraktu maginje, određivanje rezistencije na antibiotike, hemolitičke aktivnosti, autoagregacije, koagregacije i hidrofobnosti stanične površine te antioksidacijske aktivnosti nefermentiranog i fermentiranog ekstrakta provedeno je na pojedinačnim uzorcima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

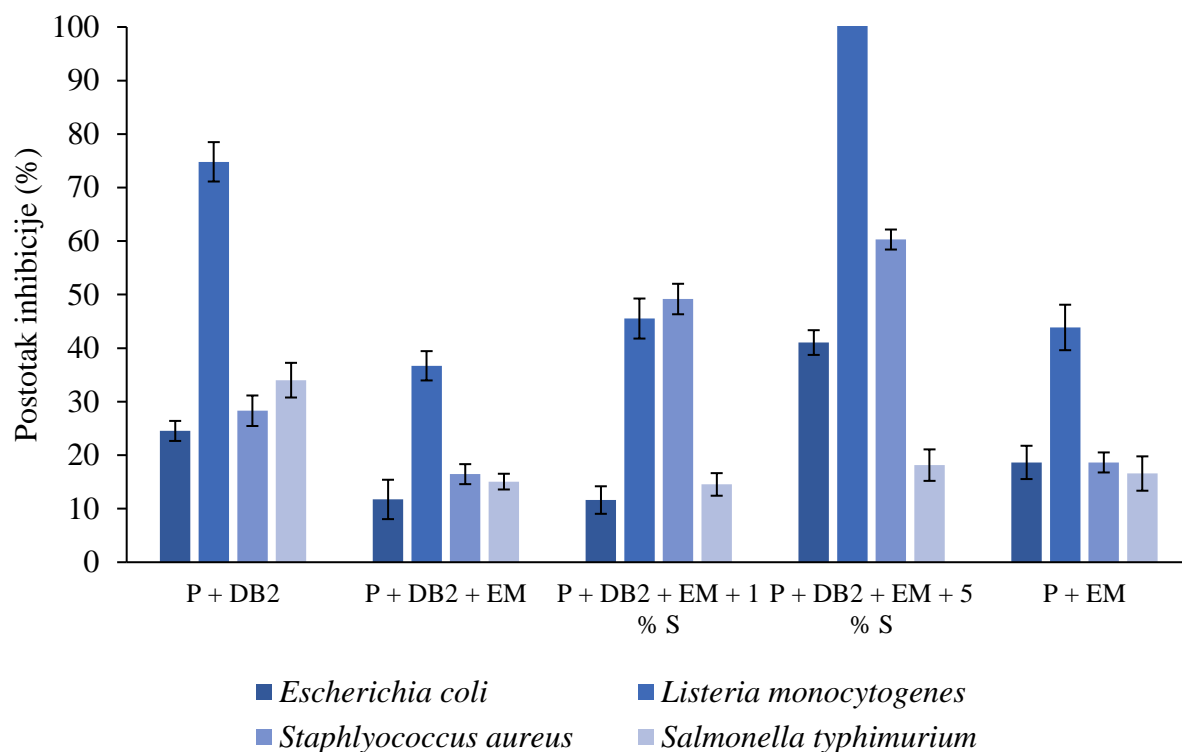
Značajan potencijal za pronalazak novih probiotičkih sojeva, koji bi svoju primjenu našli u proizvodnji funkcionalnih proizvoda, krije se u voću, a zbog velike raznolikosti voćnih vrsta brojne od njih su nedovoljno istražene s toga aspekta što predstavlja osnovu za nova istraživanja i razvoj industrije. Jedna je od takvih voćnih vrsta je i jagoda, stoga je ovo istraživanje među prvima u kojemu je provedena detaljna karakterizacija potencijalnih probiotika *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 izoliranih iz ploda jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) sorte 'Albion'.

Kako je inhibitorni utjecaj potencijalnih probiotika prema patogenim mikroorganizmima jedan od osnovnih preduvjeta ispoljavanja korisnih učinaka, u ovome istraživanju ispitivana je antimikrobna aktivnost sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 prema čestim patogenim mikroorganizmima. Praćen je rast patogena u prisutnosti supernatanata ispitivanih sojeva uzgojenih u različitim uvjetima te je turbidimetrijskom metodom određena antimikrobna aktivnost. Rezultati su prikazani na slikama 1 i 2.



P-odabrani patogen; EM-vodeni ekstrakt maginje; S-fetalni goveđi serum

**Slika 1.** Antimikrobna aktivnost soja *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 prema odabranim patogenima izražena kao postotak inhibicije rasta ± SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$



P-odabrani patogen; EM-vodeni ekstrakt maginje; S-fetalni goveđi serum

**Slika 2.** Antimikrobna aktivnost soja *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 prema odabranim patogenima izražena kao postotak inhibicije rasta  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Bakterijski soj *Lpb. plantarum* DB1 pokazao je visoki stupanj inhibicije u svim ispitanim uvjetima rasta ( $>60\%$ ) prema svim patogenim mikroorganizmima. *Lpb. plantarum* DB2 iskazao je značajno nižu inhibiciju ispitanih patogena uz iznimku inhibicije *L. monocytogenes* koja je bila oko 75 % u standardnim uvjetima uzgoja (P + DB2), a uz dodatak seruma i ekstrakta maginje ostvarena je potpuna inhibicija navedenog patogena. Dobiveni rezultati ukazuju na značajnu razliku u sposobnosti inhibicije ispitivanih izolata te značajan utjecaj i povezanost uvjeta uzgoja i sposobnosti inhibicije izolata *Lpb. plantarum* DB2. Jedno od osnovnih funkcionalnih svojstava probiotika je njihova antimikrobna aktivnost prema patogenim mikroorganizmima koja se očituje kroz različite mehanizme djelovanja poput lučenja bakteriocina i drugih spojeva s antimikrobnim djelovanjem ili putem kompetencije za hranom; koja kao krajnji cilj ima zaštitu organizma od patogena (Behare i sur., 2021). Antimikrobnom djelovanju različitih sojeva *Lpb. plantarum* svjedoče rezultati istraživanja Jeong i sur. (2021) gdje su zabilježene razine inhibicije između 15 i 23 % prema patogenima *E. coli*, *L. monocytogenes* i *S. aureus*. Probiotička svojstva ovisna su isključivo o soju te mogu značajno varirati među bakterijama iste vrste (Campana i



sur., 2017), stoga razlike u inhibitornom djelovanju bakterija mliječne kiseline istog roda i vrste nisu neočekivane što su svojim istraživanjem pokazali i Hu i sur. (2019).

Rezistencija na antibiotike predstavlja zdravstveni problem za domaćina zbog mogućnosti njenog prijenosa na patogene bakterije, stoga je ispitivanje antibiotske rezistencije važan korak u procjeni sigurnosti potencijalnih probiotičkih bakterija. U ovome istraživanju ispitivana je osjetljivost sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 na odabrane antibiotike putem disk difuzijske metode, a lista odabranih antibiotika i dobiveni rezultati prikazani su u tablici 6. Sojevi su klasificirani na temelju promjera nastalih zona inhibicije na osjetljive, umjereno osjetljive ili rezistentne.

**Tablica 6.** Rezultati ispitivanja osjetljivosti sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 na odabrane antibiotike disk difuzijskom metodom

| Antibiotski<br>disk | Klasifikacija osjetljivosti |                           |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------|
|                     | <i>Lpb. plantarum</i> DB1   | <i>Lpb. plantarum</i> DB2 |
| Ampicilin           | S                           | S                         |
| Eritromicin         | S                           | S                         |
| Gentamicin          | R                           | R                         |
| Kanamicin           | R                           | R                         |
| Klindamicin         | S                           | S                         |
| Kloramfenikol       | S                           | S                         |
| Streptomicin        | R                           | R                         |
| Tetraciklin         | S                           | S                         |
| Vankomicin          | R                           | R                         |

S-osjetljiv; I-umjereno osjetljiv; R-rezistentan

Prema dobivenim rezultatima (tablica 6), oba ispitivana izolata pokazuju rezistenciju prema istim antibioticima: kanamicin, gentamicin i streptomicin koji spadaju u skupinu aminoglikozidnih antibiotika te vankomicin. Rezistentnost na vankomicin uobičajena je kod pojedinih sojeva bakterija roda *Lactobacillus*, što su svojim istraživanjem pokazali Zhou i sur. (2005) koji navode da je rezistencija na vankomicin intrinzično, kromosomski kodirano svojstvo te da nije prenosivo na druge bakterijske sojeve, stoga ne predstavlja potencijalni rizik. Autori istog istraživanja također su uočili rezistenciju sojeva *L. plantarum* na aminoglikozidne

antibiotike koja se isto tako smatra intrinzičnim svojstvom bakterija te ne predstavlja opasnost od prijenosa rezistencije na druge bakterije (Prete i sur., 2020). Prijenos rezistencije uglavnom je posredovan plazmidima koji nose gene za antibiotsku rezistenciju, dok intrinzično prisutna rezistencija ne predstavlja opasnost već može imati i koristi za domaćina (Zhou i sur., 2005).

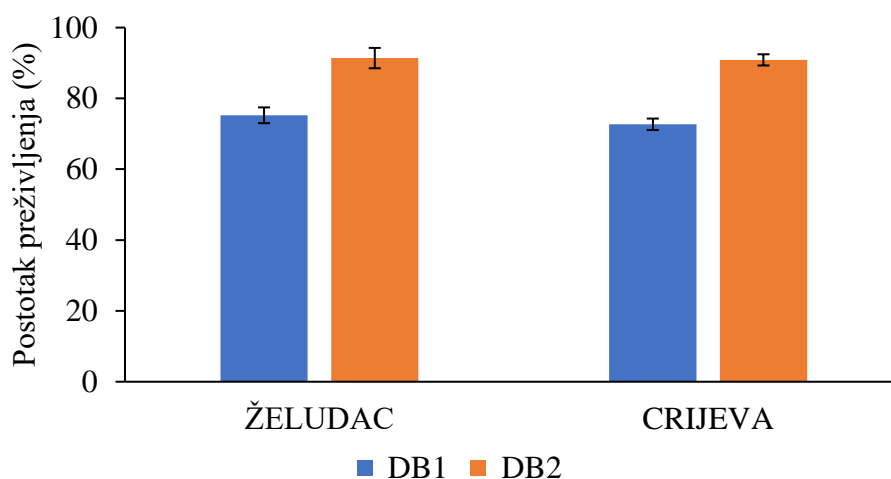
Jedan od osnovnih sigurnosnih kriterija za odabir probiotičkih bakterija je taj da ne posjeduju hemolitičku aktivnost, odnosno sposobnost liziranja crvenih krvnih stanica pri čemu dolazi do oslobađanja njihovog sadržaja u krvotok što može imati štetne posljedice na ljudsko zdravlje (Dutra i sur., 2014). Iz toga razloga u ovom istraživanju je ispitivana hemolitička aktivnost testiranih sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i DB2, a rezultati su prikazani u tablici 7.

**Tablica 7.** Rezultati određivanja hemolitičke aktivnosti sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2

| Ispitivani soj                           | Izgled nastale zone na krvnom agaru |
|--|-------------------------------------|
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DB1 | Nema zone                           |
| <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> DB2 | Nema zone                           |

Rezultati su pokazali kako nije došlo do nastanka vidljivih zona na krvnom agaru što se klasificira kao  $\gamma$ -hemoliza, odnosno znači da ispitivani sojevi nemaju hemolitičku aktivnost te su prema tome kriteriju sigurni za ljudsku upotrebu (tablica 7). Odsutnost hemolitičke aktivnosti u skladu je s drugim literaturnim izvorima koji pokazuju da sojevi *Lpb. plantarum* ne pokazuju hemolitičku aktivnost (Katiku i sur., 2022).

Ključan uvjet za ispoljavanje funkcionalnog djelovanja probiotika je njihova mogućnost preživljavanja u specifičnim uvjetima različitih dijelova gastrointestinalnog trakta kako bi dospjeli na ciljano mjesto u organizmu domaćina. Stoga je u ovome istraživanju ispitivana sposobnost preživljavanja izolata *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 u simuliranim uvjetima želuca i crijeva. Rezultati su prikazani na slici 3.



**Slika 3.** Preživljavanje sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 u simuliranim uvjetima želuca i crijeva izražena kao postotak preživljavanja  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Prema dobivenim rezultatima, oba soja su pokazala visoku sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima želuca i crijeva, koja je iznosila više od 70 % za soj *Lpb. plantarum* DB1 u oba slučaja te više od 90 % za soj *Lpb. plantarum* DB2 u oba slučaja (slika 3), što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja, poput Nath i sur. (2020) gdje je sposobnost preživljavanja ispitivanog soja *L. plantarum* bila iznad 90 %.

Na vijabilnost probiotika u uvjetima gastrointestinalnog sustava te njihovu dopremu na ciljano mjesto u organizmu moguće je utjecati primjenom inovativnih tehnoloških postupaka, kao što je liofilizacija. Stoga je u ovome istraživanju provedena liofilizacija ispitivanih sojeva *Lpb. plantarum* DB1 i *Lpb. plantarum* DB2 koja je izražena kao postotak preživljavanja bakterijskih stanica nakon provedenog procesa. Oba soja su uspješno liofilizirana s postotkom uspješnost od 92 % za soj *Lpb. plantarum* DB1 te 97 % za soj *Lpb. plantarum* DB2. Rezultati su u skladu s drugim literaturnim izvorima, poput Shekh i sur. (2020) koji su pokazali kako je za veći postotak preživljavanja potrebno dodatno prilagoditi uvjete liofilizacije, kao što su upotreba prebiotika i krioprotektanta.

Detaljna probiotička karakterizacija obuhvaća i ispitivanje sposobnosti formiranja biofilмова probiotičkih kandidata. U ovom istraživanju ispitivana je sposobnost sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 da stvaraju biofilmove te je ona klasificirana na slabu, umjerenu ili jaku. Rezultati formiranih biofilмова nakon 24 h i 48 h za ispitane izolate prikazani su u tablici 8.

**Tablica 8.** Sposobnost formiranja biofilmova bakterijskih sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 izražena kao srednja vrijednost OD pri 595 nm ± SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

|                               |                           | 24 h         |                 | 48 h         |                    |
|-------------------------------|---------------------------|--------------|-----------------|--------------|--------------------|
|                               |                           | OD           | Klasifikacija   | OD           | Klasifikacija      |
| <b>Referentne vrijednosti</b> | ODK                       | 0,127 ± 0,01 | /               | 0,073 ± 0,01 | /                  |
|                               | 2×ODK                     | 0,254 ± 0,01 |                 | 0,147 ± 0,01 |                    |
|                               | 4×ODK                     | 0,508 ± 0,01 |                 | 0,293 ± 0,01 |                    |
| <b>Ispitivani soj</b>         | <i>Lpb. plantarum</i> DB1 | 0,156 ± 0,04 | Slaba formacija | 0,243 ± 0,03 | Umjerena formacija |
|                               | <i>Lpb. plantarum</i> DB2 | 0,522 ± 0,17 | Jaka formacija  | 0,715 ± 0,11 | Jaka formacija     |

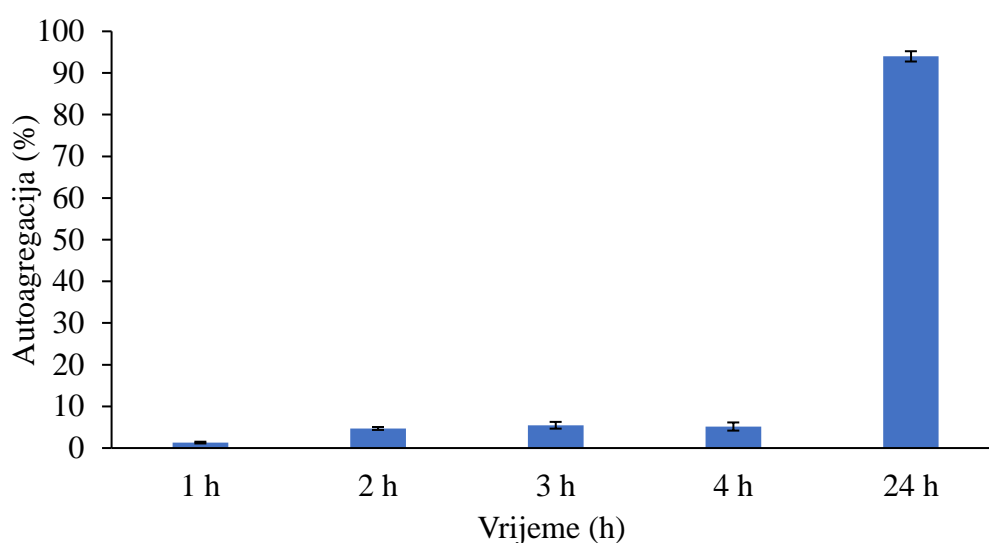
OD-optička gustoća; ODK-optička gustoća kontrole

Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 8 možemo uočiti da postoji razlika u sposobnosti formiranja biofilmova ispitivanih sojeva jer je bakterijski soj *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 klasificiran kao slabi producent biofilmova nakon 24 h inkubacije te kao umjereni producent biofilmova nakon 48 h inkubacije, dok je soj *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 klasificiran kao jaki producent biofilmova u oba slučaja (24 i 48 h). Na temelju promjene optičke gustoće između 24 i 48 sati vidimo kako vrijeme inkubacije ima značajan utjecaj na formiranje biofilmova te je kod oba ispitivana soja dobivena veća vrijednost nakon 48 sati.

Sposobnost formiranja biofilmova, kompleksnih zajednica bakterija povezanih izvanstaničnim matriksom kojeg same izlučuju, može značajno djelovati na funkcionalnost probiotičkih bakterija na način da povećava njihovu sposobnost preživljavanja u gastrointestinalnim uvjetima i sposobnost kolonizacije gastrointestinalnog trakta, pozitivno djeluje na kompetitivnost s patogenim vrstama, dok istovremeno može potaknuti stvaranje i izlučivanje novih te većih količina pojedinih aktivnih molekula značajnih za zdravlje domaćina, u odnosu na zasebne (planktonske) stanice (Gao i sur., 2022). Formacija biofilma direktno je povezana sa sposobnosti adhezije koja je ključna za kompetitivno isključivanje patogenih mikroorganizama (Knipe i sur., 2021). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s Iorizzo i sur. (2021) čije istraživanje je pokazalo kako svih 5 ispitivanih sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* posjeduju sposobnost stvaranja biofilmova koja značajno ovisi o ispitivanom soju, dok su Rezaei

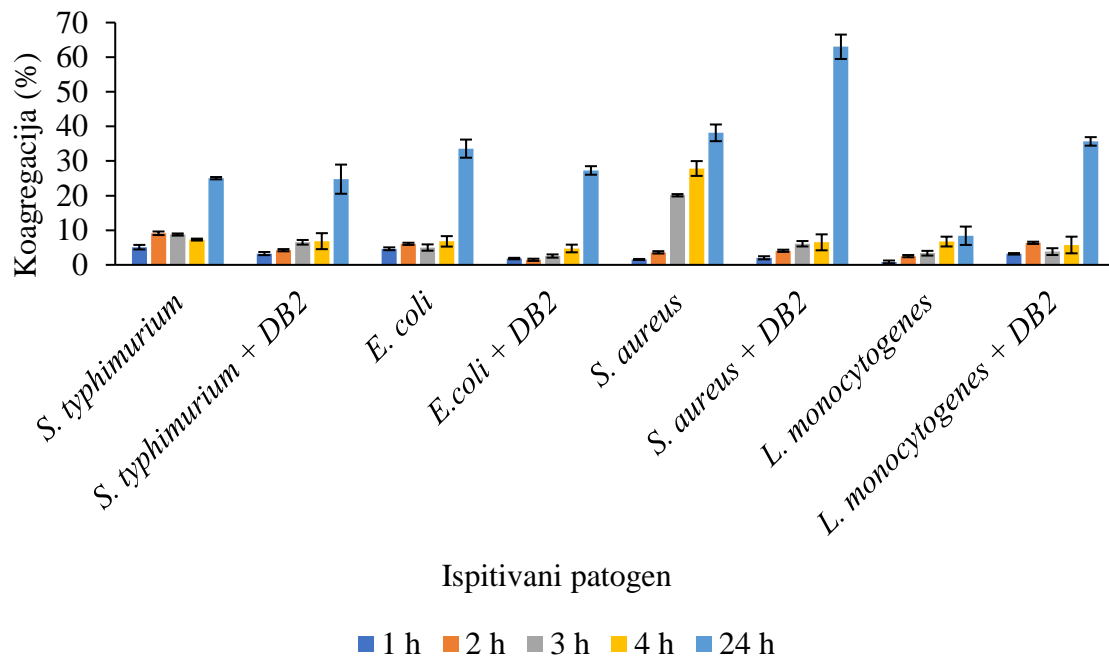
i sur. (2021) također pokazali utjecaj vremena inkubacije na jačinu formiranog biofilma. Na temelju rezultata ovog istraživanja i navedenih literaturnih saznanja, možemo uočiti da soj *Lpb. plantarum* DB2 ima bolju sposobnost formiranja biofilmova u odnosu na soj *Lpb. plantarum* DB1 te pokazuje potencijal za stvaranje biofilmova u gastrointestinalnom sustavu domaćina u svrhu primjene kao probiotik.

Osim sposobnosti formiranja biofilmova, dodatni probiotički kriteriji povezani sa sposobnošću kolonizacije gastrointestinalnog trakta su autoagregacija i koagregacija. Kako je soj *Lpb. plantarum* DB2 pokazao viši stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima GI trakta te bolju sposobnost formiranja biofilmova, određena mu je sposobnost autoagregacije te koagregacije s čestim patogenim mikroorganizmima (slike 4 i 5).



**Slika 4.** Sposobnost autoagregacije bakterijskog soja *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 u vremenskim intervalima kroz 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Iz rezultata prikazanih na slici 4 vidimo kako vrijednosti autoagregacije (prikazane kao postotak autoagregiranih stanica) soja *Lpb. plantarum* DB2 rastu s vremenom te nakon 24 sata inkubacije prelaze vrijednost od 90 %.

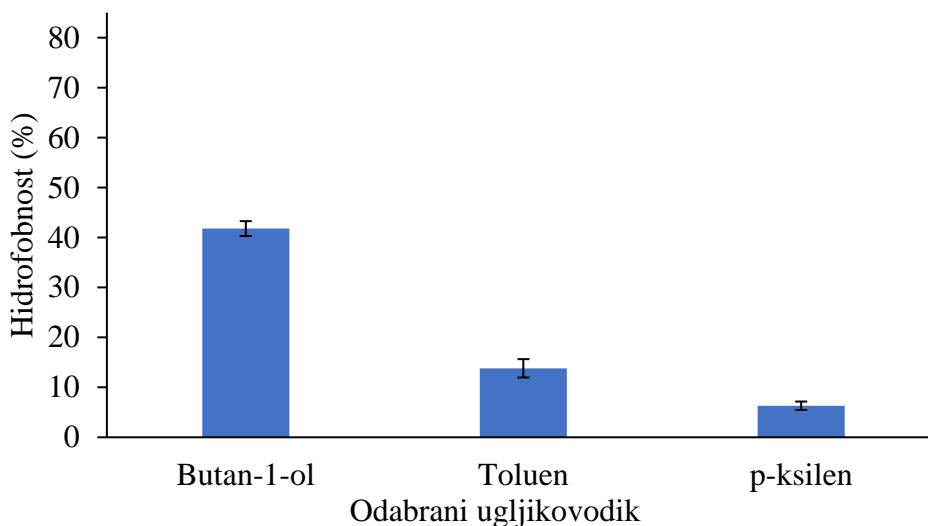


**Slika 5.** Sposobnost koagregacije bakterijskog soja *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 u vremenskim intervalima kroz 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD uz statistički značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Vrijednosti koagregacije soja *Lpb. plantarum* DB2 s ispitivanim patogenima, izražene kao postotak koagregiranih stanica u odnosu na početnu vrijednost, rasle su s vremenom te dostigle najviše vrijednosti nakon 24 h sata inkubacije i nalaze se u intervalu od 24,76 do 63,01 % pri čemu je najmanja koagregacija zabilježena sa *S. typhimurium*, a najveća sa *S. aureus* (slika 5).

Svojstvo autoagregacije (sposobnost bakterijskih stanica da se međusobno povezuju) omogućava bolju adheziju na gastrointestinalni sustav i pospješuje kolonizaciju dok svojstvo koagregacije probiotika sa stanicama patogena pridonosi antimikrobnom djelovanju probiotika na patogene te pozitivno djeluje na smanjenje kolonizacije gastrointestinalnog sustava patogenim mikroorganizmima (Ahmed i sur., 2021). Vrijednosti autoagregacije dobivene u ovom istraživanju znatno su više od vrijednosti dobivenih u Guan i sur. (2023) za ispitivani izolat *Lpb. plantarum* BXM2 (93,99 prema 55,41 %). Rezultati koagregacije u skladu su s drugim istraživanjima, poput Guan i sur. (2023) gdje su vrijednosti koagregacije ispitivanog izolata *Lpb. plantarum* BXM2 s patogenima *E. coli*, *S. aureus* i *S. typhimurium* bile u intervalu 34,05 – 58,34 %.

Na uspješnost adhezije na stanice epitela domaćina te posljedično uspješnost kolonizacije, utječe i hidrofobnost stanične površine bakterijskih stanica, pri čemu bakterije s većim stupnjem hidrofobnosti pokazuju bolju sposobnost adhezije na epitelne stanice (García-Cayuela i sur., 2014). U ovom istraživanju određena je hidrofobnost soja *Lactiplantibacillus* DB2 na temelju određivanja adhezije bakterijskih stanica na odabrane ugljikovodike (butan-1-ol, *p*-ksilen i toluen) (slika 6).



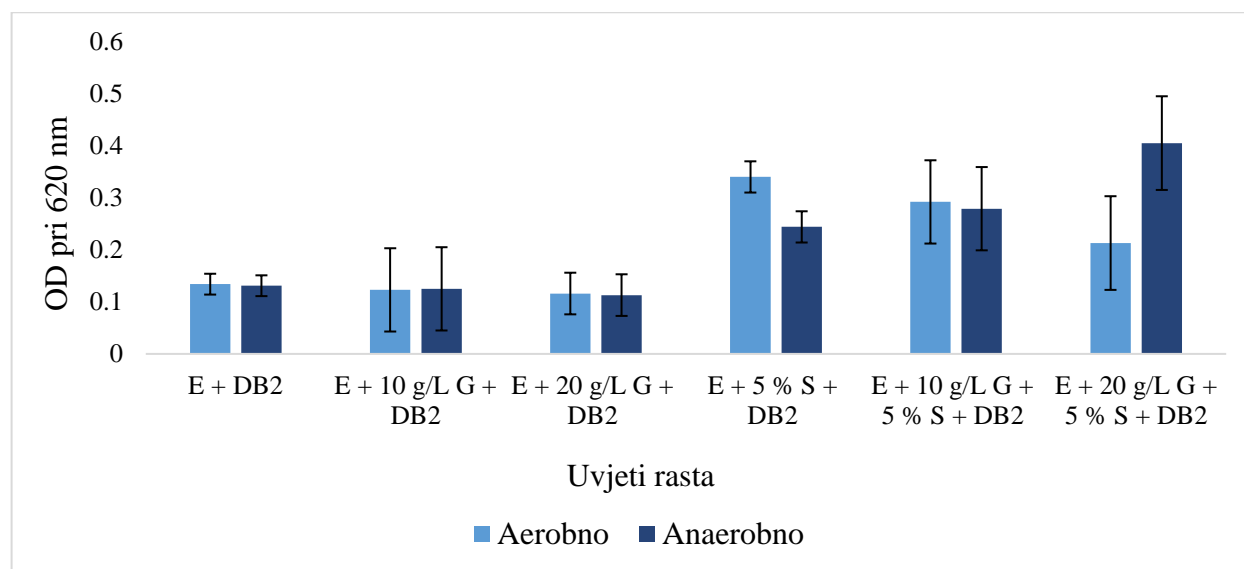
**Slika 6.** Hidrofobnost stanične površine soja *Lpb. plantarum* DB2 na odabrane ugljikovodike izražena kao postotak  $\pm$  SD, uz statističku značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Iz dobivenih rezultata (slika 6) vidimo kako soj *Lpb. plantarum* DB2 pokazuje najveću adheziju na butan-1-ol (oko 40 %), a najmanju na *p*-ksilen (oko 6 %). Usporedbom dobivenih rezultata s drugim istraživanjima u kojima je određivana hidrofobnost stanične površine različitih sojeva *L. plantarum*, može se uočiti kako je adhezija ispitivanog soja na toluen, u iznosu 13,80 %, manja u odnosu na 25,20 % kod Nath i sur. (2020), dok je adhezija na *p*-ksilen od 6,31 % znatno manja u odnosu na 51,83 – 79,13 % dobiveno u istraživanju Yadav i sur. (2016). Na temelju prikazanih rezultata možemo uočiti da je hidrofobnost stanične površine specifično svojstvo pojedinog soja bakterija mliječne kiseline.

Fermentacijom različitih prehrambenih namirnica moguće je dobiti širok spektar funkcionalnih proizvoda koji pokazuju značajne benefite za ljudsko zdravlje, poput smanjenja rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti i pojedinih vrsta raka, zaštite od razvoja infekcija, imunomodulatornog djelovanja i drugih. S time u vidu, u ovome istraživanju je ispitivan potencijal vodenog ekstrakta maginje fermentiranog pomoću bakterija mliječne kiseline u svrhu

razvoja novih funkcionalnih probiotičkih proizvoda. Na temelju dosadašnjih rezultata ovoga istraživanja, kao nositelj fermentacije odabrana je kultura *Lactiplantibacillus plantarum* DB2. S ciljem produljenja trajnosti i očuvanja probiotičkih svojstava dobivenog proizvoda, provedene su mikroinkapsulacija te liofilizacija nefermentiranog i fermentiranog vodenog ekstrakta maginje. Kao mjera uspješnosti provedenih procesa i zadržavanja probiotičkih svojstava određivana je antioksidacijska aktivnost dobivenih uzoraka.

Kako bi se proces fermentacije bio uspješan i rezultirao proizvodom željenih tehnoloških i funkcionalnih karakteristika, bitan preduvjet je da korišteni probiotički soj pokazuje sposobnost rasta i preživljavanja u odabranom fermentacijskom mediju. Stoga je u ovome istraživanju ispitivana sposobnost rasta soja *Lpb. plantarum* DB2 u vodenom ekstraktu maginje, bez i uz dodatak izvora hranjivih tvari (glukoza i fetalni goveđi serum) pri aerobnim i anaerobnim uvjetima tijekom inkubacije od 24 sata. Rezultati su prikazani na slici 7.



E-vodeni ekstrakt maginje; S-fetalni goveđi serum; G-glukoza

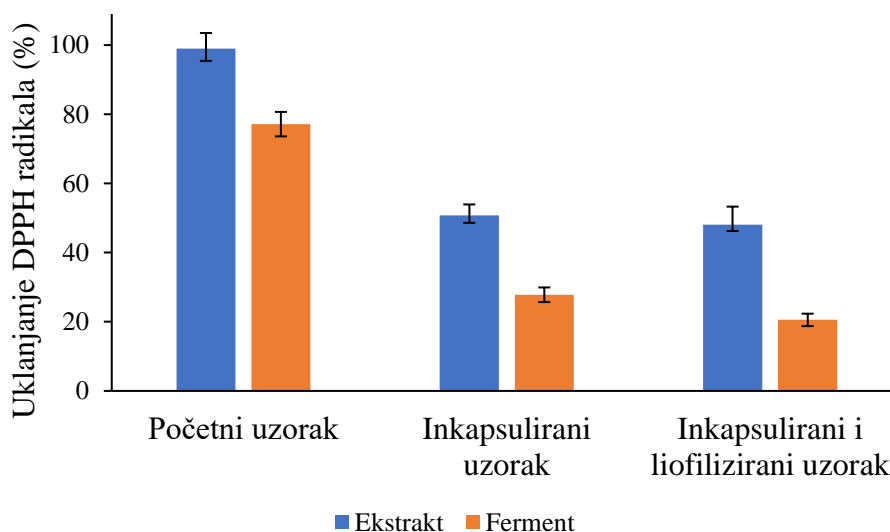
**Slika 7.** Sposobnost rasta soja *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 u vodenom ekstraktu maginje uz dodatak seruma i različitih koncentracije glukoze pri aerobnim i anaerobnim uvjetima prikazana kao optička gustoća pri 620 nm  $\pm$  SD, uz statističku značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Iz dobivenih rezultata je vidljivo kako je u čistom ekstraktu maginje inhibiran rast ispitivanog izolata zbog nedostatka hranjivih tvari (slika 7). Također vidimo kako nije zabilježena statistički značajna razlika između aerobnih i anaerobnih uvjeta u čistom ekstraktu. Dodatak same glukoze u koncentracijama od 10 i 20 g/L nije imao utjecaja na povećanje



sposobnosti rasta, dok je dodatkom seruma u koncentraciji od 5 % značajno povećana sposobnost rasta *Lpb. plantarum* DB2 u vodenom ekstraktu maginje. Najveći rast zabilježen je u anaerobnim uvjetima nakon dodatka 10 g/L glukoze i 5 % seruma. Iako ekstrakti voća predstavljaju veliki potencijal za razvoj probiotičkih proizvoda, u trenutku pisanja ovoga rada broj literaturnih izvora na ovu temu je malen. Istraživanje koje su proveli Mahmoudi i sur. (2021) pokazalo je da ispitivani soj *L. plantarum* postiže maksimalne vrijednosti rasta nakon 24 sata nakon čega prelazi u stacionarnu fazu te fazu odumiranja nakon 40 sati procesa fermentacije vodenog ekstrakta žižule (*Ziziphus jujube*). Zbog manjka literaturnih izvora potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdili optimalni uvjeti rasta probiotika u voćnim ekstraktima.

Antioksidacijska aktivnost spada među glavna i ponajviše istražena funkcionalna svojstva funkcionalne hrane, stoga je u ovom istraživanju ispitivana antioksidacijska aktivnost nefermentiranog vodenog ekstrakta maginje i vodenog ekstrakta maginje fermentiranog sojem *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 te njihovih mikroinkapsulata prije i nakon liofilizacije. Određena je ukupna antioksidacijska aktivnost kao sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala i prikazana kao postotak uklonjenih DPPH radikala (slika 8).



**Slika 8.** Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala nefermentiranog i fermentiranog vodenog ekstrakta maginje te njihovih mikroinkapsulata prije i nakon liofilizacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD, uz statističku značajnu razliku  $p \leq 0,05$

Iz rezultata prikazanih na slici 8 vidimo kako vodeni ekstrakt maginje posjeduje snažan antioksidacijski kapacitet koji se nakon fermentacije bakterijskom kulturom smanjio, odnosno sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala spustila se s početnih 98,98 % na 77,15 %.

Osim toga, vidljivo je kako je nakon procesa mikroinkapsulacije zadržana antioksidacijska aktivnost uzoraka, no slabijega intenziteta u odnosu na početne vrijednosti. Procesom liofilizacije očuvana je antioksidacijska aktivnost mikroinkapsuliranih uzoraka pri čemu je zabilježen slabi pad s početnih 50,72 % na 48,05 % kod nefermentiranog vodenog ekstrakta maginje te s 27,81 % na 20,54 % kod fermentiranog vodenog ekstrakta maginje. U sva tri slučaja nefermentirani vodeni ekstrakt maginje pokazao je bolju antioksidacijsku aktivnost u odnosu na fermentirani. Procesom liofilizacije moguće je značajno utjecati na produljenje trajnosti probiotičkih proizvoda te preživljavanje probiotičkih kultura uz istovremeno očuvanje njihovih funkcionalnih svojstava (Li i sur., 2019). U ovome istraživanju je, nakon provedenih procesa mikroinkapsulacije i liofilizacije, i dalje primijećena značajna antioksidacijska aktivnost ispitivanih uzoraka: oko 50 % za nefermentirani te iznad 20 % za fermentirani vodeni ekstrakt maginje; no potrebno je provesti daljnja istraživanja s ciljem optimizacije te smanjenja gubitka antioksidacijske aktivnosti tijekom ovih procesa.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Uspješno je provedena probiotička karakterizacija sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 i *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 izoliranih iz plodova jagode (*Fragaria ananassa* × Duch.) sorte 'Albion'. Oba soja zadovoljila su sigurnosne kriterije stoga se mogu smatrati sigurnima za upotrebu.
2. Antimikrobna aktivnost soja *Lactiplantibacillus plantarum* DB1 bila je u rasponu od 60 do 90 %, dok je soj *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 pokazao značajno niže vrijednosti, ali je prilikom dodatka ekstrakta maginje i 5 % fetalnog goveđeg seruma postignuta potpuna inhibicija *L. monocytogenes*.
3. Oba soja su pokazala visok stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava s određenim razlikama (>70 % DB1 i >90 % DB2), dok je soj *Lpb. plantarum* DB2 pokazao visok stupanj formacije biofilmova nakon 24 i 48 h, a soj *Lpb. plantarum* DB1 nizak (24 h), odnosno umjeren (48 h) stupanj.
4. Soj *Lpb. plantarum* DB2 pokazao je visoke vrijednosti autoagregacije (>90 % nakon 24 h) i koagregacije s patogenima (najviše u slučaju *S. aureus*: >60 % nakon 24 h) dok je prilikom ispitivanja hidrofobnosti stanične površine najveća vrijednost postignuta s butan-1-olom (40 %).
5. Vodeni ekstrakt maginje (*Arbutus unedo* L.) pokazuje vrlo visoku antioksidacijsku aktivnost, koja je uspješno očuvana nakon fermentacije u prisutnosti soja *Lactiplantibacillus plantarum* DB2 (>70 %).
6. Metodama mikroinkapsulacije i liofilizacije uspješno je očuvana antioksidacijska aktivnost fermentiranog (20 %) i nefermentiranog vodenog ekstrakta maginje (50 %).

## 6. LITERATURA

- Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, i sur. (2018) Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci Technol* **75**, 105–114. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.03.009>
- Ahmed ASI, El Moghazy GM, Elsayed TR, Goda HAL, Khalafalla GM (2021) Molecular identification and in vitro evaluation of probiotic functional properties of some Egyptian lactic acid bacteria and yeasts. *J Genet Eng Biotechnol* **19**, 1–16. <https://doi.org/10.1186/S43141-021-00212-4/TABLES/10>
- Alkhatib A, Tsang C, Tiss A, Bahorun T, Arefanian H, Barake R, i sur. (2017) Functional Foods and Lifestyle Approaches for Diabetes Prevention and Management. *Nutrients* **9**, 1310. <https://doi.org/10.3390/nu9121310>
- Altunkaya A, Hedegaard R V., Brimer L, Gökmen V, Skibsted LH (2013) Antioxidant capacity versus chemical safety of wheat bread enriched with pomegranate peel powder. *Food Funct* **4**, 722–727. <https://doi.org/10.1039/C3FO30296B>
- Ashaolu TJ (2020) Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. *Biomed Pharmacother* **130**, 110625. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110625>
- Axelsson L (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. U: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A (ured.) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3. izd., Marcel Dekker, New York/Basel, str. 1-66.
- Bebek Markovinović A, Brčić Karačonji I, Jurica K, Lasić D, Skendrović Babojelić M, Duralija B, i sur. (2022) Strawberry Tree Fruits and Leaves (*Arbutus unedo* L.) as Raw Material for Sustainable Functional Food Processing: A Review. *Hortic* **8**, 881. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE8100881>

- Bebek Markovinović A, Milošević S, Teslić N, Pavlić B, Putnik P, Brčić Karačonji I, i sur. (2023) Development of a Pressurized Green Liquid Extraction Procedure to Recover Antioxidant Bioactive Compounds from Strawberry Tree Fruit (*Arbutus unedo* L.). *Plants* **12**, 2006. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12102006>
- Behare P, Hussain SA, Naranjo DR, Sharma P, McAuliffe O (2021) Prebiotic and Probiotic. U: Pathania S, Tiwari BK (ured.) Food Formulations: Novel Ingredients and Processing Techniques, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, str. 237–263. <https://doi.org/10.1002/9781119614760.CH12>
- Bendaali Y, Vaquero C, González C, Morata A (2022) Contribution of Grape Juice to Develop New Isotonic Drinks With Antioxidant Capacity and Interesting Sensory Properties. *Front Nutr* **9**, 12. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.890640>
- Borges S, Silva J, Teixeira P (2012) Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **101**, 677–682. <https://doi.org/10.1007/S10482-011-9666-Y>
- Campana R, Van Hemert S, Baffone W (2017) Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog* **9**, 12. <https://doi.org/10.1186/S13099-017-0162-4>
- Choudhury N, Meghwal M, Das K (2021) Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Front* **2**, 426–442. <https://doi.org/10.1002/FFT2.94>
- Chen C, Cao Z, Li J, Tao C, Feng Y, Han Y (2020) A novel endophytic strain of *Lactobacillus plantarum* CM-3 with antagonistic activity against *Botrytis cinerea* on strawberry fruit. *Biol Control* **148**, 104306. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2020.104306>
- Dayib M, Larson J, Slavin J (2020) Dietary fibers reduce obesity-related disorders: mechanisms of action. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **23**, 445–450. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000696>

- De Albuquerque TMR, Garcia EF, De Oliveira Araújo A, Magnani M, Saarela M, De Souza EL (2018) In Vitro Characterization of Lactobacillus Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* **10**, 704–716. <https://doi.org/10.1007/S12602-017-9318-2>
- de Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant’Ana AS (2016) Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci Technol* **58**, 96–114. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2016.09.011>
- De Angelis M, Gobbetti M (2011) Lactic Acid Bacteria | Lactobacillus spp.: General Characteristics. U: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH (ured.) *Encyclopedia of Dairy Science*, 2. izd, Academic Press, Oxford, str. 78–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00259-4>
- de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol Adv* **36**, 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2018.09.003>
- Dey G (2018) Non-dairy Probiotic Foods: Innovations and Market Trends. U: Panda S, Shetty P (ured.) *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries, Food Microbiology and Food Safety*, Springer, Cham, str. 159–173. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-74820-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-74820-7_9)
- Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, De Oliveira RB, Golenbock DT, i sur. (2014) Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4110–E4118. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1405023111>
- Eurostat (2022) How much fruit and vegetables do you eat daily? - Products Eurostat News - Eurostat. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/ddn-20220104-1>. Pristupljeno 30. ožujka 2023
- Fevria R, Hartanto I (2019) Isolation and characterization of Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus sp*) from strawberry (*Fragaria vesca*). *J Phys Conf Ser* **1317**, 012086. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1317/1/012086>

- Fidelis M, De Moura C, Kabbas T, Pap N, Mattila P, Mäkinen S, i sur. (2019) Fruit Seeds as Sources of Bioactive Compounds: Sustainable Production of High Value-Added Ingredients from By-Products within Circular Economy. *Molecules* **24**, 3854. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24213854>
- Frece, J. (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
- Frece J, Markov K, Kovačević D (2010) Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *MESO Prvi Hrvat časopis o mesu* **12**, 92–99.
- Gandomi H, Abbaszadeh S, Misaghi A, Bokaie S, Noori N (2016) Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Sci Technol* **69**, 365–371. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.01.064>
- Gao J, Sadiq FA, Zheng Y, Zhao J, He G, Sang Y (2022) Biofilm-based delivery approaches and specific enrichment strategies of probiotics in the human gut. *Gut Microbes* **14**, 2126274. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2126274>
- Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE, da Costa WCA, Oliveira K de S, Franco OL, i sur. (2016) Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. *Front Microbiol* **7**, 1371. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01371>
- Garcia EF, de Oliveira Araújo A, Luciano WA, de Albuquerque TMR, de Oliveira Arcanjo NM, Madruga MS, i sur. (2018) The performance of five fruit-derived and freeze-dried potentially probiotic *Lactobacillus* strains in apple, orange, and grape juices. *J Sci Food Agric* **98**, 5000–5010. <https://doi.org/10.1002/JSFA.9034>

- García-Cayuela T, Korany AM, Bustos I, P. Gómez de Cadiñanos L, Requena T, Peláez C, i sur. (2014) Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res Int* **57**, 44–50. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.01.010>
- GVR (2022) Functional Foods Market Size, Share & Trends Analysis Report By Ingredient (Carotenoids, Prebiotics & Probiotics, Fatty Acids, Dietary Fibers), By Product, By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2022 - 2030. GVR – Grand View Research, <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/functional-food-market>. Pristupljeno 19. ožujka 2023.
- Granato D, Barba FJ, Bursać Kovačević D, Lorenzo JM, Cruz AG, Putnik P (2020) Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. *Annu Rev Food Sci Technol* **11**, 93–118. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-032519-051708>
- Guan X, Zhao D, Yang Y, Huang J, Lin B, Zheng Y, i sur. (2023) Characterization and in vitro assessment of probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* BXM2 from fermented honey passion fruit beverage. *Food Front.* (objavljeno online 29. travnja 2023.) <https://doi.org/10.1002/FFT2.240>
- Gul K, Singh AK, Jabeen R (2016) Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Crit Rev Food Sci Nutr* **56**, 2617–2627. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.903384>
- Halder D, Mandal M, Chatterjee SS, Pal NK, Mandal S (2017) Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines* **5**, 31. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES5020031>
- Hap S, Gutierrez NA (2012) Functional properties of some New Zealand fruit extracts towards selected probiotic and pathogenic bacteria. *Benef Microbes* **3**, 309–318. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0004>
- Hasler CM, Brown AC (2009) Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J Am Diet Assoc* **109**, 735–746. <https://doi.org/10.1016/J.JADA.2009.02.023>



- Hasler CM, Kundrat S, Wool D (2000) Functional foods and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* **2**, 467–475. <https://doi.org/10.1007/S11883-000-0045-9>
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, i sur. (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 506–514. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2014.66>
- Horáčková Š, Rokytová K, Bialasová K, Klojdová I, Sluková M (2018) Fruit Juices With Probiotics-New Type of Functional Foods. *Czech J Food Sci* **36**, 284–288. <https://doi.org/10.17221/39/2018-CJFS>
- Hu CH, Ren LQ, Zhou Y, Ye BC (2019) Characterization of antimicrobial activity of three *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese traditional dairy food. *Food Sci Nutr* **7**, 1997–2005. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1025>
- Iorizzo M, Testa B, Ganassi S, Lombardi SJ, Ianiro M, Letizia F, i sur. (2021) Probiotic properties and potentiality of *Lactiplantibacillus plantarum* strains for the biological control of chalkbrood disease. *J Fungi* **7**, 379. <https://doi.org/10.3390/JOF7050379>
- Ismail T, Akhtar S, Riaz M, Ismail A (2014) Effect of pomegranate peel supplementation on nutritional, organoleptic and stability properties of cookies. *Int J Food Sci Nutr* **65**, 661–666. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.908170>
- Jeong CH, Sohn H, Hwang H, Lee HJ, Kim TW, Kim DS, i sur. (2021) Comparison of the Probiotic Potential between *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Kimchi and Standard Probiotic Strains Isolated from Different Sources. *Foods* **10**, 2125. <https://doi.org/10.3390/FOODS10092125>
- Katiku MM, Matofari JW, Nduko JM (2022) Preliminary evaluation of probiotic properties and safety profile of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from spontaneously fermented milk, *Amabere amaruranu*. *Heliyon* **8**, e10342. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10342>

- Keşa AL, Pop CR, Mudura E, Salanţă LC, Pasqualone A, Dărab C, i sur. (2021) Strategies to Improve the Potential Functionality of Fruit-Based Fermented Beverages. *Plants* **10**, 2263. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10112263>
- Khezri S, Mahmoudi R, Dehghan P (2018) Fig juice Fortified with Inulin and *Lactobacillus delbrueckii*: A Promising Functional Food. *Appl Food Biotechnol* **5**, 97–106. <https://doi.org/10.22037/AFB.V5I2.19844>
- Knipe H, Temperton B, Lange A, Bass D, Tyler CR (2021) Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. *Rev Aquac* **13**, 324–352. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12477>
- Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**, 981–987. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2003.01915.X>
- Kostelac D (2022) Formulacija i razvoj višestruko mikroinkapsuliranog probiotika s ciljanim učincima na zdravlje (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
- Kostelac D, Gerić M, Gajski G, Frece J (2023) Probiotic bacteria isolated from fermented meat displays high antioxidant and anti-inflammatory potential. *Mutagenesis* **38**, 58–63. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEAC023>
- Leeuwendaal NK, Stanton C, O’toole PW, Beresford TP (2022) Fermented Foods, Health and the Gut Microbiome. *Nutrients* **14**, 1527. <https://doi.org/10.3390/NU14071527>
- Li K, Wang B, Wang W, Liu G, Ge W, Zhang M, i sur. (2019) Microencapsulation of *Lactobacillus casei* BNCC 134415 under lyophilization enhances cell viability during cold storage and pasteurization, and in simulated gastrointestinal fluids. *LWT* **116**, 108521. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108521>
- Li Z, Teng J, Lyu Y, Hu X, Zhao Y, Wang M (2019) Enhanced Antioxidant Activity for Apple Juice Fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. *Molecules* **24**, 51. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24010051>

- Liu RH (2004) Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr* **134**, 3479S-3485S. <https://doi.org/10.1093/JN/134.12.3479S>
- Mahmoudi B, Mousavi ZE, Khodaiyan F (2021) A Functional Non-Dairy Beverage Produced from Jujube Extract Using Probiotic Lactic Acid Bacteria. *J Agr Sci Tech* **23**, 813–824. <https://doi.org/10.1002/fsn3.963>
- Maisto M, Annunziata G, Schiano E, Piccolo V, Iannuzzo F, Santangelo R, i sur. (2021) Potential Functional Snacks: Date Fruit Bars Supplemented by Different Species of *Lactobacillus* spp. *Foods* **10**, 1760. <https://doi.org/10.3390/FOODS10081760>
- Mashitoa FM, Akinola SA, Manhevi VE, Garcia C, Remize F, Slabbert RM, i sur. (2021) Influence of Fermentation of Pasteurised Papaya Puree with Different Lactic Acid Bacterial Strains on Quality and Bioaccessibility of Phenolic Compounds during In Vitro Digestion. *Foods* **10**, 962. <https://doi.org/10.3390/foods10050962>
- Min M, Bunt CR, Mason SL, Hussain MA (2019) Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* **59**, 2626–2641. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1462760>
- Mishra V, Prasad DN (2005) Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol* **103**, 109–115. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.10.047>
- Misra S, Pandey P, Dalbhat CG, Mishra HN (2022) Emerging Technologies and Coating Materials for Improved Probiotication in Food Products: a Review. *Food Bioprocess Technol* **15**, 998–1039. <https://doi.org/10.1007/S11947-021-02753-5>
- Mokoena MP (2017) Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* **22**, 1255. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22081255>
- Morales D (2022) Use of Strawberry Tree (*Arbutus unedo*) as a Source of Functional Fractions with Biological Activities. *Foods* **11**, 3838. <https://doi.org/10.3390/FOODS11233838>

- Mozzi F (2016) Lactic Acid Bacteria. U: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F (ured.) Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, Oxford, str. 501–508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>
- Nath S, Sikidar J, Roy M, Deb B (2020) In vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. *Food Qual Saf* **4**, 213–223. <https://doi.org/10.1093/FQSAFE/FYAA026>
- Nowak D, Jakubczyk E (2020) The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods* **9**, 1488. <https://doi.org/10.3390/FOODS9101488>
- Ouwehand AC, Röytiö H (2015) Probiotic fermented foods and health promotion. U: Holzapfel W (ured.) Advances in Fermented Foods and Beverages. Woodhead Publishing, Cambridge/Waltham/Kidlington, str. 3–22.
- Perricone M, Bevilacqua A, Altieri C, Sinigaglia M, Corbo MR (2015) Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. *Beverages* **1**, 95–103. <https://doi.org/10.3390/BEVERAGES1020095>
- Prete R, Long SL, Joyce SA, Corsetti A (2020) Genotypic and phenotypic characterization of food-associated *Lactobacillus plantarum* isolates for potential probiotic activities. *FEMS Microbiol Lett* **367**, fnaa076. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNAA076>
- Ratsep M (2014) Effect of *Lactobacillus plantarum* Strains on Clinical Isolates of *Clostridium difficile* in vitro. *J Probiotics Heal* **02**, 1000119. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000119>
- Rezaei Z, Khanzadi S, Salari A (2021) Biofilm formation and antagonistic activity of *Lactocaseibacillus rhamnosus* (PTCC1712) and *Lactiplantibacillus plantarum* (PTCC1745). *AMB Express* **11**, 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13568-021-01320-7/FIGURES/5>
- Ritchie H, Spooner F, Roser M (2018) Causes of death – Our World in Data. <https://ourworldindata.org/causes-of-death#citation>. Pristupljeno 22. ožujka 2023.

- Rodrigues NPA, Garcia EF, de Souza EL (2021) Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. *Brazilian J Microbiol* **52**, 2257–2269. <https://doi.org/10.1007/S42770-021-00543-X/METRICS>
- Rodrigues S, Silva LCA, Mulet A, Cárcel JA, Fernandes FAN (2018) Development of dried probiotic apple cubes incorporated with *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *J Funct Foods* **41**, 48–54. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.12.042>
- Ruiz Rodríguez LG, Zamora Gasga VM, Pescuma M, Van Nieuwenhove C, Mozzi F, Sánchez Burgos JA (2021) Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. *Food Res Int* **140**, 109854. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109854>
- Salvetti E, Torriani S, Felis GE (2012) The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob Proteins* **4**, 217–226. <https://doi.org/10.1007/S12602-012-9117-8>
- Shibamoto T, Kanazawa K, Shahidi F, Ho CT (2008) Functional food and health: An overview. *ACS Symp Ser* **993**, 1–6. <https://doi.org/10.1021/BK-2008-0993.CH001>
- Sikorska H, Smoragiewicz W (2013) Role of probiotics in the prevention and treatment of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents* **42**, 475–481. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2013.08.003>
- Shekh SL, Boricha AA, Chavda JG, Vyas BRM (2020) Probiotic potential of lyophilized *Lactobacillus plantarum* GP. *Ann Microbiol* **70**, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13213-020-01556-X/TABLES/3>
- Stein AJ, Rodriguez-Cerezo E (2008) Functional Food in the European Union. JRC European Commission, Sevilja, str. 15. <https://doi.org/10.2791/21607>
- Surh YJ (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3**, 768–780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>

- Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, i sur. (2020) Fermented foods in a global age: East meets West. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **19**, 184–217. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12520>
- Tomašević I, Putnik P, Valjak F, Pavlič B, Šojić B, Bebek Markovinović A, i sur. (2021) 3D printing as novel tool for fruit-based functional food production. *Curr Opin Food Sci* **41**, 138–145. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.03.015>
- Tseng A, Zhao Y (2013) Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chem* **138**, 356–365. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.09.148>
- Veiga M, Costa EM, Silva S, Pintado M (2020) Impact of plant extracts upon human health: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **60**, 873–886. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1540969>
- Wan MLY, Co VA, El-Nezami H (2021) Dietary polyphenol impact on gut health and microbiota. *Crit Rev Food Sci Nutr* **61**, 690-711. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1744512>
- Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, i sur. (2021) Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 612285. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.612285>
- Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, i sur. (2017) Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients* **9**, 521. <https://doi.org/10.3390/NU9050521>
- White J, Hekmat S (2018) Development of Probiotic Fruit Juices Using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short Chain and Long Chain Inulin Fiber. *Ferment* **4**, 27. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION4020027>
- Yadav R, Puniya AK, Shukla P (2016) Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an indigenous fermented beverage Raabadi. *Front Microbiol* **7**, 227903. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01683/BIBTEX>

Yoha KS, Anukiruthika T, Anila W, Moses JA, Anandharamakrishnan C (2021) 3D printing of encapsulated probiotics: Effect of different post-processing methods on the stability of *Lactiplantibacillus plantarum* (NCIM 2083) under static in vitro digestion conditions and during storage. *LWT* **146**, 111461. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111461>

Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS (2005) Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int J Food Microbiol* **98**, 211–217. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.05.011>

Zhu Z, Gavahian M, Barba FJ, Roselló-Soto E, Bursać Kovačević D, Putnik P, Denoy GI (2020) Valorization of waste and by-products from the food industry through the use of innovative technologies. U: Barba, F.J., Putnik, P., Bursać Kovačević, D. (ured.) *Agri-Food Industry Strategies for Healthy Diets and Sustainability*, Academic Press, Cambridge, str. 247-267. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-02185-4>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Filip Dolenc izjavlujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Filip Dolenc

Vlastoručni potpis