

# Primjena različitih nosača za mikroinkapsulaciju bakterijskih sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10

---

Nušinović, Emina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:896563>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2018.

Emina Nušinović

859/BPI

**PRIMJENA RAZLIČITIH NOSAČA  
ZA MIKROINKAPSULACIJU  
BAKTERIJSKIH SOJEVA  
*Lactobacillus plantarum* D13 I  
*Lactococcus lactis* ZG7-10**

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Blaženki Kos na stručnom vodstvu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc, te asistenticama Katarini Zorić, mag. ing. biotechn. i Martini Banić, mag. ing. biotechn. na savjetima i pomoći tijekom izvođenja i pisanja ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji na strpljenju i podršci koju su mi pružali tijekom studiranja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

## PRIMJENA RAZLIČITIH NOSAČA ZA MIKROINKAPSULACIJU BAKTERIJSKIH SOJEVA *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10

*Emina Nušinović, 859/BPI*

**Sažetak:** Da bi probiotički pripravci pokazali pozitivne učinke na zdravlje potrošača, moraju sadržavati visoku koncentraciju živih stanica. Zbog toga se istražuju različiti matriksi i metode kako bi se povećalo njihovo preživljavanje tijekom proizvodnje, čuvanja i primjene u različitim prehrambenim proizvodima te nakon oralne primjene u gastrointestinalnom traktu domaćina. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj mikroinkapsulacije na preživljavanje bakterija *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10. Stoga je provedena mikroinkapsulacija primjenom tri nosača, alginata,  $\kappa$ -karagenana i kazeina uz djelovanje transglutaminaze, a zatim i liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica uz upotrebu različitih lioprotektora. Mikroinkapsulacija u alginatu i dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora, pokazali su se najučinkovitiji za oba soja. Prolaskom mikroinkapsuliranih liofiliziranih stanica kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta, visok postotak preživjelih stanica ukazuje na zaštitni učinak mikroinkapsulacije za probiotičke sojeve, pri čemu je broj živih stanica bio veći od  $10^8$  CFU/g, što je u skladu sa zahtjevima koje moraju ispunjavati probiotički proizvodi.

**Ključne riječi:** probiotici, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, mikroinkapsulacija, liofilizacija, DGGE

**Rad sadrži:** 45 stranica, 8 slika, 6 tablica, 93 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *prof. dr. sc. Blaženka Kos*

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 06. travnja 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic And Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

### APPLICATION OF DIFFERENT CARRIERS FOR MICROENCAPSULATION OF BACTERIAL STRAINS *Lactobacillus plantarum* D13 AND *Lactococcus lactis* ZG7-10

*Emina Nušinović, 859/BPI*

**Abstract:** In order to express their benefits on human health, the probiotic preparations need to contain high concentration of viable cells. Therefore, different matrices and methods have been investigated to improve their survival during production, storage or application in different food products, and after an oral application in the host gastrointestinal conditions. The aim of this thesis was to investigate influence of microencapsulation on the survival of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* D13 and *Lactococcus lactis* ZG7-10. Therefore, the microencapsulation was performed with application of three different carriers, alginate,  $\kappa$ -carrageenan and transglutaminase-induced casein, and then lyophilization of microencapsulated cells with the addition of various lyoprotectors. Microencapsulation in alginate, and addition of skim milk as lyoprotector, proved to be most effective for both bacterial strains. After transit through simulated gastrointestinal tract conditions, high percentage of viable cells indicates the protective effect of the microencapsulation on the probiotic strains, wherein the number of viable cells was above  $10^8$  CFU/g, what is in accordance with the claims set up for probiotic products.

**Keywords:** probiotics, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, microencapsulation, lyophilization, DGGE

**Thesis contains:** 45 pages, 8 figures, 6 tables, 93 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Blaženka Kos, Full professor*

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

#### Reviewers:

1. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant Professor
2. PhD. *Blaženka Kos*, Full Professor
3. PhD. *Ksenija Markov*, Full Professor
4. PhD. *Jasna Mrvčić*, Associate Professor

**Thesis defended:** 06 April 2018

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Bakterije mliječne kiseline.....	3
2.2. Definicija probiotika i karakteristike probiotičkih sojeva .....	4
2.2.1. Uloga probiotika u funkcionalnoj hrani .....	7
2.2.2. Seleksijski kriteriji za probiotičke sojeve .....	7
2.2.3. Funkcionalna svojstva probiotičkih bakterija .....	10
2.3. Mikroinkapsulacija probiotičkih bakterija.....	11
2.3.1. Metode mikroinkapsulacije stanica probiotika.....	14
2.3.2. Nosači koji se primjenjuju za mikroinkapsulaciju probiotičkih stanica .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
3.1. Materijali .....	16
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	16
3.1.2. Hranjive podloge.....	16
3.1.3. Kemikalije .....	17
3.1.4. Aparatura i pribor .....	19
3.2. Metode rada .....	20
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama .....	20
3.2.2. Izolacija kromosomske DNA .....	20
3.2.3. RAPD-PCR (engl. Random Amplified Polymorphic DNA – Polymerase chain raction) .....	21
3.2.4. Elektroforeza u denaturirajućem gradijentu DGGE (engl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.....	22
3.2.5. Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u alginatu .....	24
3.2.6. Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u $\kappa$ -karagenanu .....	25
3.2.7. Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u kazeinu djelovanjem transglutaminaze.....	26



3.2.8.	Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica uz dodatak različitih lioprotektora.....	26
3.2.9.	Preživljavanje mikroinkapsuliranih i liofiliziranih sojeva bakterija mliječne kiseline tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta.....	27
3.2.9.1.	Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva.....	27
3.2.9.2.	Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje.....	27
<b>4.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>28</b>
4.1.	Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u različitim nosačima .....	28
4.2.	Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica uz dodatak različitih lioprotektora.....	32
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČCI .....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>37</b>

# 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline su gram – pozitivne, nesporogene bakterije koje obuhvaćaju više bakterijskih rodova, od kojih su za prehrambenu industriju najznačajniji: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Lactobacillus*. Prirodno su prisutne na susprtatima bogatim hranjivim tvarima, kao što su meso, mlijeko i povrće, te u humanom gastrointestinalnom sustavu. Predstavnici roda *Lactobacillus*, koji su prisutni u humanom gastrointestinalnom i urinarnom traktu kao sastavni dio mikrobiote, definirani su kao probiotički sojevi (Kaur Sarao i Arora, 2017; Slover i Danziger, 2008). Među laktobacilima najraznovrsniji je *Lactobacillus plantarum*, uključujući sojeve sa vrijednim tehnološkim mogućnostima i značajkama probiotika (da Silva Sabo i sur., 2014; Guidone i sur., 2014), te se koristi kao funkcionalna starter kultura u fermentaciji različitih namirnica. *Lactococcus lactis*, koja je fakultativno anaerobna, nepatogena bakterija te ima GRAS status, ima značajnu primjenu u prehrambenoj industriji. Često je prisutna na životinjama i površini biljaka, te se najčešće izolira iz mliječnog okoliša ili biljnog materijala. *L. lactis* jedna je od najbolje okarakteriziranih gram – pozitivnih bakterija. Osim što doprinosi okusu namirnica, kao BMK proizvodi kiselinu koja konzervira hranu.

Humani gastrointestinalni sustav je specifičan ekosustav koji sadrži veliki broj različitih bakterijskih vrsta. Mikroorganizmi intestinalne mikroflore mogu imati pozitivne, ali i negativne učinke (poremećaj ravnoteže gastrointestinalnog sustava) na ljudsko zdravlje. Probiotici koji se primjenjuju u prehrani, definiraju se kao „živi mikrobnii dodaci prehrani ili komponente bakterija koje iskazuju povoljne učinke na zdravlje ljudi“ (Kaur Sarao i Arora, 2017; Salminen i sur., 2008).

Mikroinkapsulacija probiotičkih stanica uglavnom se koristi za zaštitu živih stanica probiotika od nepoželjnih uvjeta okoline (Leboš Pavunc i sur., 2011; Champagne i Kailasapathy, 2008), omogućava stabilizaciju bakterijskih stanica tj. poboljšava njihovu aktivnost i stabilnost tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja. Svrha mikroinkapsulacije živih stanica probiotika je smanjiti pad broja živih stanica dodatkom probiotika u hranu, dok ne dosegnu ciljno mjesto djelovanja, odnosno dok ne dođu do crijeva.

Glavni cilj mikroinkapsulacije stanica probiotika, osim zaštite stanica od nepovoljnih uvjeta specifičnog mikrookoliša, je omogućiti njihovo otpuštanje u crijevima u visokom broju preživjelih mikrobnih stanica uz očuvanje metaboličke aktivnosti.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj mikroinkapsulacije na preživljavanje probiotičkih bakterija *Lactobacillus plantarum* i *Lactococcus lactis* u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta pri čemu je provedena mikroinkapsulacija u alginatu, κ-karagenanu i kazeinu djelovanjem enzima transglutaminaze. Osim toga ispitan je utjecaj liofilizacije mikroinkapsuliranih bakterijskih stanica u alginatu primjenom različitih lioprotektora. Tako pripremljene stanice podvrgnute su simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta te je praćeno njihovo preživljavanje.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Naziv bakterije mliječne kiseline (BMK) obuhvaća bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu iz laktoze, a provode fermentaciju i koagulaciju mlijeka. To je skupina gram – pozitivnih, nesporogenih bakterija. Ove bakterije su acidotolerantne i katalaza negativne. Obuhvaćaju više bakterijskih rodova, a neki od najznačajnijih rodova u prehrambenoj industriji su: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Lactobacillus*. Rodovi BMK se međusobno razlikuju na temelju morfoloških karakteristika, metaboličkom putu fermentacije glukoze, sposobnosti rasta pri visokim koncentracijama soli i različitim temperaturama, te toleranciji na različite pH vrijednosti (Šušković i sur., 2010). BMK imaju važnu ulogu u konzerviranju hrane. U razvijenom svijetu, BMK se učestalo konzumiraju u mliječnim proizvodima kao što su sir i jogurt (Desai, 2008). Upotreba mliječnih starter kultura postala je važan aspekt prehrambene industrije tijekom 21. stoljeća. U današnje vrijeme broj komercijalnih namirnica koje se deklariraju kao funkcionalna hrana je u porastu, te je na tržištu dostupan i sve veći broj farmaceutskih pripravaka koji promoviraju zdravstvene tvrdnje na temelju karakteristika određenih sojeva BMK. Većina tih sojeva nije u potpunosti znanstveno istraženo i stoga deklarirane tvrdnje nisu precizne. Općenito, sojevi iz rodova BMK su prisutni u staništima bogatim hranjivim tvarima, kao što su različiti prehrambeni proizvodi (mlijeko, meso, povrće), a neke su dio mikrobiote usne šupljine, crijeva i rodnice sisavaca. Učestalo su prestavnici roda *Lactobacillus*, koji su prisutni u gastrointestinalnom i urinarnom traktu ljudi kao sastavni dio mikrobiote, definirani kao probiotički sojevi (Kaur Sarao i Arora, 2017; Slover i Danziger, 2008). Tako se primjerice *Lactobacillus plantarum* koristi kao funkcionalna starter kultura u fermentaciji različitih namirnica. Ovaj soj je heterofermentativan, fakultativno anaeroban mikroorganizam koji može rasti u rasponu temperatura od 15°C do 45°C. Uspješno se može izolirati iz različitih ekoloških niša kao što su biljni materijali, mlijeko, mesni proizvodi, riba, otpadne vode te želudac i intestinalni trakt ljudi i životinja. Među laktobacilima je najraznovrsniji, uključujući sojeve s vrijednim tehnološkim mogućnostima i značajkama probiotika (da Silva Sabo i sur., 2014; Guidone i sur., 2014). Osim toga, probiotički sojevi *L. plantarum* imaju različite primjene s obzirom da mogu provoditi fermentativne i metaboličke procese, kao što su povećanje količine specifičnih korisnih sastojaka (vitamini u fermentiranim prehrambenim proizvodima),

održavanje zdravlja korisnika, s obzirom na njihovo imunomodulacijsko djelovanje i *de novo* sintezu vitamina u želucu čovjeka (Arena i sur., 2014, 2015). Značajna BMK u prehrambenoj industriji je *Lactococcus lactis* koja je fakultativno anaerobna bakterija. Pripada skupini nepatogenih, mezofilnih, homofermentativnih, gram - pozitivnih bakterija te ima GRAS status. Često je prisutna na životinjama i površini biljaka, te se najčešće izolira iz mliječnog okoliša ili biljnog materijala. Prilikom inokulacije u mlijeko koristi enzime za proizvodnju ATP-a iz laktoze, a kao nusproizvod nastaje mliječna kiselina. Koristi se u industrijskoj proizvodnji mliječnih proizvoda kao što su mlijeko, jogurt, sir, sojino mlijeko, maslac, te u proizvodnji ukiseljenog povrća, piva, vina, nekih vrsta kruha te ostalih fermentiranih namirnica. *L. lactis* za rast koristi glukozu, arginin, metionin, glutamat i valin. Kao izvore ugljika koristi glukozu, laktozu, maltozu, saharozu, manitol, galaktozu, fruktozu, glukozamin i trehalozu. *L. lactis* jedna je od najbolje okarakteriziranih gram – pozitivnih bakterija. Osim što doprinosi okusu namirnica, kao BMK proizvodi kiselinu koja konzervira hranu. Neki sojevi se mogu primjeniti kao biokonzervansi kao rezultat proizvodnje bakteriocina, primjerice soj *L. lactis* koji sintetizira nisin. Tijekom posljednja dva desetljeća značajno se povećala primjena ove bakterije u prehrambenoj industriji, a u znanstvenim istraživanjima se primjenjuje kao modelni mikroorganizam gram – pozitivnih bakterija umjesto *B. subtilis* i *L. plantarum* ili Gram – negativne *E. coli* (Song i sur., 2017; Garcia - Fruitos, 2012). Većina probiotičkih bakterija upravo je okarakterizirana iz rodova BMK.

## **2.2. DEFINICIJA PROBIOTIKA I KARAKTERISTIKE PROBIOTIČKIH SOJEVA**

Riječ probiotik je izvedenica grčkih riječi „pro“ i „bios“ što znači „za život“. Izraz probiotik su 1965. godine koristili Lilly i Stillwell za produkte koje izlučuje jedan organizam kako bi se potaknuo rast drugog organizma (Gupta i Garg, 2009). Zatim je Parker 1974. godine definirao probiotike kao „organizme i tvari koje pridonose mikrobnj intestinalnoj ravnoteži“, a Fuller je 1989. godine proširio definiciju kao „živi mikrobnj dodatak prehrani koji djeluje korisno na zdravlje domaćina poboljšavajući mu intestinalnu mikrobnj ravnotežu“. Suvremene definicije probiotika odnose se na živi mikrobnj dodatak prehrani koji blagotvorno djeluje na domaćina iskazivanjem funkcionalnih učinaka u gastrointestinalnom traktu (Kaur Sarao i Arora, 2017; Salminen i sur., 2001; Mc Farland 2000). Stoga se probiotički sojevi kontinuirano

primjenjuju za modulaciju sastava narušene ravnoteže crijevne mikrobiote domaćina. Probiotici koji se primjenjuju u prehrani, definiraju se kao „živi mikrobni dodaci prehrani ili komponente bakterija koje iskazuju povoljne učinke na zdravlje ljudi“ (Kaur Sarao i Arora, 2017; Salminen i sur., 2008). Važno funkcionalno svojstvo ovih bakterija je i sposobnost inhibicije rasta nepoželjnih mikroorganizama odnosno mogućnost antimikrobnog djelovanja. Probiotički sojevi BMK iskazuju poželjne učinke na zdravlje domaćina, što je ustanovljeno znanstvenim istraživanjima i potvrđeno kliničkim studijama. Rodovi bakterija mliječne kiseline (BMK) *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* najčešće se primjenjuju kao probiotici (Šušković i sur., 2010; Holzapfel i sur., 2001). No pojedini bakterijski sojevi iz rodova bakterija *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, ali i kvasac *Saccharomyces*, su također okarakterizirani kao probiotici.

Prema znanstvenim studijama dokazan je učinak probiotičkih sojeva na prevenciju i smanjenje učestalosti dijareje, zatim uspostavljanje narušene ravnoteže crijevne mikrobiote kao rezultat antimikrobne aktivnosti probiotičkih sojeva, olakšavanje simptoma intolerancije na laktozu, sprječavanje alergijskih reakcija na pojedine sastojke hrane, imunomodulacijsko djelovanje i antitumorske aktivnosti (Kaur Sarao i Arora, 2017; Anderson i sur., 2001). Probiotičke bakterije doprinose zdravlju ljudi poboljšavajući ravnotežu crijevne mikrobiote u prvom redu kompetitivnom ekskluzijom patogena. Pojedine probiotičke bakterije iskazuju imunomodulacijske učinke, utječu na smanjenje koncentracije kolesterola u krvi, te sudjeluju u sintezi vitamina. Važan kriterij prilikom primjene probiotičkog pripravaka je preživljavanje prisutnog probiotičkog soja tijekom samog procesa biotehnološke proizvodnje, a u konačnici prepoznatljivost samog proizvoda od strane potrošača - domaćina (Kaur Sarao i Arora, 2017; Heenan i sur., 2004). Općenito preporučena dnevna doza iznosi  $10^6$  CFU/g za sojeve *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* bakterije, ali i za druge probiotičke sojeve (Boylston i sur., 2004).

Većina probiotičkih bakterija upravo su predstavnici sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Guarner i sur., 2005; Sanders, 2003; Salminen i von Wright, 1998). Da bi se pojedini soj u konačnici mogao primjeniti kao probiotik potrebno je ispuniti stroge izborne kriterije, uključujući otpornost na nepoželjne uvjete gastrointestinalnog trakta (otpornost na želučanu kiselinu i žučne soli), da nisu toksični i bez prenosivih gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju tj. da su sigurni za humanu upotrebu, te funkcionalne izborne kriterije poput sinteze antimikrobnih komponenti, primjerice bakteriocina. Odabrani sojevi

pokazuju i sposobnost adhezije i kolonizacije u GIT (Kaur Sarao i Arora, 2017; Guarner i sur., 2005; Morelli, 2000).

Prilikom odabira pojedinog mikrobnog soja kao probiotika potrebno je ispuniti slijedeće zahtjeve (Kaur Sarao i Arora, 2017, Harish and Varghese, 2006):

- izolacija iz bakterijskih vrsta autohtonih domaćinu
- netoksičnost i nepatogenost
- sposobnost preživljavanja tijekom prolaska kroz GIT
- dokazan poželjan učinak na zdravlje domaćina-funkcionalni kriteriji
- sposobnost preživljavanja u visokom broju živih mikrobnih stanica (CFU/ml; CFU/g) tijekom proizvodnje, skladištenja i primjene.

Probiotički sojevi prema definiciji su živi mikroorganizmi koji primjenjeni u dovoljno visokoj koncentraciji mikrobnih stanica doprinose zdravlju domaćina (Kaur Sarao i Arora, 2017, FAO/WHO, 2002). Na tržištu je prisutan veliki broj komercijalnih probiotičkih pripravaka, koji sadrže jedan ili više mikrobnih sojeva, a koji su namjenjeni za raznovrsne zdravstvene učinke. U Tablici 1. su navedeni bakterijski sojevi iz četiri roda BMK koje se najčešće primjenjuju kao probiotici (Minocha, 2009, Marco i sur., 2006), ali probiotički pripravci prisutni na tržištu sadrže sojeve i iz drugih rodova, kao što su *Propionibacterium*, *Escherichia* i *Enterococcus* (Ouwehand i sur., 2002).

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremosis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii ssp. (bulgaricus)</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

**Tablica 1.** Sojevi bakterija mliječne kiseline koji su najčešće zastupljeni u probiotičkim pripravcima (Kaur Sarao i Arora, 2017; Parvez i sur., 2006).

### 2.2.1. Uloga probiotika u funkcionalnoj hrani

S porastom razumijevanja suvremenog potrošača o povezanosti uloge prehrane na zdravlje čovjeka, povećan je interes za hranom koja može doprinjeti očuvanju zdravlja, tkz. funkcionalom hranom. Funkcionalna hrana definirana je kao hrana koja omogućuje specifičan zdravstveni učinak preko i iznad njenog prirodnog nutritivnog statusa (Kaur Sarao i Arora, 2017; Gibson and Rastall, 2004). Funkcionalna hrana je isključivo prehrambena namirnica i ne može se primjeniti u bilo kojem drugom obliku primjerice kao kapsula, a neophodno je da iskazuje specifičan zdravstveni učinak upravo u količini koja se uobičajeno konzumira prehranom. Hrana se smatra funkcionalnom kada njena primjena uzrokuje poželjne zdravstvene učinke na jedan ili više ciljanih mjesta u tijelu (Isolauri i sur., 2002). U suvremenom konceptu funkcionalne hrane istaknut je interes za gastrointestinalnim interakcijama mikrobiote i domaćina (Salminen i sur., 1998), što je usmjerilo znanstvenu zajednicu prema istraživanjima dominantnih vrsta mikroorganizama u intestinalnom traktu, prisutnoj autohtonoj mikrobioti, koje imaju važnu ulogu u očuvanju zdravlja domaćina, odnosno osobit je interes prema odabiru potencijalnih kandidata za probiotičke bakterije. Primjena probiotičkih sojeva je jedno od obećavajućih područja za razvoj funkcionalne hrane (Kaur Sarao i Arora, 2017)

Bakterije iz roda *Bifidobacterium* su značajan udio mikrobiote gastrointestinalnog trakta jer metabolička aktivnost bakterija ove vrste doprinosi održavanju ravnoteže mikrobiote gastrointestinalnog trakta (Kaur Sarao i Arora, 2017; Gibson and Roberfroid, 1995). Dokazani poželjni učinci ovih bakterija proizlaze iz interakcija prisutnih u mikrookolišu GIT - a i dostupnih hranjivih tvari koje selektivno potiču rast odnosno koje omogućavaju preživljavanje i aktivnost bifidobakterija (engl. bifidogenic factors), te njihovu ulogu kao izvora ugljika i energije u crijevima.

### 2.2.2. Seleksijski kriteriji za probiotičke sojeve

Primjena probiotičkih sojeva s ciljem poboljšanja nutritivnog statusa i/ili zdravlja domaćina može biti egzogena i endogena. Pri egzogenoj primjeni, probiotički sojevi se koriste za fermentaciju različitih namirnica, što omogućuje konzerviranje nutrijenata i u njihovu dostupnost (Kaur Sarao i Arora, 2017; Desai, 2008). Osim toga, probiotički mikroorganizmi metaboliziraju šećer laktozu u jogurtu, čineći hranu prihvatljivom za potrošače koji su



netolerantni na laktozu. Osobito značajna karakteristika probiotika koji djeluju egzogeno je sinteza tvari koje imaju antimikrobni ili antikancerogeni učinak ili iskazuju svojstva farmaceutika. Odabir mikrobnih sojeva, s ciljem njihove terapijske primjene ili primjene u prehrambene svrhe, utemeljen je na specifičnim zahtjevima (Kaur Sarao i Arora, 2017; Desai, 2008). Probiotici koje domaćin unosi u organizam moraju ispunjavati selektivne kriterije.

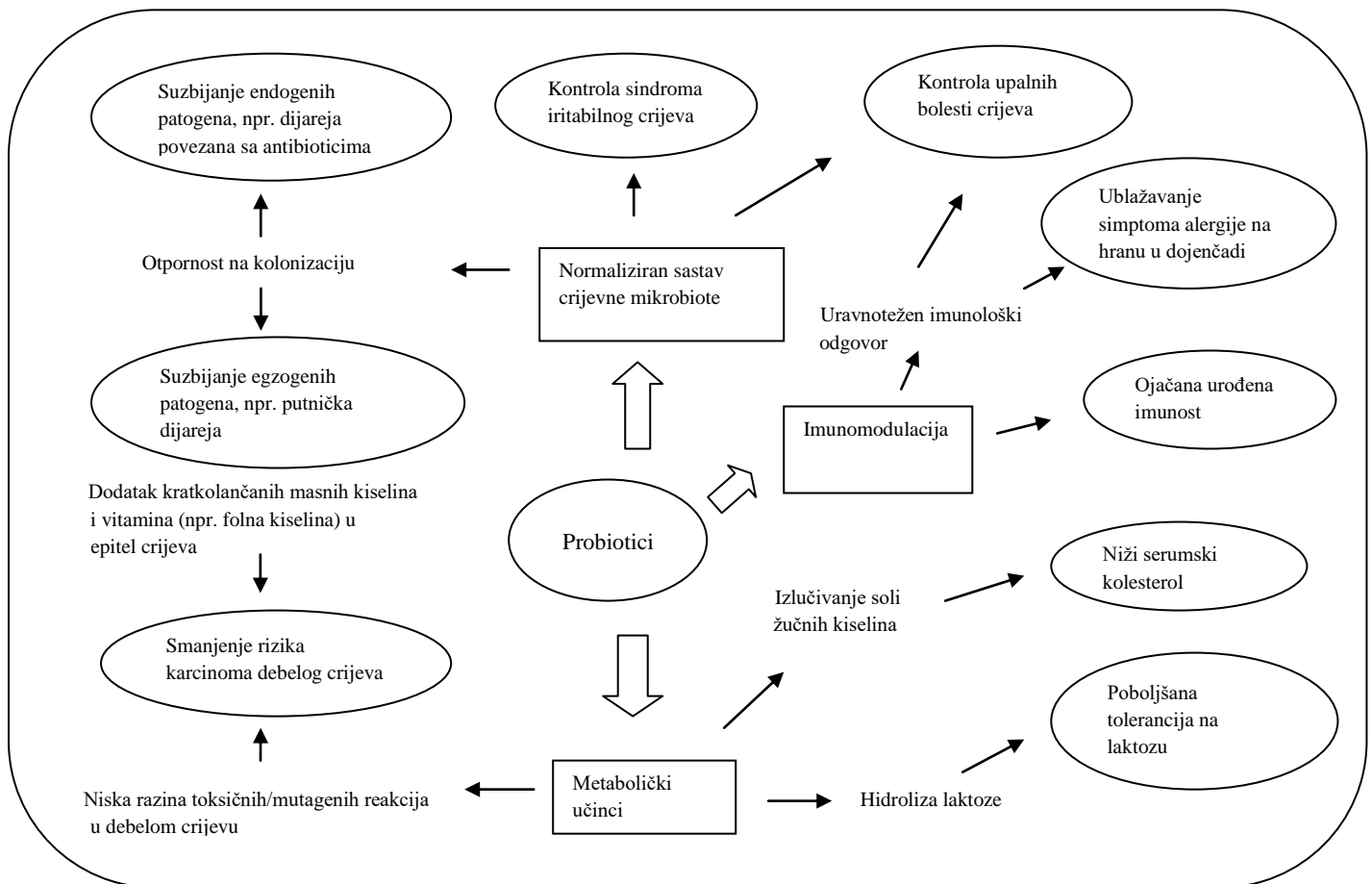
Kako bi iskazali svoje pozitivne učinke probiotički sojevi moraju prvo preživjeti u visokom broju živih stanica na ciljnom mjestu djelovanja. Da bi se uopće razmotrili za karakterizaciju kao probiotici, prvi selektivni kriterij je genetička stabilnost odabrane vrste. Zatim je potrebno da koloniziraju specifičan mikrookoliš (Kaur Sarao i Arora, 2017; Desai, 2008), te da su tolerantni na imunostav domaćina i da ne potiču stvaranje antitijela. No pojedini sojevi mogu i poticati specifične komponente imunološkog sustava i time potaknuti obranu protiv patogenih mikroorganizama. Prilikom proizvodnje probiotika važno je da se mikroorganizmi razmnožavaju brzo i u ekonomski prihvatljivom hranjivom mediju, te da se održe u visokom broju preživjelih mikrobnih stanica tijekom proizvodnje i skladištenja (Kaur Sarao i Arora, 2017; Desai, 2008). Kandidati za probiotičke sojeve mogu se odabirati primjenom *in vitro* metoda, kao što su: preživljavanje sojeva tijekom proizvodnje i skladištenja, osjetljivost na niske pH vrijednosti, želučane sokove, žuč, gušteraču, crijevne sokove, sluznice crijeva i dišnih puteva što se ispituje primjenom modela *in vitro* staničnih kultura, te interakcija s patogenim mikroorganizmima. Ukoliko su *in vitro* istraživanja uspješna, provode se daljnja istraživanja *in vivo* na životinjama i kasnije dugotrajna klinička istraživanja. Zahtjevi koje moraju ispuniti kandidati za probiotičke sojeve (Kaur Sarao i Arora, 2017; Salminen i von Wright, 1998) s ciljem primjene kod ljudi su:

- preživljavanje u uvjetima ciljnog mjesta djelovanja
- sposobnost adhezije i kolonizacija u ciljnom mjestu djelovanja
- isključenost imunološke reakcije domaćina protiv sojeva probiotika
- isključenost patogenih, alergijskih, toksičnih, mutagenih ili kancerogenih reakcija domaćina uslijed primjene probiotičkih sojeva, njegovih fermentacijskih produkata ili komponenata bakterijskih stanica
- genetička stabilnost
- jednostavna i reproducibilna proizvodnja
- preživljavanje tijekom proizvodnje i skladištenja

Poželjni učinci sojeva iz roda *Bifidobacterium* su prikazani na Slici 1. Stoga je primjena ovih bakterija kao probiotika obećavajuća (Kaur Sarao i Arora, 2017; Champagne i sur., 1994). Pojedini sojevi probiotika imaju antikancerogene učinke koji se očituju kao:

- mogućnost uklanjanja prokancerogena
- modulacija kancerogenih enzima
- sprječavanje tumora

Osim toga primjena probiotičkih sojeva predstavlja učinkovitu terapiju za ponovno uspostavljanje ravnoteže intestinalne mikrobiote uzrokovane kao posljedica terapije antibioticima (Kaur Sarao i Arora, 2017; Gibson i sur., 1995).



**Slika 1.** Shematski prikaz zdravstvenih učinaka probiotika (Kaur Sarao i Arora, 2017; Parvez i sur., 2006).

### 2.2.3. Funkcionalna svojstva probiotičkih bakterija

Probiotički mikroorganizmi koji se unose oralnim putem moraju barem prolazno preživjeti u želucu i tankom crijevu kako bi iskazali svoje pozitivne učinke. Iako se to smatra minimalnim zahtjevom, mnoge bakterije, uključujući *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. thermophilus*, koje proizvode jogurt, često ne prežive dolazak u donji dio tankog crijeva (Kaur Sarao i Arora, 2017; Desai, 2008). Razlog tome su najvjerojatnije niske pH vrijednosti u želucu. Većina mikroorganizama, uključujući laktobacile, koji su acidotolerantni, mogu preživjeti kratak vremenski period u tim uvjetima. Stoga, da bi probiotici iskazali svoje funkcionalne učinke, primjenjuju se različita tehnološka rješenja za zaštitu mikrobnih stanica i onih odabranih sojeva koji preživljavaju pri niskoj pH vrijednosti, primjerice unose se putem pufiranih sustava kao što su jogurt, mlijeko i ostala hrana.

Većina dokazanih zdravstvenih učinaka probiotika odnose se na očuvanje zdravlja GIT - a. GIT čovjeka sadrži kompleksnu mikrobiotu, bez čijeg uravnoteženog sastava i aktivnosti nije moguće preživjeti (Kaur Sarao i Arora, 2017; Round i Mazmanian, 2009). Probiotici se mogu adhezirati na epitel crijeva i time spriječiti invaziju patogenih sojeva što se naziva otpornost na kolonizaciju (Sherman i sur., 2009; Gueimonde i sur., 2007; Saxelin i sur., 2005).

Kako bi se postigao značajan zdravstveni učinak, probiotici u crijevima moraju preživjeti niske pH vrijednosti, te visoke koncentracije žučnih soli u želucu. Visoke koncentracije kiselina u želucu su prirodna prepreka nepoželjnim mikroorganizmima, a također smanjuju broj preživjelih mikrobnih stanica probiotika (Heidebach i sur., 2012; Ross i sur., 2005; Naidu i sur., 1999). Stoga se istražuju metode koje će omogućiti neometan prolazak probiotičkih sojeva kroz želudac, a osobito su značajne različite metode imobilizacije stanica. Primjenjuju se različiti polimeri za mikroinkapsulaciju, primjerice alginat,  $\kappa$ -karagenan, hitozan, škrob ili ksantan ili gelan guma, pa i celuloza – acetat - ftalat.

Celuloza – acetat - ftalat je polimer koji se primjenjuje za kontrolirano otpuštanje lijekova u medicinske svrhe, pa se i koristi za mikroinkapsulaciju stanica probiotika. Njegova primjena prilikom inkapsulacije probiotičkih sojeva pokazala je značajni zaštitni utjecaj na preživljavanje bakterijskih stanica u simuliranim uvjetima želuca (Heidebach i sur., 2012; O’Riordan i sur., 2001).

Zaštitni utjecaj inkapsuliranih stanica probiotika ovisi o fizikalnim karakteristikama i veličini matriksa kapsule. No na preživljavanja inkapsuliranih stanica probiotika utječu preostali čimbenici tijekom simuliranog prolaska kroz želudac, odnosno sama osjetljivost mikrobnog soja i sadržaj želučane tekućine. Preživljavanje određenog soja bakterije pri

niskim pH vrijednostima najčešće je uvjetovana aktivnošću membranskog ionskog transportnog sustava koji izaziva proton pokretačka sila. Reguliranje kapaciteta citoplazmatskog pH, pri niskim ekstracelularnim pH vrijednostima, ovisi o aktivnosti enzimskog kompleksa H<sup>+</sup> - ATP-aze, što se razlikuje od soja do soja (Heidebach i sur., 2012; Matsumoto i sur., 2004).

Nakon prolaska kroz želudac, stanice probiotika moraju uspješno preživjeti uvjete mikrookoliša prisutne u crijevima. Prilikom inkubacije bakterijskih stanica u simuliranoj žučnoj otopini smrtnost stanica probiotika je bila niža u usporedbi s preživljavanjem u simuliranim želučanim uvjetima pri niskom pH. U većini slučajeva nije došlo do pada broja živih stanica prilikom inkubacije u simuliranim uvjetima žučne otopine, bez obzira da li su korištene slobodne ili inkapsulirane stanice (Heidebach i sur., 2012; Muthukumarasamy i sur., 2006; Reid i sur., 2005; Favaro-Trindade i Grosso, 2002; Trindade i Grosso, 2000). Kako bi primjena mikroinkapsuliranih stanica probiotika bila moguća u prehrambenoj industriji, potrebno je osigurati da hidrokoloide, koji se primjenjuju kao materijal za izradu matriksa, štite mikrobnu stanicu tijekom skladištenja u hrani i u uvjetima niskog pH, ali isto tako kapsule moraju biti probavljive nakon što se stanice probiotika otpuste u crijevima. Otpuštanje mikroinkapsuliranih bakterijskih stanica probiotika je neophodno za uspješnu interakciju stanica probiotika sa humanim intestinalnim ekosustavom, te zbog toga obavezan uvjet za uspješnu primjenu probiotika u funkcionalnoj hrani. S obzirom da je poroznost alginatnog gela dovoljno mala da zadržava stanice mikroorganizma unutar mreže gela (Heidebach i sur., 2012; Allan-Wojtas i sur., 2008), kvantitativno otpuštanje postiže se razgradnjom matriksa gela tijekom probave.

### **2.3. MIKROINKAPSULACIJA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA**

Primjena mikrokapsuliranih probiotičkih stanica u prehrambenim proizvodima je relativno novi pristup unutar probiotičkog koncepta. Primjenjene metode preuzete su iz tehnologije imobiliziranih stanica za mikroinkapsuliranje probiotika i optimizirane prema specifičnim zahtjevima važnim u zaštiti probiotičkih stanica u primjenjenoj hrani (Heidebach i sur., 2012; Tamime i sur., 2005). Glavni cilj je zaštitni učinak stanica mikroinkapsulacijom tj. očuvanje metaboličke aktivnosti, a time i sprječavanje snižavanja broja stanica probiotika uzrokovanog raznim čimbenicima stresa tijekom procesa proizvodnje, skladištenja i prolaska kroz intestinalni trakt (Heidebach i sur., 2012; Mattila-Sandholm i sur., 2002; Shah, 2000).

Mikroinkapsulacija je fizikalno kemijski ili mehanički proces (Kaur Sarao i Arora, 2017; Chen i Chen, 2007). Mikrobna stanica (no može biti i enzim ili neki drugi bioaktivni sastojak) koja se inkapsulira navodi se kao jezgra, a naziv „omotač“ ili nosač koristi se za matriks (najčešće hidrogel) u koji se jezgra raspršuje. Struktura nosača osigurava fizičku barijeru i na taj način štiti inkapsuliranu tvar. Inkapsulirane bioaktivne tvari mogu se koristiti za različite potrebe u prehrambenoj industriji kao što su „maskiranje“ okusa, boja i mirisa, kontrola reakcija oksidacije, produljenje roka trajanja, omogućavanje održivog i kontroliranog otpuštanja tvari. Mikroinkapsulacija probiotičkih stanica uglavnom se koristi za zaštitu živih stanica probiotika od nepoželjnih uvjeta okoline (Leboš Pavunc i sur., 2011; Champagne i Kailasapathy, 2008), te u konačnici daje strukturu omogućavajući nove funkcije ili inovativne sustave za probiotičke proizvode (Kaur Sarao i Arora, 2017; Poncelet i sur., 1993). Mikroinkapsulacijom se postiže stabilizacija bakterijskih stanica tj. poboljšava njihova aktivnost i stabilnost tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja. Postupak mikroinkapsulacije pridonosi dodatnoj zaštiti stanica laktobacila i bifidobakterija tijekom procesa rehidracije i liofilizacije (Heidebach i sur., 2012; Kim i sur., 1996).

Svrha mikroinkapsulacije živih stanica probiotika je smanjiti neizbježan pad broja živih stanica dodatkom koncentrata probiotika u hranu, dok ne dosegnu ciljno mjesto djelovanja, odnosno dok ne dođu do crijeva.

Pojedini sojevi sintetiziraju egzopolisaharide koji se mogu smatrati prirodnim mehanizmom mikroinkapsulacije. Međutim, većina bakterija mliječne kiseline koje sintetiziraju egzopolisaharide, ne proizvode ih u dovoljnim količinama za samostalnu i potpunu inkapsulaciju svojih stanica (Heidebach i sur., 2012; Shah, 2002). Mikrokapsula potpomaže fizičko izdvajanje od njenog mikrookoliša sve dok ona ne bude otpuštena u okolinu. Njome se ujedno i štiti stanica od okoliša i na taj način poboljšava njezina stabilnost i aktivnost tijekom skladištenja, te omogućava ravnomjerno i kontrolirano otpuštanje u okolinu. Stoga, otpuštanje stanica probiotika iz „mikrokapsule“ u crijeva trebalo bi biti osigurano, jer je kolonizacija gastrointestinalnog trakta važan zahtjev za izvršavanje utjecaja probiotika. Kapsule moraju biti dovoljno malene kako bi se izbjegao učinak na senzorička svojstva proizvoda za koji su namjenjene.

Mikroinkapsulirane stanice probiotika koje se primjenjuju u prehrambenoj industriji namjenjene su da zadrže stabilnost do same konzumacije. Veličina kapsula mora se detaljno razmotriti zbog mogućeg utjecaja na promjenu senzorskih svojstava hrane. Alginat, koji se najčešće koristi za inkapsulaciju probiotika, može se ekstrahirati iz stanične stijenke morskih algi. S obzirom da predstavlja izvor ugljikohidrata različitim morskim mekušcima, ljudi ga ne

moгу probaviti i ponaša se kao prehrambeno vlakno (Heidebach i sur., 2012; Brownlee i sur., 2005). Za djelotvornu upotrebu probiotičkih mikrokapsula u prehrambenoj proizvodnji, potrebno je osigurati da hidrokoloidi, korišteni kao materijal za izgradnju matriksa, osiguravaju željeni efekt zaštite pri kiselim pH vrijednostima, te da su probavljivi, što omogućuje otpuštanje stanica probiotika u crijeva.

Razvoj tehnologije koja uključuje inkapsulaciju živih stanica probiotika započinje biotehnoškim procesom uz primjenu tehnike imobiliziranih stanica (TIS). TIS se koristi u biotehnologiji i podrazumijeva imobilizaciju živih stanica unutar pora gela. Uspješno se koristila u raznim područjima fermentacije, uz najveću upotrebu u mliječnoj industriji, inokulaciji mlijeka za proizvodnju jogurta i sira, proizvodnji mliječne kiseline.

Biopolimeri, kao što su alginat, gelan guma, karagenan, ksantan ili njihove mješavine prikladni su i najčešće upotrebljavani u TIS za potrebe mljekarstva jer imaju sposobnost da lako stvaraju hidrogel pri niskim koncentracijama 1% - tih vodenih otopina (Heidebach i sur., 2012; Burey i sur., 2008).

Za inkapsulaciju stanica probiotika mogu se koristiti različite tehnologije koje rezultiraju različitim veličinama mikrokapsula. Mikrokapsule širokog raspona veličine, od 0,2 do 5000  $\mu\text{m}$ , proizvedene su tehnikom emulgiranja, dok se kapsule veličine ne manje od 300  $\mu\text{m}$  proizvode metodom ekstruzije.

Prema istraživanjima De Vos i suradnika (2010) specifični čimbenici, kao što su koncentracija mliječne i octene kiseline, smanjenje pH vrijednosti, prisutnost vodikovog peroksida i visoke koncentracije kisika, rezultiraju smanjenjem održivosti u mliječnim proizvodima kao što su jogurt i smrznuti deserti. Preživljavanja mikroorganizama u mliječnim proizvodima i gastrointestinalnom traktu može se povećati mikroinkapsulacijom bakterijskih stanica (Picot i Lacroix, 2004; Krasaekoopt i sur., 2003). Osim zaštite stanica od nepovoljnih uvjeta specifičnog mikrookoliša, glavni cilj mikroinkapsulacije stanica probiotika je omogućiti njihovo otpuštanje u crijevima u visokom broju preživjelih mikrobnih stanica uz očuvanje metaboličke aktivnosti. Fizikalno kemijske karakteristike mikrokapsula utječu na preživljavanje stanica probiotika.

### 2.3.1. Metode mikroinkapsulacije stanica probiotika

Za mikroinkapsulaciju imobiliziranih stanica u mljekarstvu većinom se koriste dvije metode, tehnika ekstruzije i emulzije. Biopolimeri, kao što su alginat, gelan guma, ksantan, karagenan ili mješavina navedenih često se koriste kao materijali za geliranje, s obzirom da se niska koncentracija (0,75 – 4% ) vodenih otopina polimera može podvrgnuti blagom ionotropnom i / ili termičkom geliranju faze (Heidebach i sur., 2012; Krasaekoopt i sur., 2003). Posljednjih godina za mikroinkapsulaciju probiotičkih stanica, kao alternativa metodama inkapsulacije baziranim na tehnikama imobiliziranih stanica, primjenjuje se i tehnika sušenja raspršivanjem.

**Tehnika ekstruzije** utemeljena je na pripremi hidrokoloidne vodene otopine, u koju se dodaju koncentrirane stanice mikroorganizma, i ekstruziju smjese hidrokoloidnih stanica kroz sapnicu koja formira kapljice koje padaju u otopinu za skrućivanje. Ako se koristi kalcijev alginat, geliranje se može postići ispuštanjem kapljica u otopinu  $\text{CaCl}_2$  (Heidebach i sur., 2012; Krasaekoopt i sur., 2003).

**Tehnika emulzije** je najprikladnija metoda za inkapsulaciju probiotičkih stanica, s obzirom na kontrolu i fleksibilnu prilagodbu veličine nastalih kapsula. Ova tehnika podrazumijeva emulgiranje malog volumena otopine mješavine hidrokoloidnih stanica (diskontinuirana faza) u veći volumen biljnog ulja (kontinuirana faza). Kada se formira emulzija vode u ulju, dispergirana mješavina hidrokoloidnih stanica prevodi se u netopljivi oblik i formira male kuglice unutar uljne faze (Heidebach i sur., 2012; Krasaekoopt i sur., 2003). Pri proizvodnji alginatnih kapsula, mikrokapsule se skrućuju sporim dodavanjem otopine  $\text{CaCl}_2$  u emulziju tijekom miješanja. Nakon što otopina kalcija dođe u kontakt sa dispergiranom alginatnom fazom, dolazi do trenutnog stvaranja gela. Na taj način, kinetika geliranja je nehomogena, što ponekad dovodi do stvaranja kapsula nepravilnog oblika (Heidebach i sur., 2012; Sheu i Marshall, 1993).

### 2.3.2. Nosači koji se primjenjuju za mikroinkapsulaciju probiotičkih stanica

**Alginat** je polisaharid ekstrahiran iz različitih vrsta algi koji se sastoji od  $\beta$  – D – manuronske i  $\alpha$  – L – hijaluronske kiseline. Ovisno o izvoru alginata, sastav polimernog lanca razlikuje se u količini i rasporedu sekvencija. Ovi faktori određuju funkcionalne karakteristike alginata

koji se koristi kao pomoćni materijal. Prilikom mikroinkapsulacije najčešće se koriste alginatni hidrogelovi (Kaur Sarao i Arora, 2017; Rowley i sur., 1999). Na temelju istraživanja kojeg su 2003. godine proveli Krasaekoopt i suradnici najčešće se koristi kalcijev alginat kao materijal za inkapsulaciju stanica probiotika, s obzirom da je netoksičan, biokompatibilan, jeftin i jednostavan. Nedostaci alginata kao nosača su osjetljivost na kiselo okruženje, no ovi nedostaci mogu se prevladati upotrebom mješavine alginata s drugim polimernim tvarima (Kaur Sarao i Arora, 2017; Krasaekoopt i sur., 2003).

**κ-karagenan** je prirodni polimer koji se koristi u prehrambenoj industriji. Stanice se dodaju u otopinu polimera pri temperaturi 40 – 50°C. Do stvaranja gela dolazi pri sobnoj temperaturi (Kaur Sarao i Arora, 2017; Krasaekoopt i sur., 2003), a dodatak kalijevih iona stabilizira formirane mikročestice. Prema istraživanju kojeg su proveli Dinakar i Mistry 1994. godine, probiotičke bakterijske stanice čuvaju se u održivom stanju inkapsulacijom u κ -karagenanu, dok su Chen i Chen 2007. godine objavili da su gelovi, dobiveni ovom metodom, lomljivi i ne mogu izdržati stresne uvjete.

**Škrob** je polisaharid sastavljen od velikog broja glukoznih jedinica povezanih glikozidnim vezama. Škrob koji se ne probavlja u tankom crijevu enzimima gušterače kao što su amilaze, poznat je pod nazivom rezistentni škrob. Ova vrsta škroba može doći do debelog crijeva gdje se fermentira (Kaur Sarao i Arora, 2017; Anal i Singh, 2007; Sajilata i sur., 2006) što dovodi do boljeg otpuštanja stanica bakterija u debelom crijevu. Probiotičke bakterije mogu koristiti rezistentni škrob u debelom crijevu (Kaur Sarao i Arora, 2017; Mortazavian i sur., 2008). Za prijanjanje stanica probiotika na granule škroba, rezistentni škrob služi kao idealna površina (Kaur Sarao i Arora, 2017; Anal i Sing, 2007).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu, u *in vitro* eksperimentima, korištena su dva soja bakterija mliječne kiseline (Tablica 2). Sojevi su selekcionirani u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu te se čuvaju pri  $-80^{\circ}\text{C}$  u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola. *Lactobacillus plantarum* je autohtoni izolat iz dimljenog sira, a *Lactococcus lactis* iz svježeg sira.

**Tablica 2.** Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D13	MRS, $37^{\circ}\text{C}$ , anaerobno
<i>Lactococcus lactis</i>	ZG7-10	M17, $30^{\circ}\text{C}$

##### 3.1.2. Hranjive podloge

Tijekom rada su za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline korištene hranjive podloge

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar sastava : pepton  $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ; mesni ekstrakt  $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ; kvašćev ekstrakt  $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ; glukoza  $20,0 \text{ g L}^{-1}$ ; Tween 80  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,05 \text{ g L}^{-1}$ ; natrijev-acetat  $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ; agar  $20,0 \text{ g L}^{-1}$  u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri  $121^{\circ}\text{C}$  tijekom 15 min.

- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- M17 agar sastava: tripsinski hidrolizat kazeina 2,5 (g L<sup>-1</sup>); pepton 2,5 (g L<sup>-1</sup>); sojin pepton 5 (g L<sup>-1</sup>); kvašćev ekstrakt 2,5 (g L<sup>-1</sup>); mesni ekstrakt 5 (g L<sup>-1</sup>); laktoza 5 (g L<sup>-1</sup>); natrijev glicerofosfat 19 (g L<sup>-1</sup>); magnezijev sulfat 0,25 (g L<sup>-1</sup>); askorbinska kiselina 0,5 (g L<sup>-1</sup>). pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- M17 bujon je istog sastava kao podloga M17 agar, ali bez dodatka agara.

### 3.1.3. Kemikalije

U ovom eksperimentalnom radu korištene su kemikalije:

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- agar, „Merck“, Njemačka
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma“, SAD
- alginat, „Fluka“, Švicarska
- amonij-perokosodisulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- biljno ulje, „Zvijezda“, Hrvatska
- Dcode dye solution „BioRad“, SAD
- EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix - (2x Premix) „Takara“, Japan
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- formamid „BioRad“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- inulin, „Difco“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- kalcijev klorid, „Fluka“, Švicarska
- kazein, „Sigma“, SAD
- κ-karagenan, „Sigma“, SAD
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska

- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- kvašćev ekstrakt, „Difco“, SAD,
- laktoza, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija,
- manganov sulfat, „Merck“, Njemačka,
- mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija,
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev citrat, „T.T.T.“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- „nuclease free“ voda, „Takara“, Japan
- obrano mlijeko u prahu, „Fluka“, Švicarska
- pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- pepton, „Biolife“, Malazija
- početnice „Invitrogen“, SAD
- Ringerova otopina, „Merck“, Njemačka
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- saharoza, „Kemika“, Hrvatska
- sorbitol, „Kemika“, Hrvatska
- TAE „BioRad“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletlen), „Sigma“, SAD
- transglutaminaza ACTIVA<sup>®</sup> YG (100 U/g), „Ajinomoto“, Njemačka
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- Tween 80, „Sigma“, SAD,
- urea „BioRad“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

#### 3.1.4. Aparatura i pribor

- DGGE system, „BioRad“, SAD
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- bagmixer, „Interscience“, Francuska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- DNA-termoblok, Mastercyclerpersonal, „Eppendorf“
- elektroforetska kadica, „BioRad“, SAD
- ependorvice
- epruvete
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- magnetska miješalica, „IKA-Werke GmbH & Co“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta
- „power supply“, „BioRad“, SAD
- stalci za ependorvice
- stalci za epruvete
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNT“, Njemačka
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- vaga, „Sartorius“, Njemačka
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri  $-80^{\circ}\text{C}$  u odgovarajućoj tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta odnosno pri odgovarajućoj temperaturi.

### 3.2.2. Izolacija kromosomske DNA

Volumen od 1,5 mL prekonoćnih kultura bakterija mliječne kiseline centrifugira se 10 min pri 9000 o/min i resuspendira u 1 mL GTE pufera (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500  $\mu\text{L}$  otopine GTE pufera, lizozima (8 mg/500  $\mu\text{l}$ ) i RNA-ze (50  $\mu\text{l ml}^{-1}$ ) te inkubiraju 30 minuta pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Zatim se dodaju: 250  $\mu\text{L}$  SDS-a (2%) i vorteksira 1 min, 100  $\mu\text{L}$  neutralnog fenol-kloroforma, vorteksira 30 sekundi i centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Supernatant, bez interfaze, pomiješa se sa 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8) i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije, koja traje 5 minuta pri sobnoj temperaturi, slijedi centrifugiranje na 13 000 o/min tijekom 10 minuta. Talog se resuspendira u 300  $\mu\text{L}$  otopine 0,3 M natrijeva acetata i 10 mM magnezijevog klorida te vorteksira. Nakon dodatka 700  $\mu\text{L}$  apsolutnog etanola (ohlađenog na  $-20^{\circ}\text{C}$ ), uzorak se preko noći inkubira pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 14000 o/min tijekom 20 minuta. Talog se suspendira u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na  $-20^{\circ}\text{C}$ ) i ponovno centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Talog DNA se resuspendira u 25  $\mu\text{L}$  TE (10mM Tris (pH 7,8) i 1mM EDTA) pufera, a koncentracija DNA se izmjeri pomoću BioSpec Nano uređaja. Koncentracija DNA za uzorak *Lactobacillus plantarum* D13 je iznosila 499,06  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ , a za *Lactococcus lactis* ZG7-10 454,59  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ .

### 3.2.3. RAPD – PCR (engl. Random Amplified Polymorphic – DNA Polymerase chain reaction)

DNA izolirana iz sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10 koristila se kao kalup za RAPD-PCR reakciju koja je provedena u DNA-termobloku, Mastercycler personal, “Eppendorf” (Leboš Pavunc i sur., 2010). Reakcijska smjesa se sastojala od DNA, početnice M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Martín-Platero i sur., 2008), pufera bez MgCl<sub>2</sub> (Biosystems, SAD), MgCl<sub>2</sub> (Biosystems, SAD), Dntp (Invitrogen, SAD) i Taq polimeraze (Biosystems, SAD). Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica, korišten je uzorak bez DNA. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD), a reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u Tablici 3, nakon čega su dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 150 V tijekom 1 sata. Gel je obojan u etidijevom bromidu, koncentracije 0,5 μg mL<sup>-1</sup> i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

**Tablica 3.** Uvjeti provođenja PCR reakcije s M13 početnicom za RAPD-PCR

Broj ponavljanja	vrijeme	T [°C]	korak
1	1 min	94	inicijalna denaturacija
35	1 min	94	denaturacija
	20 s	40	sparivanje
	80 s	72	polimerizacija
1	5 min	72	završna elongacija

### 3.2.4. Elektroforeza u denaturirajućem gradijentu DGGE (engl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

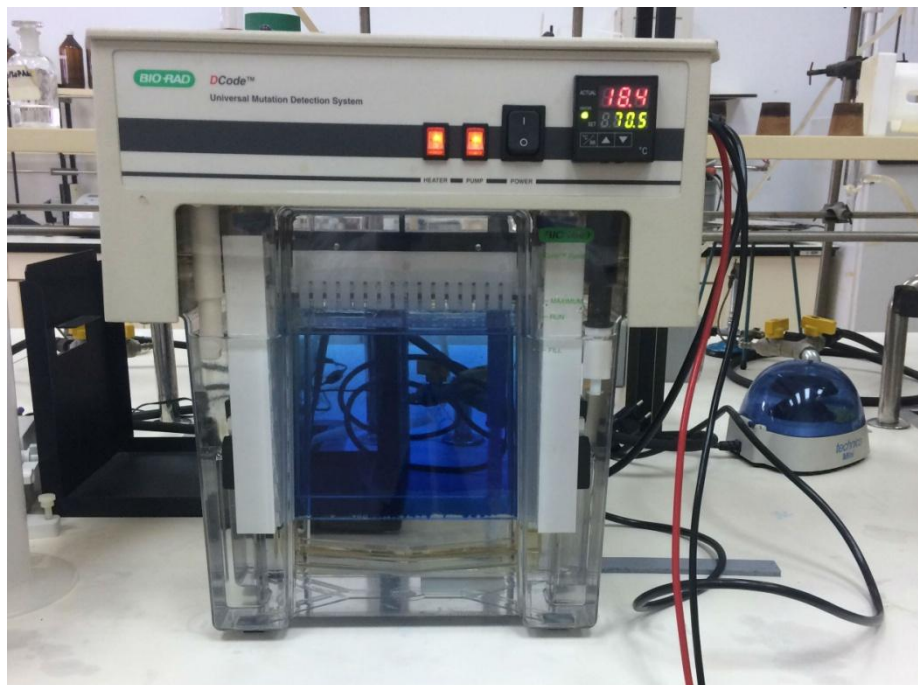
Izolacija kromosomske DNA iz odabranih izolata provedena je prema prethodno opisanoj metodi (3.2.3.), nakon čega je provedena PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) reakcija za DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) s univerzalnim bakterijskim početnicama HDA1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') i HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') u uvjetima prikazanim u Tablici 4. Osim DNA i početnica, u reakcijskoj smjesi su se nalazili EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix - (2x Premix) i voda. Uzorak bez DNA korišten je kao negativna kontrola, kako fragment dobiven nakon PCR reakcije ne bi bio produkt dimerizacije dviju početnica. Standard se sastojao od  $\lambda$  DNA HindIII i 100 bp DNA Ladder. Dobiveni PCR produkti razdvojeni su u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 200 V. Gel je obojan u etidijevom bromidu i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

**Tablica 4.** Uvjeti provođenja PCR reakcije s univerzalnim HDA1 i HDA2 početnicama za DGGE

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

Nakon utvrđivanja prisutnosti PCR produkata provedena je DGGE elektroforeza na poliakrilamidnom gelu gradijenta denaturirajućeg agensa 30-70% koji je pripremljen miješanjem reagensa prema proračunu za različite gradijente kako je prikazano u Tablici 5.

Neposredno prije nanošenja gela u suspenziju je dodano 130  $\mu\text{L}$  0,1  $\text{g mL}^{-1}$  APS-a i 5,8  $\mu\text{L}$  TEMED-a. U suspenziju višepostotnog gela dodana je plava boja Dcode dye solution (300  $\mu\text{L}$ ) kako bi se te dvije suspenzije razlikovale. Kao uzorci korišteni su PCR produkti svakog soja, a kao standard združeni sojevi *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* i *Lactococcus lactis*. Nanošenje uzoraka započelo je pri 58°C, a sama elektroforeza pri 60°C. DGGE elektroforeza prvih 10 minuta se provodila pri 30V kako bi se uzorci spustili na dno jažica, a nakon toga 3 sata pri 80V (Slika 2). Nakon završene elektroforeze gel je obojan u etidijevom bromidu koncentracije 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).



**Slika 2.** Prikaz aparature za provođenje DGGE elektroforeze



**Tablica 5.** Prikaz proračuna reagenasa potrebnih za dobivanje gela različitog gradijenta

Priprema gela za DGGE (volumena 34mL)				
Reagens	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	100%	0%
Urea		7M	7,14 g	/
Formamid		40	6,8 mL	/
TAE	50x	1x	340 $\mu$ L	34 $\mu$ L
Akrilamid/bisakrilamid	40%	8%	3,4 mL	3,4 mL
Voda			Nadopuniti do ukupnog volumena	
UKUPNI VOLUMEN			17 mL	17 mL

### 3.2.5. Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u alginatu

Prekonoćne kulture sojeva, *L. plantarum* D13 i *L. lactis* ZG7-10 uzgojene su propagacijom u 300 ml odgovarajućeg bujona pri odgovarajućoj temperaturi. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min (4°C), a zatim su isprane dva puta s 10 ml fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom, resuspendiran u istom volumenu 2%-tnog (v/w) natrijevog alginata. Smjesa bakterijskih stanica i alginata je postepeno dodana u 1%-tnu otopine kalcijevog klorida uz miješanje na magnetnoj miješalici, prilikom čega je došlo do formiranja mikrokapsula (Slika 3). Kuglice su ostavljene 1 sat na magnetnoj miješalici da očvrstu, zatim su isprane dva puta fiziološkom otopinom nakon čega je uslijedilo određivanje broja mikroinkapsuliranih stanica oslobađanjem iz mikrokapsula pomoću 2%-tnog (v/w) natrijevog citrata (prilagođeno prema Li i sur., 2009). Broj stanica je određen indirektnom metodom, odnosno naciepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (10  $\mu$ L) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica.



**Slika 3.** Prikaz bakterijskih stanica mikroinkapsuliranih u alginatu

### 3.2.6. Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u $\kappa$ -karagenanu

Prekonoćne kulture sojeva *L. plantarum* D13 i *L. lactis* ZG7-10 uzgojene su propagacijom u 300 ml odgovarajućeg bujona pri odgovarajućoj temperaturi. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min ( $4^{\circ}\text{C}$ ), a zatim su ispirane dva puta s 10 ml fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom, resuspendiran u istom volumenu 2%-tne (v/w) otopine  $\kappa$ -karagenana. Smjesa bakterijskih stanica i  $\kappa$ -karagenana je postepeno dodana u 1% - tnu otopine kalcijevog klorida uz miješanje na magnetnoj miješalici. Talog je ispran dva puta fiziološkom otopinom te je određen broj stanica indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi ( $10\ \mu\text{L}$ ) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri  $37^{\circ}\text{C}$ , izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica.

### 3.2.7. Mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline u kazeinu djelovanjem transglutaminaze

Prekonoćne kulture sojeva *L. plantarum* D13 i *L. lactis* ZG7-10 uzgojene su propagacijom u 300 ml odgovarajućeg bujona pri odgovarajućoj temperaturi. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min (4°C), a zatim su ispirane dva puta s 10 ml fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom, resuspendiran u 15%-tnoj otopini kazeina (2 grama taloga/28 grama kazeina), a nakon toga je dodan enzim transglutaminaza (10 U transglutaminaze/g kazeina). Nakon dodatka transglutaminaze, smjesa stanica i kazeina je dodana u 150 ml temperiranog (40°C) biljnog ulja te je provedeno miješanje na magnetnoj miješalici uz grijanje (40°C) pri 900 g/min tijekom 2 sata. Nastala suspenzija je odvojena od uljne faze centrifugiranjem pri 500 g/min tijekom 1 minute. Dobivene mikrokapsule su resuspendirane u Ringerovoj otopini. Broj mikroinkapsuliranih stanica određen je indirektnom metodom resuspendiranjem u fiziološkoj otopini i razbijanjem u Bag-mixeru.

### 3.2.8. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica uz dodatak različitih lioprotektora

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

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

#### 3.2.9.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok je pripremljen suspendiranjem pepsina ( $3,0 \text{ g L}^{-1}$ ) u 0,5% otopini natrijevog klorida, kojoj je pH vrijednost podešena na 2.0 s koncentriranom kloridnom kiselinom. Simulirani sok tankoga crijeva je pripremljen suspendiranjem pankreatina ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) i žučnih soli ( $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$  goveđe žuči) u 0,5% otopini natrijeva klorida, kojoj je pH vrijednost podešena na 8.0 s natrijevom lužinom (Kos, 2001).

#### 3.2.9.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje

Liofilizirane mikroinkapsulirane stanice bakterijskih sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10, su izložene djelovanju želučanog soka (pH=2) tijekom 2 sata, a zatim su centrifugirane pri 3500 o/min i resuspendirane u simuliranom soku tankoga crijeva ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$  goveđe žuči) tijekom 3 sata (Kos, 2001). Broj preživjelih stanica određen je indirektnom metodom.

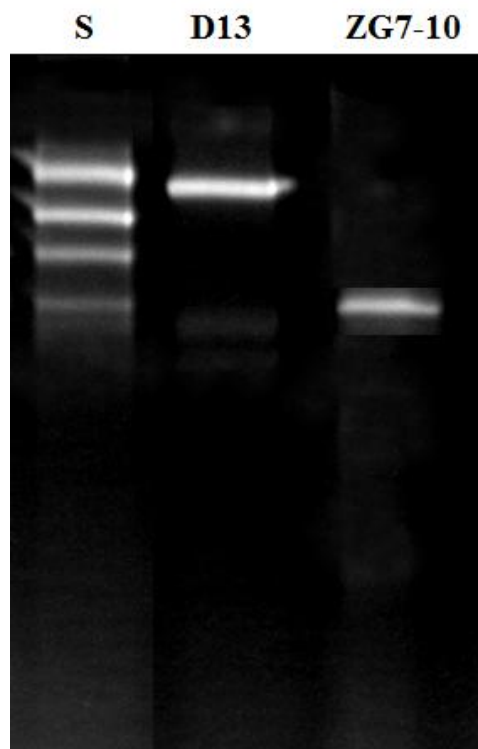
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. MIKROINKAPSULACIJA ODABRANIH SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U RAZLIČITIM NOSAČIMA

Bakterijski sojevi *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10 su izolirani iz tradicionalno proizvedenih sireva i u budućnosti će se koristiti kao funkcionalne starter kulture za kontroliranu proizvodnju sireva pa je u ovom radu provedeno ispitivanje različitih načina njihove proizvodnje. Budući da će se ti sojevi koristiti u kombinaciji s drugim sojevima, potrebno je imati mogućnost potvrde prisutnosti korištenih sojeva te njihovo međusobno razlikovanje u gotovom proizvodu. U tu svrhu su u ovom radu provedene DGGE i RAPD metode. Primjenom gel elektroforeze u denaturirajućem gradijentu (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) moguće je razlikovati bakterijske rodove, ali i vrste unutar istog bakterijskog roda.

DGGE elektroforeza je provedena s dva gela koja imaju različite gradijente denaturirajućih agensa (30 do 70%; 40 do 60%). Tijekom odvijanja DGGE umnoženi su dijelovi DNA analiziranih sojeva, denaturirani i razdvojeni prema molekularnoj masi. Kao standard je korištena DNA svih ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline. Na Slici 4 su prikazani rezultati na 30% do 70%-tnom gelu.

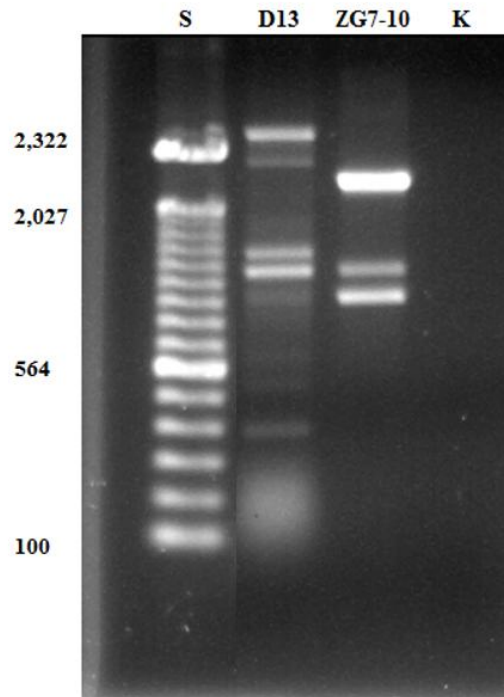
Kao standard su korišteni združeni sojevi *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus fermentum* D12, *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10. Uspoređivanjem bakterijskih sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10, koji su korišteni u ovom radu, vidi se da se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



**Slika 4.** Rezultati DGGE elektroforeze bakterijskih sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10

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

Na Slici 5 su prikazani fragmenti DNA bakterijskih sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10, dobiveni RAPD metodom što pokazuje da se i ova metoda može koristiti za razlikovanje bakterijskih sojeva. Prema dobivenim rezultatima PCR reakcija vidljivo je da u negativnoj kontroli ne dolazi do dimerizacije korištenih početnica pa su dobivene DNA vrpce pozitivan rezultat PCR reakcije.

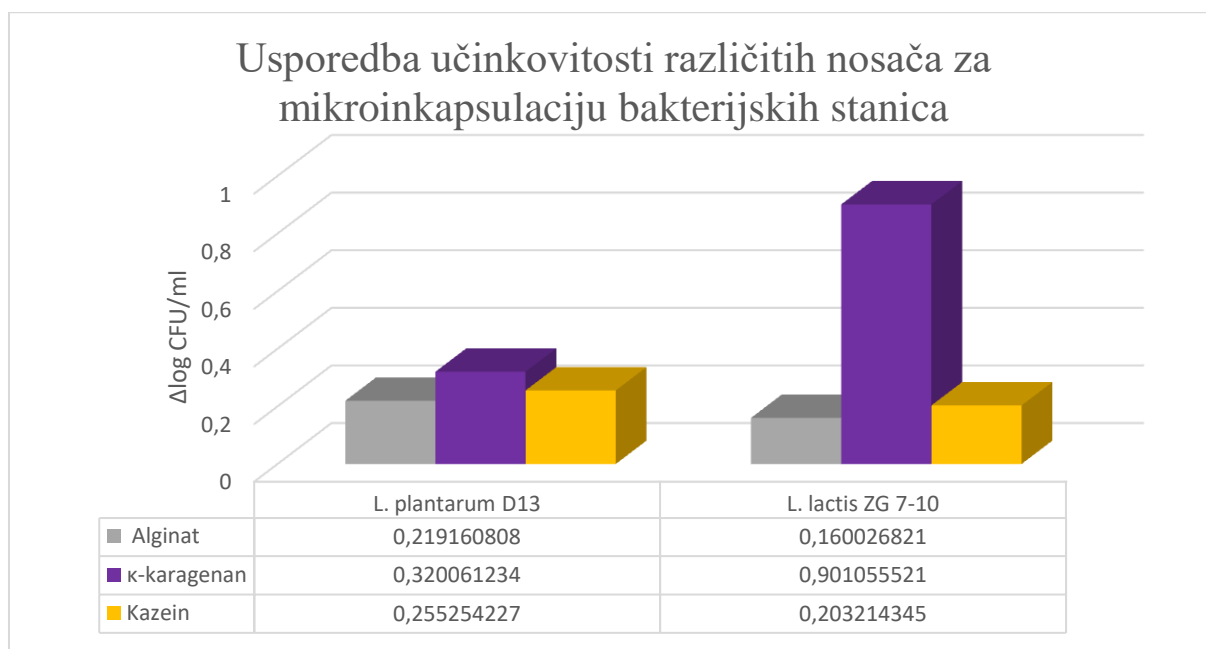


**Slika 5.** DNA profili sojeva bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10) nakon provedene RAPD-PCR reakcije

Budući da je cilj ovog rada bio optimirati biotehnološku proizvodnju sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10, provedena je mikroinkapsulacija tih sojeva u različitim nosačima. Kao nosači korišteni su alginat,  $\kappa$ -karagenan i kazein s djelovanjem enzima transglutaminaze (Slika 6).

Mikroinkapsulacija je postupak kojim se bakterijske stanice štite od različitih nepovoljnih uvjeta okoline (svjetlost, vlaga, kisik) (Pourashouri i sur., 2014; Mahdavi, 2014). Upotreba različitih nosača može rezultirati različitim fizikalno-kemijskim karakteristikama, ovisno o strukturi i karakteristikama samog nosača.

**Alginat** je prirodno proizveden polisaharid ekstrahiran iz različitih vrsta algi koji se često koristi za mikroinkapsuliranje probiotika zbog svoje biokompatibilnosti, ekonomičnosti, jednostavnosti, netoksičnosti i dobre razgradnje (Iravani i sur., 2014; Mortazavian i sur., 2007).  **$\kappa$ -karagenan** je prirodni polimer koji se koristi u prehrambenoj industriji te pri sobnoj temperaturi pokazuje svojstvo stvaranja gela (Kaur Sarao i Arora, 2017; Krasaekoopt i sur., 2003), dok se **kazein**, koji je također prirodni polimer, koristi za mikroinkapsulaciju u mliječnim proizvodima (Iravani i sur., 2014; Picot i Lacroix, 2004).



**Slika 6.** Usporedba učinkovitosti mikroinkapsulacije stanica odabranih sojeva BMK *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10 u različitim nosačima: alginatu (■), κ-karagenanu (■) i kazeinu djelovanjem transglutaminaze (■) izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta\log$  CFU/ml) prije i nakon postupka mikroinkapsulacije

Usporedba dobivenih rezultata za učinkovitost mikroinkapsulacije u različitim nosačima (Slika 6) pokazuje kako je alginat najučinkovitiji nosač za oba bakterijska soja jer je uz njega dobivena najmanja smrtnost stanica, 0,219 log jedinica za soj *L. plantarum* D13 te 0,16 log jedinica za soj *L. lactis* ZG7-10. κ – karagenan se pokazao kao najmanje učinkovit nosač pogotovo za soj *L. lactis* ZG7-10 jer je za taj soj smrtnost iznosila 0,9 log jedinica.

Istraživanje koje su proveli Talwalkar i Kailasapathy 2003. godine pokazalo je da mikroinkapsulacija u alginatu omogućava značajnu zaštitu probiotika pri aerobnim uvjetima za nekoliko probiotičkih sojeva i na taj način omogućava visoku stopu preživljavanja inkapsuliranih stanica tijekom skladištenja u jogurtu (Heidebach i sur., 2012).

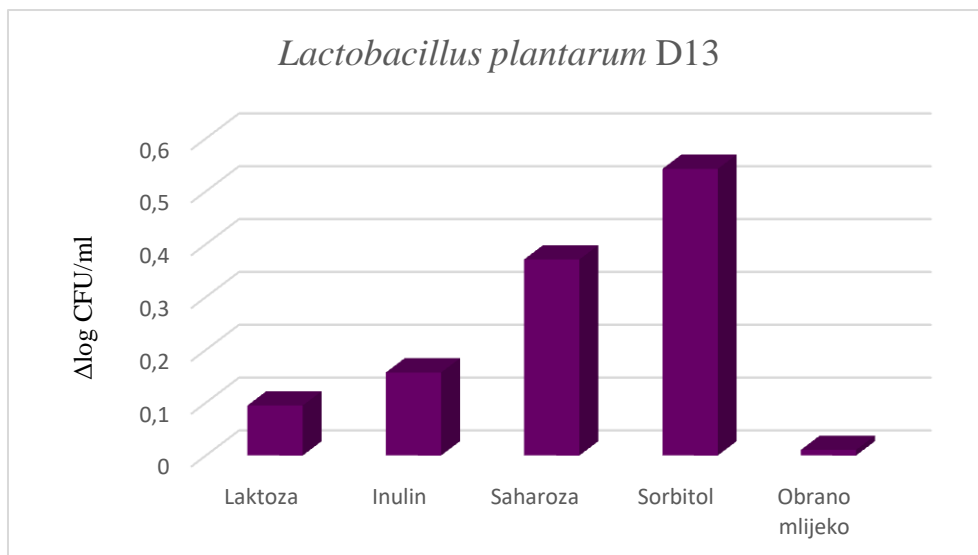


#### 4.2. LIOFILIZACIJA MIKROINKAPSULIRANIH STANICA UZ DODATAK RAZLIČITIH LIOPROTEKTORA

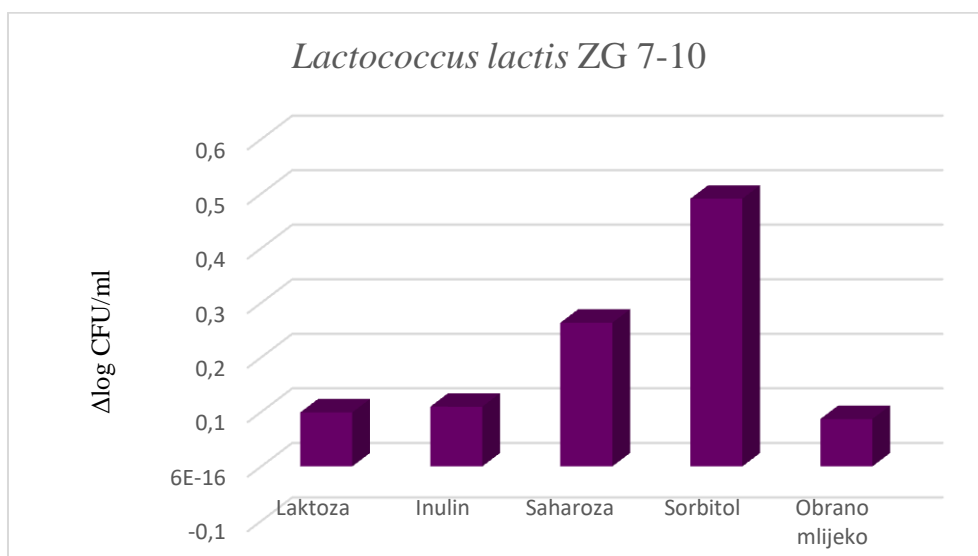
Budući da se kao najbolji nosač za mikroinkapsulaciju pokazao alginat, istraživanje je nastavljeno ispitivanjem najboljeg lioprotektora koji će imati najveći zaštitni učinak tijekom liofilizacije sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10, mikroinkapsuliranih u alginatu.

Liofilizacija je proces koji započinje zamrzavanjem mikroorganizama nakon čega slijedi sublimacija (primarno sušenje) i desorpcija (sekundarno sušenje) kako bi se smanjio sadržaj vode (Mendoza i sur., 2013; Schoug Bergenholtz i sur., 2012). Liofilizacija se obično koristi za očuvanje i skladištenje starter kultura koje se koriste u mliječnoj industriji. Ove tehnike mogu dovesti do nepoželjnih nuspojava, kao što su oštećenja membrane, proteina i denaturacija enzima te oštećenja DNA (Kandil i El Soda, 2015; Stummer i sur., 2012; Meng i sur., 2008). Korištenje lioprotektora je važno za poboljšavanje preživljavanja stanica, a kao lioprotektori se mogu koristiti različiti ugljikohidrati (dekstran, trehaloza, saharoza, laktoza, glukoza), alkoholi (sorbitol, glicerol), aminokiseline, proteini (sirutke) i obrano mlijeko, koji svojim djelovanjem inhibiraju intracelularno formiranje leda, oštećenja membrana, denaturaciju proteina i time smanjuju oštećenja stanica (Savini i sur., 2010; Ming i sur., 2009; Schoug i sur., 2006; Zayed i Roos, 2004; Hubalek, 2003).

U ovom radu su kao lioprotektori korišteni laktoza, inulin, saharoza, sorbitol i obrano mlijeko.



**Slika 7.** Preživljavanje probiotičkih stanica soja *Lactobacillus plantarum* D13 ( $\Delta\log$  CFU/ml) uz primjenu različitih lioprotektora



**Slika 8.** Preživljavanje probiotičkih stanica soja *Lactococcus lactis* ZG7-10 ( $\Delta\log$  CFU/ml) uz primjenu različitih lioprotektora

Rezultati istraživanja pokazuju kako se za oba soja kao najbolji lioprotektor pokazalo obrano mlijeko jer je smrtnost stanica za soj *Lactobacillus plantarum* D13 iznosila 0,01 log jedinica (Slika 7), a za soj *Lactococcus lactis* ZG7-10 0,09 log jedinica (Slika 8).

Mendoza i suradnici su 2013. godine proveli ispitivanje osjetljivosti četiri različita soja bakterija mliječne kiseline na liofilizaciju korištenjem devet različitih lioprotektora: laktoza (10% w/v), saharoza (10% w/v), obrano mlijeko (10% w/v), koncentrat proteina sirutke (10% w/v), laktoza (5% w/v) + saharoza (5% w/v), obrano mlijeko (5% w/v) + laktoza (5% w/v), obrano mlijeko (5% w/v) + saharoza (5% w/v), koncentrat proteina sirutke (5% w/v) + laktoza (5% w/v) i koncentrat proteina sirutke (5% w/v) + saharoza (5% w/v). Bakterijske vrste *Lactobacillus plantarum* i *Lactococcus lactis* su pokazale visoki postotak preživljavanja korištenjem samih šećera kao lioprotektora ili u kombinaciji šećera i obranog mlijeka. Preživljavanje stanica svih ispitivanih sojeva tijekom skladištenja pri temperaturi 4°C bilo je puno veće nego pri 25°C, dok je bakterija vrste *Lactococcus lactis* tijekom skladištenja pri temperaturi 4°C pokazala visoki postotak preživljavanja primjenom svih lioprotektora.

Nakon odabira obranog mlijeka kao najboljeg lioprotektora provedeno je istraživanje preživljavanja bakterija mliječne kiseline u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Stanice odabranih bakterijskih kultura mikroinkapsulirane u alginatu i liofilizirane uz dodatak 10%-tnog obranog mlijeka kao lioprotektora, izložene su djelovanju želučanog soka tijekom 2 sata te resuspendirane u simuliranom soku tankoga crijeva tijekom 3 sata (Tablica 6). Kako bi unaprijedili svoje blagotvorne učinke na zdravlje domaćina, probiotici moraju preživjeti prolazak kroz nepovoljne uvjete gastrointestinalnog trakta i doći do debelog crijeva u odgovarajućim koncentracijama kako bi se kolonizirali i proliferirali (Li i sur., 2011). Preporuča se da probiotički pripravci moraju sadržavati žive mikrobne stanice u koncentracijama od  $10^8$ - $10^9$  CFU/g neposredno prije oralne primjene, kako bi se osiguralo da dovoljan terapijski minimum od  $10^6$ - $10^7$  CFU/g dođe do debelog crijeva (Nazzaro i sur., 2009).

Kako bi se probiotičke mikrokapsule učinkovito koristile u prehrambenim proizvodima, potrebno je osigurati da nosači ne pokazuju samo zaštitni učinak tijekom skladištenja u hrani i pri nepovoljnim uvjetima proizvodnje, nego da omogućuju otpuštanje probiotičkih stanica iz mikrokapsula u željenom odredištu. Ovo otpuštanje je bitan korak za učinkovitu interakciju probiotičkih stanica s humanim intestinalnim ekosustavom i stoga je nužan preduvjet za uspješnu primjenu probiotika u funkcionalnoj hrani.

**Tablica 6.** Usporedba preživljavanja mikroinkapsuliranih i liofiliziranih bakterijskih sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Bakterijski sojevi	Broj živih stanica (CFU/ml):					
	Prije izlaganja simuliranom soku želuca (N <sub>0</sub> )	Nakon izlaganja simuliranom soku želuca (N)	Smrtnost stanica (Δlog N <sub>0</sub> -N)	Prije izlaganja simuliranom soku želuca + simuliranom soku tankog crijeva (N <sub>0</sub> )	Nakon izlaganja simuliranom soku želuca + simuliranom soku tankog crijeva (N)	Smrtnost stanica (Δlog N <sub>0</sub> -N)
<i>Lactobacillus plantarum</i> D13	2,50 x 10 <sup>10</sup>	9,68 x 10 <sup>9</sup>	0,42	2,50 x 10 <sup>10</sup>	5,80 x 10 <sup>9</sup>	0,63
<i>Lactococcus lactis</i> ZG7-10	8,96 x 10 <sup>9</sup>	1,48 x 10 <sup>9</sup>	0,782	8,96 x 10 <sup>9</sup>	9,55 x 10 <sup>8</sup>	0,972

Dobiveni rezultati pokazuju kako je veće preživljavanje bakterijskih sojeva samo nakon prolaska kroz želučani sok nego nakon izlaganja simuliranim uvjetima cijelog gastrointestinalnog trakta za oba soja, ali je preživljavanje soja *Lactobacillus plantarum* D13 u oba slučaja bolje od soja *Lactococcus lactis* ZG7-10 kod kojeg je došlo do veće smrtnosti stanica.

Dobiveni rezultati pokazuju visoko preživljavanje ispitivanih bakterijskih sojeva, što je u skladu s drugim istraživanjima pa su tako Annan i sur. (2008), Picot i Lacroix (2004) te Guerin i sur. (2003) objavili povećanje preživljavanja probiotičkih stanica tijekom izlaganja uvjetima gastrointestinalnog trakta, kada su stanice bile mikroinkapsulirane. No, Muthukumarasamy i sur. (2006), Reid i sur. (2005), Favaro-Trindade i Grosso (2002) te Trindade i Grosso (2000) nisu uočili takav zaštitni učinak mikroinkapsulacije.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Mikroinkapsulacija u alginatu pokazala se uspješnom metodom mikroinkapsulacije sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10.
2. Mikroinkapsulirani sojevi *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactococcus lactis* ZG7-10 najbolje preživljavaju proces liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora.
3. Nakon izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, oba liofilizirana mikroinkapsulirana soja su pokazala visoki stupanj preživljavanja, odnosno koncentraciju stanica veću od  $10^8$  CFU/g.
4. RAPD i DGGE analizama je moguće razlikovati bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus*.

## 5. REFERENCE

- Adelene Ai-Lian Song, Lionel L. A. In, Swee Hua Erin Lim, Raha Abdul Rahim (2017) A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory, *Microb. Cell Fact.* **16**, 55.
- Anal, A. K., Singh, H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Technol.* **18** (5), 240–251.
- Anderson, H., Asp, N. G., Bruce, A., Roos, S., Wadstrom, T., Wold, A. (2001) Health effects of probiotics and prebiotics. A literature review on human studies. *Scan.J. Nutr.* **45**, 58–75.
- Annan, N. T., Borza, A. D., Hansen, L. T. (2008) Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.* **41**, 184–193.
- Arena, M. P., Caggianiello, G., Russo, P., Albenzio, M., Massa, S., Fiocco, D. (2015) Functional starters for functional yogurt. *Foods* **4**, 15–33.
- Arena, M. P., Fiocco, D., Massa, S., Capozzi, V., Russo, P. (2014) *Lactobacillus plantarum* as a strategy for an *in situ* production of vitamin B2. *J. Food. Nutr. Disord.* S1, 4.
- Bezkorovainy, A., Miller-Catchpole, R., Kot, E. (1997) Health benefits of *Bifidobacteria*. *Tecnologia Lactea Latinoamericana*; **10**, 34–41.
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., Reinheimer, J. A. (2004) Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *Int. Dairy J.* **14**, 375–387.
- Brownlee, I. A., Allen, A., Pearson, J. P., Dettmar, P. W., Havler, M. E., Atherton, M. R., Onsoyen, E. (2005) Alginate as a source of dietary fiber. *Crit.Rev. Food Sci.* **45**, 497–510.
- Burey, P., Bhandari, B. R., Howes, T., Gidley, M. J. (2008) Hydrocolloid gel particles: Formation, characterization, and application. *Crit. Rev.Food Sci.* **48**, 361–377.

Champagne, C. P. and Kailasapathy, K. (2008) Encapsulation of probiotics. U: Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals, str. 344–369. Garti, N., Ured., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.

Champagne, C. P., Lacroix, C., Sodinigallot, I. (1994) Immobilized cell technologies for the dairy-industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**, 109–134.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M. (2004) An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *J. Microbiol. Meth.* **56**, 27–35.

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

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., de Souza Oliveira, R. P. (2014) Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **64**, 527–536.

Desai, A. (2008) Strain identification, viability and probiotics properties of *Lactobacillus casei*, Ph.D. Thesis, School of biomedical and health sciences. Victoria University, Werribee Campus, Victoria, Australia.

Ding, W. K., Shah, N. P. (2007) Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J. Food Sci.* **72**, 446–450.

F. Nazzaro, F. Fratianni, R. Coppola, A. Sada, P. Orlando (2009) Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *J. Funct. Foods*, **1**, 319–323

FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada: Joint FAO/WHO Working Group, str. 1–11.

Favaro-Trindade, C. S., Grosso, C. R. F. (2002) Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J. Microencapsul.* **19**, 485–494.

Gacesa, P. (1992) Enzymatic degradation of alginates. *Int. J. Biochem.* **24**, 545–552.

- Garcia-Fruitos E. (2012) Lactic acid bacteria: a promising alternative for recombinant protein production. *Microb. Cell Fact.* **11**, 157.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X., Cummings, J. H. (1995) Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, **108**, 975–982.
- Gibson, G. R., Rastall, R. A. (2004) Functional foods. *Bioscience Explained* **2**, 1–7.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125** (6), 1401–1412.
- Gouin, S. (2004) Microencapsulation-industrial appraisal of existing technologies and trend. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 330–347.
- Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L. (2005) Should yogurt cultures be considered probiotic? *Br. J. Nutr.* **93**, 783–786.
- Guarner, F., Schaafsma, G. J. (1998) Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 237–238.
- Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., Salminen, S. (2007) Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile — A preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 228–232.
- Guerin, D., Vuilleumard, J. C., Subirade, M. (2003) Protection of *Bifidobacteria* encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. *J. Food Protect.* **66**, 2076–2084.
- Guidone, A., Zotta, T., Ross, R. P., Stanton, C., Rea, M. C., Parente, E. (2014) Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A multivariate screening study. *LWT- Food Sci. Tech.* **56**, 69–76.
- Gupta, V., Garg, R. (2009) Probiotics. *Ind. J. Med. Microbiol.* **27** (3), 202–209.
- Harish, K. and Varghese, T. (2006) Probiotics in humans: Evidence based review. *Calicut Med. J.* **4** (4), 3.



- Heenan, C. M., Adams, M. C., Hosken, R. W., Fleet, G. H. (2004) Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensmittel. Wissenschaft. and Technol.* **37**, 461–466.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2012) Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications, *Crit. Rev. Food Sci.* **52** (4), 291-311.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 365–373.
- Hubalek, Z. (2003) Protectants Used in the Cryopreservation of Microorganisms. *Cryobiology*, **46**, 205-229.
- Isolauri, E., da Costa Ribeiro, H., Gibson, G., Saavedra, J., Salminen, S., Vanderhoof, J., Varavithya, W. (2002) Functional foods and probiotics: Working group report of the first world congress of pediatric gastroenterology hepatology and nutrition. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* **35**, 106–109.
- Iyer, C., Phillips, M., Kailasapathy, K. (2005) Release studies of *Lactobacillus casei* strain Shirota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in ex vivo porcine gastrointestinal contents. *Lett. in Appl. Microbiol.* **41**, 493–497.
- J. Šušković, B. Kos, J. Beganović, A. Leboš Pavunc, K. Habjanič, S. Matošić (2010) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria, *Food Technol. Biotech.* **48** (3), 296-307.
- Jarocki, P., Podleśny, M., Waśko, A., Targoński, Z. (2010) Differentiation of three *Lactobacillus rhamnosus* Strains (E/N, Oxy, and Pen) by SDS-PAGE and Two – Dimensional Electrophoresis of Surface – Associated Proteins, *J. Microbiol. Biotechn.* **20** (3), 558 – 562.
- Jia, W., Li, H. K., Zhao, L. P., Nicholson, J. K. (2008) Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 123–129.
- Kandil, S., El Soda, M. (2015) Influence of Freezing and Freeze Drying on Intracellular Enzymatic Activity and Autolytic Properties of Some Lactic Acid Bacterial Strains. *Adv. Microb.* **5**, 371-382.

- Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S., Park, H. J. (2008) Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Lwt-Food Sci. Tech.* **41**, 493–500.
- Kim, T. S., Hur, J. W., Yu, M. A., Cheigh, C. I., Kim, K. N., Hwang, J. K., Pyun, Y. R. (2003) Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. FoodProt.* **66**, 3–12.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* **13**(1), 3–13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004) The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **14**, 737–743.
- Leboš Pavunc, A.; Beganović, J.; Kos, B.; Uroić, K.; Blažić, M.; Šušković, J (2012). Characterization and Application of Autochthonous Starter Cultures for Fresh Cheese Production. *Food Technol. Biotech.* **50** (2), 141-151.
- Leboš Pavunc, J. Beganović, B. Kos, A. Buneta, S. Beluhan, J. Šušković (2011) Influence of microencapsulation and transglutaminase on viability of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92 and consistency of set yoghurt, *Int. J. Dairy Technol.* **64** (2), 254-261.
- Lee, K. Y., Heo, T. R. (2000) Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl. Environ. Microb.* **66**, 869–873.
- Li Y., Sperry J.S., Shao M (2009) Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environ. Exp. Bot.* **66**, 341–346.
- Loveleen Kaur Sarao M. Arora (2017) Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review, *Crit. Rev. Food Sci.* **57** (2), 344-371.
- Mandal, S., Puniya, A. K., Singh, K. (2006) Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *Int. Dairy J.* **16**, 1190–1195.
- Marco, M. L., Pavan, S., Kleerebezem, M. (2006) Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr. Opin. Biotech.* **17**, 204–210.

- Martín-Platero M.A., Valdivia E., Maqueda M., Martín-Sánchez I., Martínez-Bueno M.(2008) Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. *Appl. Environ. Microb.* **74**, 18.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., Benno, Y. (2004) H<sup>+</sup>-ATPase activity in *Bi-fidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* **93**, 109–113.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R., Saarela, M. (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* **12**, 173–182.
- Mc Farland, L. (2000) A review of evidence of health claims for biotherapeutic agents. *Microb.Ecol. Health Dis.* **12**, 65–76.
- McMaster, L. D., Kokott, S. A., Slatter, P. (2005) Microencapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World J. Microb. Biot.* **21**, 723–728.
- Ming, L., Rahim, R., Wan, H., Ariff, A. (2009) Formulation of Protective Agents for Improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 Survival Rate Subjected to Freeze Drying for Production of Live Cells in Powderized Form. *Food Bioprocess Tech.* **2**, 431-436.
- Minocha, A. (2009) Probiotics for preventive health. *Nutr. Clin. Pract.* **24**, 227–241.
- Morelli, L. (2000) In vitro selection of probiotic Lactobacilli: A critical appraisal. *Curr. Iss. Intest. Microbiol.* **1**, 59–67.
- Mortazavian, A. M., Azizi, A., Ehsani, M. R., Razavi, S. H., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S. Reinheimer, J. A. (2008) Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink Doogh after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft* **63** (4), 427–429.
- Muthukumarasamy, P., Holley, R. A. (2006) Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *Int. J. Food Microbiol.* **111**, 164–169.
- Muthukumarasamy, P., Ian-Wojtas, P., Holley, R. A. (2006) Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *J. Food Sci.* **71**, 20–24.
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R., Clemens, R. A. (1999) Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci.* **39**, 13–126.

- O’Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., Conway, P. (2001) Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 1059–1066.
- Ouweland, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002) Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 279–289.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., Kim, H. Y. (2006) Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 1171–1185.
- Picot, A., Lacroix, C. (2004) Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy J.* **14** (6), 505–515.
- Poncelet, D., Poncelet, S. B., Beaulieu, C., Neufeld, R. J. (1993) Scale-up of gel bead and microcapsule production in cell immobilization. U: Fundamentals of Animal Cell Capsulation and Immobilization, str. 532–547. Goosen, M. F. A., Ured., CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Reid, A. A., Vuilleumard, J. C., Britten, M., Arcand, Y., Farnworth, E., Champagne, C. P. (2005). Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>2+</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *J. Microencapsul.* **22**, 603–619.
- Round, J. L., Mazmanian, S. K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 313–323.
- Rowley, J. A., Madlambayan, G., Mooney, D. J. (1999). Alginate hydro-gels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* **20** (1), 45–53.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. (2006) Resistant starch: A review. *Compr.Rev. Food Sci. Food Saf.* **5** (1), 1–17.
- Salminen, S. (2001) Human studies on probiotics: Aspects of scientific documentation. *Scand. J. Nutr.* **45**, 8–12.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., Rowland, I. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br.J. Nutr.* **80**, 147–171.

- Salminen, S., von Wright, A. (1998b) Current probiotics-safety assured? *Microb. Ecol. Health D.* **10**, 68–77.
- Sanders, M. E. (2003) Probiotics: Considerations for human health. *Nutr. Rev.* **61**, 91–99.
- Savini, M., Cecchini, C., Verdenelli, M.C., Silvi, S., Orpianesi, C. (2010) Pilot-Scale Production and Viability Analysis of Freeze-Dried Probiotic Bacteria Using Different Protective Agents. *Nutrients*, **2**, 330-339.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W. M. (2005) Probiotic and other functional microbes: From markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotech.* **16**, 204–211.
- Shah, N. P. (2000) Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* **83**, 894–907.
- Shah, N. P., Ravula, R. R. (2000) Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Aust. J. Dairy Technol.* **55**, 139–144.
- Sherman, P. M., Ossa, J. C., Johnson-Henry, K. (2009) Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr. Clin. Pract.* **24**, 10–14.
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T. (1993) Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *J. Food Sci.* **58**, 557–561.
- Siuta-Cruce, P., Goulet, J. (2001) Improving probiotic survival rates. *Food Technol.* **55**, 36 – 42.
- Slover and Danziger (2008) *Lactobacillus*: A review. *Clin. Microbiol. Newsl.* **30** (4), 23 – 27.
- Song, S. H., Cho, Y. H., Park, J. (2003) Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using a microporous glass membrane emulsification system. *J. Food Sci.* **68**, 195–200.
- Tamime, A. Y., Saarela, M., Korslund Sondergaard, A., Mistry, V. V., Shah, N. P. (2005) Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. U: Probiotic Dairy Products, str. 39–71. Tamime, A. Y, Ured., Blackwell, Oxford.
- Trindade, C. S. F., Grosso, C. R. F. (2000) The effect of the immobilisation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Milchwissenschaft.* **55**, 496–499.

X.Y. Li, X.G. Chen, Z.W. Sun, H.J. Park, D.-S. Cha (2011) Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydr.Polym.* **83**, 1479-1485.

Zayed, G., Roos, Y.H. (2004) Influence of Trehalose and Moisture Content on Survival of *Lactobacillus salivarius* Subjected to Freeze-Drying and Storage. *Process Biochem.* **39**, 1081-1086.

Zuidam, N. J., Shimoni, E. (2009) Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. U: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing, str. 3–29. Zuidam, N. J., Nedovic, V., Ured., Springer-Verlag, New York.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

*Emina Nušinić*

Emina Nušinić