

Razvoj liofiliziranog probiotičkog mikroinkapsulata s dodatkom L-askorbinske kiseline

Jurić, Vesna

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:149164>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2020.

Vesna Jurić

1056/N

Razvoj liofiliziranog probiotičkog
mikroinkapsulata s dodatkom
L-askorbinske kiseline

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jadranke Frece te uz pomoć asistenta Denija Kostelca, mag. ing. biotechn.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jadranki Frece na stručnom vodstvu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Posebna zahvala asistentu Deniju Konstelcu, mag. ing. biotechn. na pomoći i brojnim vrijednim savjetima tijekom izvođenja i pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su uvijek bili uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Razvoj liofiliziranog probiotičkog mikroinkapsulata s dodatkom L-askorbinske kiseline

Vesna Jurić, 1056/N

Sažetak: Do danas su dokumentirani višestruki korisni učinci probiotika na zdravlje domaćina. Iako je tržište preplavljeno probiotičkim proizvodima, nerijetko provedene studije pokazuju da dostupni probiotički sojevi ne zadovoljavaju osnovne probiotičke kriterije. Jedan od glavnih kriterija je visoki stupanj preživljavanja tijekom prolaska kroz gastrointestinalni sustav domaćina kako bi se na ciljanom mjestu ispoljili korisni učinci. S obzirom na to da je nužno da probiotici u što većem broju prežive navedene stresne uvjete, često se koriste tehnike koje štite stanice netoksičnim biopolimerima. Primjer primjene takvog matriksa je mikroinkapsulacija u alginatnom nosaču. Uz navedeno, važno je da se pripremljenim proizvodima maksimalno produlji trajnost pa se koriste tehnike liofilizacije koje omogućavaju dulje skladištenje. Uz osnovne probiotičke karakteristike često su poželjne i određene funkcionalne karakteristike. Primjerice, novija istraživanja potiču konzumaciju proizvoda s visokim antioksidacijskim potencijalom zbog mnogobrojnih korisnih učinaka na zdravlje. U ovom radu, korištenjem tehnika mikroinkapsulacije i liofilizacije odabran je najefikasniji način zaštite odabranih probiotičkih bakterija: *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9. Liofilizirani mikroinkapsulati navedenih sojeva pokazali su visok stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava i bili su prikladan nosač L-askorbinske kiseline povećavajući antioksidativni kapacitet pripravka. Određena je bazalna antioksidacijska aktivnost odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline izražena kao sposobnost uklanjanja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Budući da L-askorbinska kiselina iskazuje potencijalnu antimikrobnu aktivnost, istražen je utjecaj na rast odabranih patogenih bakterija: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Listeria monocytogenes* ATCC 2356 te je koncentracija od 50 mg mL⁻¹ značajno inhibirala rast navedenih patogena.

Ključne riječi: probiotici, mikroinkapsulacija, liofilizacija, L-askorbinska kiselina

Rad sadrži: 43 stranice, 15 slika, 4 tablice, 55 literaturnih 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. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: Deni Kostelac, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ksenija Markov
2. Prof.dr.sc. Jadranka Frece
3. Prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak
4. Prof.dr.sc. Jasna Mrvčić (zamjena)

Datum obrane: 21. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

Development of a lyophilized probiotic microencapsulate with the addition of L-ascorbic acid

Vesna Jurić, 1056/N

Abstract: Multiple beneficial effects of probiotics on hosts health have been documented. Although the market is flooded with probiotic products, studies often show that available probiotic strains do not fulfill probiotic requirements. One of the main criteria is a high survival rate during passage through the hosts gastrointestinal system in order to exert beneficial effects at the target site. Since it is necessary for probiotics to survive these stressful conditions, techniques that protect cells with non-toxic biopolymers are often used. An example of the use of such a matrix is microencapsulation in an alginate carrier. In addition to the above, it is important to extend shelf life, so lyophilization techniques are used in order to enable longer storage. In addition to the basic probiotic characteristics, certain functional characteristics are often desirable. For example, recent studies encourage the consumption of products with high antioxidant potential due to the many beneficial health effects. In this paper, using the techniques of microencapsulation and lyophilization, the most effective way of protection of selected probiotic bacteria was selected: *Lactobacillus plantarum* M2 and *Lactobacillus plantarum* KO9. Lyophilized microencapsules of these strains showed a high survival rate in simulated conditions of the gastrointestinal system and were a suitable carrier of L-ascorbic acid increasing the antioxidant capacity of the composition. The basal antioxidant activity of selected strains of lactic acid bacteria expressed as the ability to remove 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals was determined. Since L-ascorbic acid exhibits potential antimicrobial activity, the influence on the growth of selected pathogenic bacteria: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Listeria monocytogenes* ATCC 2356 was investigated and the concentration of 50 mg mL⁻¹ significantly inhibited the growth of these pathogens.

Keywords: probiotics, microencapsulation, lyophilization, L-ascorbic acid

Thesis contains: 43 pages, 15 figures, 4 tables, 55 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. Jadranka Frece, Full professor

Technical support and assistance: Deni Kostelac, MSc

Reviewers:

1. PhD. Ksenija Markov, Full professor
2. PhD. Jadranka Frece, Full professor
3. PhD. Anet Režek Jambrak, Full professor
4. PhD. Jasna Mrvčić, Full professor (substitute)

Thesis defended: 21 September 2020

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	3
2.1.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	4
2.2. PROBIOTICI.....	5
2.2.1. Definicija probiotika.....	5
2.2.2. Izbor probiotičkih sojeva.....	7
2.2.3. Djelovanja probiotika	8
2.3. STABILNOST PROBIOTIČKIH PROIZVODA	13
2.3.1. Liofilizacija	13
2.3.2. Mikroinkapsulacija.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	18
3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije	18
3.1.3. Aparatura i pribor	19
3.2. METODE RADA	20
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	20
3.2.2. Uzgoj mikroorganizama i priprema suspenzije	20
3.2.3. Mikroinkapsulacija probiotičkih sojeva	20
3.2.4. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica	22
3.2.5. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	22
3.2.6. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti odabranih sojeva BMK	23
3.2.7. Mikroinkapsulacija stanica probiotičkih sojeva u alginatu uz dodatak L-askorbinske kiseline.....	24
3.2.8. Određivanje antimikrobne aktivnosti L-askorbinske kiseline na BMK i odabrane patogene	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. MIKROINKAPSULACIJA ODABRANIH SOJEVA BMK.....	25
4.2. LIOFILIZACIJA ODABRANIH SOJEVA BMK	26
4.3. PREŽIVLJAVANJE LIOFILIZIRANIH I MIKROINKAPSULIRANIH SOJEVA BMK U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG SUSTAVA.....	28
4.4. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL <i>L. plantarum</i> M2 I <i>L. plantarum</i> KO9	30

4.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST L-ASKORBINSKE KISELINE NA RAST ODABRANIH SOJEVA BMK I ODABRANIH PATOGENIH MIKROORGANIZAMA	31
5. ZAKLJUČCI	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Gastrointestinalni sustav ljudi sadrži oko 100 trilijuna (100×10^{18}) mikroorganizama čije održavanje homeostaze je važno ne samo zbog apsorpcije hrane nego i regulacije metabolizma te jačanja imunološkog sustava. Pri tomu nam uvelike mogu pomoći probiotici (Eslami i sur., 2019), jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u životinja ili ljudi djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture (Šušković i sur., 1997). U skupinu probiotika spadaju bakterije mliječne kiseline (BMK), bakterije rodova *Bifidobacterium* i *Bacillus* te kvasci (De Melo Pereira i sur., 2018). BMK su gram-pozitivne bakterije kojima je krajnji metabolički produkt fermentacije ugljikohidrata mliječna kiselina (Peng i sur., 2020) te se smatraju sigurnima za korištenje i nose GRAS status (Generally Recognized as Safe) (Burgain i sur., 2014). Da bi izvršili svoj povoljan učinak na domaćina, probiotici moraju zadržati aktivnost tijekom skladištenja, a nakon unosa u organizam preživjeti prolazak kroz želudac i tanko crijevo kako bi u dovoljnom broju stigle do mjesta kolonizacije (Chen i sur., 2017; Harel i Tang, 2014; Li i sur., 2009). S obzirom na navedene prepreke minimalna količina probiotika u proizvodu do isteka roka trajanja trebala bi biti 10^6 - 10^7 CFU mL⁻¹ (Chen i sur., 2017) te su razvijene različite biotehnološke metode zaštite probiotičkih bakterija i produljenja vijabilnosti, od kojih je najznačajnija mikroinkapsulacija (Corona-Hernandez i sur., 2013; Cook i sur., 2012; Islam i sur., 2010; Li i sur., 2009). Mikroinkapsulacija uključuje prevlačenje sloja materijala preko drugog čvrstog, tekućeg ili plinskog materijala kojeg je potrebno zaštititi u različitim nepovoljnim uvjetima. Kod probiotičkih pripravaka se osigurava zaštita stanica tijekom procesa proizvodnje, skladištenja i prolaska kroz želudac te kontrolirano otpuštanje duž crijeva (Arslan-Tontul i Erbas, 2017; Harel i Tang, 2014; Sobel i sur., 2014). Za dugoročno čuvanje bakterijskih kultura često se koristi liofilizacija, proces uklanjanja vode smrzavanjem i sušenjem čime se inhibiraju kemijske i fizikalne reakcije što za posljedicu ima bolje očuvanje i produljenu stabilnost pripravka (Siow i sur., 2016; Kasper i Friess, 2011; Reddy i sur., 2009).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj korištenja tehnika mikroinkapsulacije i liofilizacije te odabir najefikasnijeg načina zaštite odabranih probiotičkih bakterija: *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava. Hrana i dodaci prehrani s visokim antioksidacijskim potencijalom dio su pravilne, uravnotežene prehrane zbog korisnih utjecaja na zdravlje. U ovom radu određena je bazalna antioksidacijska aktivnost odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline izražena kao sposobnost uklanjanja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Istražena je mogućnost

korištenja tehnike mikroinkapsulacije u alginatu kao nosača L-askorbinske kiseline, snažnog antioksidansa. L-askorbinska kiselina iskazuje potencijalnu antimikrobnu aktivnost pa je istražen utjecaj na rast odabranih patogenih bakterija: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Listeria monocytogenes* ATCC 2356.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su gram-pozitivne, nesporogene, štapićaste ili kuglaste stanice kojima je krajnji metabolički produkt fermentacije ugljikohidrata mliječna kiselina (Peng i sur., 2020). Prokarioti su, heterotrofni i kemoorganotrofni organizmi te tvore filogenetsko heterogenu bakterijsku skupinu koja se smatra sigurnom za korištenje te nosi GRAS status (Generally Recognized as Safe) (Burgain i sur., 2014). BMK su neizostavan dio ljudskog gastrointestinalnog trakta te imaju mnoge povoljne učinke na zdravlje ljudi kao što su održavanje zdrave mikroflore crijeva, stimulacija imunološkog sustava, inhibicija rasta patogenih organizama, snižavanje razine kolesterola, poboljšanje iskorištavanja laktoze, sprječavanje dijareje i konstipacije, apsorpcija kalcija i sinteza vitamina (Li i sur., 2009). Neki istraženi sojevi iskazuju antikancerogena svojstva, te mogu biti korisni u liječenju narušene crijevne mikroflore i povećane propusnosti crijeva (Feucht i Kwak, 2013). BMK produkcijom mliječne kiseline u crijevima stvaraju nepovoljne uvjete za rast patogenih bakterija. Mogu sudjelovati u sintezi tiamina, riboflavina, folne kiseline, niacina, i apsorpciji minerala (Islam i sur., 2010).

BMK kao što su *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei* su organizmi koji se najduže primjenjuju u obliku starter kultura i probiotika uglavnom u mliječnim proizvodima (mlačenica, sir, smrznuti deserti, acidofilno mlijeko i jogurt), kao i u drugim prehrambenim proizvodima (čokolada, žitarice, meso i sokovi) (Feucht i Kwak, 2013). Jogurt, sir i kiseli kupus, kruh, šunka i masline, kiseli krastavci, soja i riblji umak zahtijevaju metaboličke aktivnosti BMK (Teusink i Molenaar, 2017).

Povoljni uvjeti za rast BMK uključuju prisustvo šećera, proteina, masti, vitamina i nukleotida. Postoje brojne razlike u potrebama za rast među vrstama i sojevima istih vrsta dok su metionin ili cistein uvijek potrebni, kao i histidin (osim za *Lactobacillus plantarum*), a u većini slučajeva su potrebne i aromatične i razgranate aminokiseline, posebno valin (Teusink i Molenaar, 2017). Vrsta i sastav hrane te okolišni uvjeti kao što su temperatura, pH i ionska snaga utječu na stabilnost bakterija tijekom skladištenja i interakcije bakterija s abiotičkim komponentama koje mogu utjecati na preživljavanje do mjesta djelovanja, na kojem su potrebne (Burgain i sur., 2014).

BMK obuhvaćaju velik broj vrsta koje pripadaju rodovima: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* i *Sporolactobacillus* (Šušković i sur., 1997).

2.1.1. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum je gram-pozitivna, nepokretna, nesporogena, mikroaerofilna i mezofilna bakterija. Stanice su štapići sa zaobljenim krajevima, veličine 0,9–1,2 x 3,0–8,0 µm te se javljaju pojedinačno, u parovima ili u kratkim lancima. *Lactobacillus plantarum* pripada skupini heterofermentativnih laktobacila. Heksoze gotovo u potpunosti pretvara do mliječne kiseline Embden–Meyerhof-Parnas-ovim putem, dok pentoze pretvara u mliječnu i octenu kiselinu (Corsetti i Valmorri, 2012). Prilagodljiva je bakterija mliječne kiseline koja se nalazi u fermentiranom mesu, povrću i mliječnim proizvodima, a uobičajeno se nalazi i u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Veliki broj površinskih proteina sugerira da *L. plantarum* ima potencijal povezivanja s mnogim različitim površinama i potencijalnim supstratima za rast te relativno veliki broj gena koji kodiraju regulatorne funkcije što ukazuje na sposobnost prilagodbe na različite uvjete (De Vries i sur., 2006).

Lactobacillus plantarum pretvara arginin u citrulin, ornitin i amonijak što pridonosi pH homeostazi. Ornitin je prekursor hlapljivih spojeva koji su ključni spojevi arome korice kruha. Benzaldehid nastaje iz fenilpiruvinske kiseline, djelovanjem aminotransferaze na fenilalaninu, u prisustvu visokih koncentracija Mn^{2+} , i doprinosi stvaranju aromatičnih spojeva tijekom zrenja sira (Corsetti i Valmorri, 2012). Pored organskih kiselina, bakterije mliječne kiseline mogu proizvesti brojne inhibitorne spojeve koji djeluju protiv drugih mikroorganizama i mogli bi biti korisni pri očuvanju hrane, a to su bakteriocini, fenil-mliječna kiselina, peptidi i masne kiseline. Bakteriocini su ribosomski sintetizirani proteini ili peptidi koji inhibiraju rast drugih bakterija. Sojevi *L. plantarum* koji proizvode bakteriocine izolirani su iz hrane biljnog i životinjskog porijekla poput žitarica, kiselog tijesta, vina, mesa i mliječnih proizvoda. Glavni antifungalni spojevi nekih *Lactobacillus* spp., uključujući *L. plantarum*, pokazali su inhibicijsku aktivnost protiv *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. i *Aspergillus niger*. BMK proizvode velike količine homoegzopolisaharida i heteroegzopolisaharida koji imaju važnu ulogu u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda pri poboljšanju teksture, viskoznosti i stabilnosti. Bakterije vrste *L. plantarum* proizvode egzopolisaharide tijekom eksponencijalne faze rasta i dosežu maksimum na početku stacionarne faze. Neki sojevi mogu proizvoditi više vrsta egzopolisaharida različite molekulske mase i sastava (Corsetti i Valmorri, 2012).

L. plantarum mogu fermentirati fruktooligosaharide (FOS) koji se ponašaju kao prebiotici, odnosno služe kao hrana probioticima i olakšavaju njihovu kolonizaciju kroz debelo crijevo. Otpornost na djelovanje antibiotika proučavana je na sojevima *L. plantarum* izoliranim iz mliječnih proizvoda od kojih je nekoliko pokazalo širok spektar otpornosti na antibiotike poput tetraciklina, eritromicina, ampicilina, penicilina G, ofloksacina i vankomicina. *L. plantarum* kao probiotik pokazuje prednost nad drugim BMK zbog praktičnosti u proizvodnji, visoke razine genetske dostupnosti i visokih performansi u GI traktu (Corsetti i Valmorri, 2012). Razne studije pokazale su zaštitni učinak *L. plantarum* kod crijevnih infekcija. U pilot studiji na ljudskim ispitanicima, dijareja povezana s *Clostridium difficile* se pojavljuje u manjoj mjeri ukoliko su antibiotici davani u kombinaciji s *L. plantarum* 299v (De Vries i sur., 2006).

Osobe oboljele od celijakije pokazuju osjetljivost na bjelančevinu gluten, odnosno njegovu frakciju glijadin. Kako bi se izbjegle negativne posljedice pri konzumaciji kruha razvijen je probiotik VSL#3 koji sadrži miješane kulture *Lactobacillus plantarum* te druge vrste roda *Lactobacillus*, zatim *Streptococcus thermophilus* i bifidobakterija. Tijekom dizanja tijesta došlo je do hidrolize glijadina, a dobiveni kruh su mogle konzumirati osobe oboljele od celijakije. Biodostupnost dvovalentnih minerala iz pekarskih proizvoda smanjena je zbog prisutnosti antinutrijenata koji ih keliraju, poput fitinske kiseline, pa je korišten mješoviti starter kultura *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus curvatus* čime je postignuto smanjenje količine fitinske kiseline za 80-90 % u kiselom tijestu nakon 12 h fermentacije. Konjugirana linolna kiselina (CLA) pokazala se korisnom pri smanjanju udjela masnog tkiva, pojave ateroskleroze i karcinogeneze. *L. plantarum* može proizvesti znatne količine dva glavna bioaktivna CLA izomera, biokonverzijom linoleinske i ricinoleinske kiseline. Rast i broj bakterija ovisi o pH, koncentraciji soli i količini vlage u skuti te temperaturi zrenja. Brojni sirevi, bilo da su proizvedeni od pasteriziranog ili sirovog kravljeg, ovčjeg ili kozjeg mlijeka, te tradicionalno fermentirano mlijeko i napici na bazi mlijeka sadrže *L. plantarum* (Corsetti i Valmorri, 2012).

2.2. PROBIOTICI

2.2.1. Definicija probiotika

Antibiotici su revolucionarizirali medicinu, njihovo otkriće bilo je prekretnica u ljudskoj povijesti i zahvaljujući tomu spašeni su brojni životi. Nažalost, upotreba ovih lijekova dovela je do brze pojave rezistentnih sojeva (Davies i Davies, 2010). Rezistencija bakterija na

antibiotike postao je važan problem u današnjoj medicini, u što su se uključile i relevantne institucije u Hrvatskoj želeći upozoriti na odgovorno korištenje ovih lijekova kako bi se njihova djelotvornost sačuvala i za buduće generacije. WHO je odavno prepoznala taj problem te se uključila u borbu protiv antibiotske rezistencije nudeći koncept funkcionalne hrane, odnosno probiotički i prebiotički koncept s ciljnim mjestom djelovanja (gastrointestinalni trakt), odnosno na crijevnu mikrofloru (Šušković i sur., 2009).

Riječ probiotik potječe od grčke riječi pro bios (za život) i tijekom godina poprimala je različita značenja. Havenaar i Huis in't Veld (1992) postavljaju konačnu definiciju koja glasi: „Probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene u životinja ili ljudi djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture“ (Šušković i sur., 1997).

Izraz probiotik se odnosi na proizvode koji:

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

Skupini probiotika pripadaju BMK, bakterije rodova *Bifidobacterium* i *Bacillus* te kvasci. Probiotička svojstva su prvo uočena kod bakterija roda *Lactobacillus*, a upravo te bakterije su prevladavajuća skupina BMK u gastrointestinalnom sustavu kod ljudi i životinja. *Bifidobacterium* su heterofermentativne, nepokretne, katalaza negativne i anaerobne bakterije koje mogu metabolizirati glukozu, fruktozu, galaktozu i laktozu. Rodu pripada 30 vrsta, od kojih 10 nalazimo u ljudskom organizmu. Probiotičku aktivnost pokazuju *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* i *B. longum*. Vrste roda *Bacillus* su aerobne i sporogene bakterije zbog čega imaju visoku vijabilnost, međutim *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides* i *B. weihenstephanesis* produciraju enterotoksine što može biti opasno. Kvasci čine veliku heterogenu skupinu eukariotskih mikroorganizama prisutnih u ljudskom gastrointestinalnom traktu, biljkama, zraku i hrani. Imaju visok udio proteina, vitamina B i različitih imunostimulirajućih komponenti kao što su proteaze, β -glukani i

manan oligosaharidi. Prednost kvasaca u odnosu na bakterije je neosjetljivost na antibiotike i dobra podnošljivost uvjeta industrijskih procesa. Europska agencija za sigurnost hrane (European Food Safety Authority - EFSA) dodijelila je kvascu *Saccharomyces boulardii* status kvalificirane pretpostavke sigurnosti (Qualified Presumption of Safety - QPS) te je najučestalije primjenjivan i istraživani probiotički organizam. Potencijalna probiotička aktivnost ostalih kvasaca (*Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces* i *Candida*) i dalje se istražuje (De Melo Pereira i sur., 2018).

2.2.2. Izbor probiotičkih sojeva

Znanstveni temelj za proučavanje probiotičkog koncepta bila je spoznaja da sastav crijevne mikroflore značajno utječe na zdravlje organizma. Da bi se neki mikroorganizam mogao koristiti u probiotičke svrhe, mora zadovoljiti strogu izbornu probiotičku strategiju, a tri glavna aspekta su: opći, tehnološki i funkcionalni. Bakterijski sojevi za probiotičku uporabu, prema ovoj, znanstveno priznatoj strategiji, trebaju zadovoljiti velik broj zahtjeva koji su navedeni u tablici 1 (Šušković i sur., 2009).

Tablica 1. Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva (Šušković i sur., 2009)

Opći kriteriji	1.	Točna taksonomska identifikacija
	2.	Humano podrijetlo za humane probiotike
	3.	Netoksičnost i nepatogenost
	4.	Genetička stabilnost (nema prijenosa plazmida)
	5.	Otpornost prema žučnim solima
	6.	Otpornost prema niskim pH vrijednostima
Tehnološki kriteriji	7.	Stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreve kulture, skladištenja i isporuke
	8.	Visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu (10^6 - 10^8 mL ⁻¹ ili g ⁻¹), npr. 100 g proizvoda osigurava 10^8 - 10^{10} živih stanica
	9.	Brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreve probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije
	10.	Dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad

		su uključeni u fermentacijske procese
Funkcionalni kriteriji	11.	Sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u "ciljanom" području primjene u organizmu
	12.	Sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela
	13.	Produkcija antimikrobnih supstancija, uključujući bakteriocine, vodikov peroksid i organske kiseline
	14.	Antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama
	15.	Mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje proizvodi autohton mikroflora
	16.	Imunomodulacijski učinak
	17.	Sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje

2.2.3. Djelovanja probiotika

Prema općim kriterijima, probiotički pripravci moraju sadržavati sojeve otporne na uvjete u gastrointestinalnom sustavu kako bi preživjeli prolazak kroz želudac i tanko crijevo. Potrebno je zadovoljiti i tehnološke kriterije odnosno odabrani soj mora imati sposobnost adhezije na epitel crijeva i kolonizacije, produkcije antimikrobnih tvari koje djeluju na širok spektar patogenih organizama te je nužna mogućnost preživljavanja tijekom određenog perioda (Khaneghah i sur., 2020). Promjene u sastavu mikroflore crijeva mogu uzrokovati poremećaje gastrointestinalnog sustava, stoga je nužno osigurati homeostazu i onemogućiti utjecaj patogenih organizama. Pri tome važnu ulogu imaju probiotici koji se vežu na crijevni epitel, zatim se povećava proizvodnja mukusa i jača crijevna barijera. Osim fizičke barijere, predloženo je više mehanizama djelovanja probiotika pri inhibiciji rasta nepoželjnih mikroorganizama. Jedan od najznačajnijih je produkcija organskih kiselina i kratkolančanih masnih kiselina koje snižavaju pH crijeva stvarajući nepovoljne uvjete za rast patogenih mikroorganizama. Važni produkti metabolizma probiotika su i vodikov peroksid i bakteriocini

koji doprinose zaštiti domaćina (Khaneghah i sur., 2020). BMK mogu producirati vodikov peroksid (H_2O_2) u prisutnosti kisika čiji se baktericidni učinak može pripisati snažnom oksidacijskom djelovanju na stanicu mikroorganizma i stanične proteine (Šušković i sur., 1997). Bakteriocini su antimikrobne tvari koje imaju bakteriostatska i baktericidna svojstva te inhibiraju razmnožavanje patogena. U fermentiranoj hrani se nalaze zahvaljujući bakterijskim kulturama, a prehrambena tehnologija omogućava dodavanje u hranu. Najznačajniji bakteriocin BMK je nisin kojega produciraju različiti sojevi vrsta *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *Streptococcus brevis*. Nadalje, adhezija probiotičkih organizama onemogućava rast patogenih mikroorganizama jer se blokiraju mjesta pogodna za vezanje patogena. Njihova prednost je u tome što imaju određene adhezijske receptore za stanice mukoze te ostvaruju elektrostatske i hidrofobne veze (Rossoni i sur., 2020). Na taj način se smanjuje pristup patogenim mikroorganizmima stanicama crijeva i onemogućava njihova adhezija, kolonizacija i prodiranje u druge organske sustave. Probiotici se mogu natjecati za mjesta vezanja na epitelu s patogenima i tako spriječiti kolonizaciju crijeva bakterijskim vrstama kao što su *B. vulgatus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* i određeni sojevi *E. coli*. Korištenje različitih probiotičkih sojeva može povećati inhibiciju rasta patogena zbog ostvarivanja više veza s crijevnim epitelom. Probiotičke bakterije i patogeni organizmi se osim za mjesta vezanja natječu i za hranjive komponente, izvor energije i nutrijenata neophodnih za rast. Za patogene bakterije, najvažniji faktor virulencije je proizvodnja toksina, stoga učinkovitost nekih probiotika ovisi upravo o sposobnosti inhibicije toksina i u konačnici obrane domaćina od istih (Khaneghah i sur., 2020). Prehrana, korištenje antibiotika i upalne bolesti crijeva dovode do disbioze, stanja izmjenjenog sastava mikroflore, odmaka od ravnoteže koja može dovesti do promjene stanica epitela crijeva i posljedično do oštećenja DNA, produkcije karcinogenih metabolita, promjene signalizacije β -katenina i proupalnih procesa te inhibicije imunološkog sustava (Gori i sur., 2019). Probiotici osiguravaju homeostazu u crijevima te pokazuju antitumorsku aktivnost. Vrste roda *Lactobacillus* produciraju glutation, superoksid dismutazu i katalazu, faktore koji sprječavaju angiogenezu, stvaranje krvnih žila potrebnih za rast malignih tumora; uzrokuju smanjenje oštećenja DNA, smanjuju upalu i veličinu tumora, sprječavaju ekspresiju tumorskih markera, poliamina i prokarcinogenih enzima. Kratkolančane masne kiseline (SCFAs – Short-chain fatty acids) stimuliraju dijeljenje stanica tankog i debelog crijeva, te njihovu diferencijaciju. Imaju protuupalni učinak i mogu inducirati ili inhibirati autofagiju, stoga sprječavaju proliferaciju stanica raka i potiču apoptozu. Apoptoza, programirana smrt stanice kod stanica tumora ne funkcionira zbog

mutacije transkripcijskih faktora regulatora apoptoze. U istraživanju na životinjskom modelu, odnosno miševima, korišteni su rezistentni sojevi s *Bifidobacterium lactis* i proces apoptoze je pokrenut u prisustvu karcinogenetskih spojeva (Eslami i sur., 2019). Probiotici mogu pokazivati antikancerogena svojstva produkcijom spojeva antikancerogenog djelovanja, vezanjem i razgradnjom potencijalnih mutagena, smanjenjem aktivnosti enzima potrebnih za karcinogenezu, inhibicijom genotoksičnih imunosupresivnih i nefrotoksičnih mikotoksina, sprječavanjem dijeljenja stanica tumora i poticanjem apoptoze. Antitumorsko djelovanje uvelike ovisi o izabranom soju, različiti sojevi pokazuju različitu učinkovitost navedenih mehanizama djelovanja (De Melo Pereira i sur., 2018). Probiotici mogu utjecati na oblikovanje i regulaciju imunološkog odgovora ljudskog organizma te djelovati na upalne procese inhibirajući produkciju jezgrinog faktora kapa B (nuclear factor kapa B - NF- κ B) i na povećanje aktivnosti prirodnoubilačkih stanica (natural killer cells - NK). Nadalje, imunološki sustav zahvaljujući djelovanju probiotika, povećava ekspresiju kostimulirajućih molekula predočnih stanica (antigen presenting cells - APC). Važan mehanizam djelovanja probiotika na imunološki sustav je aktivacija limfocita i produkcija citokina (Chugh i Kamal-Eldin, 2020; Khaneghah i sur., 2020). Oralno unesene probiotičke bakterije ostvaruju interakciju s crijevnim epitelom odnosno imunološkim stanicama lamine proprie preko toll-like receptora (TLR) i uzrokuju produkciju različitih citokina. Djeluju na različite stanice imunološkog sustava, enterocite, dendrite, Th1, Th2 i regulatorne T stanice na temelju čega se javlja proupalni ili protuupalni odgovor (Chugh i Kamal-Eldin, 2020; Rossoni i sur., 2020). Većina mehanizama djelovanja uključuje tkivo-specifičnu regulaciju ekspresije gena, ponajviše u crijevima i u jetri. Izlučivanje mucina na površini epitela doprinosi sprječavanju infekcija, a ekspresija gena za produkciju mucina je pod utjecajem probiotika (Rossoni i sur., 2020).

2.2.3.1. Antioksidacijska aktivnost

Reakcije oksidacije su neophodne za normalno funkcioniranje organizma, međutim pritom nastaju nestabilni, reaktivni slobodni radikali skloni pokretanju lančanih reakcija štetnih za stanice. Abiotički stres uzrokuje nastanak reaktivnih oblika kisika (ROS – Reactive oxygen species) i oštećenja tkiva koja vode do starenja, poremećaja u radu srca i jetre, raka i neurodegenerativnih poremećaja. Antioksidansi sprječavaju pojavu i ublažavaju već razvijene bolesti smanjujući utjecaj oksidanasa (Neha i sur., 2019) tako što hvataju slobodne radikale, ponašaju se kao reducirajuća sredstva, inaktiviraju peroksidaze i keliraju metale (Yang i sur., 2018). Endogeni enzimatski antioksidansi su glutation peroksidaza, superoksid dismutaza i katalaza, endogeni neenzimatski antioksidansi su urična kiselina, lipoična kiselina, bilirubin,

glutation i metatonin. Najznačajniji egzogeni antioksidansi su karotenoidi, vitamini E, A i C te flavonoidi (Neha i sur., 2019). Antioksidansi prekidaju lančane reakcije tako što ulaze u reakcije s međuproduktima, nestabilnim slobodnim radikalima, reduciraju ih i stabiliziraju, međutim pritom se oksidiraju. Jedna molekula antioksidansa može reducirati jednu molekulu slobodnog radikala. S obzirom na to da slobodni radikali nastaju kontinuirano, potrebno je osigurati dovoljnu količinu antioksidanasa koji će štititi ljudski organizam i usporiti kronična oboljenja (Mishra i sur., 2015). Oralno unešeni mikronutrijenti i fitokemikalije se ne apsorbiraju u tijelu u potpunosti, dio prođe kroz probavni sustav neapsorbiran. Bioraspoloživost označava koncentraciju unešene tvari koja dospije do ciljnog organa ili tkiva. Farmakološka definicija bioraspoloživosti obuhvaća nekoliko povezanih procesa: oslobađanje, apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje (liberation, absorption, distribution, metabolism and excretion - LADME). Na bioraspoloživost utječu sastav hrane, kemijska struktura tvari, struktura i količina ostalih unešenih tvari te mukoza crijeva, vrijeme prolaska kroz probavni sustav, brzina želučanog pražnjenja, metabolizam i reakcije konjugacije i vezanja na proteine u krvi i tkivima. S obzirom na to da ovisi o brojnim faktorima, teško ju je precizno odrediti pa je uveden pojam relativna bioraspoloživost koji uspoređuje bioraspoloživosti različitih izvora tvari. Postoje velike individualne razlike u bioraspoloživosti te ona može biti u rasponu od 0 % do 100 % (Holst i Williamson, 2008). Antioksidansi u obliku dodataka prehrani mogu doprinijeti obrani organizma od slobodnih radikala. Probiotici, odnosno BMK, zbog svog antioksidacijskog djelovanja pokazuju potencijal za korištenje u obliku supletmenata i inkorporiranje u funkcionalnu hranu u svrhu očuvanja zdravlja. Istraživanja su pokazala da određeni probiotici povećavaju aktivnost antioksidacijskih enzima i djeluju na cirkulirajući oksidacijski stres (Mishra i sur., 2015). Više sojeva vrsta rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, i *Bifidobacterium longum*) hidrolizom proteina daju peptide koji pokazuju antioksidativno djelovanje *in vitro* i *in vivo*. Redukcija disulfidnih veza i nastajanje -SH skupina, hvatanje slobodnih radikala, keliranje iona metala, regulacija prooksidansa, produkcija glutationa i drugih antioksidanasa doprinosi antioksidativnom djelovanju probiotičkih bakterija. Unos probiotičkih bakterija se povezuje s povećanom aktivnošću antioksidacijskih enzima poput glutation S-transferaze, glutation reduktaze, glutation peroksidaze, superoksid dismutaze i katalaze te smanjenjem oksidativnog stresa (Chugh i Kamal-Eldin, 2020).

Askorbinsku kiselinu ili vitamin C sintetiziraju sve biljke i većina životinja, a za ljude je vitamin, odnosno mikronutrijent koji je potrebno unositi egzogeno, zbog mutacije gena za gulonolakton oksidazu, terminalni enzim na putu sinteze. Manjak vitamina C kod ljudi uzrokuje skorbut koji se može izliječiti jedino unosom samog vitamina. Vitamin C važan je nutrijent koji sudjeluje u održavanju međustaničnih vezivnih tkiva, osteoida, dentina i kolagena. Ima ulogu kofaktora za 15 enzima kod sisavaca, reducirajućeg sredstva i antioksidansa u brojnim kemijskim reakcijama. Potreban je za stvaranje i stabilizaciju trostruke spirale kolagena, pretvorbu folne kiseline u folinsku kiselinu, sintezu dopamina, norepinefrina, epinefrina i karnitina te metabolizam cikličkih nukleotida i prostaglandina. Vitamin C ima potencijalna antioksidacijska svojstva i stabilizira niz drugih spojeva, uključujući vitamin E i folnu kiselinu. Pospješuje apsorpciju željeza redukcijom iz fero oblika u feri oblik koji se lakše apsorbira. Može utjecati na upalni odgovor sudjelujući u metabolizmu prostaglandina, steroidnih hormona nadbubrežne žlijezde i kateholamina (Padayatty i Levine, 2016; Agarwal i sur., 2015). Rezultati istraživanja Linusa Paulinga pokazali su da megadoze vitamina C nemaju značajan utjecaj na prevenciju prehlade, ali imaju umjeren povoljan učinak na trajanje i jačinu prehlade što može biti posljedica antihistaminskog učinka vitamina u farmakološkim dozama (Institute of Medicine, 2000). Zbog nemogućnosti sinteze vitamina C u ljudskom organizmu, unos vitamina C u obliku svježeg voća, povrća ili dodataka prehrani je od presudnog značaja. S obzirom na to da je topljiv u vodi, u potpunosti se apsorbira u gastrointestinalnom traktu i prenosi se u stanice i tkiva, a višak se izlučuje urinom. Koncentracija vitamina C u plazmi ovisi o prehranbenom unosu, apsorpciji u gastrointestinalnom traktu, raspodjeli u tjelesnim tekućinama i unosu u tkiva, iskorištavanju u tijelu te izlučivanju preko bubrega (Padayatty i Levine, 2016; Agarwal i sur., 2015). Preporučeni dnevni unos (RDA - Recommended Dietary Allowances) vitamina C za žene je 75 mg dok za muškarce iznosi 90 mg (Institute of Medicine, 2000).

Vitamin C ima važnu ulogu u mehanizmima za očuvanje zdravlja organizma kao što su antimikrobna aktivnost i utjecaj na odgovor domaćina na uzročnike infekcija (Wintergerst i sur., 2005). Već oko 100 godina poznata je antimikrobna aktivnost vitamina C na *Mycobacterium tuberculosis*, uzročnika tuberkuloze što je ustanovljeno *in vivo* istraživanjima na zamorcima. Različite koncentracije vitamina C pokazuju potencijalno antimikrobno djelovanje na oportunističke patogene bakterije kao što su *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i sprječavanje stvaranja biofilmova meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (Mousavi i sur., 2019).

U *in vitro* istraživanju na modelu pilećeg probavnog sustava, vitamin C je pokazao antibakterijski učinak na *Salmonella enteritidis*. Studije koje su proučavale rast *Enterococcus faecalis* u prisustvu vitamina C, pokazale su različite rezultate. Vitamin C je imao neznatan utjecaj na rast *Escherichia coli* ATTC 11775, no u kombinaciji s mliječnom kiselinom inhibirao je rast *E. coli* O157:H7. Antibakterijska aktivnost vitamina C ovisi o bakterijskom soju i koncentraciji vitamina (Mousavi i sur., 2019).

2.3. STABILNOST PROBIOTIČKIH PROIZVODA

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

2.3.1. Liofilizacija

Liofilizacija ili sušenje smrzavanjem je metoda sušenja kojom se uklanja voda procesima sublimacije i desorpcije u svrhu očuvanja i produljenja stabilnosti hrane, bioloških i farmaceutskih proizvoda (Siow i sur, 2016; Kasper i Friess, 2011). Inhibiraju se ili dovoljno usporavaju kemijske i fizikalne reakcije razgradnje, što rezultira poboljšanom stabilnošću i jednostavnim rukovanjem tijekom otpreme i skladištenja. Proces se sastoji od tri koraka: zamrzavanje, primarno sušenje i sekundarno sušenje. Tijekom zamrzavanja, tekuća faza se hladi, nastaju centri nukleacije i formiraju se kristali leda što uzrokuje izdvajanje većine vode u kristale (Kasper i Friess, 2011) i koncentriranje otopljene tvari u otopini (Broeckx i sur., 2016). Primarno sušenje označava uklanjanje nastalog leda sublimacijom i traje dok se udio

vode u pripravku ne smanji na 7-8 %. Potrebno je da tlak koji se primjenjuje u uređaju bude niži od tlaka pare na površini pripravka koji se liofilizira. Sekundarnim sušenjem se izdvaja vezana voda procesom desorpcije, obično na povišenoj temperaturi i niskom tlaku da bi se omogućio željeni niski udio vlage (Broeckx i sur., 2016; Siow i sur., 2016; Kasper i Friess, 2011). Kako bi se zaštitile probiotičke bakterije od mehaničkog i osmotskog stresa, mogu se dodati krioprotektori i lioprotektori. Krioprotektori su topljivi u vodi i snižavaju temperaturu ledišta vode. Prilikom nastanka kristala stanice se zbijaju u nezamrznutu frakciju koja se dodatkom krioprotektora povećava što daje više prostora probioticima i smanjuje mogućnost mehaničkog oštećenja. Lioprotektori štite stanice tijekom faze sušenja čuvajući integritet stanične membrane (Broeckx i sur., 2016).

Liofilizacija, smrzavanje i sušenje raspršivanjem neke su od najkorisnijih tehnika konzerviranja hrane, poljoprivrednih proizvoda i lijekova s time da je liofilizacija najprikladnija metoda za dugoročno čuvanje bakterijskih kultura i često se koristi za očuvanje BMK starter kultura uključenih u fermentaciju mlijeka i hrane (Reddy i sur., 2009). U prehrambenoj industriji najčešće se koriste metode sušenja raspršivanjem, sušenja u dehidratorima, sušarama i konvekcijskim pećima što je ekonomski isplativo, ali se provode pri visokim temperaturama što je štetno za komponente osjetljive na toplinu, poput proteina pa se u farmaceutskoj industriji češće provodi liofilizacija zbog nužne visoke kvalitete proizvoda. Prednosti liofilizacije nad drugim metodama sušenja su stabilnost i dobro otapanje liofiliziranog pripravka, korištenje niskih temperatura i minimalna oštećenja stanica uzrokovana temperaturom te poboljšanje mehaničkih svojstava liofiliziranog pripravka (Siow i sur., 2016). Glavni nedostaci tehnike liofilizacije su dugo vrijeme potrebno za provođenje postupka i visoka cijena (Broeckx i sur., 2016).

2.3.2. Mikroinkapsulacija

Tijekom procesiranja i skladištenja hrane probiotičke bakterije su izložene oksidativnom stresu, promjenama temperature i pH vrijednosti (Corona-Hernandez i sur., 2013) što utječe na smanjenje broja bakterija pa Međunarodna mljekarska federacija preporučuje da bi minimalna količina probiotika u proizvodu do isteka roka trajanja trebala biti 10^6 - 10^7 CFU mL^{-1} (Chen i sur., 2017). Fermentirani mliječni proizvodi su jako osjetljivi na kvarenje zbog visokog aktiviteta vode (a_w) i dostupnosti hranjivih tvari (Corona-Hernandez i sur., 2013). Kako bi se poboljšalo preživljavanje BMK, predloženi su različiti pristupi koji povećavaju otpornost tih osjetljivih mikroorganizama na nepovoljne uvjete, uključujući odgovarajući izbor sojeva otpornih na kiseline i žuči, korištenje spremnika koji ne propuštaju kisik,

fermentacije u dva koraka, prilagodbe stresu, uključivanje mikronutrijenata kao što su peptidi i aminokiseline te mikroinkapsulacija (Li i sur., 2009). Zbog nekoliko fizikalno-kemijskih promjena koje se događaju tijekom pripreme i skladištenja probiotičke hrane i zbog složenog metabolizma koji ima svaki soj, potrebno je primijeniti nekoliko prehrambenih tehnologija kako bi se jamčilo preživljavanje probiotika. Tehnologija imobilizacije stanica, poput mikroinkapsulacije, može smanjiti izloženost bakterija fizikalno-kemijskim stresorima (Corona-Hernandez i sur., 2013).

Inkapsulacijom se probiotici štite u različitim nepovoljnim uvjetima, osiguravajući zaštitu stanica tijekom procesa proizvodnje, skladištenja i prolaska kroz želudac te kontrolirano otpuštanje duž crijeva (Arslan-Tontul i Erbas, 2017; Harel i Tang, 2014). Provodi se prevlačenjem sloja materijala preko drugog čvrstog, tekućeg ili plinskog materijala. U prehrambenoj industriji različiti sastojci hrane mogu se pohraniti unutar prevlake ili matrice u cilju zaštite, kontroliranja oslobađanja, produljenja roka trajanja namirnice, kontroliranja reakcija oksidacije te maskiranja okusa, boja i mirisa. Inkapsulacije u rasponu od 100 nm do 1000 nm klasificiraju se kao mikroinkapsulacije dok se komponente između 1 nm i 100 nm nazivaju nanokapsulama (Arslan-Tontul i Erbas, 2017; Sobel i sur., 2014). Nužno je da unutarnja faza i prevlaka međusobno ne reagiraju niti se otapaju jedna u drugoj, stoga se za hidrofobne tvari poput jestivog ulja i masti koristi hidrofilni materijal za inkapsulaciju, a to mogu biti različiti polisaharidi (šećer, škrob, dekstrin, celuloza, guma arabika, alginat, karagenan i pektin), proteini (proteini soje, pšenice i kukuruza, želatina i kazein) te polimeri. Analogno, u sustavima u kojima je potrebno inkapsulirati hidrofilnu tvar, kao matrica ili prevlaka se koristi hidrofobni materijal odnosno lipidi (mast, hidrogenizirane masti, gliceridi, fosfolipidi, masne kiseline i biljni steroli), voskovi (pčelinji vosak i parafin) te polimeri. Kontrolirano otpuštanje se postiže primjenjujući saznanja o okidačima koji dovode do pokretanja mehanizma otpuštanja, a to mogu biti korištenje različitih otapala, promjena temperature, udjela vlaga, tlaka i pH te primjena enzima. Enzimi i promjena pH koriste se kao okidači za oslobađanje kada se neka tvar mora isporučiti u određenom dijelu gastrointestinalnog trakta (usta, želudac, tanko crijevo ili debelo crijevo) (Sobel i sur., 2014).

2.3.2.1. Metode mikroinkapsulacije

Za povećanje vijabilnosti probiotičkih mikroorganizama naširoko korištene tehnike mikroinkapsulacije mikroorganizama su tehnika emulzije i ekstruzijska tehnika (Arslan-Tontul i Erbas, 2017).

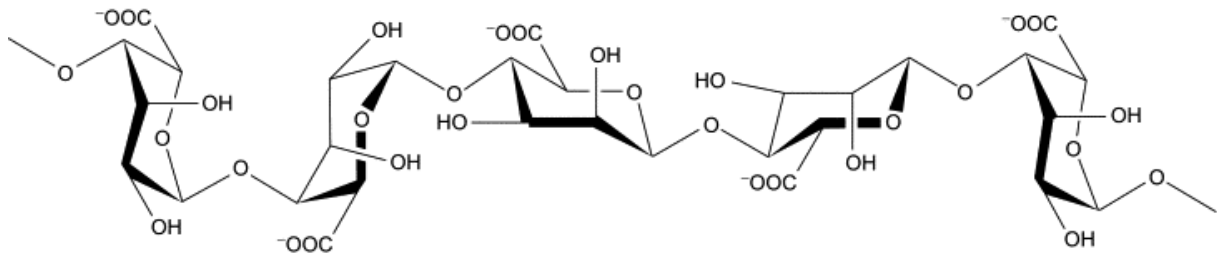
Tehnika emulzije se provodi emulgiranjem otopine mješavine hidrokoloidnih stanica (diskontinuirana faza) u biljno ulje (kontinuirana faza). Kada se formira emulzija vode u ulju, dispergirana mješavina hidrokoloidnih stanica prevodi se u netopljivi oblik i formira male kuglice unutar uljne faze. Mikrokapsule se skrućuju dodavanjem otopine CaCl_2 u emulziju tijekom miješanja (Feucht i Kwak, 2013).

Ekstruzijska tehnika je jedna od najstarijih i najčešće korištenih tehnika za proizvodnju hidrokoloidnih kapsula, a uključuje istiskivanje materijala za oblaganje i sastojka koji se treba inkapsulirati kroz mlaznicu pri visokim tlakom. Ova metoda je poznata i kao "metoda kapljica" i koristeći ju moguće je povećati stopu preživljavanja probiotika do 95 % (Feucht i Kwak, 2013). Ekstruzijska tehnika se obično primjenjuje pomoću šprice i igle, ali se koriste i sustavi za prskanje, poput vibrirajućih mlaznica, mlaznica za atomiziranje zraka i rotirajućeg diska za atomiziranje. Upotreba sustava za prskanje smanjuje veličinu mikrokapsula u odnosu na korištenje igala, od milimetarske veličine do nekoliko stotina mikrometara (Cook i sur., 2012). Postupak ide tako da se u suspenzija mikroorganizama dodaje hidrokoloid poput natrijevog alginata i nakon toga se otopina ekstrudira kroz špricu ili iglu za oblikovanje kapljica u otopinu kalcijeva klorida koja služi kao otopina za stvrdnjavanje. Tako nastaju trodimenzionalne rešetke polimera koje se umrežavaju ionima kalcija, a stanice su zarobljene unutar istih. Ova je metoda jeftina, jednostavna i lako se provodi, blaga je prema stanicama, tako da je njihovo oštećenje minimalno i održivost relativno visoka (Kavitake i sur., 2018; Feucht i Kwak, 2013). Ekstruzijska tehnika može dati jednolike oblikovane mikrokapsule za razliku od emulgiranja. Promjer mikrokapsula je od 0,3 mm do 3,0 mm, a ovisi o otopini za stvrdnjavanje, viskoznosti smjese i promjeru otvora kroz koji prolazi. Što se tiče prinosa inkapsulacije, metoda ekstrudiranja jedna je od najučinkovitijih tehnika s gotovo 100 %-tnom učinkovitošću, no preživljavanje stanica nakon postupka sušenja raspršivanjem relativno je nisko zbog štetnih uvjeta, kao što su zagrijavanje i primjena mehaničke sile u ovom procesu. Ekstruzijska metoda se često koristi za inkapsulaciju BMK iako njenom primjenom nastaju samo relativno velike kapsule. Najveća mana ove tehnike je što nije pogodna za masovnu proizvodnju zbog sporog formiranja kapsula (Feucht i Kwak, 2013).

2.3.2.2. Alginat

Polimerni materijali se često koriste za inkapsulaciju probiotika jer mogu formirati snažnu gel matricu koja zadržava bakterije zajedno s drugim spojevima za očuvanje te omogućavaju kontrolirano otpuštanje. Primjer takvog materijala je alginat od kojeg jednostavnim postupkom nastaju mikrokapsule (Harel i Tang, 2014). Pronalazimo ga u staničnoj stijenci i

matriksu stanica smeđih morskih algi gdje ima važnu strukturnu ulogu mehaničke zaštite i fleksibilnosti (Borazjani i sur., 2017). Alginati su linearni polimeri sastavljeni od β -D-manuronske kiseline (M) i α -L-guluronske kiseline (G), povezanih (1-4)-glikozidnim vezama (slika 1). Omjeri G i M blokova variraju ovisno o vrstama alge i njihov uzorak određuje fizikalno-kemijska svojstva alginata, naime alginati s niskim omjerom M:G proizvode guste i krhke gelove, dok visoki omjeri M:G alginata tvore elastične gelove (Rostami i sur., 2017).



Slika 1. Struktura alginata (Kariduraganavar i sur., 2014)

Promjene omjera i slijeda građevnih blokova, molekulske mase i karboksilnih skupina značajno utječu na reološka svojstva alginata (Borazjani i sur., 2017). Alginatni gelovi su stabilni u otopinama niskog pH, ali nabubre u slabo bazičnim otopinama pa se alginatna prevlaka može upotrijebiti za zaštitu lijekova i bakterija od kiselosti želučanog soka, dok se dovoljno brzo razgrade u uvjetima višeg pH i koncentracije fosfata koje nalazimo u crijevima (Harel i Tang 2014; Annan i sur., 2008). Guluronska kiselina djeluje vrlo snažno s dvovalentnim kationima, tvoreći spoj nalik "kutiji jaja", što rezultira stvaranjem umreženih alginatskih makromolekula pa se to svojstvo koristi kod ekstruzijske tehnike. Na makroskopskoj razini nastaje hidrogelni matriks s vrlo poželjnim svojstvima, zbog čega je koristan pri inkapsulaciji bakterija, matičnih stanica i biomaterijala (Cook i sur., 2012). Kada se pH snizi ispod pKa vrijednosti D-manuronske i L-glukuronske kiseline (3,6 i 3,7), alginat se pretvara u alginsku kiselinu uz oslobađanje kalcijevih iona i stvaranje gušćeg gela zbog gubitka vode, a pritom zarobljene stanice i/ili lijekovi i dalje ostaju u mikrokapsulama (Annan i sur., 2008).

Alginat je pogodan za inkapsulaciju bakterija zbog jednostavnosti i blagih uvjeta rukovanja, niske cijene, biokompatibilnosti, Generally Recognized as Safe (GRAS) statusa te netoksičnosti za bakterije i domaćina (Kavitake i sur. 2018; Harel i Tang, 2014; Cook i sur., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Probiotički sojevi *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9, korišteni u postupcima mikroinkapsulacije i liofilizacije, dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije

3.1.2.1. Hranjive podloge

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

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar sastava (g L^{-1} destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Na-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, no bez dodatka agara.

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj test-mikroorganizama:

- HA (hranjivi agar), sastava (g L^{-1} destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K_3PO_4 0,3; agar 18. pH vrijednost podloge je 7,3; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121°C tijekom 15min.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao i hranjivi agar, samo bez dodanog agara.

3.1.2.2. Kemikalije

- etanol, 70 %, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- kalcijev klorid, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- kalijev klorid, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- koncentrirana kloridna kiselina, „Carlo Erba Reagents“, Španjolska
- mononatrijev fosfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- natrijev alginat, „Sigma“, St. Louis, SAD
- natrijev dihidrogenfosfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska

- natrijev citrat dihidrat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- natrijev hidrogenkarbonat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- natrijev sulfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- pankreatin, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- pepsin, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- urea, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- žučne soli, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD

3.1.3. Aparatura i pribor

- automatske pipete, „Eppendorf“, Enfield, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica, „Tecan“, Männedorf, Švicarska
- kivete, „Eppendorf“, Enfield, SAD
- laboratorijske čaše
- laboratorijske epruvete i stalci
- lijevak za odjeljivanje
- liofilizator, model Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Osterode am Harz, Njemačka
- magnetska miješalica MS-H-S DLAB
- menzure (10, 50, 100 i 1000 mL)
- mikrotitarske pločice (s 96 jažica)
- petrijeve zdjelice
- pH-metar „Mettler Toledo“, Zürich, Švicarska
- spektrofotometar, „Helios β UV-Vis Unicam“, Cambridge, UK
- stalci za epruvete
- termostat, „Sutjeska“, Beograd, Srbija
- uređaj za centrifugu Z 206 A „Hermle“, Njemačka
- vaga analitička „Sartorius“, Göttingen, Njemačka
- vibro-mješač EV-102, „Tehtnica“ Podplat, Slovenija

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Probiotički sojevi *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 čuvani su u MRS tekućoj hranjivoj podlozi pri + 4 °C, u hladnjaku. Precjepljivani su svakih 14 dana i inkubirani pri 37 °C.

3.2.2. Uzgoj mikroorganizama i priprema suspenzije

Prekonoćne kulture *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 uzgojene su pri 37 °C u MRS bujonu. Stanice su centrifugirane pri 6000 o/10 min, a zatim isprane uz ponovnu centrifugu 2 puta s 9 mL sterilne vode te je isprana biomasa resuspendirana u sterilnoj deioniziranoj vodi formirajući konačnu suspenziju.

3.2.3. Mikroinkapsulacija probiotičkih sojeva

3.2.3.1. Mikroinkapsulacija stanica probiotičkih sojeva u alginatu

Natrijev alginat (3 %) dodan je u 15 mL suspenzije svježe biomase *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9. Suspenzija bakterijskih stanica i alginata postupno je dodavana u 70 mL 2 %-tne otopine za stvrdnjavanje (otopina CaCl₂) uz miješanje na magnetskoj miješalici (slika 2). Formiranje mikrokapsula bakterijskih stanica u alginatu odvijalo se tijekom 20 min te su mikroinkapsulirane bakterijske stanice isprane u sterilnoj destiliranoj vodi.



Slika 2. Mikroinkapsulacija *Lactobacillus plantarum* M2 u 3 %-tnom alginatu

3.2.3.2 Određivanje broja živih mikroorganizama u suspenziji indirektnom metodom

Iz uzorka koji sadrži bakterijske stanice pripremljena su decimalna razrjeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi. MRS hranjiva podloga u Petrijevoj zdjelici nacijepljena je sa 100 μL šestog, sedmog i osmog decimalnog razrjeđenja. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su izrasle kolonije i izračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka (CFU mL^{-1}).

3.2.3.3. Određivanje broja živih mikroorganizama u mikrokapsulama indirektnom metodom

Alginatne mikrokapsule su depolimerizirane u 20 mL sterilne 2 %-tne otopine Nacitrata na magnetskoj miješalici. Broj stanica je određen indirektnom metodom, odnosno nacijepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u sterilnoj destiliranoj vodi na MRS hranjivu podlogu u Petrijevoj zdjelici. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su izrasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica po mililitru uzorka (CFU mL^{-1}).

3.2.3.4. Određivanje učinkovitosti mikroinkapsulacije

Broj stanica prije i poslije mikroinkapsulacije određivan je indirektnom metodom, a zatim je izračunata učinkovitost mikroinkapsulacije (EY) prema sljedećem izrazu (Annan i sur., 2008):

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

Gdje je:

N_0 = broj stanica u biomasi

N = broj mikroinkapsuliranih stanica u alginatu

3.2.4. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica

Bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 uzgojene u MRS hranjivoj podlozi su centrifugirane (10 min pri 6000 o/min), isprane sterilnom destiliranom vodom i resuspendirane u obranom mlijeku u prahu (10 %). Tako priređena suspenzija stanica svježe biomase je zamrznuta na -20 °C preko noći, a zatim liofilizirana u liofilizatoru (model Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka). Priređene mikroinkapsulirane stanice *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 također su zamrznute na -20 °C preko noći prije nego što su podvrgnute procesu liofilizacije. Preživljavanje slobodnih i mikroinkapsuliranih stanica nakon liofilizacije određivano je indirektnom metodom.

3.2.5. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

3.2.5.1. Priprava simuliranog želučanog i soka tankog crijeva

Simulirani uvjeti usne šupljine ostvareni su u obliku otopine različitih soli: KCl (0,8946 g L⁻¹), NaH₂PO₄ (0,8878 g L⁻¹), Na₂SO₄ (1,680 g L⁻¹), NaHCO₃ (1,680 g L⁻¹) i CO(NH₂)₂ (0,1981 g L⁻¹) kojoj je pH podešen na 6,83 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g L⁻¹) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 g L⁻¹), KCl (0,8946 g L⁻¹), NaH₂PO₄ (0,8878 g L⁻¹), Na₂SO₄ (1,680 g L⁻¹), NaHCO₃ (1,680 g L⁻¹), CO(NH₂)₂ (0,1981 g L⁻¹) kojoj je pH podešen na 3,03 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g L⁻¹) i žučnih soli (3,0 g L⁻¹) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 g L⁻¹), KCl (0,8946 g L⁻¹), NaH₂PO₄

(0,8878 g L⁻¹), Na₂SO₄ (1,680 g L⁻¹), NaHCO₃ (1,680 g L⁻¹), CO(NH₂)₂ (0,1981 g L⁻¹) kojoj je pH podešen na 7,09 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

3.2.5.2. Preživljavanje liofiliziranih i liofiliziranih mikroinkapsuliranih stanica bakterija mliječne kiseline tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta

Liofilizat i liofilizirane mikrokapsule bakterija *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 dodani su u otopinu koja simulira uvjete usne šupljine te ostavljeni stajati 5 minuta nakon čega su centrifugirani i odliven je supernatant. Svježoj biomasi dodan je simulirani želučani sok u kojem su stajali 2 sata. Ponovljen je postupak centrifugiranja i odlijevanja te je dodan simulirani sok tankog crijeva u kojem su liofilizat i liofilizirane mikrokapsule bakterija *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 stajali 2 sata. Broj živih stanica određivan je nakon 5 min stajanja liofilizata u otopini koja simulira uvjete usne šupljine, nakon 2 h stajanja liofilizata u otopini koja simulira uvjete želučanog soka te nakon 2 h stajanja liofilizata u otopini koja simulira uvjete u tankom crijevu. Zadržavanje stanica unutar mikrokapsula određivano je nakon 5 min stajanja liofiliziranih mikrokapsula u otopini koja simulira uvjete usne šupljine, nakon 2 h stajanja mikrokapsula u otopini koja simulira uvjete želučanog soka te nakon 2 h stajanja mikrokapsula u otopini koja simulira uvjete u tankom crijevu.

3.2.6. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti odabranih sojeva BMK

1 mL pripremljene stanične kulture (~10⁸ CFU) dodan je u 2 mL etanolne otopine DPPH radikala (0,07 mM). Otopina je dobro izmiješana i prebačena na inkubaciju 30 minuta u mraku. Uzorak je potom centrifugiran 10 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 517 nm (spektrofotometar, „Helios β UV-Vis Unicam“, Cambridge, UK). Za mjerenje je napravljena slijepa proba koja sadrži samo etanol i stanice, dok su kontrole uključivale deioniziranu vodu i otopinu DPPH. Preostali DPPH postotak uklanjanja radikala izračunat je:

$$\text{postotak uklanjanja radikala (\%)} = [1 - (A_{uz} - A_{bl}/A_c)] \times 100$$

gdje je:

A_{uz} = apsorbancija uzorka

A_{bl} = apsorbancija slijepa probe

A_c = apsorbancija kontrolnog uzorka

Korišteni standard je L-askorbinska kiselina (20 mg L⁻¹).

3.2.7. Mikroinkapsulacija stanica probiotičkih sojeva u alginatu uz dodatak L-askorbinske kiseline

Natrijev alginat (3 %) i L-askorbinska kiselina (20 mg mL⁻¹) dodani su u 15 mL suspenzije svježe biomase *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9. Suspenzija bakterijskih stanica, alginata i L-askorbinske kiseline postupno je dodavana u 60 mL 2 %-tne otopine za stvrdnjavanje (otopina CaCl₂) uz miješanje na magnetskoj miješalici. Formiranje mikrokapsula bakterijskih stanica u alginatu odvijalo se tijekom 20 min te su mikroinkapsulirane bakterijske stanice isprane u destiliranoj vodi.

3.2.8. Određivanje antimikrobne aktivnosti L-askorbinske kiseline na BMK i odabrane patogene

Antimikrobna aktivnost L-askorbinske kiseline prema bakterijama mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 te prema patogenima *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 27853 i *Listeria monocytogenes* ATCC 2356 određivana je koristeći turbidimetrijsku metodu.

Po 240 µL hranjivog bujona i MRS bujona različitih koncentracija L-askorbinske kiseline (13,3; 25 i 50 mg mL⁻¹) i 10 µL suspenzije prethodno uzgojenog mikroorganizma dodano je u jažice mikrotitarske ploče. Tijekom 48 h inkubacije (2, 4, 5, 24, 29 i 48 h za bakterije mliječne kiseline i 3, 6, 24 i 48 h za patogene bakterije) pri 37 °C mjerena je apsorbancija pri 620 nm uz pomoć čitača mikrotitarskih ploča. Promatran je rast mikroorganizama i određena je inhibicija prema sljedećem izrazu:

$$\text{postotak uklanjanja radikala (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100$$

gdje je:

A_t = apsorbancija u vremenu t

A_0 = apsorbancija u vremenu t=0

Kontrolni uzorci su sadržavali inokulirani bujon i MRS bujon bez dodatka L-askorbinske kiseline, a slijepe probe su bili uzorci bez dodatka mikroorganizama.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu bakterijski sojevi *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 zaštićeni su slojem alginata koristeći tehnike mikroinkapsulacije te su podvrgnuti liofilizaciji u obliku svježe biomase i u mikroinkapsuliranom obliku kako bi se zaštitili na dulje vrijeme tijekom skladištenja. Ispitana je uspješnost mikroinkapsulacije i liofilizacije te preživljavanje svih pripremljenih oblika u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava. Nadalje, kako su odabrani sojevi BMK pokazali slabu do umjerenu bazičnu razinu antioksidativne aktivnosti pripremljeni su mikroinkapsulati koji su uz željeni broj bakterija sadržavali L-askorbinsku kiselinu (20 mg mL^{-1}) koja je standard antioksidativne aktivnosti i ispitano je djelovanje spomenute kiseline na BMK te mogućnost obogaćivanja mikroinkapsulata radi postizanja zadovoljavajuće antioksidativne aktivnosti.

4.1. MIKROINKAPSULACIJA ODABRANIH SOJEVA BMK

Bakterijske stanice svježe biomase probiotičkih *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 mikroinkapsulirane su u 3 %-tnom alginatu. Određen je početni broj živih stanica (N_0) i broj bakterijskih stanica nakon mikroinkapsulacije svježe biomase u alginatu (N), te je izračunata učinkovitost mikroinkapsulacije (EY) (tablica 2).

Tablica 2. Učinkovitost mikroinkapsulacije *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 u 3 %-tnom alginatu izražena kao broj stanica po gramu mikroinkapsulata te kao konačan postotak uspješnosti

Bakterijski soj	N_0	N	$\log N_0$	$\log N$	EY (%)
<i>L. plantarum</i> M2	$2,6 \cdot 10^9$	$7,9 \cdot 10^8$	9,41	8,90	94,58
<i>L. plantarum</i> KO9	$2,9 \cdot 10^9$	$5,1 \cdot 10^8$	9,46	8,71	92,24

Postupak mikroinkapsulacije oba istraživana soja bio je uspješan te je uspješnost mikroinkapsulacije u oba slučaja iznad 90 %, a broj stanica po gramu mikroinkapsulata zadovoljava tehnološke probiotičke kriterije. Mikroinkapsulacija je prikazana na slici 2, a pripremljene mikrokapsule na slici 3. Usporedive vrijednosti ostvarili su i Zanjani i sur. (2014) provodeći alginatnu i kitozansku dvoslojnu mikroinkapsulaciju probiotičkih bakterija *Lactobacillus casei* i *Bifidobacterium bifidum* uz uspješnost mikroinkapsulacije također iznad 90 %. Slično navedenom, Holkem i sur. (2016) uspješno su mikroinkapsulirali probiotički soj

Bifidobacterium Bb-12 u alginatni nosač uz uspješnost od približno 90 % što smatraju izvrsnim u usporedbi s ostalim istraživanjima u kojima je korištena ova metodologija postižući uspješnost mikroinkapsulacije redom od 50 % i 70 % (Song i sur., 2013; Zou i sur., 2011).

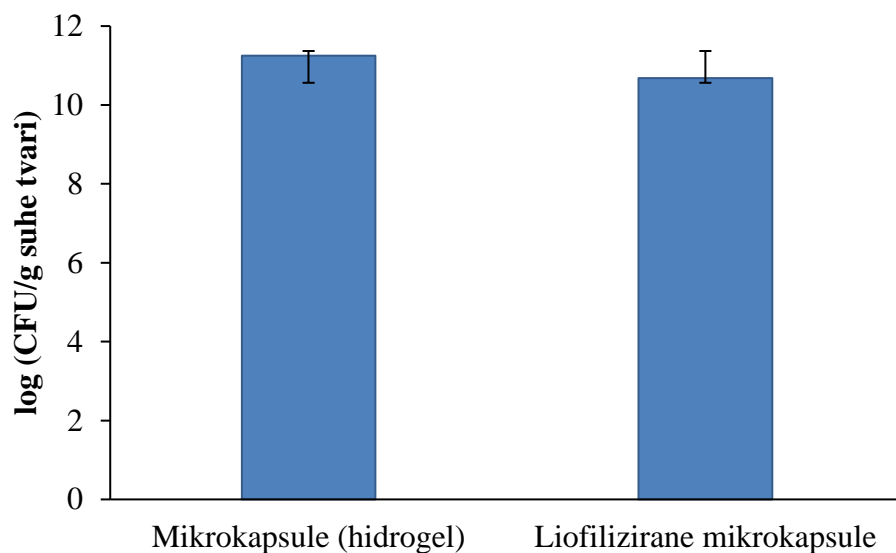


Slika 3. *Lactobacillus plantarum* M2 mikroinkapsuliran u 3 %-tnom alginatu

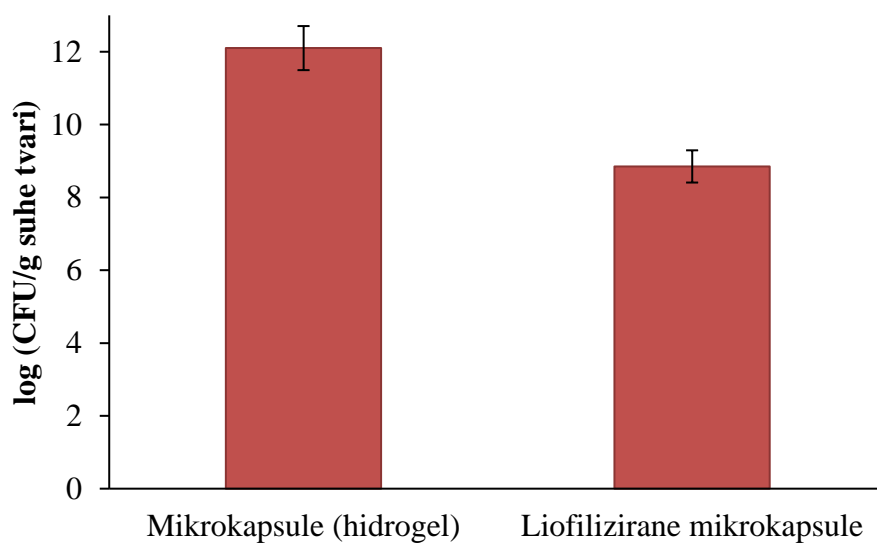
Rezultati ovog istraživanja nedvojbeno pokazuju potencijal istraživanih sojeva kao objekata mikroinkapsulacije omogućavajući zaštitu stanica uz visoku uspješnost mikroinkapsulacije. Ukoliko bi se kao takvi koristili u probiotičkim pripravcima *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 ispunjavaju kriterije preživljenja procesa kapsuliranja u dovoljnom broju za ispunjavanje probiotičkih kriterija.

4.2. LIOFILIZACIJA ODABRANIH SOJEVA BMK

Provedena je liofilizacija dvaju sojeva BMK: *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9. Odabrani sojevi uspješno su liofilizirani u slobodnom obliku i u prethodno mikroinkapsuliranom obliku. Kod svih liofilizata određeno je preživljavanje nakon rehidracije radi izračuna uspješnosti procesa. Na slikama 4 i 5 prikazane su usporedbe neliofiliziranih mikroinkapsulata i liofiliziranih mikrokapsula te bakterijski sadržaj izražen po gramu mikrokapsula (suhe tvari).



Slika 4. Broj živih stanica *Lactobacillus plantarum* M2, izražen kao log (CFU g⁻¹ suhe tvari) ± SD neliofiliziranih i liofiliziranih alginatnih mikroinkapsulata



Slika 5. Broj živih stanica *Lactobacillus plantarum* KO9, izražen kao log (CFU g⁻¹ suhe tvari) ±SD neliofiliziranih i liofiliziranih alginatnih mikroinkapsulata

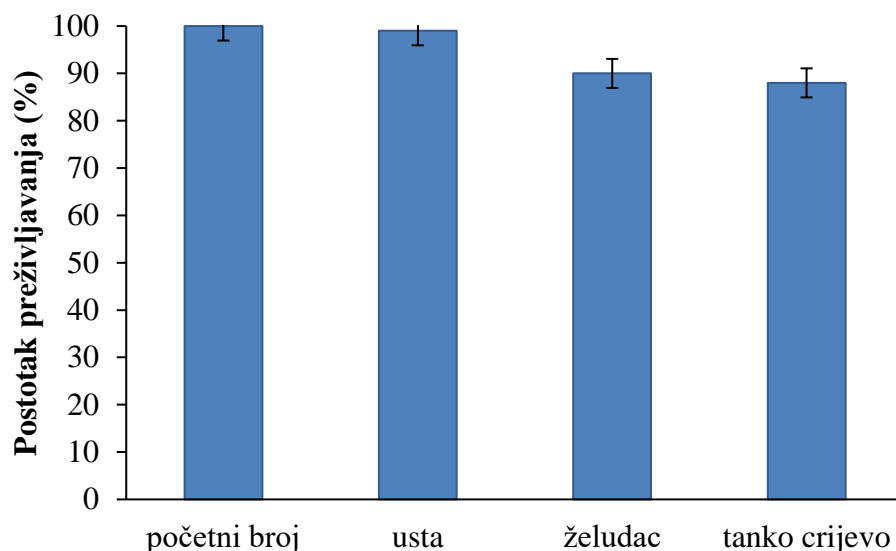
Tablica 3. Učinkovitost liofilizacije mikroinkapsuliranih stanica *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 izražena kao srednja vrijednost log (CFU g⁻¹ suhe tvari) trostrukog pokusa i postotak uspješnosti

	log (CFU g ⁻¹ suhe tvari)		Uspješnost liofilizacije (%)
	Mikrokapsule (hidrogel)	Liofilizirane mikrokapsule	
<i>L. plantarum</i> M2	11,25	10,68	94,93
<i>L. plantarum</i> KO9	12,1	8,85	73,14

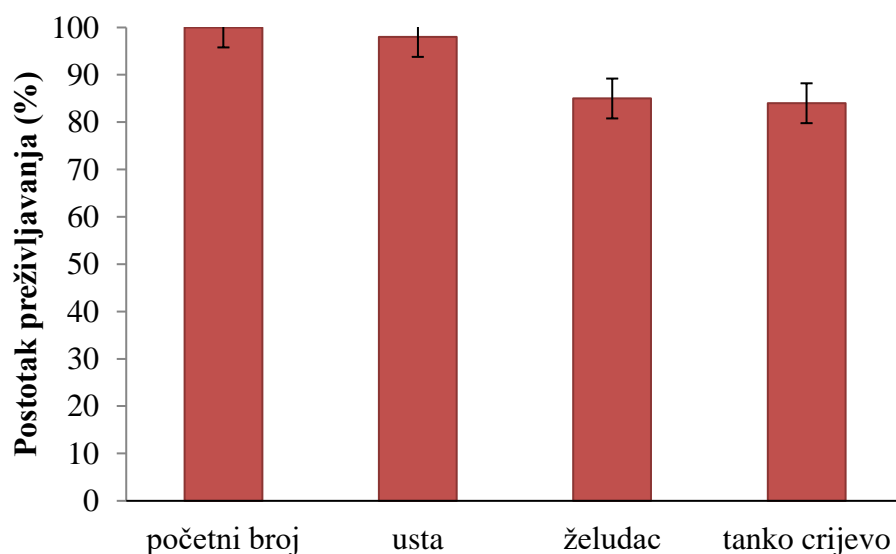
U oba slučaja proces liofilizacije je na 73 - 95 % uspješnosti. Unatoč stresnim uvjetima za stanicu, liofilizacija BMK često se provodi te se, ukoliko je potrebno, dodaju lioprotektori. Uspješna liofilizacija omogućava visok stupanj preživljenja korisnih mikroorganizama i dulje vrijeme skladištenja. Uspješnost varira obzirom na zaštitni medij tijekom liofilizacije. Istraživanje Bolla i sur. (2011) pokazalo je značajne razlike u preživljavanju BMK nakon liofilizacije u prisutnosti različitih protektora. *Lactobacillus plantarum* M2 iskazuje minimalan gubitak živih stanica tijekom procesa liofilizacije dok je prilikom liofilizacije mikroinkapsulata *L. plantarum* KO9 primijećen statistički značajan pad. Primijećeni pad je u skladu s dostupnom literaturom gdje se pojavljuju različite razine preživljenja od 63 % do 95 % ovisno o liofiliziranom soju i samoj tehnici zaštite prilikom liofilizacije (De Giulio i sur., 2005). Unatoč redukciji broja broj stanica po gramu mikroinkapsulata oba testirana soja zadovoljavaju tehnološke probiotičke kriterije o broju živih stanica u pripravku te su time zadovoljili uvjete za daljnje testiranje. Rezultati ovog istraživanja pokazuju visok stupanj preživljenja liofilizacije bakterija ukomponiranih u mikrokapsule te ukazuju na protektivnu ulogu alginata što je usporedivo s rezultatima De Giulio i sur., (2005) gdje je demonstriran protektivni učinak kalcijevog alginata tijekom liofilizacije bakterija mliječne kiseline.

4.3. PREŽIVLJAVANJE LIOFILIZIRANIH I MIKROINKAPSULAIRANIH SOJEVA BMK U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG SUSTAVA

Ispitano je preživljavanje stanica probiotičkih sojeva *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9, nakon što su liofilizirane odnosno mikroinkapsulirane u alginatu i liofilizirane, u simuliranim uvjetima usne šupljine, simuliranom želučanom soku te u simuliranom soku tankog crijeva koji sadrži sok gušterače i žuč. Rezultati su prikazani na slici 6 za *Lactobacillus plantarum* M2, na slici 7 za *Lactobacillus plantarum* KO9.



Slika 6. Preživljavanje liofiliziranih stanica *Lactobacillus plantarum* M2 u simuliranim uvjetima usne šupljine, simuliranom želučanom soku te simuliranom soku tankog crijeva



Slika 7. Preživljavanje liofiliziranih stanica *Lactobacillus plantarum* KO9 u simuliranim uvjetima usne šupljine, simuliranom želučanom soku te simuliranom soku tankog crijeva

Oba soja iskazala su visoki stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava. Na slikama 6 i 7 vidljiv je pad broja stanica u uvjetima želuca i tankog crijeva što se može objasniti ekstremnim uvjetima niskog pH i žučnih soli. Iako rezultati ukazuju na pad broja, važno je napomenuti da se radi o vrlo malom padu te da je ukupno preživljavanje zadovoljavajuće za probiotičku primjenu jer rezultira velikim brojem živih stanica na ciljanoj mjestu djelovanja. Mogućnost prolaska kroz gastrointestinalni

sustav u velikom broju živih stanica nužan je probiotički atribut koji je i preduvjet kasnijeg koloniziranja ciljanih dijelova gastrointestinalnog sustava i omogućavanja funkcionalnog djelovanja. Iako nužan, kriterij preživljavanja nije uvijek zadovoljen. Primjerice, Caillard i suradnici (2017) su testirali nekoliko probiotičkih pripravaka dostupnih na tržištu koji su pokazali značajnu redukciju u broju prilikom izlaganja uvjetima gastrointestinalnog sustava.

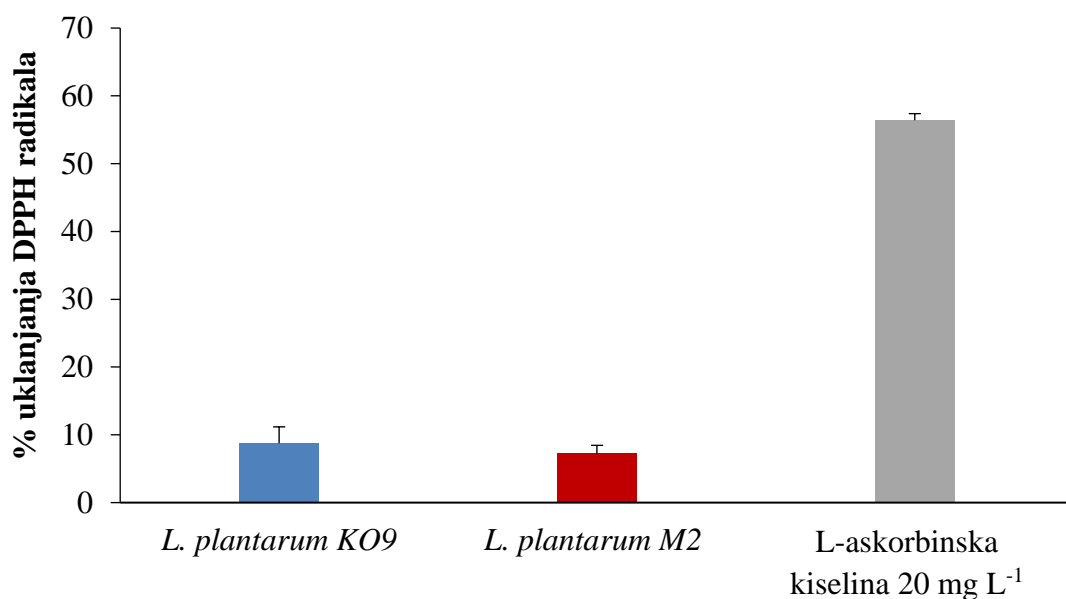
Iako su rezultati liofiliziranih stanica demonstrirali zadovoljavajuće preživljavanje, kao dio ovog istraživanja ispitana je i sposobnost zadržavanja u liofiliziranim alginatnim mikrokapsulama. Rezultati su prikazani u tablici 4 i ukazuju na pružanje potpune zaštite bakterijskim stanicama u pripremljenim kapsulama. Rezultati su iskazani kao zadržavanje stanica u kapsulama što je jednako preostalim živim stanicama na kraju izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava.

Tablica 4. Zadržavanje stanica *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 u liofiliziranim alginatnim mikrokapsulama tijekom izloženosti simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava

	<i>Lactobacillus plantarum</i> M2		<i>Lactobacillus plantarum</i> KO9	
	CFU mL ⁻¹	postotak zadržavanja u kapsulama (%)	CFU mL ⁻¹	postotak zadržavanja u kapsulama (%)
početni broj u liofiliziranim mikrokapsulama	4,8 · 10 ¹⁰	/	7 · 10 ¹⁰	/
usta (5 min)	4,8 · 10 ¹⁰	99,9	6,9 · 10 ¹⁰	98,6
želudac (2 h)	4,5 · 10 ¹⁰	93,8	6,7 · 10 ¹⁰	95,7
tanko crijevo (2 h)	4,4 · 10 ¹⁰	91,7	6,6 · 10 ¹⁰	94,3

4.4. ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL *L. plantarum* M2 I *L. plantarum* KO9

Ponekad se unos probiotičkih bakterija povezuje s povećanom aktivnošću antioksidacijskih enzima poput glutathion S-transferaze, glutathion reduktaze, glutathion peroksidaze, superoksid dismutaze i katalaze te smanjenjem oksidativnog stresa. U ovom radu određena je ukupna antioksidacijska aktivnost *L. plantarum* KO9 i *L. plantarum* M2. Kao standard korištena je L-askorbinska kiselina (20 mg L⁻¹). Rezultati sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala prikazani su na slici 8.

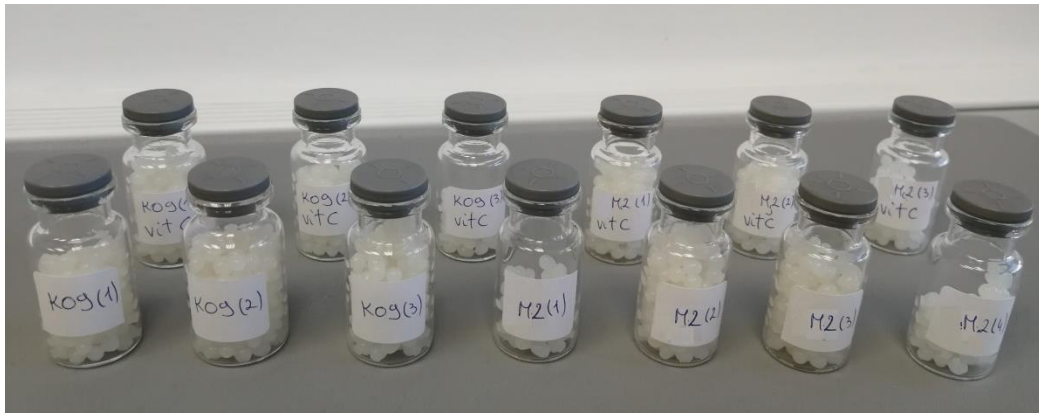


Slika 8. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala pomoću *L. plantarum* KO9 i *L. plantarum* M2 izraženo kao postotak redukcije prisutnih radikala u reakcijskoj smjesi ± standardna devijacija trostrukog eksperimenta

Rezultati ukazuju na slabi antioksidacijski kapacitet u usporedbi sa standardnim jakim antioksidansom (L-askorbinska kiselina), no potrebno je uzeti u obzir da se radi o bazalnom antioksidativnom potencijalu jer bakterijske stanice nisu prethodno izložene oksidacijskom stresu te potencijal indukcije antioksidativne aktivnosti nije istražen u ovom radu. Također, treba uzeti u obzir i broj stanica u suspenziji. U ovom istraživanju broj stanica u korištenoj suspenziji bio je otprilike 10^8 stanica po mililitru, a rezultati su usporedivi s Li i sur. (2008) koji su pokazali značajnu redukciju antioksidativnog potencijala bakterije *L. plantarum* kada je broj stanica u suspenziji reduciran s 10^{10} na 10^9 stanica po mililitru.

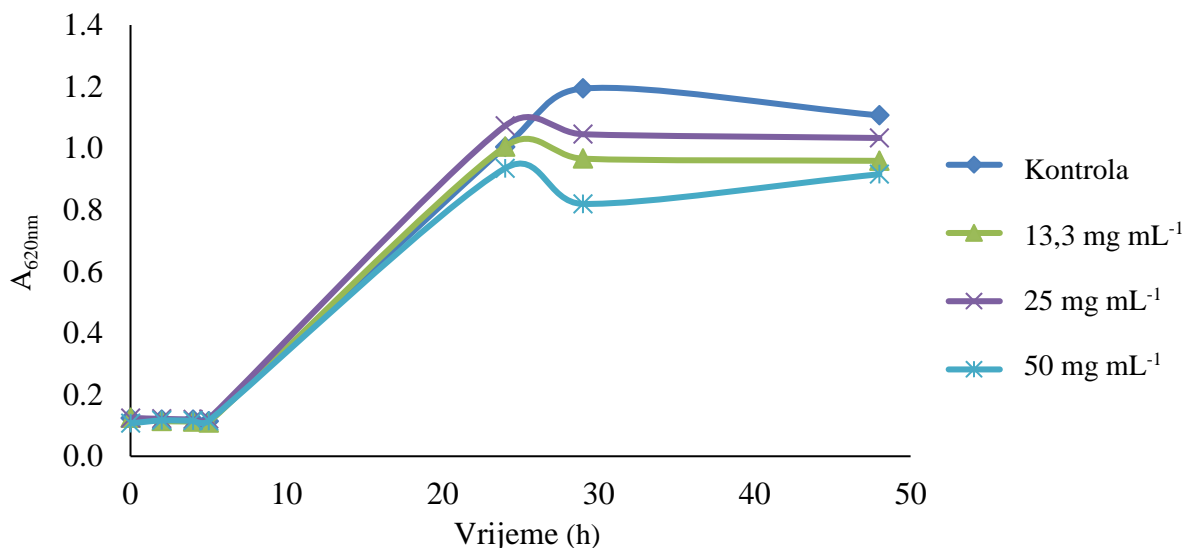
4.5. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST L-ASKORBINSKE KISELINE NA RAST ODABRANIH SOJEVA BMK I ODABRANIH PATOGENIH MIKROORGANIZAMA

Unatoč navedenim razlozima nižeg antioksidativnog kapaciteta daljnji pokusi provedeni kao dio ovog rada usmjerili su se na jačanje antioksidativnog kapaciteta potencijalnih probiotičkih pripravaka. Korišteni su istraživani sojevi u obliku liofiliziranih mikroinkapsulata koji su u tom obliku pokazali najveću otpornost na uvjete gastrointestinalnog trakta te je u ponovno pripremljene liofilizirane mikrokapsule dodana L-askorbinska kiselina kako bi se povećala antioksidativna sposobnost. Pripremljene alginatne mikrokapsule *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 uz dodatak vitamina C prikazane su na slici 9.

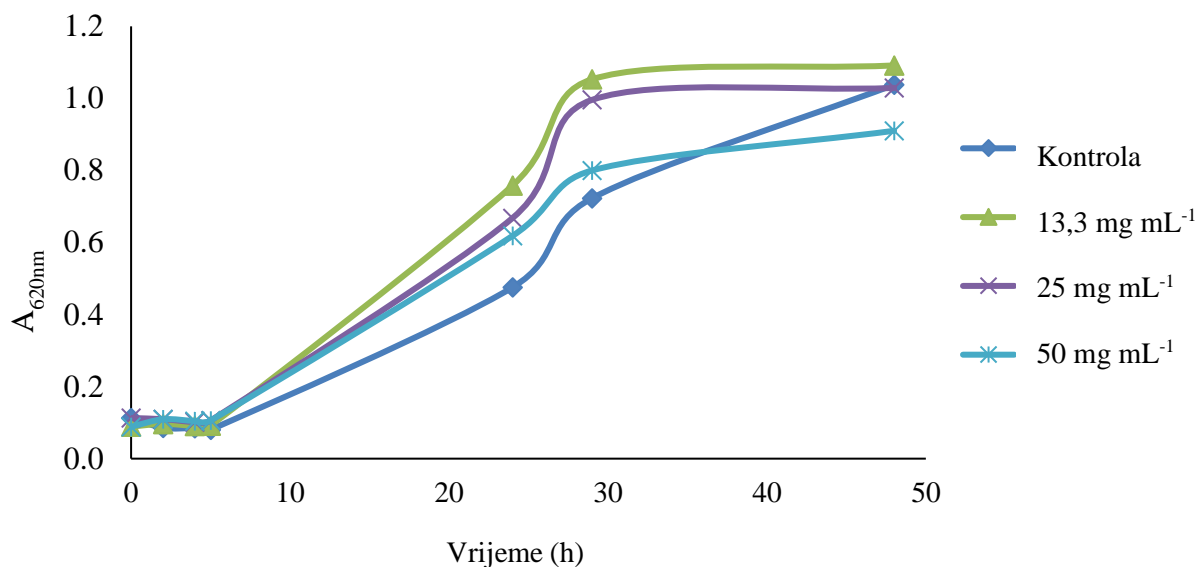


Slika 9. *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 mikroinkapsulirani u 3 %-tnom alginatu uz dodatak L-askorbinske kiseline (20 mg mL^{-1})

Mikroinkapsulacija L-askorbinske kiseline u alginatni nosač je istražena i pouzdanost takvog postupka je dokazana (Barra i sur., 2019), a takvi pripravci su pokazali zadovoljavajuću stabilnost prilikom pravilnog skladištenja kroz dulje vrijeme (Thangaraj i sur., 2015). Važna razlika između takvih pripravaka i probiotičkih kapsula s dodanom L-askorbinskom kiselinom je mogući utjecaj različitih koncentracija L-askorbinske kiseline na preživljavanje i rast odabranih sojeva BMK. Spomenuti utjecaj je ispitan turbidimetrijskom metodom, a rezultati su prikazani na slikama 10 i 11.



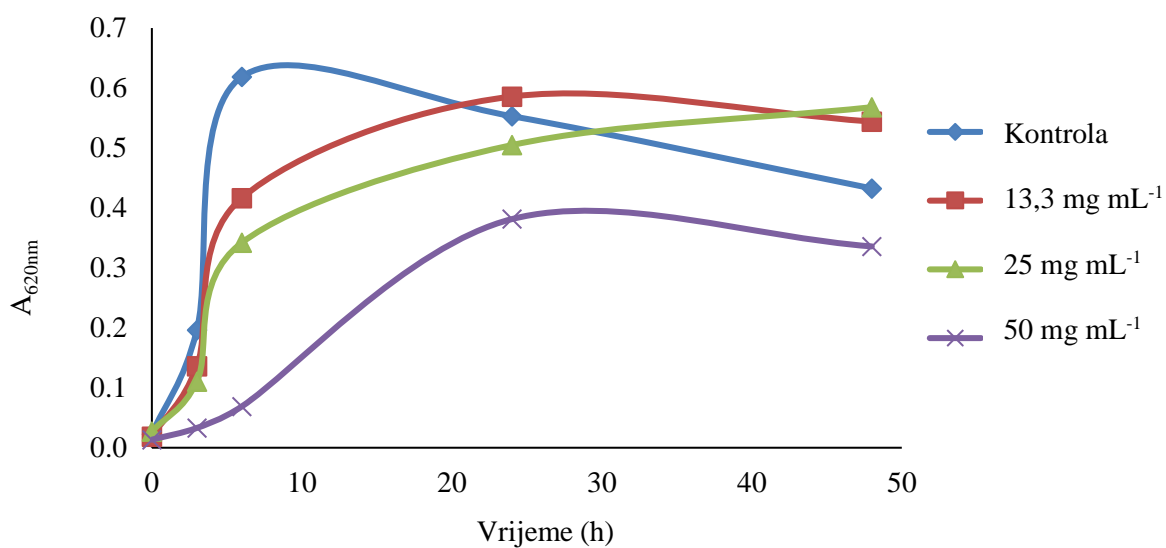
Slika 10. Krivulja rasta *Lactobacillus plantarum* M2 pri koncentracijama L-askorbinske kiseline od $13,3 \text{ mg mL}^{-1}$, 25 mg mL^{-1} i 50 mg mL^{-1} izražena kao apsorbancija na 620 nm u ovisnosti o vremenu



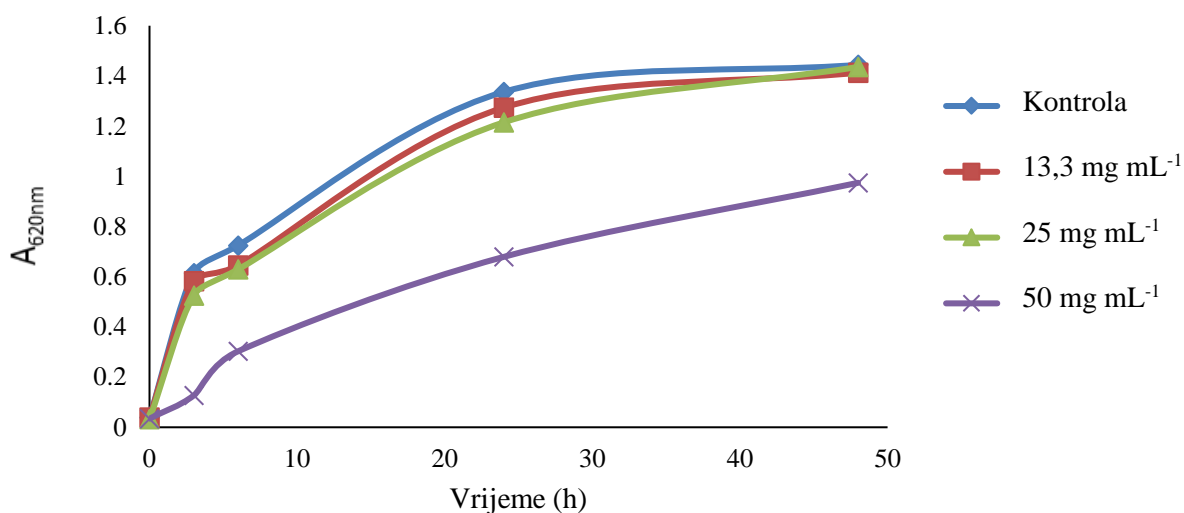
Slika 11. Krivulja rasta *Lactobacillus plantarum* KO9 pri koncentracijama L-askorbinske kiseline od 13,3 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹ i 50 mg mL⁻¹ izražena kao apsorbancija na 620 nm u ovisnosti o vremenu

Rezultati pokazuju da je prisutna niska inhibicija rasta kod najviših koncentracija L-askorbinske kiseline (50 mg mL⁻¹). Ostale vrijednosti su na granici statističke značajnosti te se može smatrati da njihov utjecaj nije značajan prilikom kombinacije spomenute kiseline i BMK u navedenim koncentracijama. Kombinacija L-askorbinske kiseline i probiotika kao pripravka nije strana te su eksperimentalno dokazana dodatna korisna djelovanja takvih preparata čak i u humanim studijama (Garaiova i sur., 2015). Rezultati ovog istraživanja i dostupne literature svakako ukazuju na veliki potencijal dodatka vitamina u probiotičke preparate pa tako i u slučaju pojačanog antioksidativnog učinka.

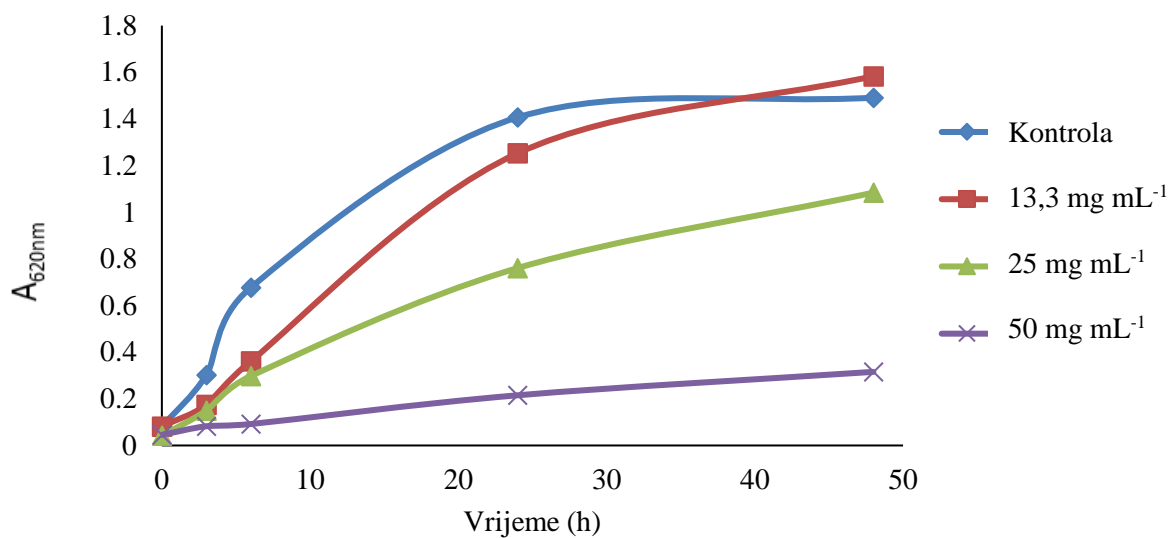
Nadalje, s obzirom na to da spomenute kombinacije pokazuju višestrukost korisnih učinaka postavlja se pitanje antimikrobnog djelovanja L-askorbinske kiseline na patogene mikroorganizme. Sojevi BMK korišteni u ovom istraživanju prethodno su demonstrirali snažnu antimikrobnu aktivnost na spektar patogenih mikroorganizama i time zadovoljili taj probiotički kriterij (Kostelac i sur., 2020), stoga je u ovom istraživanju ispitana antimikrobna aktivnost L-askorbinske kiseline na četiri patogena mikroorganizma: *Salmonella* Typhimurium ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 2356. Rezultati su prikazani na slikama 12-15.



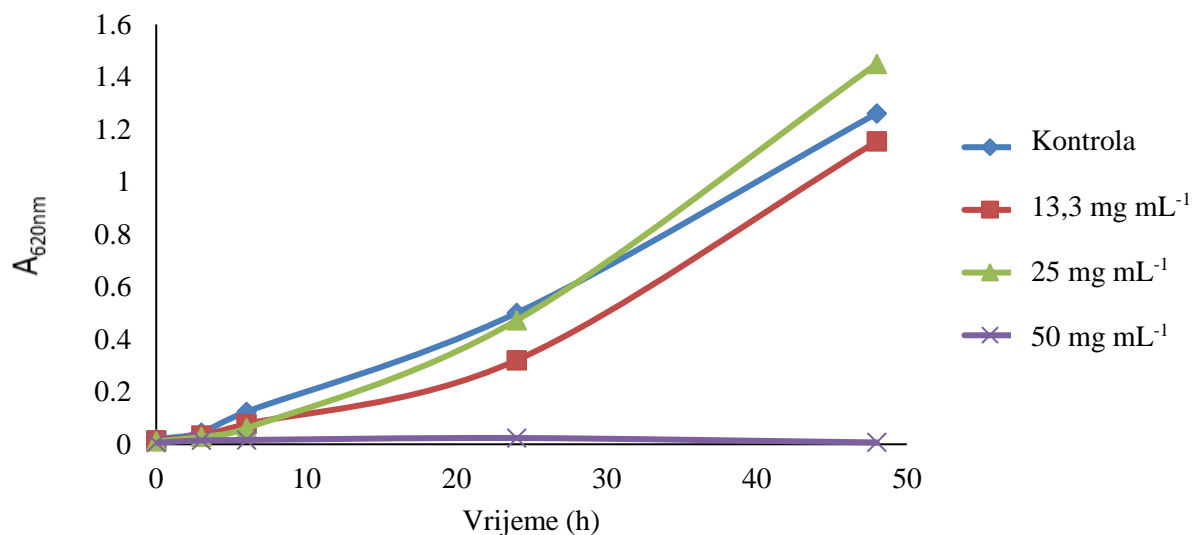
Slika 12. Krivulja rasta bakterije *Salmonella* Typhimurium ATCC 27853 pri koncentracijama L-askorbinske kiseline od 13,3 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹ i 50 mg mL⁻¹ izražena kao apsorbancija na 620 nm u ovisnosti o vremenu



Slika 13. Krivulja rasta bakterije *Escherichia coli* ATCC 25922 pri koncentracijama L-askorbinske kiseline od 13,3 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹ i 50 mg mL⁻¹ izražena kao apsorbancija na 620 nm u ovisnosti o vremenu



Slika 14. Rast patogene bakterije *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pri koncentracijama L-askorbinske kiseline od 13,3 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹ i 50 mg mL⁻¹ izražena kao apsorbancija na 620 nm u ovisnosti o vremenu



Slika 15. Rast patogene bakterije *Listeria monocytogenes* ATCC 2356 pri koncentracijama L-askorbinske kiseline od 13,3 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹ i 50 mg mL⁻¹ izražena kao apsorbancija na 620 nm u ovisnosti o vremenu

Ono što je vidljivo iz rezultata jest da je inhibicija maksimalna i značajna pri koncentraciji L-askorbinske kiseline od 50 mg mL⁻¹. Stupanj inhibicije varira, a maksimalan je kod *L. monocytogenes* ATCC 2356 čiji je rast onemogućen u ispitivanim uvjetima. Niže koncentracije nisu značajno inhibirale rast istraživanih mikroorganizama što ukazuje na pretpostavku kako je inhibicija ovisna o koncentraciji. Antimikrobna aktivnost L-askorbinske kiseline prethodno je dokazana na više patogenih mikroorganizama no daljnje studije o mehanizmima djelovanja su neophodne (Mousavi i sur., 2019). Antioksidansi, uključujući i askorbinsku kiselinu, pokazali su značajnu djelotvornost u inhibiciji patogenih bakterija, no i antiviralnu aktivnost (Tajkarimi i sur., 2011). Najznačajnija inhibicija dostignuta u ovom istraživanju je inhibicija *L. monocytogenes* ATCC 2356 i *S. aureus* ATCC 25923. Inhibiciju *S. aureus* ATCC 25923 pomoću askorbinske kiseline su istraživali i Kallio i sur. (2012) te su zaključili kako je značajna inhibicija rezultat promjene metabolizma *S. aureus* uzrokovane askorbinskom kiselinom koju smatraju netoksičnom alternativom inhibicije rasta patogena.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata ovog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Mikroinkapsulacija u alginatu uspješno je primijenjena za oba probiotička soja: *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 s učinkovitošću iznad 90 %, a broj stanica po gramu mikroinkapsulata zadovoljava tehnološke probiotičke kriterije.
2. Istraživani sojevi bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 uspješno su liofilizirani u slobodnom obliku i u prethodno mikroinkapsuliranom obliku sa 73 - 95 % uspješnosti. Tijekom procesa liofilizacije *Lactobacillus plantarum* M2 iskazuje minimalan gubitak živih stanica, dok je prilikom liofilizacije mikroinkapsulata *Lactobacillus plantarum* KO9 primijećen statistički značajan pad, no oba testirana soja zadovoljavaju tehnološke probiotičke kriterije o broju živih stanica po gramu probiotičkog pripravka.
3. U *in vitro* simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava oba soja iskazala su visoki stupanj preživljavanja u liofiliziranom (88 % za *Lactobacillus plantarum* M2 i 84 % za *Lactobacillus plantarum* KO9) i liofiliziranom i mikroinkapsuliranom obliku (91,7 % za *Lactobacillus plantarum* M2 i 94,3 % za *Lactobacillus plantarum* KO9).
4. Istraživani probiotički sojevi *Lactobacillus plantarum* M2 i *Lactobacillus plantarum* KO9 pokazali su nisku bazalnu antioksidacijsku aktivnost uklonivši 7,3 % i 8,8 % DPPH slobodnih radikala u usporedbi sa standardnim jakim antioksidansom L-askorbinskom kiselinom koja je uklonila 56,4 % radikala u testiranim uvjetima.
5. L-askorbinska kiselina u koncentraciji od 50 mg mL⁻¹ iskazala je značajnu inhibiciju rasta odabranih patogenih bakterija. Niže koncentracije (13,3 i 25 mg mL⁻¹) nisu značajno inhibirale rast istraživanih mikroorganizama. Najznačajnija dostignuta inhibicija je ostvarena naspram *L. monocytogenes* ATCC 2356 (99,44 %) i *S. aureus* ATCC 25923 (78,84 %) pri koncentraciji askorbinske kiseline od 50 mg mL⁻¹ tijekom 48 sati.

6. LITERATURA

1. Agarwal, A., Shaharyar, A., Kumar, A., Shafi Bhat, M., Mishra, M. (2015) Scurvy in pediatric age group - A disease often forgotten?. *J. Clin. Orthop. Trauma* **6**, 101-107. doi: 10.1016/j.jcot.2014.12.003
2. Annan, N. T., Borza, A. D., Truelstrup Hansen, L. (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. doi: 10.1016/j.foodres.2007.11.001
3. Arslan-Tontul, S., Erbas, M. (2017) Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. *Lwt-Food Sci. Technol.* **81**, 160-169. doi: 10.1016/j.lwt.2017.03.060
4. Barra, P. A., Márquez, K., Gil-Castell, O., Mujica, J., Ribes-Greus, A., Faccini, M. (2019) Spray-Drying Performance and Thermal Stability of L-ascorbic Acid Microencapsulated with Sodium Alginate and Gum Arabic. *Molecules* **24(16)**, 2872; doi: 10.3390/molecules24162872
5. Bolla, P. A., De los Angeles Serradell, M., De Urreza, P. J., De Antoni, G. L. (2011) Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *J. Dairy Res.* **78(1)**, 15-22. doi: 10.1017/S0022029910000610
6. Borazjani, N. J., Tabarsa, M., You, S., Rezaei, M. (2017) Effects of extraction methods on molecular characteristics, antioxidant properties and immunomodulation of alginates from *Sargassum angustifolium*. *Int. J. Biol.Macromol.* **101**, 703-711. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.128
7. Broeckx, G., Vandenheuvél, D., Claesb, I. J. J., Lebeerb, S., Kiekens, F. (2016) Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int. J. Pharm.* **505 (1-2)**, 303-318. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.04.002.
8. Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., Cailliez-Grimal, C., Gaiani, C. (2014) Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Adv. Colloid. Interfac.* **213**, 21-35. doi: 10.1016/j.cis.2014.09.005

9. Caillard, R., Lapointe, N. (2017) In vitro gastric survival of commercially available probiotic strains and oral dosage forms. *Int. J. Pharm.* **519(1-2)**, 125-127. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.01.019.
10. Chen, L., Yang, T., Song, Y., Shu, G., Chen, H. (2017) Effect of xanthan-chitosan-xanthan double layer encapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB01 in simulated gastrointestinal conditions, bile salt solution and yogurt. *Lwt-Food Sci. Technol.* **81**, 274-280. doi: 10.1016/j.lwt.2017.04.005
11. Chugh, B., Kamal-Eldin, A. (2020) Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Curr. Opin. Food Sci.* **32**, 76-82. doi: 10.1016/j.cofs.2020.02.003
12. Cook, M. T., George Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. (2012) Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. Control. Release.* **162**, 56-57. doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.003
13. Corona-Hernandez, R. I., Alvarez-Parrilla, E., Lizardi-Mendoza, J., Islas-Rubio, A. R., De la Rosa, L. A., Wall-Medrano, A. (2013) Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**, 614-628. doi: 10.1111/1541-4337.12030
14. Corsetti, A., Valmorri, S. (2011) Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum* u Encyclopedia of Dairy Sciences, 2. izd., (Fuquay, J. W., Fox, P. F., McSweeney P. L. H., ured.) Academic Press, str. 111-118.
15. Davies, J., Davies, D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **74(3)**, 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
16. De Giulio, B., Orlando, P., Barba, G., Coppola, R., De Rosa, M., Sada, A., De Prisco, P. P., Nazzaro, F. (2005) Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World J. Microb. Biot.* **21**, 739–746. doi: 10.1007/s11274-004-4735-2
17. De Melo Pereira, G. V., De Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. R. (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol. Adv.* **36**, 2060–2076. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.09.003
18. De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., De Vos, W. M. (2006) *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int. Dairy J.* **16**, 1018–1028. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.09.003

19. Eslami, M., Yousefi, B., Kokhaei, P., Hemati, M., Nejad, Z. R., Arabkari, V., Namdar, A. (2019) Importance of probiotics in the prevention and treatment of colorectal cancer. *J. Cell. Physiol.* **234(10)**, 1-17. doi: 10.1002/jcp.28473
20. Feucht, A., Kwak, H.-S. (2013) Microencapsulation of Lactic Acid Bacteria. *Korean J. Food Sci. An.* **33(2)**, 229-238. doi: 10.5851/kosfa.2013.33.2.229
21. Garaiova, I., Muchova, J., Nagyova, Z., Wang, D., Li, J. V., Orszaghova, Z., Michael, D. R., Plummer, S. F., Duračková, Z. (2015). Probiotics and vitamin C for the prevention of respiratory tract infections in children attending preschool: a randomised controlled pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **69(3)**, 373-379. doi: 10.1038/ejcn.2014.174.
22. Gori, S., Inno, A., Belluomini, L., Bocus, P., Bisoffi, Z., Russo, A., Arcaro, G. (2019) Gut microbiota and cancer: how gut microbiota modulates activity, efficacy and toxicity of antitumoral therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **143**, 139-147. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.09.003.
23. Harel, M., Tang, Q. (2014) Protection and Delivery of Probiotics for Use in Foods. U: Microencapsulation in the Food Industry. (Gaonkar, A. G., Vasisht, N., Khare, A. R., Sobel, R., ured.), Elsevier, San Diego, London, str. 469-482.
24. Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Nunes, G. L., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., De Menezes, C. R. (2016) Development and characterization of alginate microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *Lwt-Food Sci. Technol.*, **71**, 302-308. doi: 10.1016/j.lwt.2016.04.012
25. Holst, B., Williamson, G. (2008) Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr. Opin. Biotech.* **19 (2)**, str 73-82. doi: 10.1016/j.copbio.2008.03.003
26. Institute of Medicine (2000) Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: The National Academies
27. Islam, Ariful, M., Yun, C.-H., Choi, Y.-J., Cho, C.-S. (2010) Microencapsulation of Live Probiotic Bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20 (10)**, 1367–1377. doi: 10.4014/jmb.1003.03020
28. Kallio, J., Jaakkola, M., Mäki, M., Kilpeläinen, P., Virtanen, V. (2012) Vitamin C inhibits staphylococcus aureus growth and enhances the inhibitory effect of quercetin on growth of Escherichia coli in vitro. *Planta med.* **78(17)**, 1824-1830. doi: 10.1055/s-0032-1315388.

29. Kariduraganavar, M. Y., Kittur, A. A., Kamble, R. R. (2014) Chapter 1 - Polymer Synthesis and Processing. U: Natural and Synthetic Biomedical Polymers. (Kumbar, S. G, Laurencin, C. T., Meng Deng, M., ured.) Elsevier, str. 1-31.
30. Kasper, J. C., Friess, W. (2011) The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78(2)**, 48-63. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.03.010.
31. Kavitate, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., Shetty, P. H. (2018) Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. *Food Biosci.* **34**, 34-44. doi: 10.1016/j.fbio.2017.11.003
32. Khaneghah, A. M., Abhari, K., Eş, I., Soares, M. B., Oliveira, R. B. A., Hosseini, H., Rezaei, M., Balthazar, C. F., Silva, R., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S., Sant’Ana, A. S. (2020) Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **95**, 205–218. doi: 10.1016/j.tifs.2019.11.022
33. Kostelac, D., Gerić, M., Gajski, G., Markov, K., Domijan, A. M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Svetec, I. K., Žunar, B., Frece, J., Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. (2020) *Int. Dairy J.* doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104828.
34. Li, X. Y., Chen, X. G., Cha, D. S., Park, H. J., Liu, C. S. (2009) Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate–gelatin and its properties. *J. Microencapsul.* **26(4)**, 315–324. doi: 10.1080/02652040802328685
35. Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Hariom Yadav, H., Prajapati, J. (2015) Probiotics as potential antioxidants: A Systematic Review. *J. Agric. Food Chem.* **63(14)**, 3615-3626. doi: 10.1021/jf506326t
36. Mousavi, S., Bereswill, S., Heimesaat, M. M. (2019) Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Vitamin C. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **9(3)**, 73–79.
37. Neha, K., Haider, M. D., Pathak, A., Yar, M. S. (2019) Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **178**, 687-704. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.06.010
38. Padayatty, S. J., Levine, M. (2016) Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis.* **22 (6)**, 463-493. doi: 10.1111/odi.12446

39. Peng, K., Koubaa, M., Bals, O., Vorobiev, E. (2020) Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. *Food Res. Int.* **137**, 1-76. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109544
40. Reddy, K. B. P. K., Awasthi, S. P., Madhu A. N., Prapulla, S. G. (2009) Role of Cryoprotectants on the Viability and Functional Properties of Probiotic Lactic Acid Bacteria during Freeze Drying. *Food Biotechnol.* **23**, 243–265. doi: 10.1080/08905430903106811
41. Rossoni, R. D., De Camargo Ribeiro, F., De Barros, P. P., Mylonakis, E., Campos Junqueira, J. (2020) A prerequisite for health: probiotics. U: *Microbiomics: Dimensions, Applications, and Translational Implications of Human and Environmental Microbiome Research.* (Kambouris, M.E., Velegraki, A., ured.), The Golden Helix Foundation, London, United Kingdom, str. 225-244.
42. Rostami Z., Tabarsa M., You S., Rezaei M. (2017) Relationship between molecular weights and biological properties of alginates extracted under different methods from *Colpomenia peregrina*. *Process Biochem.* **58**, 289-297. doi: 10.1016/j.procbio.2017.04.037
43. Siow, C. R. S., Heng P. W. S., Wah Chan, L. W (2016) Application of freeze-drying in the development of oral drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Del.* **13 (11)**, 1595-1608. doi: 10.1080/17425247.2016.1198767
44. Sobel, R., Versic, R., Gaonkar, A. G. (2014) Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. U: *Microencapsulation in the Food Industry.* (Gaonkar, A. G., Vasisht, N., Khare, A. R., Sobel, R., ured.), Elsevier, San Diego, London, str. 3-11.
45. Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., Ma, X. (2013) Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydr. Polym.*, **96(1)**, 181-189. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.068
46. Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo.* **47 (1)**, 57-73. <<https://hrcak.srce.hr/94894>> Pristupljeno 23. travnja 2020.
47. Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **4 (3-4)**, 77-84. <<https://hrcak.srce.hr/49962>> Pristupljeno 23. travnja 2020.

48. Tajkarimi, M., Ibrahim, S. A. (2011) Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on Escherichia coli O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control*, **22(6)**, 801-804. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.030
49. Teusink, B., Molenaar, D. (2017) Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology* **6**, 7-13. doi: 10.1016/j.coisb.2017.07.005
50. Thangaraj, S., Seethalakshmi, M. (2015) Application of Microencapsulation Technology for the Production of Vitamin-C Fortified Flavoured Milk. *J. Adv. Dairy Res.* **3(3)**, 143. doi: 10.4172/2329-888X.1000143
51. Wintergerst, E. S., Maggini, S., Hornig, D. H. (2005) Immune-Enhancing Role of Vitamin C and Zinc and Effect on Clinical Conditions. *Ann. Nutr. Metab.* **50**, 85–94. doi: 10.1159/000090495
52. Yang, C. S., Ho, C.-T., Zhang, J., Wan, X., Zhang, K., Lim, J. (2018) Antioxidants: Differing Meanings in Food Science and Health Science. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 3063–3068. doi: 10.1021/acs.jafc.7b05830
53. Zanjani, M. A. K., Tarzi, B. G., Sharifan, A., Mohammadi, N. (2014) Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iran. J. Pharm. Res.*, **13(3)**, 843-852. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4177644/>> Pristupljeno 25. kolovoza 2020.
54. Zou, Q., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Zhang, H., Chen, W. (2011) Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **46(8)**, 1672-1678. doi: 10.1111/j.1365-2621.2011.02685.x

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem 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.

Vesna Jurić