

Antioksidativni potencijal probiotičke bakterije *L. plantarum* S1

Milardović, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:576540>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Nutricionizam

Ana Milardović

0058212509

ANTIOKSIDATIVNI POTENCIJAL PROBIOTIČKE BAKTERIJE

Lactobacillus plantarum S1

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: Prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Antioksidativni potencijal probiotičke bakterije *L. plantarum* S1

Ana Milardović, 0058212509

Sažetak:

Sirutka je važan prehrambeni proizvod s pozitivnim učincima na zdravlje. Brojna istraživanja ukazuju na njena protuupalna, antikancerogena i antioksidativna svojstva te da je spontano fermentirana sirutka potencijalan izvor probiotičkih bakterija. Cilj ovog rada bio je istražiti antioksidativni potencijal probiotičke bakterije *Lactobacillus plantarum* S1 izolirane iz sirutke. Određena je sposobnost uklanjanja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnih radikala kao ukupna antioksidativna sposobnost te je određena unutarstanična koncentracija glutationa. Istražena je i korelacija broja stanica i sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala kako bi preporučili optimalnu koncentraciju za ispoljavanje zdravstveno korisnih učinaka. Rezultati su ukazali na visoku sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala i umjerenu prisutnost glutationa u neinduciranim uvjetima. Također, ukupna antioksidativna aktivnost istraživanog probiotika ovisi o koncentraciji bakterijskih stanica.

Ključne riječi: antioksidativni kapacitet, *Lactobacillus plantarum*, probiotik, sirutka

Rad sadrži: 20 stranica, 4 slika, 1 tablica, 38 literaturnih navoda, 3 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: Deni Kostelac, mag. ing.

Datum obrane: 15. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Nutrition

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Antioxidative potential of probiotic bacteria *L. plantarum* S1

Ana Milardović, 0058212509

Abstract:

Whey is a food product that has a positive effect on health. Various studies indicate its anti-inflammatory, anticancer and antioxidant properties and that spontaneously fermented whey is a potential source of probiotic bacteria. The goal of this thesis was to investigate the antioxidative potential of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* S1 isolated from whey. Ability to remove 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radicals (DPPH) was determined as the total antioxidative capability and the intracellular glutathione concentration was also determined. The correlation between the number of cells and the ability to remove DPPH free radicals was researched to recommend optimal concentration for health effects. The results point to a high ability of removing DPPH free radicals and a moderate presence of glutathione under controlled conditions. Also, the total antioxidative activity of the researched probiotic depends on the concentration of bacterial cells.

Keywords: antioxidant capacity, *Lactobacillus plantarum*, probiotic, whey

Thesis contains: 20 pages, 4 figures, 1 table, 38 references, 3 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Jadranka Frece, Full professor

Technical support and assistance: Deni Kostelac, MSc

Defence date: July 15th 2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Sirutka	2
2.2. Zdravstveno korisni učinci sirutke	2
2.3. Antioksidansi	3
2.4. Bakterije mliječne kiseline	3
2.5. Probiotici	4
2.6. <i>Lactobacillus plantarum</i>	5
2.7. Probiotički kriteriji	5
2.8. Glutation (GSH)	6
2.9. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) kao mjera antioksidativne aktivnosti	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Materijali	7
3.1.1. Mikroorganizam	7
3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizama	7
3.1.3. Aparatura i pribor	8
3.1.4. Kemikalije	8
3.2. Metode rada	9
3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije	9
3.2.2. Priprema suspenzija različitih koncentracija	9
3.2.3. Određivanje broja mikroorganizama u suspenziji	9
3.2.4. Razbijanje stanica	9
3.2.5. DPPH metoda	10
3.2.6. Priprema otopina askorbinske kiseline različitih koncentracija	10
3.2.7. Priprema etanolne otopine DPPH	10
3.2.8. Mjerenje koncentracije glutaciona	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	12
4.1. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala (<i>L. plantarum</i> S1, 24h rast)	

4.2. Određivanje koncentracije glutaciona u suspenziji	14
5. LITERATURA	16

1. UVOD

Iako je još Hipokrat isticao ljekovita svojstva sirutke, do nedavno se ona odbacivala kao nusprodukt u tehnološkom procesu proizvodnje sira ili se eventualno koristila kao stočna hrana. U novije vrijeme, počeli su se istraživati njeni brojni korisni učinci na zdravlje zbog čega postaje sve popularnijim prehrambenim proizvodom (Novak, 2018). Posebno se ističe visoka biološka vrijednost proteina sirutke (Barukčić i sur., 2019), međutim njene komponente često imaju i protuupalna i antikarcinogena svojstva (Attaallah i sur., 2012), smanjuju simptome alergijskih reakcija, a pozitivno utječu i na apsorpciju željeza (Jeličić i sur., 2008). Posebna pozornost pridaje se razvoju proizvodnje fermentiranih napitaka od sirutke pomoću probiotičkih sojeva, a tu je najvažnije odabrati adekvatnu kulturu bakterija, kako bi se dobio visokovrijedan funkcionalan proizvod prihvatljivih senzorskih svojstava (Jeličić i sur., 2008). Bakterije mliječne kiseline daju poželjnu teksturu, aromu i nutritivnu vrijednost proizvodu (Corsetti i Settani, 2007). Fermentacija može biti potpomognuta starter kulturama ili može nastupiti spontanom djelovanjem prirodno prisutnih mikroorganizama (Petrovicky, 2016). Probiotici su pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji primijenjeni kod ljudi ili životinja blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore (Šušković, 1996). Smatra se da su korisne za prevenciju kroničnih gastrointestinalnih i kardiovaskularnih bolesti, da sprječavaju rak i osteoporozu i da blagotvorno utječu na zdravije starenje (Saarela i sur., 2000). Antioksidansi su molekule koje imaju sposobnost doniranja elektrona, čime neutraliziraju molekule ili atome koji sadržavaju jedan nespareni elektron koji ima tendenciju stvaranja elektronskog para (Wang i sur., 2017). Slobodni radikali nastaju u tijelu normalnim metaboličkim reakcijama, ali i prilikom izlaganja stresu, teškom tjelesnom naporu, UV zračenju, toksičnim tvarima i prilikom pušenja (Krznarić, 2008). Ukoliko ipak dođe do narušene ravnoteže između slobodnih radikala i antioksidativne obrane u stanici, javlja se stanje oksidacijskog stresa (Wang i sur., 2017). Probiotičke bakterije imaju potencijal sprječavanja pojave oksidativnog stresa (Kim i sur., 2020). Da bi se neki bakterijski soj okarakterizirao kao probiotik, mora biti siguran, funkcionalan i adekvatnih tehnoloških karakteristika (Saarela i sur., 2000). Cilj rada bio je ispitati antioksidativnu aktivnost probiotičke kulture *L. plantarum* S1 izolirane iz sirutke određivanjem sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala i unutarstanične koncentracije glutaciona.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sirutka

Sirutka je sporedni proizvod koji nastaje u tehnološkom procesu proizvodnje sira, a ovisno o načinu koagulacije kazeina može biti kisela ili slatka. Sastav i svojstva ovise o tehnologiji proizvodnje osnovnog proizvoda te o kakvoći korištenog mlijeka (Tratnik, 1998). Prema prosječnom sastavu sirutka sadrži oko 93% vode, a u nju prelazi i oko 50% suhe tvari mlijeka. Najveći dio sirutke čini laktoza, manje od 1% proteini sirutke, a u manjim količinama prisutne su mineralne tvari i vitamini topljivi u vodi i mastima (Jeličić i sur., 2008). Iako je još Hipokrat isticao ljekovita svojstva sirutke, do nedavno se ona odbacivala kao nusprodukt u proizvodnji mliječnih proizvoda ili se eventualno koristila kao stočna hrana. U novije vrijeme sirutka postaje sve popularniji prehrambeni trend zbog nepobitnih dokaza o njenim zdravstveno korisnim učincima (Novak, 2018). Polazna je sirovina za proizvodnju raznih bezalkoholnih napitaka, fermentiranih napitaka na bazi sirutke, dijetetskih napitaka, napitaka sličnih mlijeku, napitaka u prahu te alkoholnih napitaka (sirutkino vino ili pak sirutkino pivo). Posebna pozornost u ovoj skupini pridaje se razvoju proizvodnje fermentiranih napitaka pomoću probiotičkih sojeva, a tu je najvažnije odabrati adekvatnu kulturu bakterija kako bi se dobio visokovrijedan funkcionalan proizvod prihvatljivih senzorskih svojstava (Jeličić i sur., 2008).

2.2. Zdravstveno korisni učinci sirutke

Proteini sirutke sastojak su koji sirutku stavljaju u središte pozornosti na tržištu mliječnih proizvoda zahvaljujući visokom udjelu esencijalnih aminokiselina zbog čega imaju mnogo veću biološku vrijednost (bolja iskoristivost nutrijenata, probavljivost i izbalansiranost omjera aminokiselina) u usporedbi sa kazeinom, kao i proteinima jaja koji su se dugo smatrali referentnima. Idealan su izbor za sportaše jer su bogati aminokiselinama razgranatih lanaca (BCAA) kao što su izoleucin, leucin i valin koji se za razliku od drugih esencijalnih aminokiselina izravno metaboliziraju i prenose u mišićno tkivo (Barukčić i sur., 2019). Budući da su probavljiviji od kazeina koriste se u proizvodnji hrane za dojenčad u svrhu povećanja hranjive vrijednosti. Napitci s bazom sirutke idealni su za osobe alergične na proteine mlijeka ili oboljele od celijakije (Jeličić i sur., 2008). Iako je antioksidativni potencijal sirutke puno niži od potencijala nekih biljaka (npr. zeleni čaj ili spirulina), lakše ju je upotrijebiti u prehrani, budući da se može dodati u puno većoj koncentraciji. Kako pospješuje detoksikaciju slobodnih radikala, može se reći da ima i antikarcinogena svojstva (Attaallah i sur., 2012). Imunoglobulini i drugi glikoproteini (laktoferin, transferin) te enzimi (lizozim, laktoperoksidaza) kao bitni čimbenici imunoaktivnog sustava sirutke posjeduju antimikrobna svojstva, a mogu reducirati ili inhibirati alergijske reakcije (Jeličić i sur., 2008). Zahvaljujući laktoferinu, sirutkini napitci se mogu koristiti kao funkcionalna hrana u svrhu

povećanja apsorpcije željeza iz hrane što je iznimno važno u prehrani male djece i mogu poboljšati apsorpciju kalcija (veže ga α -laktalbumin) (Jeličić i sur., 2008).

2.3. Antioksidansi

Antioksidansi su molekule koje imaju sposobnost doniranja elektrona, čime neutraliziraju reaktivne kisikove vrste. Reaktivne kisikove vrste (ROS) su slobodni radikali u koje spadaju superoksidni anionski radikali, hidroksilni radikali i vodikov peroksid, a izvori ROS-a su pak ionizirajuće zračenje, UV zračenje, citokini i patogeni (Wang i sur., 2017). Slobodni radikali su molekule ili atomi kratka vijeka koji sadržavaju jedan nespareni elektron s tendencijom stvaranja elektronskog para. Nastaju u tijelu u normalnim uvjetima tijekom metaboličkih reakcija. Stres, pušenje, težak fizički napor, izlaganje UV zračenju, toksičnim tvarima i drugim čimbenicima također dovode do stvaranja slobodnih radikala (Krznić, 2008). Oksidativni stres je stanje u kojem je narušena ravnoteža između reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i antioksidativne obrane u stanici. Dovodi do hidroksilacije DNK, denaturacije proteina, peroksidacije lipida i apoptoze (Wang i sur., 2017). Uzrokuje upale, kronične kardiovaskularne bolesti, neurološke poremećaje, rak, dijabetes tip II, hiperlipidemiju, aterosklerozu, brže starenje, reumatoidni artritis, Parkinsonovu bolest i dr. (Kim i sur., 2020). Organizam se protiv oksidativnog stresa bori enzimatskim i neenzimatskim putevima. Enzimi koji kataliziraju raspad slobodnih radikala na manje reaktivne spojeve su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, katalaza i glutredoxin. Ne-enzimatska obrana uključuje glutation, tireodoksin, vitamin C i E, karotenoide, vitamini B3 (u obliku niacina), B2, B6, koenzim Q10, aminokiselinu cistein i bioflavonoide koji sami hvataju slobodne radikale i time ih stabiliziraju (Wang i sur., 2017). Antioksidansi djeluju tako da snižavaju energiju slobodnih radikala, sprječavaju njihovo nastajanje ili prekidaju lančanu reakciju oksidacije (Krznić, 2008). Prehrana se može obogatiti dodacima (antioksidansima) koji mogu biti prirodnog ili sintetskog porijekla. Sigurnost umjetnih, tj. sintetskih komponenti je upitna (Ito i sur., 2002), stoga se javila potreba za pronalaskom funkcionalnih prirodnih izvora. Iako je poznato da takve prirodne varijante antioksidansa možemo pronaći u npr. voću i povrću (vitamin C, E, karotenoidi...), zanimljiv potencijalan izvor su i probiotičke bakterije.

2.4. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su grupa Gram-pozitivnih, nesporulirajućih, katalaza-negativnih aerotolerantnih bakterija koje nemaju citokrome, a imaju specifične zahtjeve za supstratima u hranjivoj podlozi u kojoj fermentiraju izvore ugljika i primarno proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod katabolizma (Axelsson, 1998). BMK su auksotrofi, stoga se uzgajaju na hranjivim podlogama kompleksnog sastava. Između ostalih sastojaka koji se dodaju u podlogu,

najznačajnije su aminokiseline, peptidi i/ili proteini. Ova skupina bakterija uključuje rodove *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Stereptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella* (Jelovac, 2011). U gastrointestinalnom traktu čovjeka obitava 112 vrsta bakterija (Kim i sur., 2020), od čega veliki udio čine upravo bakterije mliječne kiseline. BMK doprinose brzoj proizvodnji mliječne kiseline i acidifikaciji prehrambenog proizvoda. Daju poželjnu teksturu, aromu i nutritivnu vrijednost proizvodu. Tradicionalno su se koristili kao biokonzervansi jer štite hranu proizvodnjom organskih kiselina, ugljikovog dioksida, etanola, vodikovog peroksida, diacetila, antifungalnih komponenti i bakteriocina (Corsetti i Settani, 2007). Imaju široku primjenu kao starter kulture već niz godina budući da im je američka FDA dala GRAS status (Generally Recognized As Safe), dok u EU imaju QPS status (Qualified Presumption of Safety) (Frece i sur., 2010 a i b).

2.5. Probiotici

Probiotici su živi mikroorganizmi koji se mogu oralno primjenjivati kao bioterapeutici za terapiju ili prevenciju bolesti (što ih svrstava u kategoriju živih lijekova) ili se primjenjuju kao funkcionalni dodaci hrani kako bi pozitivno utjecali na ravnotežu crijevne mikroflore (Šušković, 2009). Po definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), probiotici su živi mikroorganizmi koji primijenjeni u adekvatnoj količini imaju pozitivne učinke na zdravlje domaćina (tzv. „dobre bakterije“). Korisni su za prevenciju kroničnih gastrointestinalnih i kardiovaskularnih bolesti, sprječavaju rak i osteoporozu i da blagotvorno utječu na zdravije starenje (Saarela i sur., 2000). Probiotici moduliraju obrambeni sustav protiv oksidativnog stresa domaćina kroz antioksidativnu aktivnost, regulaciju signalnih puteva, kelaciju metalnih iona i modulaciju intestinalne mikroflore (Kim i sur., 2020). Najčešće se koriste probiotici izolirani iz gastrointestinalnog trakta čovjeka, budući da su najsigurniji (ne predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje) i dokazano funkcionalni (spremni su preživjeti različite uvjete duž gastrointestinalnog trakta) međutim, dobra svojstva pokazale su i neke vrste izolirane iz hrane (Zago i sur., 2010). U istraživanju Ayyanna i sur. (2018) utvrđeno je da su štakori kojima su se davali probiotici imali povećane koncentracije superoksid dismutaze, katalaze i glutation-S-transferaze. U tih istih štakora povećale su se koncentracije IL10 (antiinflamatorni citokini), a smanjile koncentracije IL6 (proinflamatorni citokini). Mehanizme kojima djeluju probiotici na domaćina objasnili su u svom radu Wang i sur. (2017). Naime, probiotici imaju svoj vlastiti antioksidativni mehanizam, to jest proizvode enzime koji ih štite od oksidativnog stresa. Od njih je najbitnija superoksid dismutaza koja katalizira razgradnju superoksida na vodu i vodikov peroksid. Međutim neke bakterije proizvode i katalazu koja razgrađuje vodikov peroksid (iako su BMK većinom katalaza negativne). Probiotici mogu vezati metale koji kataliziraju reakcije oksidacije (Fe^{2+} ili Cu^{2+}) u formu kelata koje onda tijelo može izlučiti iz organizma. Oni mogu izlučivati metabolite manje od 2000 Da koji prolaze kroz epitelnu

barijeru te suprimiraju proizvodnju TNF- α u LPS-om stimuliranim humanim limfocitima (Kostelac i sur., 2020). Često se probiotici inkorporiraju u fermentirane proizvode koji osim što služe kao prirodni konzervansi daju karakterističnu aromu i kiselost. Dobro je koristiti starter kulture (*S. thermophilus*, jogurt kulture i mezofilni starteri s *Lactobacillus* vrstama) i probiotičke kulture zajedno. Bitno je prilikom proizvodnje dodati probiotičke kulture prije ili u isto vrijeme kad i starter kulture jer metaboliti starter kultura mogu utjecati na rast probiotika. Stopa rasta starter kultura trebala bi biti umjerena kako bi se omogućio rast probiotika tijekom fermentacije. Održivost probiotika u hrani ovisi o pH, temperaturi skladištenja, prisutnosti kompetitivnih mikroorganizama i inhibitorima (Saarela i sur., 2000).

2.6. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum jest štapićasta fakultativno heterofermentativna bakterija mliječne kiseline koja se nalazi u mnogim nišama okoliša (mliječni proizvodi, meso, riba, povrće, biljni fermentati) (Zago i sur., 2010). Zbog svoje prilagodljivosti, bezopasnosti i ostalih pozitivnih karakteristika, široko se koristi u prehrambenoj industriji. Razlikuje se u odnosu na ostale laktobacile po sposobnosti iskorištavanja kisika (aerotolerantna je), bez obzira što nema nikakav respiratorni sustav pa se konzumirani kisik nakuplja u obliku vodikovog peroksida koji se koristi za inhibiciju rasta kompetitivnih bakterija (Novak, 2018). Stoga *L. plantarum* ima enzim manganazu koji joj omogućuje toleranciju na visoke količine vodikovog peroksida (Archibald i Fridovich, 1981 a). Određeni sojevi su snažni producenti biofilma, nisu toksični, ne pokazuju hemolitičku aktivnost, imaju povećanu sposobnost autoagregacije te im ponekad supernatanti iskazuju veliku antimikrobnu aktivnost (Kostelac i sur., 2020). U potpunosti mogu iskorištavati laktulozu (proizvode β -galaktozidazu), nešto slabije kukuruzna vlakna i rafinozu, dok inulin i ksilitol uopće ne mogu iskorištavati (Zago i sur., 2010).

2.7. Probiotički kriteriji

Da bi se bakterijski soj okarakterizirao kao probiotik treba biti točno taksonomski identificiran, potrebna je potpuna karakterizacija soja, a mora zadovoljiti i stroge probiotičke kriterije. Šušković i sur. (2009) dijele ih na opće (podrijetlo, zdravstvena sigurnost, otpornost prema niskom pH, sokovima želuca, žuči i gušterače), tehnološke (preživljavanje i zadržavanje aktivnosti tijekom pripreme i čuvanja) te funkcionalne (antimikrobno djelovanje posebno prema patogenim bakterijama, adhezija na crijevni epitel, poticanje imunološkog odgovora i promjene mikrobnog metabolizma u gastrointestinalnom traktu). Kim i sur., (2020) navode da soj, kako bi se probiotički okarakterizirao, treba biti otporan na pH (od otprilike 2 u želudcu do 8 u duodenumu), pepsin (prisutan u želudcu) i pankreatin (prisutan u duodenumu u gastrointestinalnom traktu), a ne smije biti otporan na antibiotike (kako ne bi došlo do horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju u

genome patogenih bakterija). Prema njima bitni kriteriji su i sposobnost autoagregacije, održana enzimatska aktivnost i iskoristivost ugljikohidrata (trebaju imati odgovarajuće enzime potrebne za njihovu hidrolizu) te hemolitička aktivnost. Probiotici također ne smiju svojim metabolizmom proizvoditi toksične spojeve. Kriterij na kojemu je naglasak u ovom radu jest antioksidativna sposobnost. Kako bi se dokazalo da je probiotička vrsta koja se istražuje dovoljno uspješna u neutralizaciji reaktivnih kisikovih vrsta, provjerava joj se sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala, aktivnost superoksid dismutaze i koncentracija glutaciona (intracelularni enzimi) (Kostelac i sur., 2020).

2.8. Glutation (GSH)

Glutation (GSH) je tripeptid koji se sastoji od glicina, cisteina i glutaminske kiseline. Endogeno se sintetizira, stoga je prehranom bitno osigurati dovoljno navedenih aminokiselina (Mischley, 2017a). Igra kritičnu ulogu kao redukcijsko sredstvo i u staničnoj detoksikaciji (Mischley i sur., 2017b). Osim što je glavni endogeni antioksidans, sudjeluje i u održavanju egzogenih antioksidansa poput vitamina C i E u reduciranim (aktivnim) oblicima. Glutation peroksidaza, glutacion transferaza i glutacion-S transferaze koriste glutacion kao supstrat. Potreban je za detoksikaciju metilglioksala i održavanje homeostaze metala u biološkim sustavima. Sudjeluje u metaboličkim i biokemijskim reakcijama kao što su sinteza i popravak DNK, sinteza proteina, sinteza prostaglandina, transport aminokiselina i aktivacija enzima (Aaseth i sur., 2016). U stanici 85-90% glutaciona se nalazi u citosolu, 10-15% u mitohondrijima i mali postotak se nalazi u endoplazmatskom retikulumu i jezgri (Fanucchi, 2014). Smatra se jednim od najkoncentriranijih intracelularnih antioksidansa, a najviše ga ima u stanicama jetre (Droge i Holm, 1997). Široko je prisutan u stanicama eukariota, dok se u prokariotskim stanicama nalazi prvenstveno u gram-negativnim bakterijama. Ipak, gram-pozitivne bakterije (ovisno o vrsti i varijaciji na razini soja) mogu sintetizirati, djelomično sintetizirati ili unijeti i iskoristiti glutacion iz medija u kojem rastu kako bi preživjele stresne uvjete u aerobnom okruženju. Preporuka je da se bakterije s potencijalom sinteze glutaciona dodaju mlijeku i sirutci koje sadrže prekursore za sintezu glutaciona (Pophaly i sur., 2012).

2.9. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) kao mjera antioksidativne aktivnosti

Među metodama za procjenu antioksidativne aktivnosti čistih spojeva i biljnih ekstrakta, najpopularnijom smatra se spektrofotometrijska DPPH metoda koju su razvili Brand-Williams i sur., (1995). DPPH radikal je jedan od rijetkih stabilnih organskih dušikovih radikala, koji stvara tamno ljubičasto obojene otopine. Kada se otopina DPPH radikala pomiješa s antioksidansom/reducirajućim spojem, nastaje hidrazin pri čemu boja otopine prelazi iz ljubičaste u žutu boju (Pyrzynska i Pekal, 2013). Tu promjenu pratimo spektrofotometrijski na valnim

duljinama 515-528 nm. Što se više smanjila apsorbanacija, to je više DPPH radikala izreagiralo (Holtz, 2009). Određeni antioksidansi zahtijevaju polarna otapala poput metanola ili etanola, dok se etil acetat ili kloroform koriste za ekstrakciju lipofilnih antioksidansa (Pyrzynska i Pekal, 2013). Većina studija izrazila je rezultate kao postotak smanjenja koncentracije DPPH[·] u otopini, koji se naziva i postotkom inhibicije ili gašenja, no u nekim radovima rezultati su predstavljeni u obliku postotka zaostalog DPPH[·]. Što je koncentracija inhibicije IC₅₀ iliti koncentracija učinkovitosti EC₅₀ niža, antioksidativna aktivnost je veća (Cerretani i Bendini, 2010). Često se antioksidativna moć uklanjanja DPPH uzorka uspoređuje sa standardnim antioksidansom, askorbinskom kiselinom. Ovo je najkorištenija metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti u istraživanjima probiotika, budući da potrebno relativno kratko vrijeme za analizu i može se koristiti za krute i tekuće uzorke. Nije specifičan za bilo koju određenu antioksidativnu komponentu, već se odnosi na ukupni antioksidativni kapacitet uzorka (Pyrzynska i Pekal, 2013).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizam

U ovom radu korišten je bakterijski soj *Lactobacillus plantarum* S1 iz skupine bakterija mliječne kiseline. Soj je preuzet iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Podloga za uzgoj mikroorganizama

Za uzgoj bakterijskih kultura korištena je MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) tekuća hranjiva podloga koja se primjenjuje za bakterije iz roda *Lactobacillus*. Podloga je bogata nutrijentima i sadrži magnezij, mangan, polisorbitat i acetat, koji djeluju kao faktori rasta. Točan sastav naveden je u tablici 1.

Uzgoj je proveden u laboratorijskim uvjetima pri 37 °C tijekom 24 sata

Tablica 1. Sastav MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) tekuće hranjive podloge

Sastav podloge, pH = 6,5	g/L destilirane vode
pepton	10
mesni ekstrakt	10
kvašćev ekstrakt	5
glukoza	20
Tween 80	1
MgSO ₄ x H ₂ O	0,1
MnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,05
natrijev acetat	5
agar	20

3.1.3. Aparatura i pribor

- Vibromješač EV-102 (Tehtnica, Slovenija)
- Spektrofotometar (Unicam Helios ξ, SAD)
- Čitač pločica Wallac 1420 Victor Multilabel Counter (PerkinElmer, SAD)
- Automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- Centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- Centrifuga Centric 150 (Tehtnica, Slovenija)
- Staklene kuglice, promjer 0,40 - 0,60 mm (Sartorius, Njemačka)

3.1.4. Kemikalije

- Etanolna otopina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (Merck, SAD)
- Komercijalni kit za određivanje katalitičke aktivnosti enzima SOD (Cayman Chemical Missouri, SAD)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Merck, SAD)
- 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina (Merck, SAD)
- Na₂HPO₄ x 12H₂O (Kemika, Hrvatska)
- Na₂HPO₄ x 2H₂O (Kemika, Hrvatska)

3.2. Metode rada

3.2.1. Priprema bakterijske suspenzije

Prekonoćna bakterijska kultura uzgajana je 24 sata u termostatu pri 37 °C u 5 mL MRS bujona. Pripremljene bakterijske suspenzije potom su izmiješane na vibromješaču i po dvije suspenzije prebačene su u novu epruvetu te centrifugirane 15 minuta na 6000 rpm. Nakon centrifugiranja odvojio se supernatant i u svaku je epruvetu potom dodana sterilna fiziološka otopina, zatim je homogenizirana na vibromješaču te ponovo centrifugirana 15 minuta na 6000 rpm. Supernatant je uklonjen, a talog 2 kivete spojen i resuspendiran u 15 mL sterilne vode.

3.2.2. Priprema suspenzija različitih koncentracija

Radi daljnje usporedbe sposobnosti uklanjanja DPPH u ovisnosti o koncentraciji bakterija pripremljene su četiri suspenzije različitih koncentracija. Originalna suspenzija (10^9 CFU/mL) razrijeđena je 2, 5 i 10 puta.

3.2.3. Određivanje broja mikroorganizama u suspenziji

Određivanje broja živih stanica *L. plantarum* S1 u suspenziji određen je neizravnim (indirektnom) metodom. Načinjeno je 8 serija decimalnih razrjeđenja u omjeru 1:10, a po 100 µL suspenzije nacijepljeno je na MRS agar u Petrijevim zdjelicama, ravnomjerno razvučeno štapićem po Drygalskom te stavljeno na inkubaciju 24/48 sati na 37 °C. Svi pokusi su provedeni u triplikatu.

Nakon inkubacije, kolonije *L. plantarum* koje su porasle na čvrstoj hranjivoj podlozi, prebrojane su pomoću brojača kolonija i predstavljaju broj živih stanica *L. plantarum*. Izbrojane kolonije izražene su kao CFU vrijednost (Colony Forming Units).

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{upotrijebljeni volumen uzorka}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad [1]$$

3.2.4. Razbijanje stanica

Kako bi se iz stanica izdvojio unutarstanični sadržaj priređenu suspenziju biomase bilo je potrebno homogenizirati na vibromješaču i nakon toga odvojiti 1 mL pripremljenog uzorka. Slijedilo je dodavanje staklenih kuglica za mehaničko razbijanje stanica u omjeru 3:2. Uzorak se potom četiri puta miješao po 1 minutu na vibromješaču, zatim hladio 1 minutu na ledu te je postupak proveden dva puta. Razbijeni sadržaj se centrifugirao 1 minutu na 9000 rpm kako bi se odvojio od staklenih kuglica. Tako odvojeni sadržaj se ponovo centrifugirao 10 minuta na 9000 rpm nakon čega je otpipetiran supernatant koji se koristio za daljnju provedbu pokusa.

3.2.5. DPPH metoda

1 mL pripremljene suspenzije bakterijskih stanica (10^9 - 10^{10} 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. Za to vrijeme odvijala se reakcija neutralizacije prikazana na slici 1. Uzorak se potom centrifugirao 10 minuta, nakon čega mu je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 517 nm. Za mjerenje je bilo potrebno napraviti slijepu probu koja sadrži 2 mL etanola, dok su kontrole uključivale 1 mL fiziološke otopine i 2 mL otopine DPPH. Preostali DPPH (% inhibicije) izračunat je prema jednadžbi

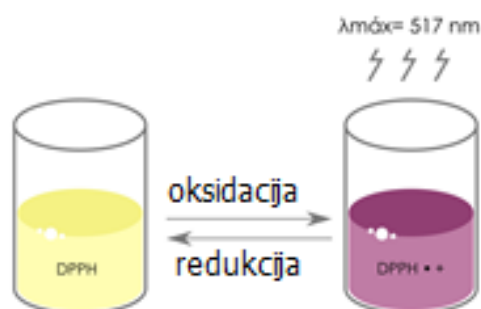
$$\text{scavenging activity (\%)} = [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}/A_{\text{control}})] \times 100 \quad [2]$$

gdje je:

A_{sample} = apsorbancija uzorka

A_{blank} = apsorbancija slijepe probe

A_{control} = apsorbancija kontrolnog uzorka



Slika 1. Reakcija neutralizacije

3.2.6. Priprema otopina askorbinske kiseline različitih koncentracija

Za pripremu otopine askorbinske kiseline koncentracije 100 mg/L, u tikvici s 100 mL otopljeno je 10 mg askorbinske kiseline u kristalićima. U kivetama su pripremljena ostala razrjeđenja; 50 mg/L, 30 mg/L, 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L i 1 mg/L.

3.2.7. Priprema etanolne otopine DPPH

Za pripremu 50 mL otopine DPPH koncentracije 0,07 mM [$M_r=394,32$ g/mol] otopljeno je 1,9 mg DPPH u 69 mL etanola.

3.2.8. Mjerenje koncentracije glutationa

Za određivanje aktivnosti glutationa (GSH) korišten je DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), poznat pod nazivom Ellmanov reagens koji služi za kolorimetrijsko određivanje tiolnih skupina u biološkim uzorcima.

Najprije je pripremljena 10 mM otopina DTNB-a tako što se odvagalo 0,0396 g DTNB-a i pomiješalo s 10 mL pufera te se otopina razrijedila još 10 puta. Također, pripremljen je 0,3 molarni Na – fosfatni pufer i to na način da se pomiješalo 10,744 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O i 4,68 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O u 100 mL destilirane vode. Puferi su pomiješani tako da konačni pH otopine iznosi 6,7.

Supernatant je razrijeđen 6 puta tako da se u 50 µL supernatanta dodalo 50 µL fosfatnog pufera. 2500 µL pripremljenog uzorka pomiješano je sa 200 µL 10 mM DTNB-a te se odmah spektrofotometrijski izmjerila optička gustoća uzorka na valnoj duljini od 412 nm prema slijepoj probi. Slijepa proba umjesto uzorka sadržavala je 2500 µL vode. Na temelju apsorbancije indirektno je dobiven podatak o koncentraciji koja se izračunala prema formuli:

$$c = \frac{A}{\epsilon} \quad [3]$$

gdje je:

c = koncentracija GSH u uzorku

A = apsorbancija na 412 nm

$\epsilon = 14,10 * 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

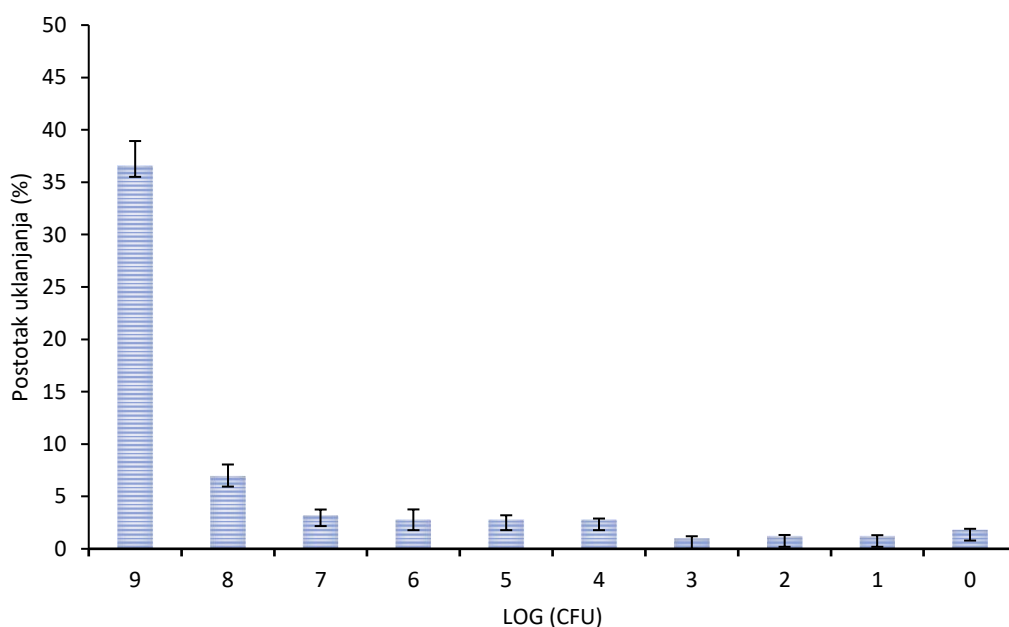
Koncentracija unutarstaničnog glutationa mjerena je pri uzgoju *L. plantarum* S1 u standardnim uvjetima, u prisutnosti 25 mM vodikovog peroksida te pri 10 mg/mL L-askorbinske kiseline i kombinaciji oba navedena spoja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Značajan antioksidativni kapacitet probiotičkog bakterijskog soja *L. plantarum* S1 izoliranog iz sirutke, dokazali smo metodom mjerenja sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala i mjerenjem koncentracije unutarstaničnog glutationa uključenog u antioksidativnu obranu stanice. Zbog visoke koncentracije glutationa i ukupne sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala *L. plantarum* S1 možemo smatrati dobrim kandidatom za uključenje u funkcionalne proizvode.

4.1. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala (*L. plantarum* S1, 24h rast)

Postotak uklanjanja slobodnih DPPH radikala pri različitim logaritamskim vrijednostima koncentracije probiotičkih stanica prikazan je na slici 2.



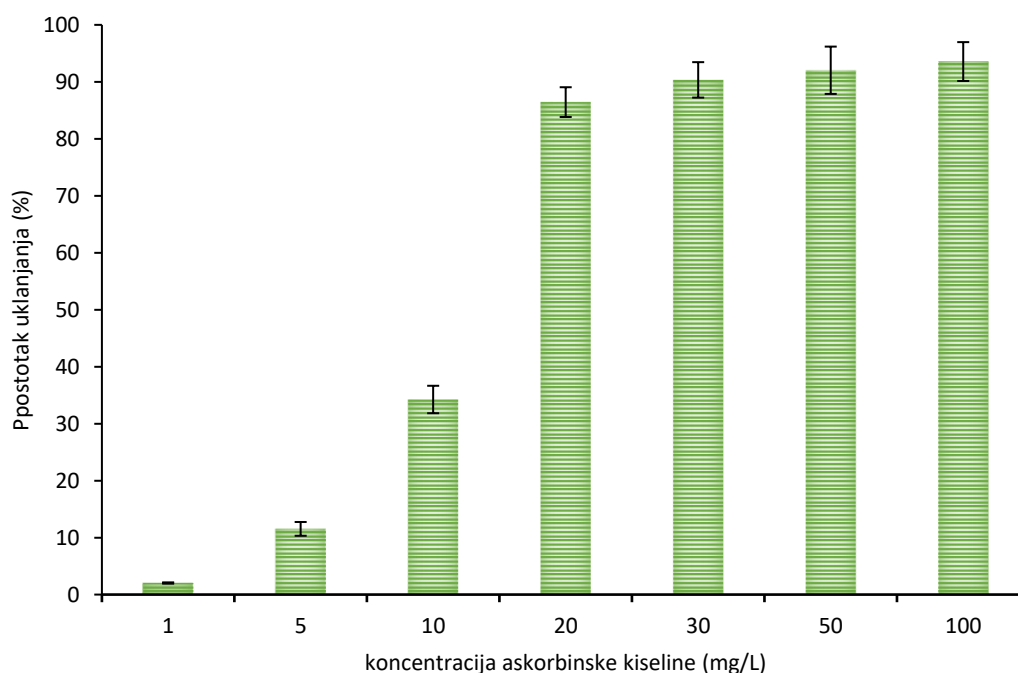
Slika 2. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala pri različitim CFU vrijednostima bakterije *Lactobacillus plantarum* S1 izraženo kao postotak \pm SD.

Tijekom 30 minuta inkubacije vidljivo je značajno uklanjanje oksidativnih stresora koje premašuje 36% pri koncentraciji stanica od 10^9 CFU/mL. Navedeni postotak može se smatrati značajnim. Uspoređujući s literaturom, bakterije vrste *L. plantarum* okarakterizirane kao jaki antioksidansi su uklanjale oko 50% radikala pri istoj koncentraciji (Das i Goyal, 2015). Nadalje, probiotičke bakterije izolirane iz fermentiranih proizvoda uspješno su uklanjale prosječno 30% prisutnih radikala (Yang i sur., 2020).

Iz rezultata ovog rada može se zamijetiti značajan pad antioksidativne aktivnosti pri nižim CFU vrijednostima. Iz navedenog se može zaključiti kako je dovoljan broj probiotičkih stanica nužan kako bi se ispoljili antioksidativni učinci. Redukcija broja probiotičkih stanica većinom se događa prolaskom kroz stresne uvjete želučano crijevnog sustava, stoga je vrlo važno da probiotici zadovoljavaju osnovni kriterij preživljenja u navedenim uvjetima kako bi se mogli efikasno primijeniti (Kostelac i sur., 2020).

Obzirom da stanice uklanjaju radikale tako što ih vežu na svoju površinu, očekivano je smanjenje antioksidativnog kapaciteta probiotika što je broj prisutnih stanica manji. Dobiveno smanjenje je usporedivo s Li i sur. (2012) koji su zabilježili značajnu redukciju antioksidativnog potencijala bakterije *L. plantarum* kada je broj stanica u suspenziji reducirano s 10^{10} na 10^9 stanica po mililitru.

Kako se u znanstvenim istraživanjima često koriste varijacije DPPH metode pri istraživanju probiotika, vrlo je važno koristiti unutarnji standard kako bi rezultati bili usporedivi. U ovom istraživanju, radi usporedbe antioksidativne sposobnosti bakterije, korištene su različite koncentracije L-askorbinske kiseline kao antioksidativnog standarda. U istim eksperimentalnim uvjetima mjerena je sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala. Rezultati su prikazani na Slici 3.

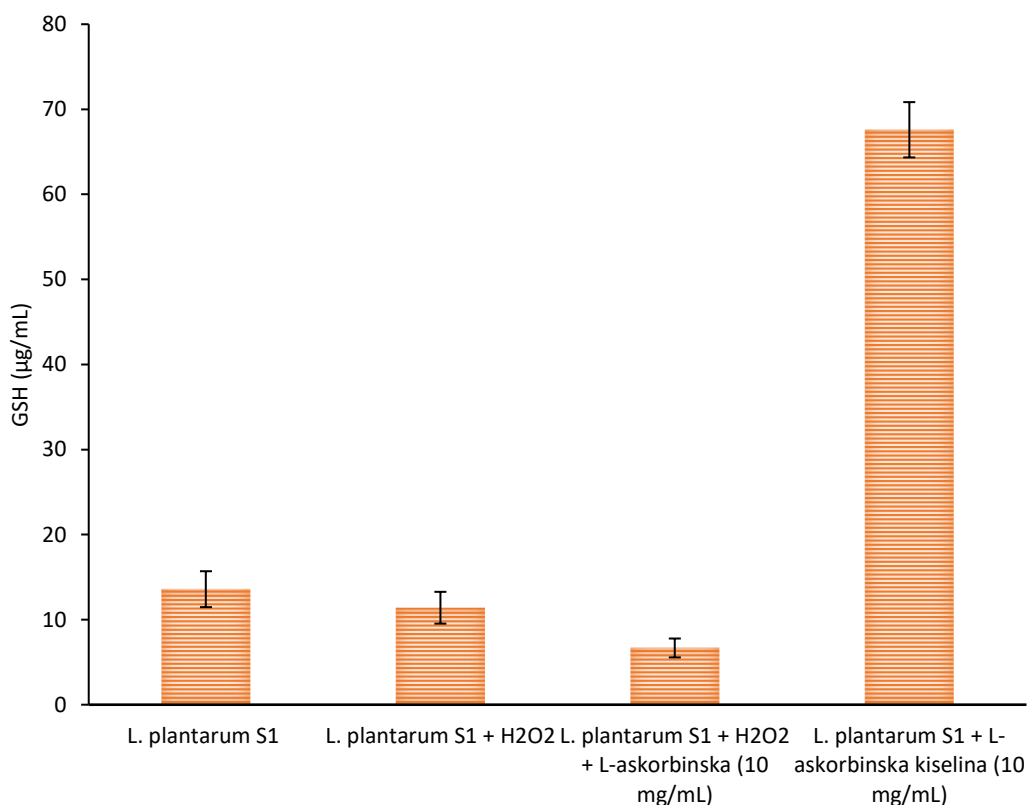


Slika 3. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala pri različitim koncentracijama L-askorbinske kiseline izražena kao postotak uklanjanja \pm SD.

Kao snažan antioksidans, L-askorbinska kiselina je pri većini koncentracija uklonila visok postotak DPPH radikala u eksperimentalnim uvjetima. Nakon usporedbe, utvrđeno je da je *L. plantarum* S1 pri koncentraciji od 10^9 CFU/mL uklonila približno kao i 10 mg/L L-askorbinske kiseline potvrdivši visok antioksidativni potencijal.

4.2. Određivanje koncentracije glutaciona u suspenziji

Antioksidativni potencijal probiotičkih bakterija također dokazujemo mjerenjem koncentracije unutarstaničnog glutaciona. U ovom radu izmjerena je unutarstanična koncentracija glutaciona pri normalnom uzgoju, pri uzgoju u oksidativnom stresu (vodikov peroksid) te u prisutnosti L-askorbinske kiseline te u kombiniranim uvjetima peroksida i L-askorbinske kiseline. Rezultati su prikazani na Slici 4.



Slika 4. Koncentracija unutarstaničnog glutaciona \pm SD u suspenziji probiotičke bakterije *Lactobacillus plantarum* S1 nakon normalnog uzgoja i uzgoja u prisutnosti vodikovog peroksida i L-askorbinske kiseline.

Iz rezultata je vidljivo da probiotička bakterija uzgojena u normalnim uvjetima proizvodi oko 14 µg/mL glutaciona. Slično, u indukciji oksidativnog stresa nije primijećena značajna promjena

u koncentraciji glutationa. Zanimljivo, prilikom pozitivne indukcije L-askorbinskom kiselinom, izmjerena je vrlo visoka koncentracija od 67 µg/mL glutationa. Kombinacija pozitivnog i negativnog induktora rezultirala je smanjenom koncentracijom glutationa naspram standardnih uzgojnih uvjeta.

Izmjerene koncentracije glutationa u standardnim uvjetima te uvjetima negativne indukcije mogu se smatrati vrlo visokima. Istraživanje Novak 2018. pokazalo je raspon koncentracija unutarstaničnog glutationa u različitim vrstama bakterija mliječne kiseline te je maksimalna vrijednost primijećena kod probiotičke bakterije *Lactobacillus lactis ssp. cremoris* MG1363 i iznosila je 5,84 µg/mL.

Glutation je mala molekula koja ispoljava antioksidativnu aktivnost, stoga je primijećena indukcija u uvjetima indukcije s L-askorbinskom kiselinom vrlo značajna te može omogućiti razvoj probiotičkih proizvoda s pojačanom antioksidativnom aktivnošću.

ZAKLJUČAK

1. Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako *L. plantarum* S1, izoliran iz sirutke ima značajan antioksidativni kapacitet.
2. Navedeni soj ima visoku sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala koja odgovara 10 mg/mL L-askorbinske kiseline.
3. Ukupan broj bakterijskih stanica značajno utječe na ukupnu antioksidativnu aktivnost te je preporučen broj od 10⁹ CFU/mL za optimalno ispoljavanje antioksidativnih učinaka.
4. *L. plantarum* S1 proizvodi značajne koncentracije unutarstaničnog glutationa koja mnogostruko raste u induciranim uvjetima rasta u prisutnosti L-askorbinske kiseline od 10 mg/mL.

5. LITERATURA

- Aaseth J. (2016) Chelation Therapy in the Treatment of Metal Intoxication, 1. izd., Academic Press, str. 1-33.
- Archibald F.S., Fridovich I. (1981a) Manganese and defenses against oxygen-toxicity in *Lactobacillus plantarum*. Journal of Bacteriology **145**: 442-451.
- Archibald F.S., Fridovich I. (1981b) Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. Journal of Bacteriology **146**: 928-936 .
- Attaallah W., Yilmaz A.M., Erdogan N., Yalcin A.S., Aktan A.O. (2012) Whey Protein Versus Whey Protein Hydrolyzate for the Protection of Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate Induced Colonic Tumors in Rats. Pathology & Oncology Research **18**: 817-822.
- Axelsson L., Ahrne S. (1998) Applied Microbial Systematics, 1. izd., Springer, Dordrecht, str. 367-388.
- Ayyanna R., Ankaiah D., Arul V. (2018) Anti-inflammatory and Antioxidant Properties of Probiotic Bacterium *Lactobacillus mucosae* AN1 and *Lactobacillus fermentum* SNR1 Wistar Albino Rats. Frontiers in Microbiology **9**:3063.
- Barukčić I., Lisak Jakopović K., Božanić R. (2019) Valorisation of Whey and Buttermilk for Production of Functional Beverages – An Overview of Current Possibilities. Food Technology and Biotechnology **57**: 448-460.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology **28**: 25-30.
- Cerretani L., Bendini A. (2010) Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention, 1.izd., Academic Press, str. 625-635.
- Corsetti A., Settanni L. (2007) *Lactobacilli* in Sourdough Fermentation. Food Research International, **40**: 539-558.
- Das, D., Goyal, A. (2015) Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. LWT-food Science and Technology, **61**: 263-268.
- Dröge W., Holm E. (1997) Role of cysteine and glutathione in HIV infection and other diseases associated with muscle wasting and immunological dysfunction. The FASEB Journal **11**: 1077-1089.

- Fanucchi M,V. (2014), *The Lung: Development, Aging and the Environment*, 2.izd., Elsevier, 493-499.
- Frece J., Markov K., Kovačević D. (2010a) Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso* **12**: 92-98.
- Frece J., Markov K., Kovačević D. (2010b) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz slavonskog kulena, kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso* **12**: 208-214.
- Holtz R.W. (2009) *Skin Aging Handbook*, 1.izd., William Andrew, str. 329-362.
- Ito Y., Suzuki K., Suzuki S., Sasaki R., Otani M., Aoki K. (2002) Serum antioxidants and subsequent mortality rates of all causes or cancer among rural Japanese inhabitants. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **72**: 237-250.
- Jeličić I., Božanić R., Tratnik Lj. (2008) Napitci na bazi sirutke - nova generacija mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo : časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* **58**: 257-274.
- Jelovac N. (2011) Katabolizam aminokiselina u stanicama bakterija mliječne kiseline. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **6**: 25-36.
- Kim H., Kim J.S., Kim Y., Jeong Y., Kim J.E., Paek N.S., Kang C.H. (2020) Antioxidant and Probiotic Properties of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* of Human Origins. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **25**: 421-430.
- Kostelac D., Gerić M., Gajski G., Markova K., Domijanc A. M., Čanak I., Jakopovića Ž., Svetec I.K., Žunar B., Frece J. (2020) Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal* **112**: 104828
- Krznarić Ž. (2008) Klinička prehrana danas. *Medicus* **17**: 65-70.
- Li S., Zhao Y., Zhang L., Zhang X., Huang L., Li D., Niu C., Yang Z., Wang, Q. (2012) Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food chemistry*, **135**: 1914-1919.
- Mischley L. K. (2017a) Chapter Forty - Nutrition and Nonmotor Symptoms of Parkinson's Disease, 1.izd., Elsevier, str. 1143-1161
- Mischley L.K., Lau R.C., Shankland E.G., Wilbur T.K., Padowski J.M. (2017b) Phase IIb Study of Intranasal Glutathione in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* **7**: 289-299.

- Novak J. (2018) Antioksidativna aktivnost odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline. Završni rad, Repozitorij Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.
- Petrovicky B. (2016) Primjena starter kultura u prehrambenoj industriji. Završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.
- Pophaly S.D., Singh R., Pophaly S.D., Kaushik J.K., Tomar S.K. (2012) Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* **11**: 114
- Pyrzynska K., Pekal A. (2013) Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods* **5**: 4288-4295.
- Roychowdhury R., Khan M. H., Choudhury S. (2019) Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance, 1. izd., Woodhead Publishing, str. 341-369.
- Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Mattila-Sandholm T. (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* **84**: 197-215.
- Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Šušković J. (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**: 77-84.
- Tratnik Lj. (1998) Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga **48**: 203-204.
- Wang F., Zhang Y. (2015) Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery, 1.izd., Academic Press, 4.3.2
- Wang Y., Wu Y.P., Wang Y.Y., Xu H., Mei X.Q., Yu D.Y., Wang Y.B., Li W.F. (2017) Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients* **9**: 521.
- Yang S. J., Kim K. T., Kim T. Y., Paik H. D. (2020) Probiotic properties and antioxidant activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in fermented black gamju. *Foods*, **9**: 1154.
- Zago M., Fornasari M.E., Carminati D., Burns P., Suarez V., Vinderola G., Reinheimer J., Giraffa G. (2011) Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* **28**: 1033-1040.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

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

Milardović Ana

ime i prezime studenta