

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Mario Dukić

**Utjecaj liofilizacije i mikroinkapsulacije na funkcionalnost
probiotičkih bakterija kao živih lijekova**

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Jagode Šušković i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008/2009.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Bakterije mliječne kiseline kao probiotici	3
2.1.1. Rod <i>Lactobacillus</i>	5
2.1.1.1. Bakterija <i>Lactobacillus helveticus</i> M92	6
2.1.2. Rod <i>Enterococcus</i>	6
2.1.2.1. Bakterija <i>Enterococcus faecium</i> L3.....	7
2.1.3. Mehanizam djelovanja probiotika	8
2.1.4. Tehnološki zahtjevi pri izboru probiotika	10
2.2. Liofilizacija probiotičkih bakterija	10
2.3. Mikroinkapsulacija probiotičkih bakterija	13
3. MATERIJAL I METODE	17
3.1. MATERIJAL	17
3.1.1. Mikroorganizmi.....	17
3.1.1.1. Radni mikroorganizmi.....	17
3.1.1.2. Test mikroorganizmi	17
3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije	17
3.1.2.1. Hranjive podloge	17
3.1.2.2. 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. Mikrobiološke metode.....	20
3.2.2.1. KOH metoda	20
3.2.2.2. Katalaza test	21
3.2.2.3. Određivanje sporogenosti.....	21
3.2.2.4. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	21
3.2.2.5. Turbidimetrijska metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja	21
3.2.3. Određivanje stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline	22
3.2.4. API test.....	22
3.2.4.1. API 50 CHL test.....	22
3.2.4.2. API 20 STREP test.....	22
3.2.5. Genetičke metode.....	23
3.2.5.1. Izolacija DNA	23
3.2.5.2. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	23
3.2.6. Preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom liofilizacije	24

3.2.7. Postupci mikroinkapsulacije probiotičkih sojeva	24
3.2.7.1. Mikroinkapsulacija stanica probiotičkih sojeva u alginatu	24
3.2.7.2. Mikroinkapsulacija stanica probiotičkih sojeva u kazeinu djelovanjem enzima transglutaminaze	25
3.2.8. Ispitivanje preživljavanja probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	25
3.2.8.1. Priprava simuliranog želučanog i soka tankog crijeva	25
3.2.8.2. Preživljavanje probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	25
4. REZULTATI	27
4.1. Utjecaj različitih lioprotektora na preživljavanje <i>L. helveticus</i> M92 i <i>E. faecium</i> L3 tijekom liofilizacije	27
4.2. Utjecaj mikroinkapsulacije vlažne biomase i liofiliziranih stanica <i>L. helveticus</i> M92 i <i>E. faecium</i> L3 na njihova funkcionalna svojstva	33
5. RASPRAVA	41
5.1. Utjecaj različitih lioprotektora na preživljavanje <i>L. helveticus</i> M92 i <i>E. faecium</i> L3 tijekom liofilizacije	41
5.2. Utjecaj mikroinkapsulacije vlažne biomase stanica <i>L. helveticus</i> M92 i <i>E. faecium</i> L3 na njihova funkcionalna svojstva	43
6. ZAKLJUČCI	46
7. ZAHVALE	47
8. POPIS LITERATURE	48

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne bakterije (s niskim sadržajem gvanina i citozina u molekuli DNA) koje su prirodno prisutne na supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, razgradni biljni materijali i u ljudskom gastrointestinalnom sustavu. To su industrijski vrlo važni mikroorganizmi koj se upotrebljavaju kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda, a sve je učestalija primjena bakterija mliječne kiseline kao probiotika ili u kombinaciji s prebioticima (sinbiotički koncept). Probiotici su definirani kao jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji primijenjeni u ljudi ili životinja, blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore (Havenaar i Huis in't Veld, 1992; Šušković, 1996). Probiotičke bakterije *Lactobacillus helveticus* M92 i *Enterococcus faecium* L3 su bakterijski sojevi selekcionirani u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, na temelju istraživanja provedenih u sklopu probiotičkog koncepta. Odabrani bakterijski sojevi ispunili su vrlo stroge izborne probiotičke kriterije (Šušković, 1996, Šušković i sur., 2001; Šušković, 2009). Naime, ustanovljeno je da dobro preživljavaju u simuliranim uvjetima probavnog sustava, rezistentni su na žučne soli i enzime probavnog sustava, asimiliraju kolesterol u prisutnosti žučnih soli te proizvode antimikrobne supstancije koje inhibiraju rast potencijalno patogenih mikroorganizama (Šušković i sur., 2000; Kos i sur., 2001; Kos i sur., 2008). Nadalje, ustanovljena je *in vitro* adhezija svih triju sojeva na epitelne stanice ileuma i želuca miševa i svinja, što je potvrđeno i *in vivo* na pokusnim miševima, te je dokazano imunomodulacijsko djelovanje sva tri probiotička soja kroz povećanje razine ukupnih IgA i IgG antitijela u serumima pokusnih miševa (Kos i sur., 2003; Frece i sur., 2005; Frece i sur., 2009). Da bi izazvali željene pozitivne učinke na zdravlje, probiotički pripravci moraju sadržavati žive mikrobne stanice u koncentracijama višim od 10^6 po gramu proizvoda (Shah, 2007). Zbog toga se istražuju različite metode koje mogu doprinjeti povećanju njihovog preživljavanja tijekom biotehnološke proizvodnje, čuvanja ili primjene probiotika u različitim proizvodima, te nakon oralne primjene u gastrointestinalnom traktu domaćina. Mnogi znanstveni radovi u literaturi opisuju utjecaj različitih metoda mikroinkapsulacije na povećanje stabilnosti i preživljavanja probiotika tijekom njihove proizvodnje i primjene, a kao najpogodnija metoda pripreme bakterijskih stanica kroz duži vremesni period često se navodi liofilizacija (Capola i sur., 2006; Ann i sur., 2007.; Annan i sur., 2008; Gbassi i sur., 2009). Stoga je cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj mikroinkapsulacije i liofilizacije na funkcionalnost probiotičkih bakterija *L. helveticus* M92 i

E. faecium L3. U tu svrhu ispitan je utjecaj različitih lioprotektora na preživljavanje bakterija *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 tijekom liofilizacije. Zatim je provedena mikroinkapsulacija liofilizirane kulture i svježe biomase stanica *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 u alginatu, te u kazeinu djelovanjem enzima transglutaminaze te je praćeno njihovo preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta i u čvrstom probiotičkom jogurtu. Također je ispitano i antimikrobno djelovanje probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 prema odabranim test mikroorganizmima kao jedno od važnih funkcionalnih svojstava probiotičkih sojeva.

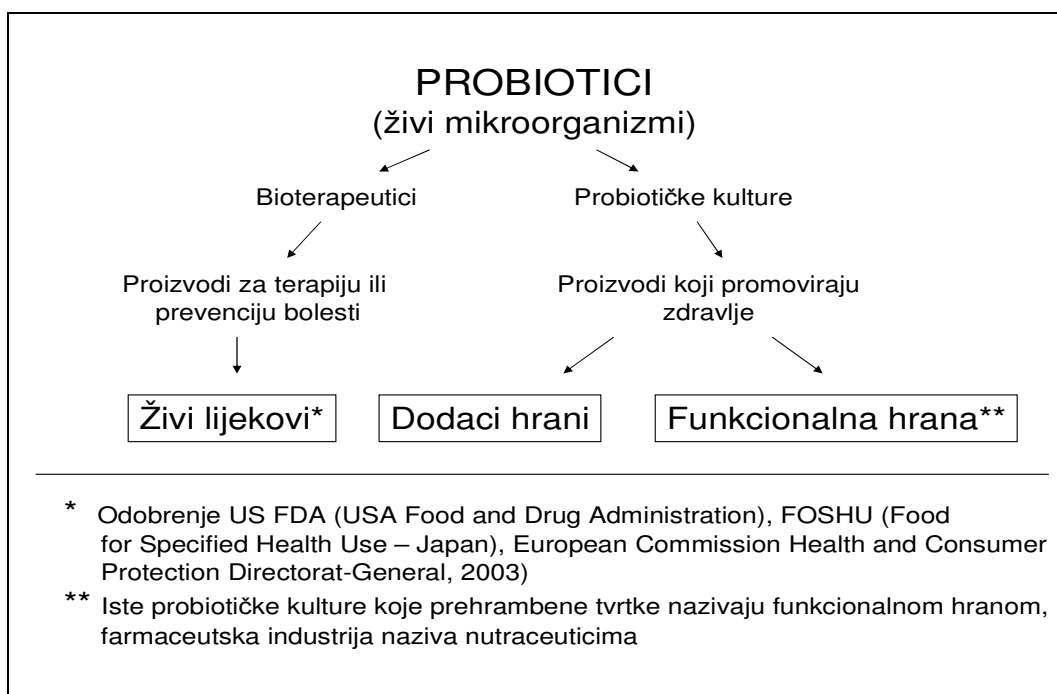
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline kao probiotici

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili samo u anaerobnim uvjetima te proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. To su gram-pozitivne, nesporogene, mezofilne bakterije, kemoorganotrofi, katalaza-negativne, nemaju citokroma, ne sintetiziraju porfirine, a rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama. Karakterizira ih GRAS status (engl. *Generally Regarded As Safe*). BMK obuhvaćaju 20 rodova: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Actinomyces* i *Atopobium*. Rod *Lactobacillus* s oko 80 vrsta je najbrojniji, a svi spomenuti rodovi izuzev roda *Bifidobacterium* imaju niski G+C (gvanin + citozin) sadržaj (< 50%) (Schleifer i Ludwig, 1995). *Bifidobacterium* i *Sporolactobacillus* filogenetički pripadaju drugim skupinama bakterija, ali su ovdje obuhvaćene u skupinu BMK zbog svojih fizioloških i biokemijskih značajki, dok im je glavna značajka proizvodnja mliječne kiseline kao krajnjeg proizvoda svojeg metabolizma (Šušković, 1996; Klein i sur., 1998; Kos, 2001). BMK energiju dobivaju fermentacijom ugljikohidrata, a većina saharida i oligosaharida transportira se u stanicu uz pomoć specifičnih permeaza te se fosforiliraju unutar stanice pomoću ATP-ovisnih kinaza. Za razgradnju heksoza, BMK koriste glikolizu ili Embden-Meyerhof-Parnasov put i 6-fosfoglukonat/fosfoketolazni put. S obzirom na način kojim fermentiraju heksoze, BMK se dijele u tri grupe: obligatno homofermentativne bakterije, obligatno heterofermentativne bakterije i fakultativno heterofermentativne bakterije (Šušković, 1996).

Velik broj poželjnih svojstava intestinalne mikroflore pripisuje se BMK, odnosno pojedinim vrstama bakterija koje uglavnom pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Poželjno djelovanje BMK na zdravlje domaćina u prvom redu obuhvaća: poboljšanje metabolizma laktoze, stimulaciju imunološkog sustava, suzbijanje urogenitalnih i crijevnih infekcija (prevenciju kolonizacije patogena mehanizmom kompetitivne ekskluzije), regulaciju koncentracije kolesterola, antitumorno djelovanje, suzbijanje alergijskih reakcija i modifikaciju crijevne mikroflore. Zbog ovih navedenih svojstava, poželjno je primijeniti bakterije mliječne kiseline u prehrani i terapeutici kao probiotike, posebno u slučajevima poremećaja ravnoteže crijevne mikroflore (Kos, 2001; Sanders i Huis in't Veld, 1999;

Conway i Henriksson, 1994). Pod pojmom probiotik podrazumijeva se „jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina“ (Šušковиć, 1996). Probiotici se prema načinu primjene mogu podijeliti na bioterapeutike i funkcionalne dodatke hrani (Slika 1.). Bioterapeutici su proizvodi namijenjeni za terapiju ili prevenciju bolesti što ih svrstava u kategoriju živih lijekova, dok probiotici kao funkcionalni dodaci hrani promoviraju zdravlje tj. pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore (Periti i Tonelli, 2002, Šušковиć, 2009). Često se iste probiotičke kulture, koje prehrambene tvrtke nazivaju funkcionalnim dodacima hrani, farmaceutska industrija naziva nutraceuticima (Sleator i Hill, 2008). Nekoliko preglednih znanstvenih radova detaljno opisuje fiziološku aktivnost i mehanizam djelovanja probiotika kao i rezultate provedenih kliničkih istraživanja koja potvrđuju korisne znanstvene učinke probiotika (Goldin i Gorbach, 1992; Šušковиć, 1996; Reid, 1999; Šušковиć i sur., 2001, Šušковиć, 2009).



Slika 1. Klasifikacija probiotičkih proizvoda (Šušковиć, 2009)

2.1.1. Rod *Lactobacillus*

Prema klasičnim fenotipskim testovima bakterije roda *Lactobacillus* podijeljene su u tri osnovne skupine prema heksoza-fermentativnom putu: homofermentativne, fakultativno heterofermentativne i obligatno heterofermentativne. Suvremene molekularne metode donijele su i novu podjelu *Lactobacillus* vrsta koja može razlikovati fenotipski vrlo slične, ali genotipski bitno različite bakterijske vrste (Vandamme i sur, 1996). Od 54 do sada prepoznatih vrsta iz roda *Lactobacillus*, od kojih 5 imaju i podvrste, bakterijske vrste pronađene u intestinalnom sustavu i/ili koje su do sada primijenjene kao probiotici jesu: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. delbruckeii* subsp. *bulgaricus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. hamsteri* (filogenetička skupina A), *L. aviarius* subsp. *aviarius*, *L. aviarius* subsp. *araffinosus*, *L. ruminis*, *L. salivarius* subsp. *salicinius*, *L. salivarius* subsp. *salivarius*, *L. agilis*, *L. casei*, *L. intestinalis*, *L. murinus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. reuteri* (filogenetička skupina B) (Tannock, 1999b).

Identifikacija bakterijskih vrsta i podjela u skupine provedena je nakon sekvencioniranja 16S rRNA gena (rDNA) pomoću specifičnih oligonukleotidnih proba PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) metodom. Velike promjene u sistematici bakterija posljedica su spoznaje da su sekvencije 16S rRNA „evolucijski kronometar“. Neke su regije unutar molekule 16S rRNA konzervirane odnosno jednake u svim bakterijskim vrstama, dok se ostali dijelovi molekule razlikuju u sekvencijama nukleotidnih baza i mogu se međusobno uspoređivati (Neefs i sur., 1993).

Usporedbom sekvencija 16S rRNA gena *Lactobacillus* vrsta ustanovljeno je da V1, V i V3 regije sadržavaju informacije specifične za određenu vrstu. Stoga je dostatna, radi identifikacije, amplifikacija gena PCR metodom i sekvencioniranje manje od polovice gena (manje od 750 parova baza), no za utvrđivanje filogenetičkih odnosa ipak je bolje sekvencionirati cijeli gen. Ako je utvrđena sekvencijska homologija rDNA manja od 97%, onda uspoređivane bakterije imaju manje od 60 do 70% sličnosti u cijelom kromosomu (tzv. „zlatni standard“ pri opisu bakterijskih vrsta) te se smatra da ne pripadaju istoj bakterijskoj vrsti (Stackebrandt i Goebel, 1994).

Mnoge bakterije imaju više kopija (alela) rRNA operona po genomu, a regija između 16S i 23S gena (engl. „spacer region“ ili „internal transcribed spacer“ – ITS) veličinom se razlikuje unutar različitih operona. Do sada su utvrđene nukleotidne sekvencije regija između 16S i 23S gena mnogih *Lactobacillus* vrsta (Tannock, 1999b). Tako je na temelju sekvencija 16S rRNA i regije između 16S i 23S gena ustanovljeno da se pod nekadašnjom bakterijskom

vrstom nazvanom *Lactobacillus acidophilus* krije čak 6 različitih bakterijskih vrsta (engl. „genomospecies“) koje se ne razlikuju na temelju fenotipskih testova. Te su vrste podijeljene u dvije DNA-homologne skupine, A i B: *Lactobacillus acidophilus* (A1), *Lactobacillus crispatus* (A2), *Lactobacillus amylovorus* (A3), *Lactobacillus gallinarum* (A4) i *Lactobacillus johnsonii* (B2).

2.1.1.1. Bakterija *Lactobacillus helveticus* M92

L. helveticus je obligatno homofermentativna, termofilna BMK koja se najčešće primjenjuje kao starter kultura u proizvodnji sira. *L. helveticus* M92 izoliran je i kroz strogi probiotički izborni kriterij definiran kao probiotički soj u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Bakterija *L. helveticus* M92 je prvobitno identificirana i imenovana kao *Lactobacillus acidophilus* M92, ali je nakon DNA analiza provedenih pomoću metode FAFLP (engl. *Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism*, DNA – *fingerprinting*), reidentificirana kao *L. helveticus* M92 (Frece, 2007). Ovaj soj ima sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, otporan je na žučne kiseline, posjeduje antibakterijsku aktivnost spram nekih enteropatogenih i sporogenih bakterija te je potencijalni kandidat u smislu probiotičkog soja (Šušković, 1996; Kos i sur., 2000; Šušković i sur., 2000). Nadalje, istraživanja u *in vitro* uvjetima pokazala su da *L. helveticus* M92 asimilira kolesterol u prisutnosti žučnih soli te se pretpostavlja da bi taj soj mogao pomoći u snižavanju serumskog kolesterola *in vivo* (Kos, 2001). Preliminarni rezultati u tehnološkom kontekstu pokazali su vijabilnost i aktivnost ovog soja i visoku razinu preživljavanja stanica tijekom procesa liofilizacije i skladištenja pri različitim temperaturama (Kos i sur., 2008). Štoviše, *L. helveticus* M92 ima visoki potencijal kao probiotički soj zahvaljujući zaštitnoj ulozi njegovih „S – layer“ proteina tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt i tijekom procesiranja kulture za probiotičke proizvode (Frece i sur., 2005a).

2.1.2. Rod *Enterococcus*

Bakterije roda *Enterococcus* pripadaju skupini streptokoka. Prema posljednjim komparativnim analizama, streptokoki se dijele u tri različite skupine (Schleifer i sur., 1995). Prva skupina obuhvaća većinu streptokoka, uključujući „piogene“ srodne bakterije *Streptococcus mutans* i *Streptococcus mileri* kao i oralne streptokoke. Drugoj skupini

pripadaju tipični enterokoki svrstani u rod *Enterococcus*, dok u treći skupinu ulaze svi streptokoki izolirani iz mlijeka čineći tako rod *Lactococcus*.

Bakterijske vrste roda *Enterococcus* najčešće se koriste kao dodaci hrani za perad i svinje. Međutim, postoje i probiotički pripravci koji sadržavaju enterokoke, a namijenjeni su ljudima. Iako rod *Enterococcus* obuhvaća velik broj vrsta, samo se dvije od njih primjenjuju kao probiotičke kulture i to: *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis*. Te se dvije vrste mogu lako razlikovati jedna od druge na osnovi fermentacijskih reakcija (arabinoza, sorbitol) i različitih temperatura rasta (Klein i sur., 1998).

Vrste *E. faecalis* i *E. faecium* često su izolirane iz kliničkog materijala. Neki od tih sojeva rezistentni su na antibiotike 1. izbora (npr. ampicilin), a mogu biti nositelji i dodatnih rezistencija kao što je rezistencija na glikopeptidne antibiotike (vankomicin i teikoplanin). Obje su rezistencije lako prenosive na druge bakterijske vrste (Leclercq i Courvalin, 1996). Prema tome, važno je spriječiti širenje takovih sojeva putem hranidbenog lanca. U bakterijskim sojevima namijenjenim probiotičkoj uporabi, prijeko je potrebno isključiti prisutnost *vanA* gena u genomu koji kodira za protein veličine 93 kDa. Iako je nemoguće isključiti prijenos *vanA* gena konjugacijom, proteinskom analizom može se odrediti prisutnost aktivnih *vanA* gena u potencijalnom probiotičkom soju. RAPD-PCR (engl. *Randomly Amplified Polymorphic DNA – Polymerase Chain Reaction*) i PFGE (engl. *Puls Field Gel Electrophoresis*) metodama moguće je razlikovati potencijalne probiotičke sojeve od kliničkih sojeva koji su rezistentni na glikopeptidne antibiotike (Klein i sur., 1998, Kos, 2001).

2.1.2.1. Bakterija *Enterococcus faecium* L3

Probiotička bakterija *E. faecium* L3 je bakterijski soj selekcioniran u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, na temelju istraživanja provedenih u sklopu probiotičkog koncepta. Ovaj soj dobro preživljava u simuliranim uvjetima probavnog sustava, rezistentan je na žučne soli i enzime probavnog sustava, asimilira kolesterol u prisutnosti žučnih soli te proizvodi antimikrobne supstancije koje inhibiraju rast potencijalno patogenih mikroorganizama (Šušković i sur. 1993.; Šušković i sur., 1997.; Kos, 2001.; Kos i sur., 2008.) Nadalje, ustanovljena je *in vitro* adhezija *E. faecium* L3 na epitelne stanice ileuma i želuca miševa i svinja, što je potvrđeno i *in vivo* na pokusnim miševima te je dokazano imunomodulacijsko djelovanje tog probiotičkog soja kroz povećanje razine ukupnih IgA i IgG antitijela u serumima pokusnih miševa (Kos i sur. 2003.; Frece i sur., 2005.; Frece, 2007.)

2.1.3. Mehanizam djelovanja probiotika

Mehanizam probiotičkog djelovanja nije još u potpunosti razjašnjen. Prema Fulleru (1989, 1992); Huis in't Veld i Havenaar (1993); Šušković i sur. (2001) probiotičko djelovanje bakterija mliječne kiseline (BMK) izražava se pomoću tri glavna mehanizma:

A. Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama u intestinalnom traktu:

- a) proizvodnjom antibakterijskih supstancija, što obuhvaća primarne metabolite: mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, diacetil, acetaldehid, vodikov peroksid i bakteriocine (proteinske supstancije s antimikrobnim djelovanjem, u prvom redu prema srodnim bakterijskim vrstama);
- b) natjecanjem za hranjive tvari, u prvom redu za neprobavljive ugljikohidrate u debelom crijevu;
- c) natjecanjem za mjesta vezanja u intestinalnom traktu. Adhezija probiotičkih sojeva u intestinalnom traktu može biti specifična i nespecifična. Specifična adhezija označava vezanje adhezina na površini bakterijske stanice s receptorom na crijevnoj epitelnoj stanici. Nespecifična adhezija obuhvaća hidrofobne i elektrostatske interakcije koje su često inicijalna faza koja prethodi specifičnoj adheziji. Adhezija bakterija na sadržaj u lumenu crijeva također je nespecifična.

B. Modifikacija metabolizamskih procesa u intestinalnom traktu:

- a) povećanjem aktivnosti nekih enzima kao npr. β -galaktozidaze, što omogućava podnošljivost laktoze pri deficijenciji tog enzima;
- b) smanjenjem aktivnosti enzima koji sudjeluju u kancerogenim procesima kao što su: β -glukuronidaza, nitroreduktaza, azoreduktaza i steroid-7 α -dehidroksilaza.

C. Stimulacija imunološkog sustava domaćina:

- a) povećanjem razine protutijela
- b) povećanjem makrofagne aktivnosti

Prema posljednjim istraživanjima, oralno primijenjeni laktobacili poboljšavaju imunost domaćina jer povećavaju broj cirkulirajućih i lokalnih protutijela, koncentraciju gama interferona, aktivnost makrofaga i broj stanica ubojica. Nakon adhezije probiotičkih BMK na crijevnu sluznicu (mukozu) slijedi njihova translokacija do limfoidnog tkiva crijeva (engl. *gut-associated lymphoid tissue*, GALT), što je presudan korak u jačanju mukozalne i sistemske imunosti (Fuller i Perdigon, 2000; Shu i Gill, 2003, Bakker-Zierikzee i sur., 2006).

Na temelju iznesenog mehanizma probiotičkog djelovanja, mogući su poželjni učinci probiotičkih sojeva na zdravlje (Tablica 1). Mehanizam probiotičkog djelovanja iznesen pod točkom A sudjeluje u sprječavanju gastrointestinalnih infekcija, dok mehanizmi probiotičkog djelovanja pod točkama B i C omogućavaju smanjenje učestalosti raka debelog crijeva te općenito antikancerogeno djelovanje, smanjenje koncentracije kolesterola u krvi, poboljšanje metabolizma laktoze, sprječavanje zatvora (konstipacije), suzbijanje alergija, stimulaciju imunokompetentnih stanica (Limfocita B i T, stanica ubojica) i povećanje makrofagne aktivnosti (Šušković i sur., 2001).

Tablica 1. Poželjna svojstva i mehanizam djelovanja probiotičkih bakterija (Sanders i Huis in't Veld, 1999; Kos, 2001).

Poželjna svojstva probiotika	Mehanizam djelovanja probiotika
Sudjelovanje u metabolizmu laktoze	β -galaktozidazna aktivnost probiotičkog soja u tankom crijevu.
Sprječavanje gastrointestinalnih i urogenitalnih infekcija	Antimikrobno djelovanje mliječne kiseline, kratkolančanih masnih kiselina, vodikovog peroksida, diacetila i bakteriocina. Stimulacija imunološkog sustava (povećana proizvodnja protutijela). Natjecanje za hranjive komponente i mjesta vezanja u GIT.
Antikancerogeno djelovanje	Sprječavanje rasta bakterija koje proizvode prokancerogene enzime: β -glikozidazu, β -glukuronidazu, nitroreduktazu, azoreduktazu i inhibicija djelovanja tih enzima. Stimulacija imunološkog sustava (aktivacija makrofaga koji djeluju tumoricidno). Utjecaj na koncentraciju sekundarnih žučnih soli.
Modulacija imunološkog sustava	Stimulacija nespecifičnog (fagociti) i specifičnog imunološkog odgovora: aktivacija humoralnog imunološkog odgovora (IgA i IgG) i staničnog imunološkog odgovora (T-limfociti).
Suzbijanje alergija	Sprječavanje translokacije antigena u krv.
Snižavanje razine masnoće u krvi, sprječavanje bolesti srca i krvnih žila	Asimilacija kolesterola. Aktivnost hidrolaze žučnih soli.
Suzbijanje hepatičke encefalopatije	Inhibicija rasta mikroorganizama koji proizvode ureazu.

2.1.4. Tehnološki zahtjevi pri izboru probiotika

Procesiranje funkcionalne hrane i mikroorganizama prisutnih u njoj može se podijeliti u tri osnovne kategorije:

- a) procesiranje starter kultura
- b) procesiranje probiotika
- c) procesiranje proizvoda da bi se postigla željena funkcionalna svojstva.

Za proizvodnju probiotičkih proizvoda, probiotički sojevi trebaju ispunjavati sljedeće tehnološke karakteristike (Fonden i sur., 2000):

- 1) Održavanje visokog broja živih probiotičkih stanica tijekom čuvanja pri niskim temperaturama i u suhim bakterijskim pripravcima.
- 2) Koncentrirane kulture trebaju dobro preživljavati čuvanje tijekom dužeg vremenskog perioda.
- 3) Ne smiju inhibirati rast starter kultura koje su također prisutne u proizvodnji.
- 4) Trebaju biti prisutne u minimalnoj koncentraciji od 10^6 do 10^8 stanica po gramu proizvoda.
- 5) Ne smiju negativno utjecati na organoleptička svojstva proizvoda.

Održavanje visokog broja probiotičkih stanica ovisi o više faktora kao što su pH, temperatura skladištenja, koncentracija kisika te prisutnost drugih mikroorganizama. Budući da se probiotici koriste samo kao dodaci hrani, oni se u njoj ne umnožavaju. Zbog tog razloga, ponekad se koriste tehnike inkapsulacije probiotika, da bi se što duže očuvao potreban broj živih stanica probiotičkih mikroorganizama za njihovo pozitivno djelovanje na zdravlje domaćina (Anal i Singh, 2007).

2.2. Liofilizacija probiotičkih bakterija

Liofilizacija ili sušenje proizvoda u zamrznutom obliku je postupak sušenja kojim se tekući dio materijala odvodi sublimacijom. Proces se sastoji od dvije faze: zamrzavanja materijala u tankom sloju pri temperaturi od -15°C do -70°C i sušenja zamrznutog materijala u vakuumu pri niskim temperaturama (sublimacija) (Šušćović, 2009).

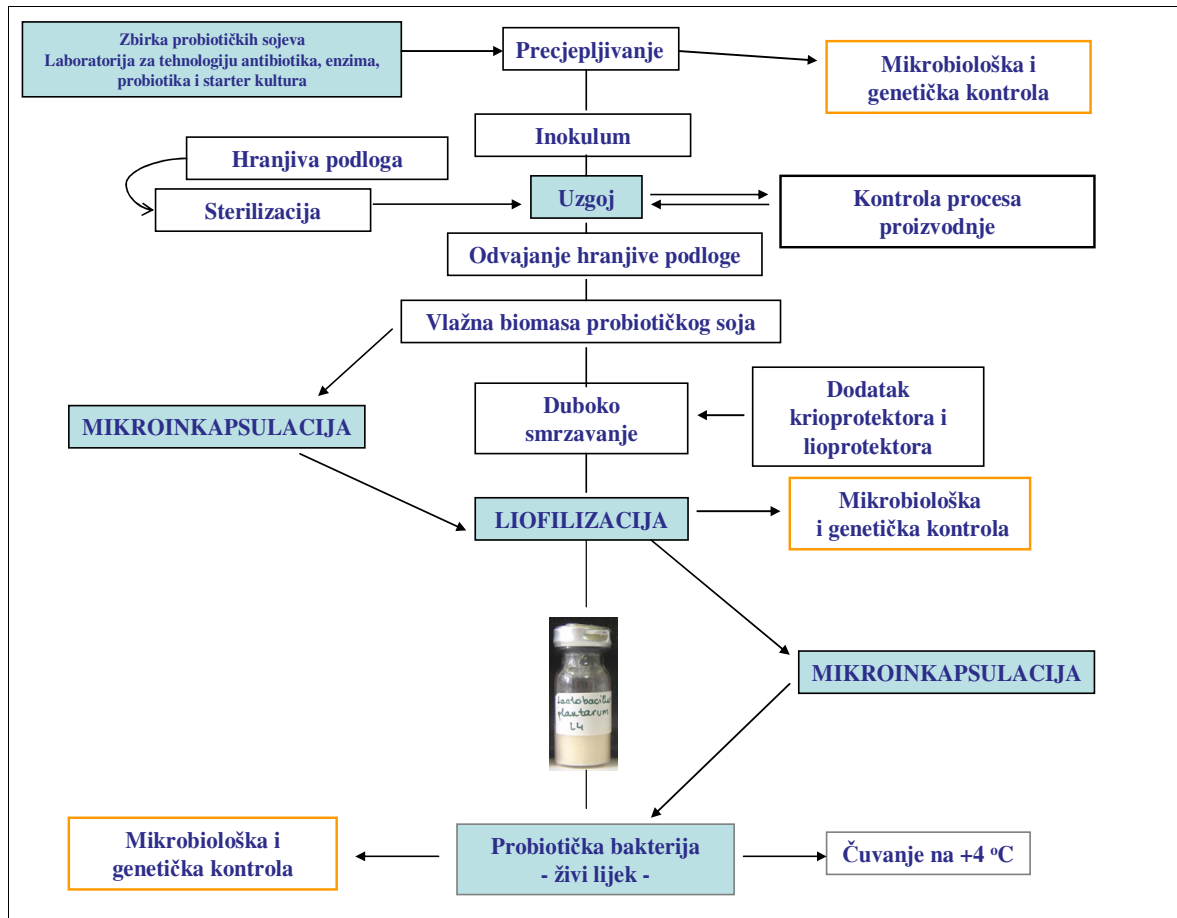
Liofilizacijom (engl. „*freeze-drying*“) se izbjegava denaturacija uzrokovana zagrijavanjem proizvoda na način da ga se održava u zamrznutom obliku tijekom postupka sušenja. Prednosti postupaka liofilizacije uključuju redukciju kontaminacije, minimalno oštećenje i gubitak aktivnosti kod termolabilnih materijala, brzinu i cjelovitost rehidracije,

mogućnost točnog i sterilnog doziranja konačnih proizvoda u spremnike itd. (Snowman, 1988).

Obzirom na veliku osjetljivost prema dehidraciji, kao i značaj BMK u prehrambenoj industriji, liofilizacija je preporučljiva metoda sušenja ovih bakterija, unatoč dugom vremenu sušenja, velikom utrošku energije i skupoj opremi koja liofilizaciju kao metodu sušenja opravdava samo ako se proizvode pripravci velike vrijednosti i kvalitete.

Dehidracija se često primjenjuje kao metoda stabilizacije probiotika za njihovo olakšano skladištenje, transport i kasniju primjenu. Liofilizacija je najraširenija tehnika dehidracije probiotika i mliječnih proizvoda. Tijekom zamrzavanja, formiranje ekstracelularnog leda uzrokuje povećanje ekstracelularne osmolalnosti, stoga odmah nakon oblikovanja leda izvan stanica dolazi do dehidracije tih istih stanica. Metode zamrzavanja stanica dijele se na sporo i brzo zamrzavanje. Kod sporog zamrzavanja proces postupne dehidracije stanica i istodobnog formiranja leda na njihovoj površini može dovesti do oštećenja samih stanica, dok se kod brzog zamrzavanja takva pojava može izbjeći kao i neravnomjerno sažimanje stanica (Fowler i Toner, 2005). Nadalje, veličina stanica ima veliki utjecaj na preživljavanje probiotika tijekom liofilizacije, gdje su male sferične stanice poput enterokoka rezistentnije na zamrzavanje i liofilizaciju za razliku od velikih štapićastih stanica laktobacila (Fonesca i sur., 2000).

Uklanjanje vezane vode iz bakterijskih stanica tijekom sušenja može dovesti do oštećenja površinskih proteina, stanične stijenke i stanične membrane. Vezana voda je vrlo važna za stabilizaciju strukturnog i funkcionalnog integriteta bioloških makromolekula, pa uklanjanje vode tijekom sušenja vodi destabilizaciji strukturnog integriteta staničnih komponenti i uzrokuje gubitak određenih funkcija (Brennan i sur, 1986). Zbog toga se, u svrhu postizanja optimalnih rezultata tijekom sušenja probiotika, pažnja mora dobro usmjeriti na minimalizaciju oštećenja određenih staničnih komponenti. Postupak liofilizacije kojim se proizvode probiotičke bakterije u praškastom obliku u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Primjer proizvodnje liofiliziranih probiotičkih bakterija kao živih lijekova u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Različiti krioprotektori, odnosno lioprotektori se dodaju u medij za sušenje prije provedbe samog postupka liofilizacije kako bi se povećalo preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom dehidracije. Takvi protektori podrazumijevaju obrano mlijeko u prahu, proteine sirutke, trehalozu, glicerol, betain, adonitol, saharozu, glukozu, laktozu i polimere poput dekstrana i polietilenglikola (Hubalek, 2003; Morgan i sur., 2006). Akumulacijom kompatibilnih krioprotektora unutar stanica smanjuje se razlika u osmotskom tlaku između intracelularnog i ekstracelularnog prostora (Kets i sur., 1996a).

Proizvodnja probiotika u praškastom obliku mora se izvoditi na način kojim će se održati adekvatan broj živih stanica. Za industrijsku proizvodnju se zbog toga često primjenjuje tehnika liofilizacije iako se tijekom procesa žive stanice probiotičkih bakterija

izlažu različitim oblicima stresa poput topline, hladnoće, osmotskog stresa, koncentracije kisika, što vodi narušavanju određenih funkcija stanica tijekom sušenja i skladištenja. Za optimalne odnosno povoljne rezultate, neophodno je provesti pravilan odabir lioprotektora (Meng i sur., 2008).

Za uspješnu liofilizaciju od primarnog je značaja postići dobar vakuum, budući da ukupan tlak unutar uređaja mora biti niži od tlaka pare na površini pripravka koji se liofilizira, a tlak para na površini kondenzatora mora biti niži od tlaka para u unutrašnjosti liofilizatora. Ova razlika tlakova upravlja brzinom sušenja. Uobičajeni vakuum koji se primjenjuje za liofilizaciju je između 50 i 100 mmHg. Pripravak koji se suši liofilizacijom tijekom sušenja prolazi kroz dvije faze: fazu primarnog sušenja i fazu sekundarnog sušenja. Primarno je sušenje iz zamrznutog stanja (od -15 °C do -70 °C), tijekom kojeg se u pripravak dovodi toplina. Smatra se da je primarno sušenje završeno kad je u pripravku preostalo još 6 – 8 % vode, jer tada u njemu više nema leda pa je i sublimacija okončana. Primarnim se sušenjem iz pripravka izdvaja tzv. slobodna voda. Sekundarno sušenje je sušenje iz "tekućeg" stanja i njime se nastoji ukloniti tzv. vezana voda, jer je ona čimbenik koji može spriječiti uspješno čuvanje osušenog pripravka, osobito kod sobne temperature (Runjić-Perić, 1996).

Laktobacili dobro podnose zamrzavanje i čuvanje na temperaturama do – 20 °C i niže, dok slabije podnose sušenje iz zamrznutog stanja i sušenje raspršivanjem (Klaenhammer i Kleeman, 1981). Sastav medija ima veliki utjecaj na stabilnost bakterijskih stanica tijekom tih procesa, npr. prisutnost CaCO₃ u mediju u koncentraciji od 0,1 % povećava preživljavanje stanica bakterijske kulture *L. acidophilus* tijekom zamrzavanja (-20 °C), ali ne i tijekom liofilizacije. Dodatak 5 % glicerola u taj medij povećava postotak preživljavanja tijekom procesa liofilizacije (Bozoglu i Gurakan, 1989). Staab i Ely (1987) su dobili bolje rezultate pri liofilizaciji anaerobnih kultura (*Bifidobacterium* i *Peptostreptococcus*) kada se koristio pepton s 12 % saharoze kao nosač bakterijskih stanica, a ne obrano mlijeko. U slučaju skladištenja bakterijskih kultura tijekom duljeg vremenskog perioda i u nepovoljnim uvjetima provodi se inkapsulacija bakterijskih stanica (Havenaar i sur., 1992; Šušković, 1996).

2.3. Mikroinkapsulacija probiotičkih bakterija

Danas je u svijetu velika potražnja za proizvodima na bazi probiotika koji se najčešće koriste i konzumiraju u obliku fermentiranih mliječnih proizvoda te kao dodaci prehrani (Champagne i Fustier, 2007). Međutim, učinkovitost probiotika ovisi o broju živih bakterijskih stanica u proizvodu budući da probiotičke bakterije moraju zadržati aktivnost

tijekom skladištenja, a nakon oralne primjene preživjeti prolazak kroz želudac i tanko crijevo gdje glavnu prepreku preživljenju čine želučane kiseline, prisutni enzimi i žučne soli. Analize probiotičkih proizvoda u različitim zemljama diljem svijeta potvrdile su da broj živih stanica probiotičkih sojeva u fermentiranim mliječnim proizvodima nije uvijek zadovoljavajući (Shah, 2000; Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001). Isto tako, probiotički preparati u obliku tableta, prahova i sl. moraju sadržavati točno određeni broj živih stanica probiotičkih mikroorganizama tijekom vijeka trajanja proizvoda (Gilliland, 1981). Dakle, važno je osigurati optimalne uvjete tijekom pripreme i čuvanja probiotika (sastav hranjive podloge, temperatura rasta, trajanje fermentacije, miješanje, homogenizacija itd.) radi mikrobiološke stabilnosti proizvoda. Dodatkom različitih protektora, inkapsuliranjem i mikroinkapsuliranjem probiotičkih sojeva tijekom zamrzavanja, sušenja ili čuvanja, može se bitno povećati broj živih stanica po gramu pripravka (Anal i Singh, 2007; Champagne i Fustier, 2007).

Uspostavljanje fizičke barijere između živih stanica probiotičkih mikroorganizama i nepovoljnih vanjskih uvjeta novi je koncept od sve veće važnosti. Do sada su se mikroorganizmi imobilizirali u svrhu njihove primjene s ciljem dobivanja različitih biotehnoških proizvoda. Zadržavanje stanica unutar matrice olakšala je separaciju stanica od njezinih metabolita. Inkapsulacijom se postiže stabilizacija stanica tj. poboljšava njihova aktivnost i stabilnost tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja. Postupak inkapsulacije pridonosi dodatnoj zaštiti stanica laktobacila i bifidobakterija tijekom procesa rehidracije i liofilizacije (Kim i sur., 1996).

Inkapsulacija je proces oblikovanja zaštitnog sloja oko neke žive ili nežive materije koja je u potpunosti sadržana unutar stijenke kapsule kao jezgra inkapsuliranog materijala, za razliku od imobilizacije gdje se imobilizirana materija može nalaziti izvan ili unutar matrice (King, 1995). Do inkapsulacije može doći i prirodnim putem i to tijekom rasta bakterijskih stanica koje proizvode egzopolisaharide. Međutim, većina bakterija mliječne kiseline koje sintetiziraju egzopolisaharide ne proizvode dovoljno egzopolisaharida za samostalnu i potpunu inkapsulaciju vlastitih stanica materije (Shah, 2002).

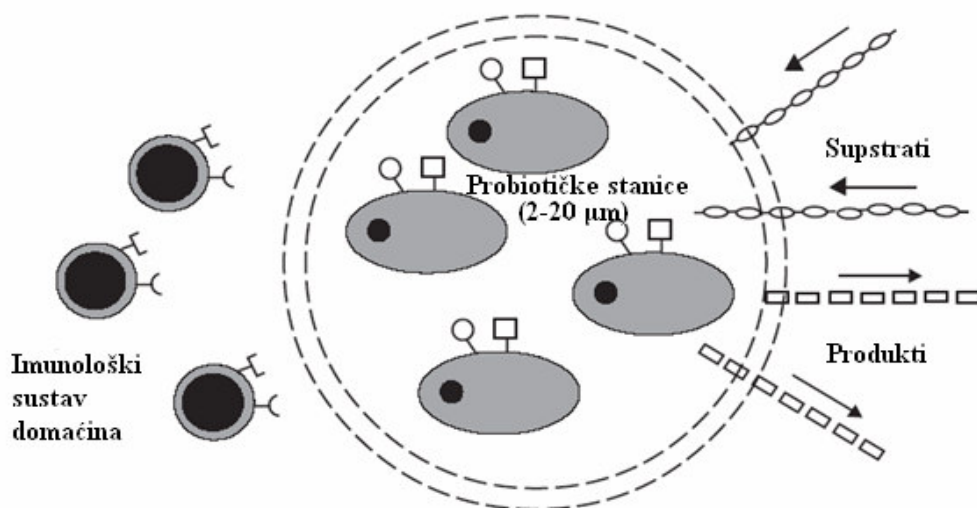
Mikrokapsula potpomaže separaciju od njenog okoliša sve dok ona ne bude otpuštena u okolinu. Njome se ujedno i zaštićuje nestabilna materija od njezinog okoliša čime se poboljšava njezina stabilnost i aktivnost tijekom skladištenja te omogućava ravnomjerno i kontrolirano otpuštanje u okolinu. Struktura koja se formira pomoću sredstva za mikroinkapsulaciju oko materije koja čine jezgru naziva se stijenka. Ona štiti jezgru, otpušta ju u kontroliranim i specifičnim uvjetima te dozvoljava prolaz manjim molekulama kroz membranu kapsule (Franjione i Vasishtha, 1995; Gibbs i sur., 1999). Kemijski sastav i

struktura stijenke obično utječe na funkcionalna svojstva mikro kapsula (Hegenbart, 1993). Od svih sredstava za mikroinkapsulaciju, najčešće se koristi kalcijev alginat zbog jednostavnosti primjene, netoksičnosti, biokompatibilnosti i niske cijene (Krasaekoopt i sur., 2004). Alginat je linearni heteropolisaharid D-manuronske i L-guluronske kiseline, ekstrahiran iz različitih vrsta algi. Funkcionalna svojstva alginata kao potpornog materijala u algama su izuzetno povezana sa strukturom i sekvencijom L-guluronske i D-manuronske kiseline. Divalentni kationi poput Ca^{2+} vežu se na polimer L-guluronske kiseline u alginatu (Krasaekoopt i sur., 2003). Kapsule mogu biti opsega od submikrona do nekoliko milimetara, varirajućih oblika (Franjione i Vasishtha, 1995).

Mikro kapsula se sastoji od semipermeabilne, sferične, tanke i čvrste membranske stijenke. Za mikroinkapsulaciju se mogu upotrijebiti i drugi „*food-grade*“ polimeri poput kitozana, karboksimetilceluloze, karagenana, želatine ili pektina (Anal i Singh, 2007). Uz primjenu biopolimera, kao zaštitno sredstvo mogu se dodati proteini sirutke budući da su biorazgradivi, a mogu se primijeniti u različitim tipovima namirnica. Rezultati *in vivo* studija dokazali su da proteini sirutke dodani pri mikroinkapsulaciji probiotičkih stanica u alginatu poboljšavaju preživljavanje probiotičkih sojeva u intestinalnom traktu domaćina (Kitabatake i Kinekawa, 1998).

Mikroinkapsulacija se može provesti i pomoću enzima transglutaminaze (Heidebach i sur., 2009). Enzim transglutaminaza katalizira reakciju između γ -karboksiamidne skupine peptida ili proteina vezanih glutaminskih ogranaka i primarnih amina. Kada transglutaminaza djeluje na proteinske molekule one se međusobno povezuju i polimeriziraju preko ϵ -(γ -glutamil) lizin veze (Kuraishi i Sakamoto, 1997). Dodatkom transglutaminaze proteinski gel je čvršći. Otopina proteina kazeina ne može sama stvarati gel, međutim, djelovanjem s transglutaminazom pri 5 U/g prelazi iz tekućine u gel nakon jednog sata inkubacije, pri pH 7 i pri temperaturi od 37°C. Ove promjene sposobnosti želatiranja proteinske otopine uzrokovane su stvaranjem ϵ -(γ -glutamil) lizin veza (Kuraishi i Sakamoto, 1997). Transglutaminaza se upotrebljava u mesnoj industriji, proizvodnji tjestenine, mliječnoj industriji, proizvodnji sojinih pripravaka itd. U mliječnim proizvodima, kazein se pokazao kao vrlo dobar supstrat za transglutaminazu. Sir, sladoled, jogurt, proizvodi su za koje se predlaže upotreba transglutaminaze (Lauber i Henle, 1999).

Bakterijske stanice zadržavaju se unutar mikro kapsula, a nutrijenti i metaboliti lako difundiraju kroz polupropusnu membranu (Slika 3) (Kailasapathy, 2002).



Slika 3. Princip mikroinkapsulacije: Membranska barijera sa selektivnim porama (30 – 70 kDa) potiče obranu stanica od imunološkog sustava domaćina, a omogućava asimilaciju supstrata i transport metabolita u mikrookoliš gastrointestinalnog sustava (INOTECH Encapsulation, Kailasapathy, 2002)

Membrana služi kao fizički otpor otpuštanju stanica i minimalizira mogućnost kontaminacije. U inkapsuliranoj formi, probiotičke bakterije su zaštićene od djelovanja bakteriofaga i nepovoljnih uvjeta kao što su npr. niska pH vrijednost želuca ili niske temperature (Krasaekoopt i sur., 2003). Inkapsulirana materija koja čini jezgru otpušta se pomoću različitih mehanizama kao npr. mehaničkom rupturom stijenke kapsule, otapanjem stijenke, fuzijom stijenke i difuzijom materijala (Franjione i Vasishtha, 1995). Otapanje alginata uz odvajanje kalcijevih iona i otpuštanje stanica unutar humanog intestinalnog trakta gdje je potrebno ciljano probiotičko djelovanje, još je jedna od prednosti mikroinkapsuliranih probiotičkih bakterija.

Postupcima mikroinkapsulacije biti će moguće dostaviti konzumentima vijabilne sojeve probiotičkih bakterija u velikom broju. Predviđa se da će mikroinkapsulacija moći poslužiti za združenu inkapsulaciju prebiotičkih supstrata i probiotičkih bakterija u istim mikrokapsulama kako bi se postigao pojačani sinbiotički učinak nakon otpuštanja u gastrointestinalnom traktu (Kailasapathy, 2002).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Mikroorganizmi

3.1.1.1. Radni mikroorganizmi

Postupci mikroinkapsulacije i liofilizacije provedeni su s probiotičkim sojevima *Lactobacillus helveticus* M92 i *Enterococcus faecium* L3. Navedeni sojevi dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Za proizvodnju čvrstog probiotičkog jogurta korištene su uz probiotičku kulturu *Lactobacillus helveticus* M92 i zamrznute jogurtne starter kulture BT-10X (*Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*).

3.1.1.2. Test mikroorganizmi

Ispitivanje antimikrobnog djelovanja probiotičkih sojeva provedeno je s test mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Lactobacillus acidophilus* ATCC, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *Enterococcus faecium* ATCC 21053. Sve spomenute kulture dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije

3.1.2.1. Hranjive podloge

Tijekom rada korištene su sljedeće podloge:

A) Hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar sljedećeg sastava (g/L destilirane vode): pepton 10 g/L; mesni ekstrakt 10 g/L; kvašćev ekstrakt 5 g/L; glukoza 20 g/L; Tween 80 1g/L; MgSO₄ · 7 H₂O 0,1 g/L; MnSO₄ · 7 H₂O 0,05 g/L; natrijev acetat 5 g/L; agar 20

g/L. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.

- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- podloga priređena s 10% obranog mlijeka otopljenog u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge je 6,0, a sterilizacija se provodi pri 113-115°C kroz 20 min. Sastav obranog mlijeka (g/L): suha tvar 86,6 g/L; proteini 31,2 g/L; laktoza 48,0 g/L; mast 0,5 g/L; pepeo 6,9 g/L.

B) Hranjive podloge za određivanje ukupnog broja bakterija u uzorcima i broja bakterija mliječne kiseline:

- Hranjiva podloga za ukupan broj: pepton bios D 5 g/L; kvašćev ekstrakt 2,5 g/L; glukoza 1 g/L; agar bios LL 15 g/L
- MRS (Man-Rogosa-Sharpe) – agar

C) Hranjive podloge za čuvanje i održavanje test mikroorganizama:

- HA (hranjivi agar), sastava (g/L destilirane vode): pepton 15 g/L; mesni ekstrakt 3 g/L; NaCl 5 g/L; kalijev fosfat 0,3 g/L; agar 18 g/L. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao hranjivi agar, ali bez dodatka agara.

3.1.2.2. Kemikalije

- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agaroz, „Appligane“, Strasbourg
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- Tween 80, „Sigma“, SAD
- kalijev fosfat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- kalijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- vodikov peroksid, „Kemika“, Hrvatska

- natrijev hidroksid, „Gram-mol“ Hrvatska
- fenolftalein, „Carlo Erba“, Italija
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- agaroz, „Appligane“, Strasbourg
- standard za elektroforezu proteina (male relativne molekulske mase 14-97 kDa), „Pharmacia“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- Taq polimeraza, „Roche“, Francuska
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- kalcijev karbonat „Sigma“, SAD
- kalcijev klorid „Sigma“, SAD
- natrijev alginat „Fluka“, Švicarska
- biljno ulje „Zvijezda“, Hrvatska
- kazein „Sigma“, SAD
- transglutaminaza, „Ajinomoto“, Njemačka

3.1.3. Aparatura i pribor

- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- bireta za određivanje mliječne kiseline
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija

- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga CENTAUR 2, „Sanyo“, Engleska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- mikroskop OPTON III, „Zeiss“, Njemačka
- komora za elektroforezu, „Sigma“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- liofilizator, model Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- elektroforetske kadice Cleaver, Scientific Ltd
- DNA-termoblok, Mastercycler personal „Eppendorf“
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT
- denzimati, „BioMerieux“, Francuska
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- lijevak za odjeljivanje
- mikroskop, OPTON III, „Zeiss“, Njemačka

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Bakterije mliječne kiseline čuvane su na kosom MRS-agaru pri +4 °C, u hladnjaku. Precjepljivane su svakih 14 dana i inkubirane pri 37 °C. Test mikroorganizmi čuvani su na kosim HA podlogama pri +4 °C u hladnjaku. Precjepljivani su svakih 14 dana i inkubirani pri 37 °C.

3.2.2. Mikrobiološke metode

3.2.2.1. KOH metoda

Ova se metoda koristi za određivanje gram-pozitivnih odnosno gram-negativnih bakterija. Na predmetno stakalce kapnuto je 10 µL 3 %-tnog kalijevog hidroksida (KOH) te je sterilno prenesena mikrobiološkom ušicom vidljiva količina bakterijskih stanica u takvu

kapljicu KOH. Smjesa je promiješana uz proširivanje mjesta do promjera od 1,5 cm. Ukoliko suspenzija postane viskozna ili gel unutar 5-60 sekundi, ispitivana je bakterija gram-negativna, dok je u protivnom gram-pozitivna (Buck, 1982).

3.2.2.2. Katalaza - test

Ovaj test provodi se kako bi se ustanovilo da li istraživani mikroorganizam proizvodi enzim katalazu. Mikrobiološkom ušicom prenesen je dio ispitivane kulture na predmetno stakalce, a potom dodano 1-2 kapi svježeg 3 %-tnog vodikovog peroksida. Test je pozitivan ako je vidljiva pojava mjehurića zbog oslobađanja kisika.

3.2.2.3. Određivanje sporogenosti

Inokulum prekoćne kulture ispitivanih bakterija nacijepi se u svježju hranjivu podlogu, a zatim inkubira 10 min u vodenoj kupelji pri 80 °C. Slijedi inkubacija pri 37 °C tijekom 48 h. Ako nema rasta kulture, ispitivana bakterija je nesporogena, budući da spore preživljavaju temperaturu od 80 °C.

3.2.2.4. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz uzorka koji sadrži bakterijske stanice pripravljena su decimalna razrjeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi. MRS hranjiva podloga u Petrijevoj zdjelici nacijepljena je sa 100 µL petog, šestog i sedmog decimalnog razrjeđenja. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su izrasle kolonije i proračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka.

3.2.2.5. Turbidimetrijska metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja probiotičkih sojeva

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 240 µL supernatanta ispitivane bakterijske kulture i 10 µL test mikroorganizma prethodno uzgojenog u hranjivom bujonu. Antibakterijsko djelovanje ispitivane bakterijske kulture prema test mikroorganizmima tijekom 24 sata uzgoja pri 37°C određuje se spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm i 540 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen hranjivi bujon bez dodanog supernatanta

ispitivane bakterije) i uzoraka s dodanim supernatantom mjera je inhibicije rasta test mikroorganizma. Slijepa proba je neinokulirana hranjiva podloga.

3.2.3. Određivanje stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline

1 mL uzorka razrijeđen je s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak titriran je s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator.

$$\text{°SH} = a \cdot 20 \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 2 \quad (1^\circ\text{SH} \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline (\%)})$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = \text{°SH} \cdot 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

3.2.4. API test

3.2.4.1. API 50 CHL test

Ispitivana bakterijska kultura uzgojena je na MRS agaru u obliku kolonija anaerobno kroz 24 h pri 37°C. U ampulu koja sadrži API 50 CHL medij za laktobacile je pomoću mikrobiološke ušice dodano nekoliko identičnih kolonija s MRS agara. Gustoća inokuluma, koja se mjeri u dezimatu, mora biti 2 McF. Pripremljena suspenzija nakapana je u cjevčice API 50 CH stripa koji sadrži 49 različitih ugljikohidrata. U sve cjevčice nakapano je mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Inkubacija je trajala 48 h pri 37°C nakon čega se očitani rezultati. Pozitivnim se smatraju testovi kod kojih je uslijed acidifikacije i prisutnosti bromkrezol purpurnog indikatora došlo do promjene boje u žuto. Biokemijski profil je identificiran pomoću softvera s bazom podataka (V 5.0).

3.2.4.2. API 20 STREP test

Ispitivana bakterijska kultura se uzgoji na MRS agaru u obliku kolonija anaerobno kroz 24 h pri 37°C. Dobro izolirana kolonija se suspendira u 0,3 ml sterilne vode i tom suspenzijom se prelije cijela površina Columbia agara s dodatkom ovčje krvi. Ploče se inkubiraju 24 h pri 37°C u anaerobnim uvjetima. U ampulu koja sadrži API SUSPENSION medij za streptokoke i srodne mikroorganizme se pomoću mikrobiološke ušice doda nekoliko identičnih kolonija s MRS agara. Gustoća inokuluma, koja se mjeri u dezimatu, mora biti 4

McF. U cjevčice prve polovice API 20 Strep stripa (testovi od VP do ADH) se nakapa pripremljena suspenzija. Ostatak suspenzije se prenese u ampulu koja sadrži API GP medij i dobro promiješa. Ovom suspenzijom se nakapaju cjevčice druge polovice stripa. U kupole testova od ADH do GLYG se ukapa mineralno ulje. Nakon 4 sata inkubacije pri 37°C se u VP test doda 1 kap VP1 i VP2 reagensa, u HIP test 2 kapi NIN reagensa te u PYRA, αGAL, βGUR, βGAL, PAL i LAP testove po 1 kap ZYM A i ZYM B reagensa. Nakon 10 min se očitaju reakcije. Biokemijski profil se identificira pomoću softvera s bazom podataka (V 6.0).

3.2.5. Genetičke metode

3.2.5.1. Izolacija DNA

Svježa MRS podloga inokulirana je s 5% prekonocne kulture te inkubirana 18 h pri 37°C. Volumen od 1,5 mL ove kulture centrifugiran je i ispran u GTE puferu. Stanice su resuspendirane u 500 μL GTE pufera uz dodatak lizozima (8 mg/500 μL) i RNA-ze (50 μL/mL) te inkubirane 30 min pri 37°C. Zatim je dodano 250 μL 2% SDS-a uz dobro miješanje od 1 min. Potom je dodano 100 μL neutralnog fenol-kloroforma, snažno izmiješano 30 sekundi i centrifugirano na 13 000 o/5 min. Supernatant bez interfaze pomiješan je s 1/10 volumena 3 M natrijeva acetata (pH 4,8) i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) provedeno je centrifugiranje na 13 000 o/10 min. Dobiveni talog je resuspendiran u 300 μL 0,3 M natrijevog acetata i 10 mM MgCl₂ te dobro izmiješan na vibro-mješaču. Nakon dodatka 700 μL apsolutnog etanola (ohlađenog na -20°C), uzorak je inkubiran preko noći pri -20°C. Zatim je slijedilo centrifugiranje pri 14000 o/20 min. Dobiveni talog je suspendiran u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na -20°C) i ponovno centrifugiran na 13 000 o/5 min. Talog DNA je resuspendiran u 50 μL TE pufera.

3.2.5.2. RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

Umnožavanje DNA molekule RAPD metodom provedeno je u DNA-termobloku. Kao DNA-kalup korištena je cjelokupna DNA bakterijskih stanica izolirana po postupku opisanom u 3.2.4.1. Za sintezu željenog fragmenta DNA korištena je oligonukleotidna početnica ISS1rev (5'-GGA TCC AAG ACA ACG TTT CAA A-3') za bakterije mliječne kiseline (Veyrat i sur., 1999). Reakcijska smjesa volumena 50 μL bila je sljedećeg sastava: DNA-kalup (4,0 ng/μL), početnica (50 pmol), 10x pufer (5,0 μL), deoksiribonukleozid trifosfati (4 ·

0,2 μM) i Taq polimeraza (jedna jedinica). Reakcijska smjesa denaturirana je 5 min pri 95 °C, a reakcija ponovljena 30 puta. Dvolančana DNA denaturirala se 40 sekundi pri 94 °C, a sinteza komplementarnih lanaca 3 min pri 72 °C. Komplementarno sparivanje početnica s kalupom trajalo je 1 minutu i to za umnažanje fragmenata specifičnih za bakterije mliječne kiseline (upotrebom početnice ISS1rev) pri 52 °C.

Nakon reakcije, 10 μL reakcijske smjese je nanešeno na 1 % agarozni gel i elektroforeza je provedena u kadici pri naponu od 55 V kroz 2 h. Nakon provedene elektroforeze, gel je inkubiran 30 min u otopini etidij-bromida, a zatim osvijetljen ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru i fotografiran kroz crveni filter.

3.2.6. Preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom liofilizacije

Bakterijske kulture uzgojene na MRS hranjivoj podlozi centrifugirane su pri 4000 o/10min, isprane sterilnom destiliranom vodom i resuspendirane u obranom mlijeku (10 %). Postupak liofilizacije proveden je u fosfatnom puferu (PBS) i s različitim lioprotektorima: 5% glicerola, 0,1% CaCO_3 u fosfatnom puferu i 10% obranog mlijeka zajedno s 5% glicerola. Tako priređene suspenzije stanica zamrznute su na – 20 °C preko noći, a zatim liofilizirane u liofilizatoru. Broj živih stanica prije i nakon liofilizacije određivan je indirektnom metodom.

3.2.7. Postupci mikroinkapsulacije probiotičkih sojeva

3.2.7.1. Mikroinkapsulacija stanica probiotičkih sojeva u alginatu

Prekonoćne kulture *Lactobacillus helveticus* M92 i *Enterococcus faecium* L3 uzgojene su pri 37°C u 50 mL MRS bujona. Stanice su centrifugirane pri 3300 o/10 min, a zatim isprane 2 puta s 10 mL 0,9%-tne otopine NaCl. Vlažna biomasa (0,1 g) probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 dodana je u 1,8 g 3%-tne otopine natrijevog alginata. Smjesa bakterijskih stanica i alginata postupno je dodavana u 10 g biljnog ulja koje je sadržavalo 5 g/L Tween 80, uz miješanje na magnetskoj mješalici 20 min. U suspenziju je zatim dodano 3,2 mL emulzije Ca^{2+} (60 g biljnog ulja, 5 g/L Tween 80 i 62,5 mM CaCl_2). Formiranje mikrokapsula bakterijskih stanica u alginatu odvijalo se tijekom 20 min uz miješanje na magnetskoj mješalici, uz dodatak 4 mL otopine peptona i 0,05 M CaCl_2 . Odjeljivanje vodene i uljne faze provedeno je u lijevku za odjeljivanje. Broj stanica prije i poslije

mikroinkapsulacije određivan je indirektnom metodom, a zatim je izračunana učinkovitosti mikroinkapsulacije prema slijedećem izrazu (Annan i sur., 2008):

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

N_0 - broj stanica u vlažnoj biomasi; N - broj mikroinkapsuliranih stanica u alginatu

3.2.7.2. Mikroinkapsulacija stanica probiotičkih sojeva u kazeinu djelovanjem enzima transglutaminaze

Prekonoćne kulture *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 centrifugirane su pri 3300 o/10 min. Talog stanica suspendiran je u otopini kazeina, a zatim je dodan enzim transglutaminaza (10 U transglutaminaze/g kazeina) pri 37°C. Neposredno nakon dodatka transglutaminaze, smjesi stanica i kazeina dodano je 7,5 g temperiranog biljnog ulja, te je provedeno miješanje na magnetskoj mješalici pri 900 o/min tijekom 2 sata. Nastale mikrokapsule izdvojene su iz uljne faze u lijevku za odjeljivanje. Uljna faza je uklonjena, a mikroinkapsulirane bakterijske stanice isprane su u fiziološkoj otopini. Tako priređene stanice primjenjene su za proizvodnju čvrstog probiotičkog jogurta, u kojemu je određivan njihov broj tijekom 21 dan čuvanja pri 4°C.

3.2.8. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

3.2.8.1. Priprava simuliranog želučanog i soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5% otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,0 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L), samog ili i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) u 0,5% otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

3.2.8.2. Preživljavanje probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Priređena suspenzija bakterijskih stanica (0,6 mL) dodana je u simulirani sok želuca ili tankoga crijeva (3 mL) (sa ili bez dodatka žučnih soli). Broj živih stanica određivan je u

simuliranom soku želuca tijekom 2 sata, a u simuliranom soku tankoga crijeva tijekom 4 sata, indirektnom metodom. Preživljavanje mikroinkapsuliranih i liofiliziranih mikroinkapsuliranih stanica bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta uspoređeno je s preživljavanjem svježe kulture probiotičkih sojeva.

4. REZULTATI

4.1. Utjecaj različitih lioprotektora na preživljavanje *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 tijekom liofilizacije

Najprije je provedena fenotipska karakterizacija probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3. Primarna fenotipska karakterizacija obuhvatila je: bojanje po Gramu, KOH metodu, katalaza test i test sporogenosti. Probiotički sojevi *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 su gram-pozitivne, katalaza-negativne i nesporogene bakterije (Tablica 2).

Metabolička aktivnost izoliranih bakterijskih sojeva u MRS hranjivoj podlozi je ispitana određivanjem koncentracije mliječne kiseline i pH vrijednosti nakon 24 sata inkubacije pri 37°C (Tablica 3).

Daljna fenotipska karakterizacija sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 je provedena API 50 CH (Tablica 4), odnosno API 20 Strep testom (Tablica 5).

Nakon fenotipske karakterizacije, provedena je i liofilizacija probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 u fosfatnom puferu (PBS) i uz primjenu različitih lioprotektora: 5% glicerola, 0,1% otopine CaCO₃ u fosfatnom puferu i 10% obranog mlijeka uz dodatak 5% glicerola. Rezultati su prikazani u Tablici 6. i Tablici 7. Kao najbolji lioprotektor za oba probiotička soja pokazao se 10% obrano mlijeko uz dodatak 5% glicerola.

U svrhu potvrde prisutnosti čiste kulture probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 u liofiliziranim pripravcima, provedena je RAPD metoda sa ISS1rev početnicom za bakterije mliječne kiseline (Slika 5). Fragmenti DNA dobiveni RAPD metodom za bakterijske kolonije izolirane iz liofilizata kulture odgovaraju fragmentima DNA za *L. helveticus* M92, odnosno *E. faecium* L3, a razlikuju se od fragmenata dobivenih za sojeve *Lactobacillus rhamnosus* GG i *L. plantarum* L4, te za standardne sojeve *L. acidophilus* ATCC 4356, *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954.

Tablica 2. Karakterizacija probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 pomoću osnovnih mikrobioloških metoda

Mikrobiološka metoda	<i>L. helveticus</i> M92	<i>E. faecium</i> L3
KOH metoda Bojanje po Gramu	Gram-pozitivna bakterija	Gram-pozitivna bakterija
Katalaza test	Katalaza- negativna	Katalaza-negativna
Test sporogenosti	Nesporogena	Nesporogena

Tablica 3. pH vrijednost i koncentracije mliječne kiseline u supernatantima kultura *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 nakon prekonocnog uzgoja u MRS hranjivoj podlozi pri 37°C.

Bakterijski soj	pH	Mliječna kiselina (g/L)
<i>L. helveticus</i> M92	4,05	10,80
<i>E. faecium</i> L3	4,65	8,90

Tablica 4. Fermentacijski profil probiotičke bakterije *L. helveticus* M92 dobiven biokemijskim testom API 50 CHL

Ugljikohidrati	<i>L. helveticus</i> M92	Ugljikohidrati	<i>L. helveticus</i> M92
Kontrola	-	Arbutin	+
Glicerol	-	Eskulin	±
Eritriol	-	Salicin	±
D-arabinoza	-	Celobioza	+
L-arabinoza	-	Maltoza	+
Riboza	-	Laktoza	±
D-ksiloza	-	Melibioza	-
L-ksiloza	-	Saharoza	+
Adonitol	-	Trehaloza	+
β-metil-ksilozid	-	Inulin	-
Galaktoza	+	Melezitoza	-
D-glukoza	+	D-rafinoza	-
D-fruktoza	+	Amidon	-
D-manoza	+	Glikogen	-
L-sorboza	-	Ksilitol	-
Ramnoza	-	β-gentobioza	±
Dulcitol	-	D-turanoza	±
Inozitol	-	D-liksoza	-
Manitol	±	D-tagatoza	-
Sorbitol	-	D-fukoza	-
α-metil-D-manozid	-	L-fukoza	-
α-metil-D-glukozid	-	D-arabitol	-
N-acetil glukozamin	+	L-arabitol	-
Amigdalinalin	+	Glukonat	-
2-keto-glukonat	-	5-keto-glukonat	-

- , negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;
 + , pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati;
 ± , promjena boje između zelene i žute

Tablica 5. Fermentacijski profil probiotičke bakterije *E. faecium* L3, dobiven biokemijskim API 20 Strep testom

Test	<i>E. faecium</i> L3	Fermentacija	<i>E. faecium</i> L3
Voges-Proskauer	+	Riboza	+
Hidroliza hipurata	-	Arabinoza	+
Hidroliza eskulina	+	Manitol	+
Pirolidonil arilamidaza	±	Sorbitol	-
α-galaktozidaza	-	Laktoza	+
β-glukuronidaza	-	Trehaloza	+
β-galaktozidaza	+	Inulin	-
Alkalna fosfataza	-	Rafinoza	-
Leucin aminopeptidaza	+	Škrob	+
Arginin dihidrolaza	+	Glikogen	-

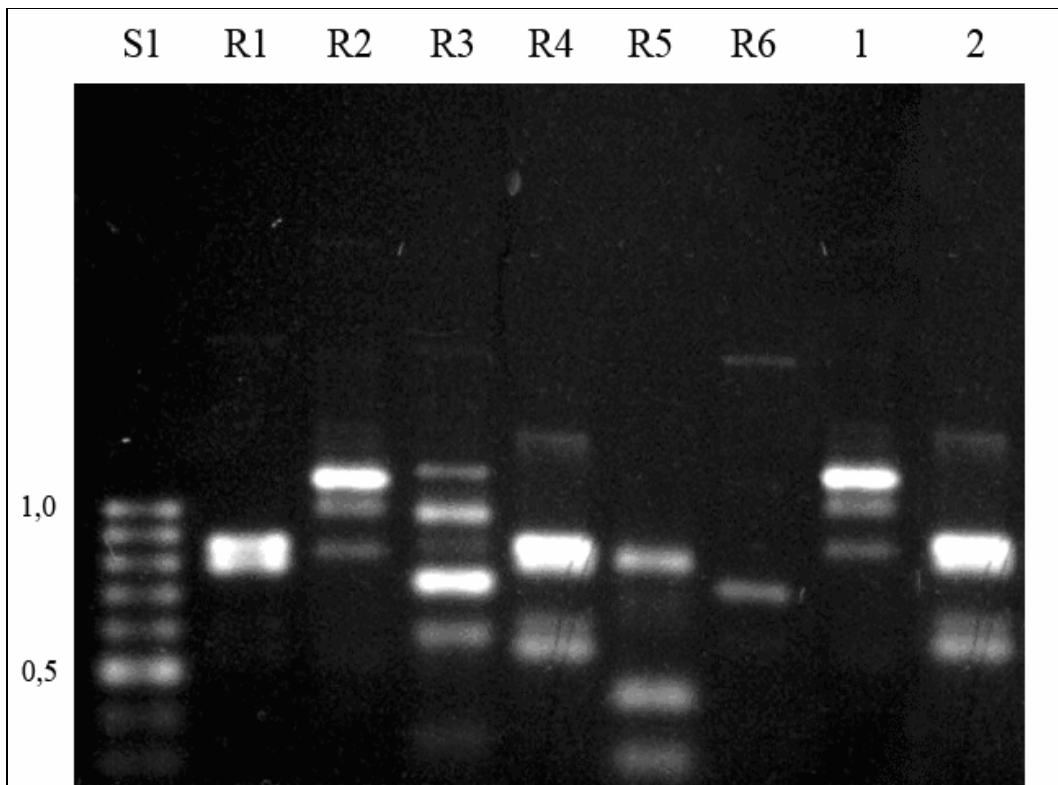
-, negativna reakcija; +, pozitivna reakcija

Tablica 6. Preživljavanje probiotičkog soja *L. helveticus* M92 nakon procesa liofilizacije u fosfatnom puferu (PBS) i uz dodatak različitih lioprotektora

<i>L. helveticus</i> M92	N (prije liofilizacije)	N (poslije liofilizacije)	Preživljavanje (%)
PBS	$4,47 \cdot 10^9$	$2,37 \cdot 10^8$	86,74
5%-tni glicerol	$4,98 \cdot 10^9$	$1,65 \cdot 10^9$	95,05
0,1% CaCO ₃ u fosfatnom puferu	$6,60 \cdot 10^9$	$8,00 \cdot 10^8$	90,72
10%-tno obrano mlijeko + 5%-tni glicerol	$6,65 \cdot 10^9$	$3,43 \cdot 10^9$	98,21

Tablica 7. Preživljavanje probiotičkog soja *E. faecium* L3 nakon procesa liofilizacije u fosfatnom puferu (PBS) i uz dodatak različitih lioprotektora.

<i>E. faecium</i> L3	N (prije liofilizacije)	N (poslije liofilizacije)	Preživljavanje (%)
PBS	$1,14 \cdot 10^{10}$	$2,63 \cdot 10^8$	83,83
5%-tni glicerol	$1,10 \cdot 10^{10}$	$5,45 \cdot 10^9$	94,01
0,1% CaCO ₃ u fosfatnom puferu	$6,81 \cdot 10^{10}$	$1,80 \cdot 10^9$	85,41
10%-tno obrano mlijeko + 5%-tni glicerol	$7,10 \cdot 10^9$	$5,25 \cdot 10^9$	97,15



Slika 5. DNA profili različitih bakterija mliječne kiseline dobivenih nasumičnim umnažanjem s ISS1rev (5'-GGA TCC AAG ACA ACG TTT CAA A-3') početnicom ; S1 – standard 1 kb; R1 – *L. acidophilus* ATCC 4356; R2 – *L. helveticus* M92; R3 – *L. plantarum* L4; R4 – *E. faecium* L3; R5 – *L. rhamnosus* GG; R6 – *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954; 1 – liofilizirana kultura probiotičkog soja *L. helveticus* M92; 2 – liofilizirana kultura probiotičkog soja *E. faecium* L3

4.2. Utjecaj mikroinkapsulacije vlažne biomase i liofiliziranih stanica *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 na njihova funkcionalna svojstva

Bakterijske stanice vlažne biomase probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 mikroinkapsulirane su u alginatu da bi se ispitalo njihovo preživljavanje tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt (Slika 6). Određen je broj živih stanica prije i nakon mikroinkapsulacije vlažne biomase i liofiliziranih čistih kultura u alginatu, kako bi se izračunala učinkovitost mikroinkapsulacije (Tablica 8.)

Glavnu prepreku preživljavanju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu čine kiseli pH želuca, probavni enzimi i žučne soli. Stoga je ispitano preživljavanje vlažne bakterijske biomase stanica, mikroinkapsuliranih stanica i liofiliziranih mikroinkapsuliranih stanica probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 u simuliranom želučanom soku, čija pH-vrijednosti iznosi 2,0, te u simuliranom soku tankog crijeva koji sadrži sok gušterače i žuč. Rezultati su prikazani na Slikama 7 i 8 za probiotički soj *L. helveticus* M92, odnosno na Slikama 9 i 10 za probiotički soj *E. faecium* L3.

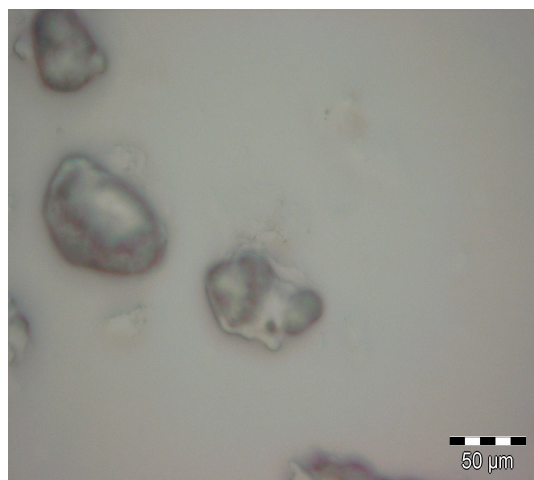
Također je u svrhu primjene probiotičkog soja *L. helveticus* M92 kao funkcionalnog dodataka u proizvodnji jogurta provedena mikroinkapsulacija vlažne biomase *L. helveticus* M92 u kazeinu, djelovanjem enzima transglutaminaze. Ispitan je utjecaj mikroinkapsulacije probiotičkog soja *L. helveticus* M92 u kazeinu djelovanjem transglutaminaze na preživljavanje ove probiotičke kulture u proizvedenom čvrstom probiotičkom jogurtu (Slika 11).

Vrlo važno funkcionalno svojstvo probiotičkih kultura je njihovo antagonističko djelovanje prema patogenim bakterijama u gastrointestinalnom traktu. Za ispitivanje antimikrobnog djelovanja probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 korištena je turbidimetrijska metoda koja osigurava izravnu interakciju ispitivane supstancije i stanica test mikroorganizama. Probiotički soj *L. helveticus* M92 pokazao je inhibicijski učinak prema svim testiranim mikroorganizmima, a osobito prema *S. aureus* 3048, te prema srodnim bakterijskim vrstama iz roda *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Enterococcus* (Slika 12). Probiotički soj *E. faecium* L3 pokazao je snažan inhibicijski učinak prema svim testiranim mikroorganizmima, a osobito prema *S. aureus* 3048, te prema srodnim bakterijskim vrstama iz roda *Lactococcus* i *Enterococcus* (Slika 13).

Tablica 8. Učinkovitost mikroinkapsulacije stanica vlažne biomase i liofiliziranih stanica probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 u alginatu.

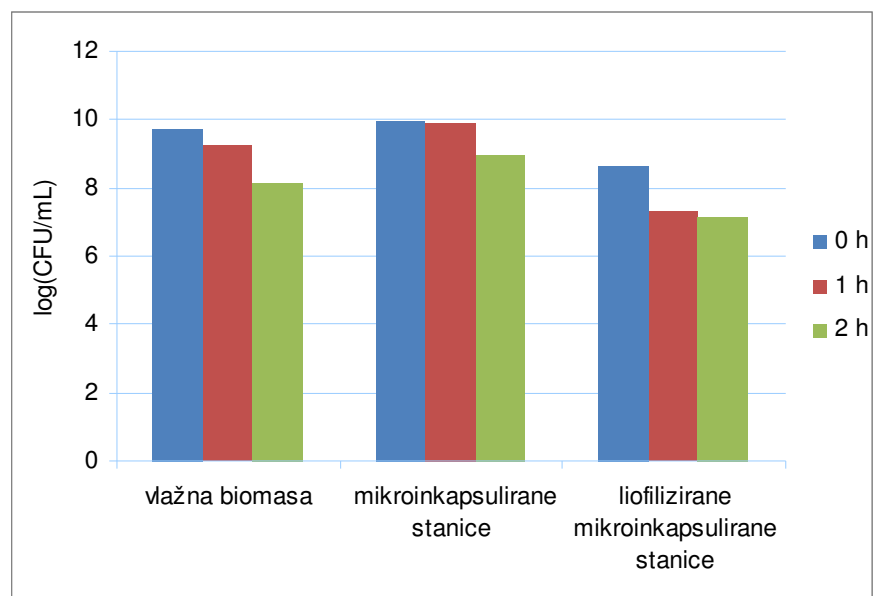
Bakterijski soj	N_0	N	log N_0	log N	EY* (%)
<i>L. helveticus</i> M92	$1,32 \cdot 10^{11}$	$6,27 \cdot 10^{10}$	11,12	10,79	97,03
Liofilizirana kultura <i>L. helveticus</i> M92	$7,83 \cdot 10^9$	$8,63 \cdot 10^8$	9,89	8,93	90,03
<i>E. faecium</i> L3	$2,01 \cdot 10^{10}$	$2,66 \cdot 10^9$	10,30	9,42	91,45
Liofilizirana kultura <i>E. faecium</i> L3	$6,40 \cdot 10^9$	$8,05 \cdot 10^7$	9,80	7,90	80,61

*EY-učinkovitost mikroinkapsulacije

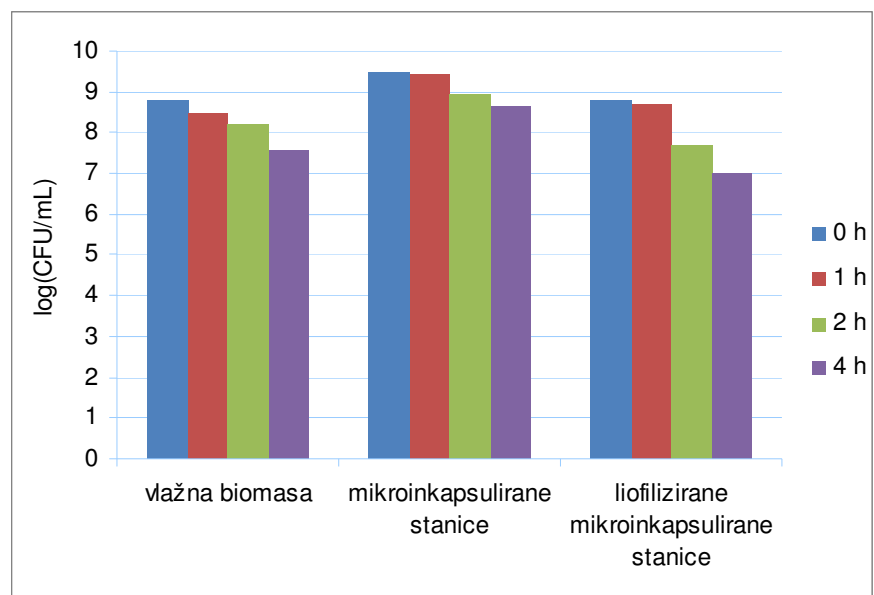


Slika 6. Mikroskopski prikaz mikroinkapsuliranih stanica vlažne biomase probiotičkog soja *L. helveticus* M92 u alginatu (povećanje 400 x).

a)

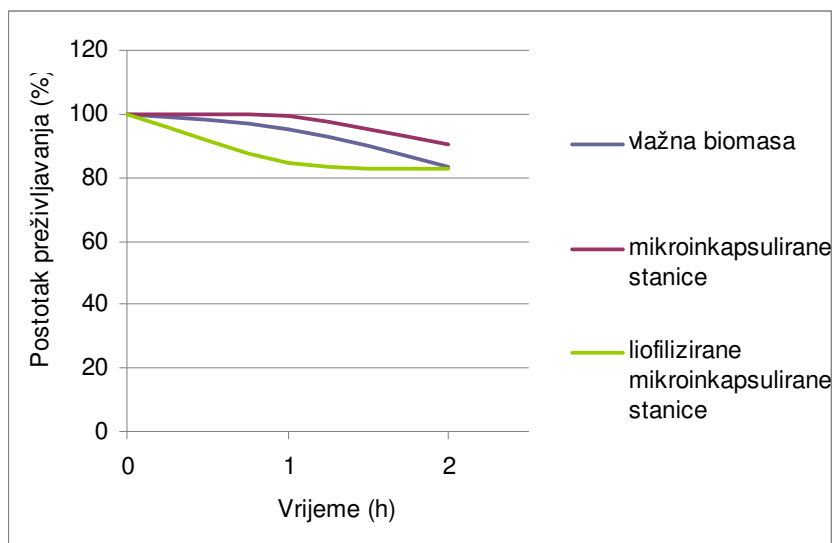


b)

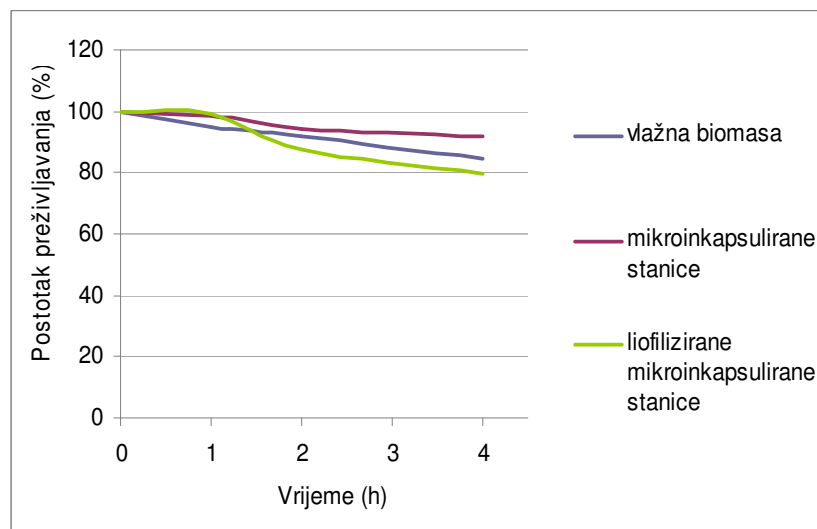


Slika 7. Preživljavanje vlažne biomase, mikroinkapsuliranih stanica i liofiliziranih mikroinkapsuliranih stanica probiotičkog soja *L. helveticus* M92 u a) simuliranom želučanom soku b) simuliranom soku tankog crijeva, izraženom kao log(CFU/ml).

a)

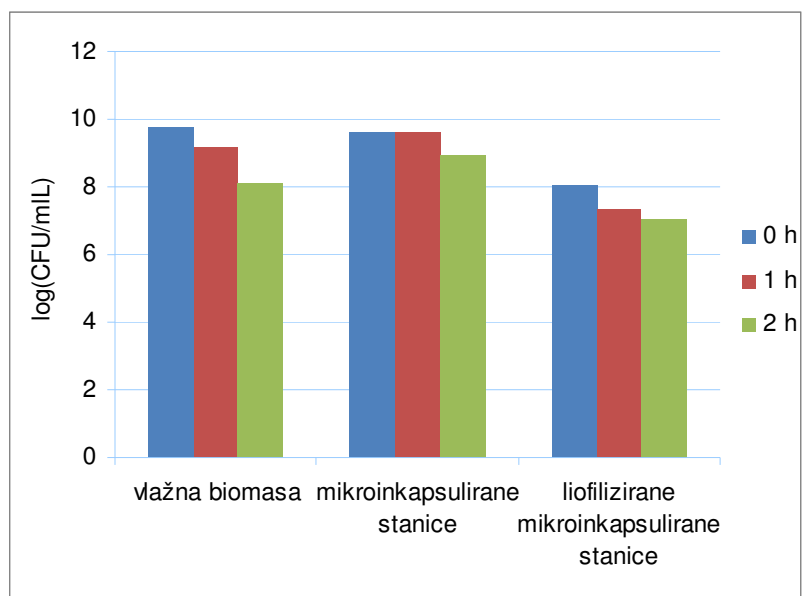


b)

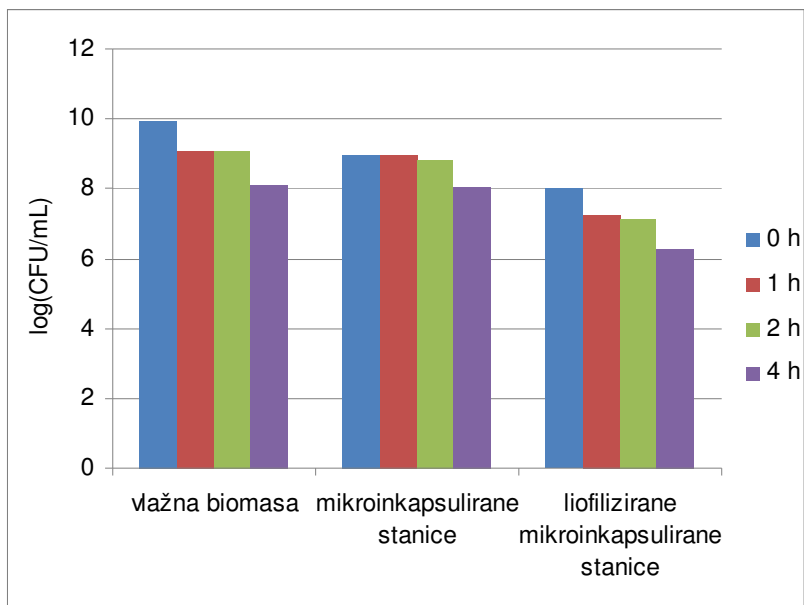


Slika 8. Postotak preživljavanja vlažne biomase, mikroinkapsuliranih stanica i liofiliziranih mikroinkapsuliranih stanica probiotičkog soja *L. helveticus* M92 tijekom u a) simuliranom želučanom soku b) simuliranom soku tankog crijeva.

a)

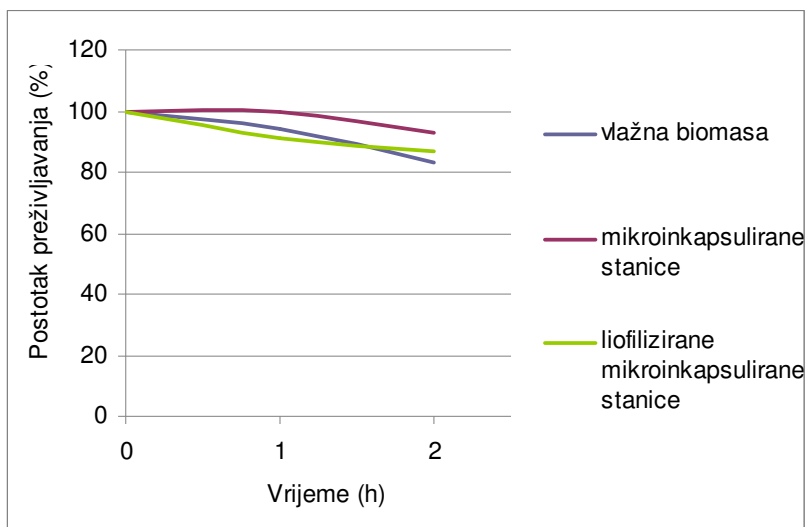


b)

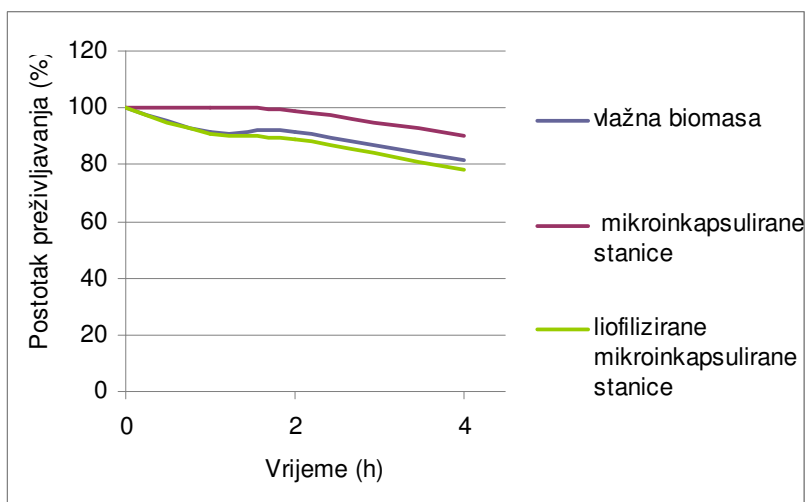


Slika 9. Preživljavanje vlažne biomase, mikroinkapsuliranih stanica i liofiliziranih mikroinkapsuliranih stanica probiotičkog soja *E. faecium* L3 u a) simuliranom želučanom soku b) simuliranom soku tankog crijeva, izraženom kao log(CFU/ml).

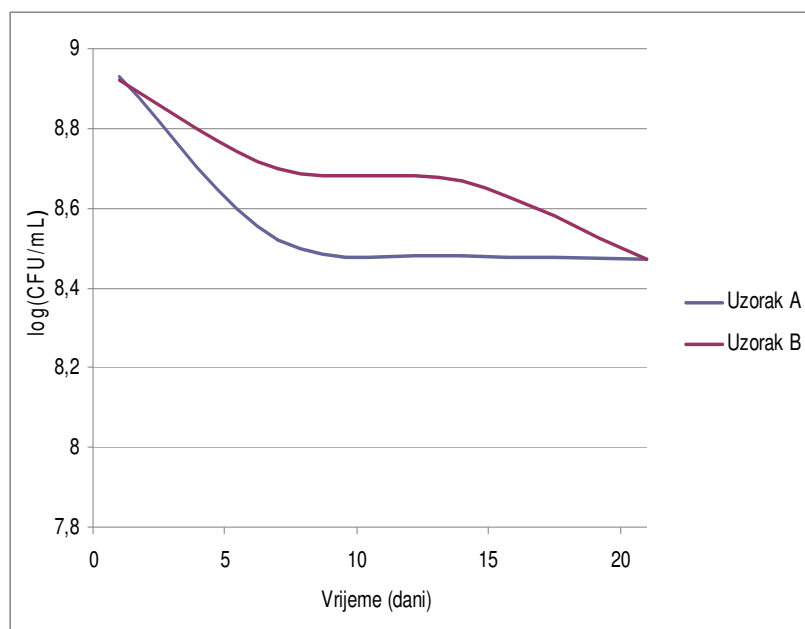
a)



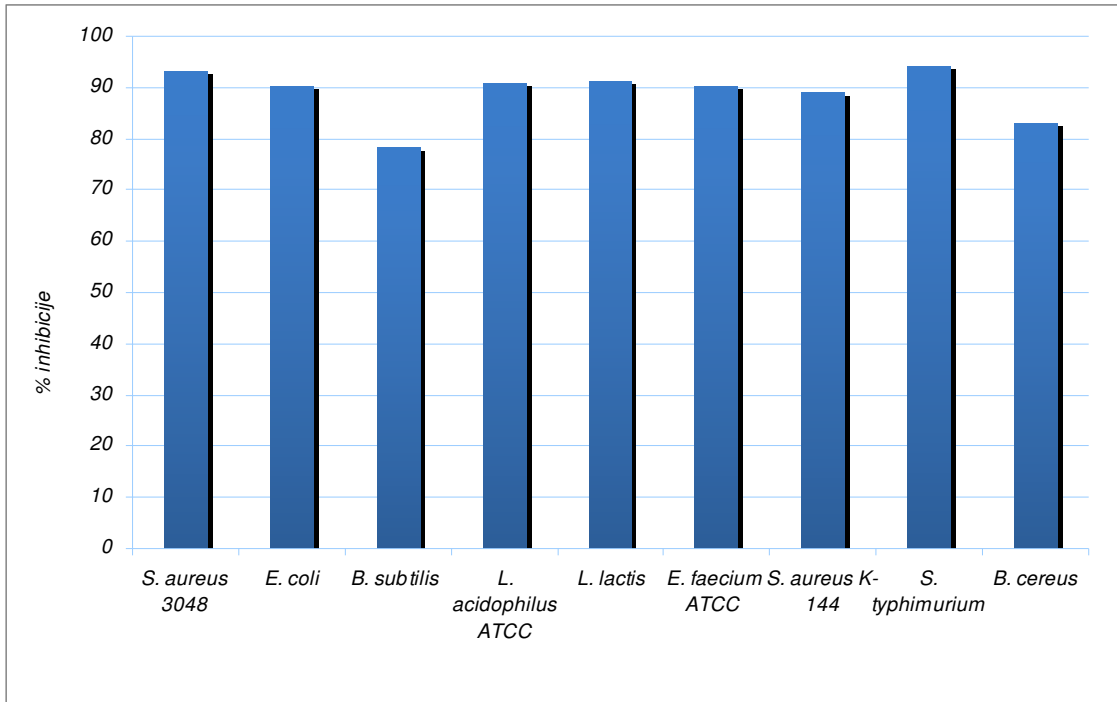
b)



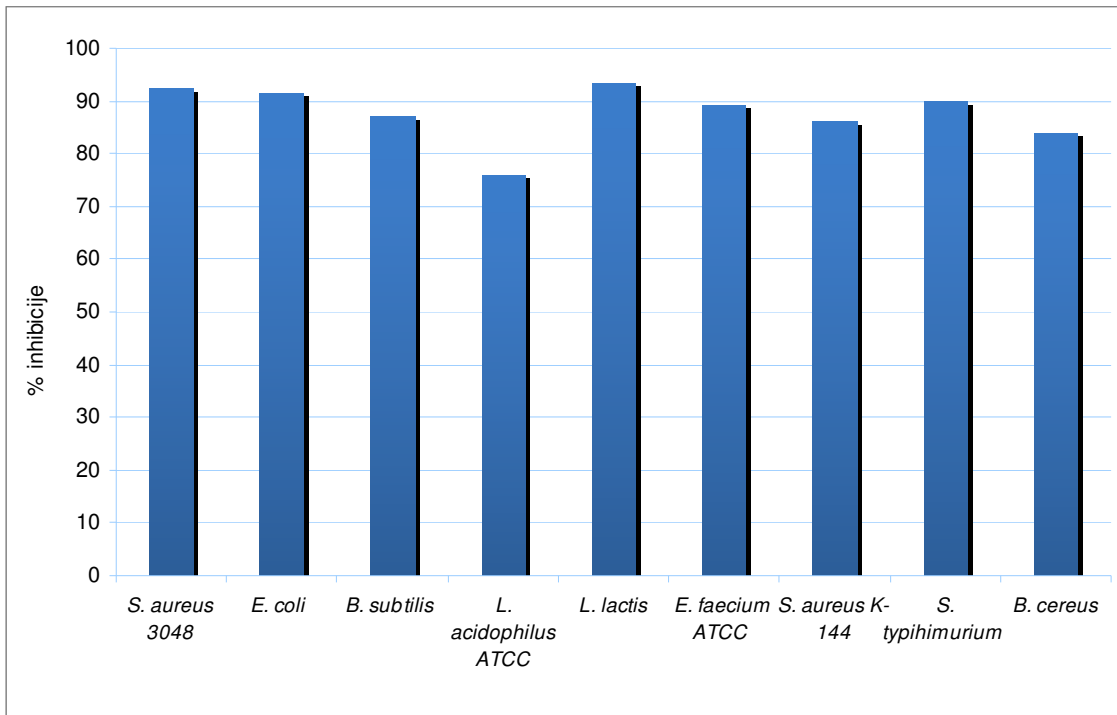
Slika 10. Postotak preživljavanja vlažne biomase, mikroinkapsuliranih stanica i liofiliziranih mikroinkapsuliranih stanica probiotičkog soja *E. faecium* L3 u a) simuliranom želučanom soku b) simuliranom soku tankog crijeva.



Slika 11. Usporedba broja živih stanica probiotičkog soja *L. helveticus* M92 u uzorcima A (čvrsti jogurt proizveden s klasičnom jogurnom kulturom uz dodatak liofilizirane kulture *L. helveticus* M92) i B (čvrsti jogurt proizveden s klasičnom jogurnom kulturom uz dodatak mikroinkapsuliranih stanica vlažne biomase probiotičkog soja *L. helveticus* M92 u kazeinu djelovanjem transglutaminaze).



Slika 12. Antimikrobno djelovanje probiotičkog soja *L. helveticus* M92



Slika 13. Antimikrobno djelovanje probiotičkog soja *E. faecium* L3

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj različitih lioprotektora na preživljavanje *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 tijekom liofilizacije

Crijevna mikroflora ljudskog gastrointestinalnog sustava sadrži preko 500 različitih bakterijskih vrsta u ukupnoj masi od 1,2 kg. Sudionici crijevne mikroflore mogu imati pozitivne, ali uslijed narušavanja ravnoteže ovog ekosustava i negativne učinke na ljudsko zdravlje. Upravo primjenom probiotika može se ponovno uspostaviti njena narušena ravnoteža. Probiotici su definirani kao jedna ili više živih stanica mikroorganizama koji primjenjeni u ljudi i životinja djeluju korisno na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone crijevne mikroflore (Šušković, 2001). Većina probiotika potječu iz rodova bakterija mliječne kiseline, a najčešće iz roda *Lactobacillus*. Današnja populacija svjesna je važnosti ispravne prehrane, pa postoji veliki interes primjene probiotika kao funkcionalnih dodataka hrani osobito u fermentiranim mliječnim proizvodima (Capela i sur., 2006; Šušković, 2009).

Primjena probiotika bilo kao funkcionalnih dodataka hrani ili u svrhu njihove primjene kao bioterapeutika zahtjeva njihovu ispravnu fenotipsku i genotipsku karakterizaciju (Kos i sur., 2008). Tradicionalne mikrobiološke metode poput bojanja po Gramu ili rasta na selektivnim hranjivim podlogama mogu poslužiti kao osnova za primarnu karakterizaciju bakterija, stoga su u ovom radu provedene osnovne mikrobiološke metode koje su potvrdile da su probiotički sojevi *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 gram-pozitivne, katalaza-negativne i nesporogene bakterije (Tablica 2). Ispitana je i njihova metabolička aktivnost pri uzgoju u MRS hranjivoj podlozi te je potvrđeno da *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 proizvode visoke koncentracije mliječne kiseline, a pH vrijednost podloge se sukladno s izmjerenom koncentracijom mliječne kiseline snizila (Tablica 3.). Fenotipskom identifikacijom API testom potvrđeno je da se radi o BMK koje pripadaju rodovima *Lactobacillus* (vrste *L. helveticus*) (Tablica 4) odnosno *Enterococcus* (vrste *E. faecium*) (Tablica 5).

Budući da je posljednjih nekoliko godina došlo do naglog širenja antibiotske rezistencije te nedostatka učinkovitih antibiotika, razvoj biotehnološke proizvodnje i primjene probiotika kao bioterapeutika predstavljavaju obećavajuću alternativu, a s ciljem smanjene primjene antibiotika (Sleator i Hill, 2008a; Sleator i Hill, 2008b). Mogućnost biotehnološke proizvodnje i primjene probiotika kao živih lijekova u središtu su znanstvenih istraživanja (Zhanga i sur., 2008). No, da bi polučili željene pozitivne učinke na zdravlje, probiotički pripravci moraju sadržavati žive mikrobne stanice u koncentracijama višim od 10^6 po gramu proizvoda (Shah, 2007).

Liofilizacija jedna je od najpogodnijih metoda čuvanja mikroorganizama, dakle i probiotika, za industrijsku primjenu kroz duži vremenski period. Međutim, preživljavanje probiotika tijekom procesa liofilizacije razlikuje se ovisno o bakterijskoj vrsti zbog različitih fizikalno-kemijskih karakteristika površine bakterijskih stanica (Capela i sur., 2006). Kako bi se poboljšalo preživljavanje probiotika, tijekom liofilizacije se primjenjuju različiti lioprotektori među kojima najčešće glicerol. U ovom je radu istražen utjecaj različitih lioprotektora: 5% glicerola, 0,1% otopine CaCO₃ u fosfatnom puferu, 10% obranog mlijeka uz dodatak 5% glicerola na preživljavanje probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 tijekom liofilizacije te je uspoređen s preživljavanjem nakon liofilizacije uz primjenu fosfatnog pufera. Utjecaj različitih lioprotektora na preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom liofilizacije prikazan je u Tablicama 6. i 7. Ispitani probiotički sojevi preživjeli su proces liofilizacije u visokom broju, no preživljavanje *E. faecium* L3 se pokazalo nešto slabijim u odnosu na preživljavanje *L. helveticus* M92. Ova razlika u preživljavanju može se pripisati razlikama u strukturi stanične ovojnice, budući da probiotički soj *L. helveticus* M92 sadrži površinski parakristalni S-sloj (Frece i sur., 2005) koji se smatra odgovornim za selektivne prednosti tijekom preživljavanja ove bakterije u gastrointestinalnom traktu, a ujedno sudjeluje i u procesu adhezije (Kos i sur., 2001.; Frece 2003.; Frece i sur., 2005). U prethodnim istraživanjima ustanovljeno je slabije preživljavanje stanica *L. helveticus* M92 tijekom liofilizacije nakon uklanjanja površinskog S-sloja (Frece, 2007). Isto tako, ispitano je i preživljavanje probiotičkih bakterija *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 tijekom procesa liofilizacije uz dodatak različitih lioprotektora. Obrano mlijeko uz dodatak glicerola pokazalo se kao najučinkovitiji lioprotektor, no mnogi autori istražuju učinak različitih lioprotektora, osobito izvora ugljika, na preživljavanje prilikom procesa liofilizacije (Capela i sur., 2006; Anal i Singh, 2007; Siaterlis i sur., 2009), pa će u skladu s tim daljnja istraživanja biti usmjerena na ispitivanje učinka različitih šećera, i to ponajviše prebiotika, na preživljenje tijekom liofilizacije.

U svrhu potvrde prisutnosti probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 u liofiliziranim pripravcima provedena je RAPD metoda kojom su uspoređeni DNA profili čistih bakterijskih kultura ispitivanih sojeva i liofiliziranih kultura i potom uspoređeni s DNA profilima drugih predstavnika bakterija mliječne kiseline iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Slika 5). Rezultati dobiveni RAPD metodom su potvrdili prisutnost čiste probiotičke kulture u liofiliziranim pripravcima.

5.2. Utjecaj mikroinkapsulacije vlažne biomase i liofiliziranih stanica *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 na njihova funkcionalna svojstva

U stresnim uvjetima gastrointestinalnog trakta domaćina neophodno je osigurati stabilnost i visok stupanj preživljavanja probiotika. To je povod za istraživanje različitih metoda koje mogu doprinjeti povećanju njihovog preživljavanja tijekom biotehnoške proizvodnje ili primjene u različitim proizvodima. Različite metode mikroinkapsulacije primjenjuju se u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Mnogi znanstveni radovi u literaturi opisuju učinkovitost metoda mikroinkapsulacije te povećanje stabilnosti i stupnja preživljavanja tijekom proizvodnje, čuvanja i primjene probiotika pri stresnim uvjetima tijekom procesiranja hrane, no i nakon oralne primjene, tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt (Capola i sur., 2006; Ann i sur., 2007.; Annan i sur., 2008; Gbassi i sur., 2009). Cilj ovog rada bio je ispitati kako se mikroinkapsulacijom probiotika u alginatu, odnosno u kazeinu djelovanjem transglutaminaze, može utjecati na njihovo preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, odnosno u jogurtu.

Postoji više metoda mikroinkapsulacije od kojih je najčešći postupak mikroinkapsulacije u alginatu (Kailasapathy, 2002). Alginati su neutralni anionski polisaharidi koji su stabilni pri niskim pH vrijednostima (Annan i sur., 2008). Poradi toga je u ovom radu provedena mikroinkapsulacija probiotičkih sojeva u alginatu kako bi se ispitalo njezin zaštitni učinak na preživljenje probiotika prilikom izlaganja simuliranim sokovima želuca (pH 2) i tankog crijeva (pH 8). Istim su postupkom mikroinkapsulirane i liofilizirane stanice probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 te je praćeno njihovo preživljavanje nakon izlaganja simuliranom soku želuca i tankog crijeva. Učinkovitost mikroinkapsulacije vlažne biomase u odnosu na liofilizirane stanice probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 u alginatu pokazala se uspješnijom i to za 7% kod *L. helveticus* M92 odnosno za 10,84% kod *E. faecium* L3 (Tablica 8.).

Prema rezultatima, najviši stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta pokazuju mikroinkapsulirane stanice vlažne biomase, što je potvrdilo protektivnu ulogu alginata (Slike 7-10), dok je preživljenje liofiliziranih mikroinkapsuliranih stanica probiotičkih sojeva bilo nešto slabije. Ovo može biti posljedica naglog zamrzavanja bakterijskih stanica tijekom liofilizacije. Naime, neki autori predlažu prethodno izlaganje stanica subletalnim stresnim uvjetima kako bi se inducirao odgovor stanice na stres, a potom izlaganje letalnim stresnim uvjetima (Sleator i Hill, 2008). Prema literaturi, mikroinkapsulacija je obećavajuća metoda, budući da predstavlja fizičku barijeru

koja doprinosi zaštiti probiotičkih stanica od različitih stresnih uvjeta poput smrzavanja ili stresnih uvjeta prisutnih u gastrointestinalnom traktu kao i prisutnosti bakteriofaga, a alginat kao sredstvo za mikroinkapsulaciju se može primjeniti u prehrambenoj industriji (Anal i Singh, 2007).

Mnogi proteini mlijeka se zbog svojih karakteristika, blagog okusa, dobre topljivosti i niske viskoznosti, mogu primjeniti kao pogodni nosači za mikroinkapsulaciju. Kazein je već uspješno primjenjen za mikroinkapsulaciju antikancerogenog lijeka Doxorubicina (Heidebach i sur., 2009). Stoga je u ovom radu ispitana metoda mikroinkapsulacije koja je utemeljena na primjeni kazeina, kao matriksa uz djelovanje enzima transglutaminaze. Primjena mikroinkapsulacije u kazeinu djelovanjem transglutaminaze doprinjela je povećanju preživljavanja probiotičkog soja *L. helveticus* M92 u jogurtu (Slika 11). Ujedno je praćeno i trajanje fermentacije jogurta kojem su dodane mikroinkapsulirane stanice probiotičkog soja *L. helveticus* M92, koje je skraćeno za 30 minuta, u usporedbi s vremenom fermentacije za jogurt u kojem su dodane svježije stanice *L. helveticus* M92. Dodatak mikroinkapsuliranih *L. helveticus* M92 nije bitno utjecao na senzorska svojstva proizvedenog čvrstog jogurta (rezultati nisu prikazani).

Kovalentno umrežavanje katalizirano transglutaminazom omogućava stvaranje stabilnih čestica gela netopljivih u vodi, koje osiguravaju zaštitu pri niskim pH vrijednostima poput onih u želucu. Zato je primjena enzima za mikroinkapsulaciju probiotika u različitim supstratima koji su sastavni dio hrane, poput kazeina, od velikog interesa (Heidebach i sur., 2009).

Probiotički sojevi *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 pokazali su i snažno inhibicijsko djelovanje prema svim odabranim test mikroorganizmima što im daje kompetitivnu prednost pri natjecanju za mjesta vezanja u gastrointestinalnom traktu. Kako su pokazali snažno antimikrobno djelovanje i prema predstavnicima srodnih bakterijskih vrsta: *L. lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *E. faecium*, trebalo bi provesti istraživanja njihove bakteriocinske aktivnosti. Naime, antimikrobno djelovanje bakterija mliječne kiseline potječe prvenstveno od mliječne kiseline, koja kao kratkolančana masna kiselina ulazi u stanice acidonetolerantnih mikroorganizama u nedisociranom obliku i disocira tek unutar stanice. Takav događaj rezultira zakiseljavanjem citoplazme, što dovodi do inhibicije sinteze nukleinskih kiselina, lipida, peptidoglikana i proteina osjetljive stanice. Proizvodi metabolizma bakterija mliječne kiseline kao što su octena kiselina, ugljikov dioksid, vodikov peroksid, diacetil i bakteriocini, inhibicijske su supstancije koje mogu biti prisutne u supernatantima kultura bakterija mliječne kiseline (Pelaez i Requena, 2005). To ukazuje da inhibicijsko djelovanje izoliranih

bakterijskih sojeva potječe prvenstveno od proizvedene mliječne kiseline, dok bi se potencijalna bakteriocinska aktivnost trebala dodatno istražiti.

6. ZAKLJUČCI

1. Probiotički sojevi *Lactobacillus helveticus* M92 i *Enterococcus faecium* L3 pokazali su najveći postotak preživljavanja tijekom liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka i glicerola kao lioprotektora.
2. Mikroinkapsulacija vlažne bakterijske biomase u odnosu na liofilizirane stanice probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 u alginatu se pokazala uspješnijom za 7% kod *L. helveticus* M92 odnosno za 10,84% kod *E. faecium* L3, obzirom na broj živih mikroinkapsuliranih bakterijskih stanica.
3. Mikroinkapsulirane stanice probiotičkih sojeva *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 pokazale su bolje preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta od vlažne bakterijske biomase i liofiliziranih mikroinkapsuliranih probiotičkih stanica.
4. Mikroinkapsulacija u kazeinu, djelovanjem enzima transglutaminaze, se pokazala kao uspješna metoda mikroinkapsulacije stanica probiotičkog soja *L. helveticus* M92.
5. Probiotički sojevi *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 pokazuju snažno antimikrobno djelovanje prema odabranim test-mikroorganizmima što je važno funkcionalno svojstvo probiotika.

7. ZAHVALE

Posebno zahvaljujem mentorici dr.sc. Jagodi Šušković, red. prof., što mi je omogućila izradu ovog rada te mi davala podršku svojim velikim iskustvom i savjetima.

Zahvaljujem dr.s. Blaženki Kos, izv. prof., na mnogobrojnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala dr.sc. Jasni Beganović na nesebičnoj pomoći i strpljenju tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i pisanja ovog rada.

Hvala Andreji Leboš Pavunc, dipl. ing., na susretljivosti i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela.

Hvala i Ivanu Radošu, univ. bacc. ing. biotech., na podršci tijekom izrade ovog rada.

8. POPIS LITERATURE

- Anal, A. K., Singh, H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. & Technol.*, **18**, 240-251.
- Ann E.Y., Kim, Y., Oh, S., Imm J.Y., Park D.J., Han, K.S., Kim, S.H. (2007) Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *Int. J. Food Sci. Technol.* **42**, 411-419.
- 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.
- Bakker-Zierikze, A. M., van Tol, E. A. F., Kroes, H., Alles, M. S., Kok, F. J., Bindels, J. G. (2006) Faecal SIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. *Pediatric Allergy Immunol.* **17**(2), 134-140.
- Bozoglu, T.F., Gurakan, G.C. (1989) Freeze-drying injury of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Protect.* **52**, 250-260.
- Brennan, M., Wanismail, B., Johnson, M. C., Ray, B. (1986) Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Protect.*, **49**, 47-53.
- Buck, J.D. (1982) Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 992-993.
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P. (2006) Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res. Int.* **39**, 203-211.
- Conway, P. L. i Henrikson, A. (1994) Strategies for the Isolation and Characterisation of Functional Probiotics. U: *Human Health: The Contribution of Microorganisms*, S. A. W. Gibson (ured.), Springer Verlag, London, str. 75-93.
- Champagne, C.P. i Fustier, P. (2007) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 184-190.
- Fonden, R., Mogensen, G., Tanaka, R., Salminen, S. (2000) Effect of culture-containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. *Int. Dairy Feder. Bull. No. 352*. IDF, Bruxelles.
- Fonseca, F., Beal, C., Corrieu, G. (2000) Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J. Dairy Res.* **67**, 83-90.
- Fowler, A., Toner, M. (2005) Cryo-injury and biopreservation. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1066, 119-135.

- Franjione, J., Vasishtha, N. (1995) The Art and Science of microencapsulation. *Technol. Today*. Southwest Research Institute.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušković, J. (2005a) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 285–292.
- Frece, J., Kos, B., Beganović, J., Vuković, S., Šušković, J. (2005) *In vivo* testing of functional properties of three selected probiotic strain, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1401-1408.
- Frece, J. (2007) In vitro and in vivo studies of probiotic mechanism effects in bacteria: *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 and *Enterococcus faecium* L3. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 365-378.
- Fuller, R. (1992) Problems and prospects. U: *Probiotics – The Scientific Basis*, R. Fuller (ured.), Chapman and Hall, London, str. 377-396.
- Fuller, R., Perdigon, G. (2000) *Probiotics 3: Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., Marchioni (2009) Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins *Int. J. Food Microbiol.* **129**, 103-105.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Ali, I., Mulligan, C. H. (1999) Encapsulation in the food industry: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **50**, 213-224.
- Gilliland, B. F. (1981) Enumeration and identification of lactobacilli in feed supplements marketed as a source of *Lactobacillus acidophilus*. Oklahoma Agricultural Experimental Station Miscellaneous publication. **108**, 61 – 63.
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L. (1992) Probiotics for humans. U: *Probiotics – The Scientific Basis*, R. Fuller (ured.), Chapman and Hall, London, str. 355-376.
- Hegenbart, S. (1993) Encapsulated ingredients keep problems conversed. *Food Prod. Des.* **3**, 28-34.
- Heidebach, T., Forst, P., Kulozik, U. (2009) Transglutaminase-induced caseinate gelation for microencapsulation of probiotic cells. *Int. Dairy J.* **19**, 77-84.
- Hubalek, Z. (2003) Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, **46**, 205–229.
- Havenaar, R., Ten Brink B., Huis in't Veld J. H. (1992) Selection of strains for probiotic use. U: *Probiotics - The Scientific Basis*, R. Fuller (ured.). Chapman and Hall, London, str. 209-221.

Huis in't Veld, J. H., Havenaar, J. R., (1993) Selection criteria for microorganisms for probiotic use. U: *Probiotics and Pathogenicity*, Flair No. 6, J. F. Jensen, M. H. Hinton, R. W. A. W. Mulder (ured.), DLO Spelderholt Centre for Poultry Research and Information Services, str. 11-19.

Kailasapathy, K. (2002) Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **3**, 39-48.

Kets, E., Teunissen, P., de Bont, J. (1996a) Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 259–261.

Kim, K. I., Baek, Y. J., Yoon, Y. H. (1996) Effects of rehydration media and immobilisation in calcium-alginate on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum*. *Korean J. Dairy Sci.* **18**, 193 – 198.

King, A. H. (1995) Encapsulation of Food Ingredients: A review of available technology, focussing on hydrocolloids. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, ACS Symposium Series 590, Ed. By Sara J. Risch and Gary A. Reineccius. American Chemical Society, Washington DC, p. 26 -39.

Kitabatake, N., Kinekawa, Y. I. (1998) Digestibility of bovine milk whey protein and β -lactoglobulin in vitro and in vivo. *J. Agric. Food. Chem.* **46 (12)**, 4917-4923.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. i Reuter, G. (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 103-125.

Klaenhammer, T.R., Kleeman, E.G. (1981) Growth characteristics, bile sensitivity, and freeze damage i colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1461-1467.

Kos, B., Šušković, J., Goreta, J., Matošić, S. (2000) Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Tech. Biotechnol.* **36**, 121–127.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981–987.

Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 699–707

- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003) Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* **13**, 3-13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004) The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **114**, 737-743.
- Kuraishi, C. Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., Soeda, T. (1997) Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *J. Food. Sci.* **62** (3), 488-490.
- Lauber, S., Henle, T. (2000) Oligomerization of β -lactoglobulin by microbial transglutaminase during high pressure treatment. *Eur. Food Res. Technol.* **213** (3), 246-247.
- Leclercq, R., Courvalin, P. (1996) Resistance to Macrolides and Related Antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46** (9), 2727-2734.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. (2001) Review: Yoghurt as probiotic carrier in food. *Int. Dairy J.* **11**, 1-17.
- Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C., Ross, R. P. (2008) Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.* **106**, 1406-1416.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., Vesey, G. (2006) Preservation of microorganisms by drying: A review. *J. Microbiol. Methods.* **66**, 183-193.
- Neefs, J. M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chappelle, S., De Wachter, R. (1993) Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res.* **21** (13), 3025-3049.
- Periti, P., Tonelli, F. (2002) Biotherapeutics and biotherapy of surgical enteropathies, *Digest. Liver Dis.* **34**, S87-S97.
- Reid, G. (1999) Testing the Efficiency of Probiotics. U: *Probiotics. A Critical Review* (Tannock, G. W., ured.), Horizon scientific press, England, str. 129-140.
- Runjić-Perić, V. (1996) Kultiviranje združenih bakterija mliječne kiseline za silažne starter kulture. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Sanders, M. E. i Huis in't Veld, J. (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issued. U: *Proceedings of the 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, str. 293-316.
- Schleifer, K. H., Ludwig, W. (1999) Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *Asm News.* **65**, 752-757.
- Schleifer, K. H., Amann, R. I., Ludwig, W. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.

- Shah, N. P. (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* **83**, 894-907.
- Shah, N. (2002) The exopolysaccharides production by starter cultures and their influence on textural characteristics of fermented milks. *Int. Dairy Federation.* 101-115.
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T. (1993) Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *J. Food. Sci.* **54**, 557-561.
- Shu, Q., Gill, H. (2002) Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice. *Immunol.Med. Microbiol.* 34-59.
- Siaterlis, A., Deepika, G. Charalampopoulos (2009) Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**, 29-301.
- Sleator, R. D., Hill, C. (2008) New frontiers in probiotic research. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**, 143-147.
- Snowman, J. W. (1988) *Downstream Processes: Equipment and Techniques*, 8. izd, Alan R. Liss, New York, str. 315-351.
- Staab, J. A., Ely, J. K. (1987) Viability of lyophilized anaerobes in two media. *Microbiology.* **24**, 174-178.
- Stackebrandt, E., Goebel, B. M., (1994) A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 846-849.
- Šušković, J., Krobot, M., Mehak, M., Matošić, S. (1993) Antimikrobna aktivnost *Lactobacillus acidophilus*. *Mljekarstvo*, **43**, 95-106.
- Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnoški fakultet u Zagrebu.
- Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo*, **47**, 107-112.
- Šušković, J., Kos, B., Matošić, S., Besendorfer, V. (2000) The effect of bile salts on survival and morphology of potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 673–678.
- Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* **39**, 227-235.
- Šušković, J. (2009) Probiotici kao živi lijekovi, predavanje iz kolegija "Probiotici i starter kulture", Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Tannock, G. W. (2004) A special fondness for Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (6), 3186-3194.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* **60**, 407–438.

Veyrat, A., Miralles, M. C., Perez-Martinez, G. (1999) A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 49-61.

SAŽETAK

Ime i prezime autora: Mario Dukić

Naslov rada: Utjecaj mikroinkapsulacije i liofilizacije na funkcionalnost probiotičkih bakterija kao živih lijekova

Tekst sažetka:

Bakterijski sojevi *Lactobacillus helveticus* M92 i *Enterococcus faecium* L3 definirani su kao probiotički sojevi prema strogim izbornim probiotičkim kriterijima u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Osim njihove primjene, kao funkcionalnih starter kultura u različitim fermentiranim proizvodima, istražuje se i njihov bioterapijski učinak kao živih lijekova. Glavni zahtjev pri izboru probiotičkih sojeva je njihovo preživljavanje u gastrointestinalnom traktu, a za postizanje probiotičkog učinka potrebno je u organizam unijeti visok broj živih probiotičkih bakterija u koncentriranom, praškastom pripravku koji se može dobiti liofilizacijom. Stoga je, u ovom radu ispitano preživljavanje probiotičkih bakterija *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3 tijekom liofilizacije, uz dodatak različitih lioprotektora. Provedena je i mikroinkapsulacija vlažne biomase i liofiliziranih probiotičkih kultura u alginatu, s ciljem ispitivanja utjecaja mikroinkapsulacije na preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Najveći broj živih probiotičkih stanica postignut je u liofiliziranim pripravcima u kojima su kao lioprotektori dodani obrano mlijeko i glicerol. Veći postotak preživljavanja mikroinkapsuliranih stanica *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3, u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, u odnosu na stanice koje nisu mikroinkapsulirane, ukazuje na zaštitnu ulogu mikroinkapsulacije za probiotičke sojeve. Prisutnost čistih kultura *L. helveticus* M92, odnosno *E. faecium* L3 u suhom aktivnom pripravku dobivenom liofilizacijom dokazana je RAPD metodom (engl. *Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Probiotičke bakterije, *L. helveticus* M92 i *E. faecium* L3, pokazale su i snažno antimikrobno djelovanje prema odabranim test mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Bacillus cereus*) što im omogućuje kompetitivnu ekskluziju nepoželjnih mikroorganizama, kad dospiju u intestinalni trakt, gdje se očekuje njihova probiotička aktivnost.

Ključne riječi: *Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* L3, liofilizacija, mikroinkapsulacija, gastrointestinalni trakt

SUMMARY

Name and Surname: Mario Dukić

Title: Influence of microencapsulation and freeze-drying on functionality of probiotic bacteria as living drugs

Abstract:

Bacterial strains *Lactobacillus helveticus* M92 and *Enterococcus faecium* L3 have been previously characterised as probiotic strains according to strong probiotic selection criteria in Laboratory of Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter culture Technology on Faculty of Food Technology and Biotechnology University of Zagreb. Besides their traditional applications as functional starter cultures for various food commodities, there is also a great interest for an investigation of the bioterapeutic influence of these probiotic strains as living drugs. The major criterion for the selection of probiotics is their survival during the transit through gastrointestinal tract. In order to exert their health benefits, probiotics need to be delivered to a host at high viable cell number, as a concentrated powder, that could be performed by freeze-drying. Hence, the objective of this work was to investigate the effects of different lyoprotectants on the survival of probiotic strains *L. helveticus* M92 and *E. faecium* L3 during freeze-drying. Wet biomass and freeze-dried bacterial cells were microencapsulated in alginate in order to investigate the effect of microencapsulation on a viability of these probiotic bacteria during the transit through the simulated gastrointestinal tract conditions. The highest number of viable bacterial cells was reached when skim milk in combination with glycerol was applied as lyoprotectants. The higher percentage of the survival of microencapsulated cells of *L. helveticus* M92 and *E. faecium* L3 compared to the percentage of the survival of non-microencapsulated probiotic cells, in simulated gastrointestinal tract conditions, indicates the protective effect of the microencapsulation in alginate. The presence of pure culture *L. helveticus* M92 or *E. faecium* L3 in freeze-dried preparations was confirmed by RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Probiotic strains *L. helveticus* M92 and *E. faecium* L3 have also shown a strong antimicrobial activity against selected test microorganisms (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus cereus*) what is an important prerequisite for competitive exclusion of undesirable bacteria in intestinal tract, where their probiotic activity is expected.

Key words: *Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* L3, freeze-drying, microencapsulation, gastrointestinal tract

