

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Nataša S. Obradović

**KARAKTERIZACIJA I PRIMENA  
PRIRODNIH HIDROGELOVA ZA  
INKAPSULACIJU PROBIOTSKE STARTER  
KULTURE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Nataša S. Obradović

**CHARACTERIZATION AND APPLICATION  
OF NATURAL HYDROGELS FOR  
ENCAPSULATION OF PROBIOTIC  
STARTER CULTURE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentor:

\_\_\_\_\_

Dr Branko Bugarski, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Komisija:

\_\_\_\_\_

Dr Marica Rakin, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

\_\_\_\_\_

Dr Marko Rakin, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

\_\_\_\_\_

Dr Ivana Pajić-Lijaković, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

\_\_\_\_\_

Dr Viktor Nedović, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Doktorand:

\_\_\_\_\_

Nataša S. Obradović, dipl.inž.tehnol.

Datum odbrane doktorske disertacije: \_\_\_\_\_

*Doktorska disertacija je urađena u okviru projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja III46010 pod nazivom „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti”, koju finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije od 2011. godine.*

*Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratorijama Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, zatim Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a pojedini eksperimenti urađeni su u laboratorijama Instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu*

## Zahvalnica

*Na prvom mestu veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Branku Bugarskom, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu na ukaznom poverenju i stručnoj pomoći tokom izrade ove disertacije. Hvala Vam što ste mi pružili podršku i priliku da budem deo Vašeg stručnog tima.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr. Marici Rakin, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu na dragocenim savetima i sugestijama u svim fazama rada na ovoj disertaciji. Hvala Vam što ste mi ukazali poverenje i otvorili vrata laboratorije na katedri za Biotehnologiju i biohemijsko inženjerstvo gde sam uradila veliki broj eksperimenata za ovu doktorsku disertaciju.*

*Zahvaljujem se prof dr. Marku Rakinu, redovnom profesoru Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu na pruženoj prilici da radim sa kolegama sa katedre za Opšte tehničke nauke i da naučim dosta stvari iz oblasti Inženjerstva materijala. Hvala Vam na stručnom usmeravanju i korisnim savetima u vezi sa mojim naučno-istraživačkim radom i tezom.*

*Dr Ivani Pajić-Lijaković, naučnom savetniku Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu želim da izrazim zahvalnost na nesebičnom angažovanju u svim fazama rada i toploj podršci. Hvala na stručnim i prijateljskim savetima tokom pisanja i koncipiranja radova i doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se prof. Dr Viktoru Nedoviću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na dragocenim savetima i komentarima prilikom pisanja doktorske disertacije. Hvala Vam sto ste mi omogućili da deo eksperimenta za tezu uradim u laboratorijama na Poljoprivrednom fakultetu.*

*Zahvalnost na podršci, podstreku, prijateljskim i stručnim savetima tokom mog naučno-istraživačkog rada dugujem mojim dugogodišnjim kolegama doc. dr Bojanu Među, dr Ivani Damnjanović i Mini Volić, mast. inž. tehnol. Zahvalnost takođe dugujem kolegi doc. dr Đorđu Veljoviću na mnogobrojnim stručnim i prijateljskim savetima tokom pisanja radova i teze. Zahvalnost na stručnim savetima i podršci tokom mog rada dugujem prof. dr Đorđu Janačkoviću i prof. dr Salviši Putiću.*

*Zahvaljujem se svim kolegama sa katedre za Hemijsko inženjerstvo a posebno kolegama dr Bojani Balanč, dr Verici Đorđević, dr Predragu Petroviću, Jovani Zvicer, mast. inž. tehnol. i dr Jasmini Stojkovskoj na pomoći i sugestijama u eksperimentalnom radu i pisanju teze. Hvala vam na lepim trenutcima provedenim u „žutoj i „ljubičastoj“ laboratoriji.*

*Želim da se zahvalim kolegama dr Tanji Krunić, dr Maji Bulatović, prof. dr Maji Vukašinović-Sekulić, doc. dr Stevi Leviću, dr Željku Radovanoviću, dr Mioni Belović i saradnicima Naučnog instituta za prehrambene tehnologije Univerziteta u Novom Sadu, na pomoći u eksperimentalnom rada, brojnim konstruktivnim diskusijama i savetima.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, mami Vesni, tati Staniši, bratu Siniši, suprugu Stevanu i sinu Bogdanu na strpljenju, podršci i ljubavi koju mi pružaju i njima posvećujem ovaj rad. Hvala vam što ste me bodrili i sve ove godine verovali u mene!*

autor

## **KARAKTERIZACIJA I PRIMENA PRIRODNIH HIDROGELOVA ZA INKAPSULACIJU PROBIOTSKE STARTER KULTURE**

### **REZIME**

Probiotske kulture su sve više zastupljene u ljudskoj ishrani pre svega zbog težnje savremenih potrošača da konzumiraju kvalitetne prehrambene proizvode koji imaju i pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje. Terapeutski efekat hrane sa dodatim živim mikroorganizmima (probioticima) posebno na primerima mlečnih proizvoda se sve više promovise od strane zdravstvenih radnika. Probiotske bakterije, da bi ostvarile željeni terapeutski efekat, neophodno je da se u organizam unesu u odgovarajućem broju i da se održi njihova vijabilnost tokom proizvodnog procesa i skladištenja proizvoda. Isto tako, posle konzumiranja proizvoda, potrebno je da adekvatan broj ćelija preživi uslove u gastro-intestinalnom traktu. Stoga je cilj ove doktorske disertacije bio priprema nosača na bazi prirodnih hidrogelova, koji će omogućiti zaštitu probiotske starter kulture tokom proizvodnje, skladištenja proizvoda i gastro-intestinalnih uslova. Osim karakterizacije dobijenih nosača sa kulturom tehnikama inkapsulacije: (i) ekstruzijom (ii) sprej-sušenjem i (iii) sušenjem smrzanjem (liofilizacijom), analizirana je i primena nosača u proizvodnji fermentisanih napitaka na bazi surutke.

U okviru doktorske disertacije je urađena karakterizacija prirodnih hidrogel sistema sa inkapsuliranom probiotskom kulturom. Hidrogel nosači su pripremani sa natrijum alginatom, surutkom i koncentratom proteina surutke. U zavisnosti od dobijenih rezultata za vijabilnost kulture nakon inkapsulacije, rađeno je obalaganje nosača hitozanom kako bi se smanjilo otpuštanje kulture tokom procesa pripreme fermentisanog napitka kao i u simuliranim uslovima gastro-intestinalnog trakta. U cilju unapređenja sastava nosača za potrebe inkapsulacije kulture, razmatran je uticaj koncentracije natrijum-alginata i koncentrata proteina surutke i na taj način vršila optimizacija procesa ekstruzije. S obzirom da se pripremani nosači implementiraju u prehrambene proizvode, neophodno je da ispune zahteve u pogledu veličine nosača kako bi se dobili proizvodi zadovoljavajućih senzornih svojstva, zbog čega su u radu pripremani nosači i tehnikom elektrostatičke ekstruzije.

Karakterizacijom dobijenih nosača sa inkapsuliranom kulturom je dobijen uvid u oblik i veličinu nosača primenom metode optičke mikroskopije. Promene u površinskoj morfologiji, mikrostrukturi sistema, poroznosti kao i afinitetu kultura prema nosaču su analizirani skenirajućom elektronskom mikroskopijom. Takođe, ispitivane su interakcije polimer/inkapsulirana kultura, polimer/surutka, polimer/surutka/koncentrat proteina surutke kao i interakcije između kulture i nosača pomenutog sastava primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom. Interakcije između polaznih komponenti nosača i kulture su imale značajan uticaj i na efikasnost inkapsulacije primenjivanim tehnikama. Eksperimentalno je pokazano da je tehnikom ekstruzije ostvaren najviši stepen inkapsulacije kulture 92,4 % za nosače u čiji sastav ulaze natrijum-alginat i surutka dok kombinacijom natrijum-alginata, surutke i koncentrata proteina surutke dobijeni stepen inkapsulacije iznosi 88,7 %. Primenom tehnike sprej-sušenja, preživljavanje inkapsulirane kulture iznosi 76,8 % za nosače pripremane samo sa dodatkom surutke dok za nosača obogaćene sa koncentratom proteina surutke iznosi 79,6 %. Liofilizacijom su dobijeni bolji rezultati u pogledu preživljavanja kulture i to za nosače pripremane sa manjom koncentracijom alginata u sastavu i sa dodatkom surutke i koncentrata proteina pri čemu dobijeni rezultat iznosi 82,5 %.

Mehanička svojstva hidrogel sistema su analizirana metodom kompresije između dve ploče u vodenoj sredini. Ispitivani hidrogel nosači su pokazali viskoelastično ponašanje, pri čemu je povećanje koncentracije polimera, dodatak surutke, proteina i obloge od hitozana su imale pozitivan uticaj na povećanje čvrstoće i modula elastičnosti nosača. Dodatak kulture u čistu polimernu matricu uticao je na smanjanje čvrstoće nosača, međutim dodatkom pomenutih komponenti (surutka i proteini surutke) su unapređena mehanička svojstva nosača. Takođe, praćen je uticaj uslova fermentacije na strukturu nosača, bubrenje nosača i mehanička svojstva nosača.

Reološko ponašanje hidrogel nosača sa kulturom je praćeno na reometru i na osnovu eksperimentalnih vrednosti dinamičkih modula i promena u veličini nosača je urađen reokinetički model ponašanja nosača u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima.

Za nosače dobijene tehnikom sprej-sušenja i liofilizacijom veličina nosača i naelektrisanje na površini čestica je određeno primenom laserske difrakcione tehnike.

Prašasti uzorci su analizirani na prisustvo vlage koja je bitan parametar za primenu ovakvog tipa prahova u prehrambenoj industriji. S obzirom da se prahovi implemetiraju u napitke, ispitana je i rastvorljivost dobijenih prahova kako bi se prema potrebi uradila optimizacija postupka sušenja.

Poseban deo rada se odnosi na implementaciju dobijenih nosača sa inkapsuliranom kulturom u napitke na bazi surutke gde se pratila vijabilnost kulture u nosačima pre i nakon fermentacije kao i tokom skladištenja napitka. Dobijeni napici su čuvani u vremskom periodu od 28 dana na hladnom mestu na temperaturi 4°C. Uzorci dobijeni nakon fermentacije su analizirani u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima i odredilo se preživljavanja kulture u datim uslovima. Eksperimentalni rezultati pokazuju da je najbolje preživljavanje kulture u nosačim dobijenim tehnikom ekstruzije potom tehnikom sprej-sušenja i nakon toga tehnikom sušenja smrzavanjem.

Na osnovu prikazanih rezultat karakterizacije nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom dobijenih pomenutim tehnikama je ukazano na mogućnosti primene ovakvih sistema kao funkcionalnih aditiva u prehrambenoj industriji.

**Ključne reči:** inkapsulacija, prirodni hidrogelovi, probiotici, ABY 6 kultura, surutka, koncentrat proteina surutke, fermentacija, funkcionalna hrana

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

**UDK broj:**



## **CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF NATURAL HYDROGELS FOR ENCAPSULATION OF PROBIOTIC STARTER CULTURE**

### **SUMMARY**

Probiotic cultures are becoming more popular in human nutrition primarily because modern consumers tend to use food products that have a more positive impact on their health. The therapeutic effect of food with added live microorganisms (probiotics), especially milk products, is promoted by health professionals. In order to achieve the desired therapeutic effect of food product, probiotic bacteria have to enter the body in appropriate number and maintain viability during production and storage conditions. After consuming the product, it is important that an adequate number of cells survive conditions in the gastrointestinal tract. Preparation of a natural hydrogel carrier, which will enable the protection of the probiotic starter culture during production, storage and the gastrointestinal conditions was goal of this doctoral dissertation. Aim was full potential impact of functional food product on human health. Thesis analyzes two types of results: characterization of obtained carriers with probiotic starter culture using different encapsulation techniques and application of the carriers in preparation of functional food product. Encapsulation techniques used: (i) extrusion (ii) by spray-drying and (iii) freeze drying (lyophilization). Production of fermented whey-based beverage was used for implementation of prepared carriers with probiotic cells.

Natural hydrogel systems with encapsulated probiotic culture are characterized in this doctoral thesis. Hydrogel systems were prepared with sodium alginate, whey, and whey protein concentrate. The carriers were coated with chitosan in order to reduce cell release during fermentation process, as well as in simulated gastrointestinal conditions.

Carriers composition for culture encapsulation was improved with optimization of extrusion process. Optimization was made using different concentrations of sodium alginate and whey protein. Hence functional food products require adequate size of carriers and satisfactory sensory properties, electrostatic extrusion technique was also applied.

Insight into shape and size of the carrier was made using the optical microscopy method. Carrier changes in surface morphology, microstructure of system, porosity and affinity of cultures for the carrier were analyzed by scanning electron microscopy.

Multiple set of interactions were studied using Fourier Transform Infrared spectroscopy: polymer/encapsulated culture, polymer/whey, polymer/whey/whey protein concentrate. Interaction between culture and carrier of mentioned composition were also analyzed using this method.

The interactions between starting components of the carrier and culture have had a significant impact on the encapsulation efficiency of probiotic starter culture. Highest degree of encapsulation efficiency (92,4 %) with extrusion technique was achieved with carriers prepared with sodium alginate and whey, while carriers consist of sodium alginate, whey and whey protein concentrate encapsulation efficiency was 88,7 %. With spray drying technique, the survival of the encapsulated culture was 76,8 % for carriers with whey addition, while for the carriers enriched with whey protein concentrate was 79,6 %. Lyophilization yields better results in terms of survival of culture, and for carriers prepared with a lower concentration of alginate with addition of whey and protein concentrate survival rate was 82,5 %.

Mechanical properties of hydrogel systems were analyzed by a compression method between two plates in the aqueous medium. Hydrogel carriers showed viscoelastic behavior. Positive effect on increase in carrier strength and elastic modulus was made with polymer concentration increase, addition of whey, whey protein and chitosan coating. Addition of cell in combination with whey and whey protein has positive effect on mechanical strength of carrier. Carrier strength decreases when only cells are added in the polymer matrix. Fermentation conditions influence on carriers structure, the swelling behavior and mechanical properties were also examined.

Mathematical model of rheological behavior was made according to experimental values for carriers swelling and dynamic modulus in simulated gastrointestinal conditions.

Carrier size and change on surface were determined by applying a laser diffraction techniques for carriers obtained by spray drying technique and lyophilization. Powdered samples were analyzed for presence of moisture, which is an important parameter in food industry. Since the powders will be implemented in beverages, powder solubility was examined in order to improve drying process.

The particular emphasis deals with implementation of obtained carriers with an encapsulated culture into whey-based beverages and analyze culture's viability before and after fermentation as well as during storage of final product. The beverages obtained were stored for 28 days in a cold place at a temperature of 4 °C. Samples obtained after fermentation were monitored in simulated gastrointestinal conditions and survival rate of the probiotic cells was examined. Experimental results show that the best culture survival result was from extrusion, thereafter with spray drying, and then with freeze drying technique.

Characterization results for carriers with an encapsulated probiotic starter culture, for applied techniques, show that prepared carriers could be used as functional additives in food industry.

**Keywords:** encapsulation, hydrogels, probiotics, ABY 6 culture, whey, whey protein concentrate, fermentation, functional food.

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical Engineering and Biotechnology

**UDC number:**

**Lista skraćenica i oznaka korišćenih u doktorskoj disertaciji**

Alg	-	alginat
Alg/S	-	nosači pripremani korišćenjem alginata i surutke
Alg/P	-	nosači pripremani korišćenjem alginata i koncentrata proteina surutke
Alg/S/P	-	nosači pripremani korišćenjem alginata, surutke i koncentrata proteina surutke
Alg/S/Ch	-	nosači pripremani korišćenjem alginata i surutke i obloženi hitozanom
BMK	-	bakterije mlečne kiseline
CFU/g	-	jedinica formiranih kolonija po gramu ispitivanog uzorka
CFU/mL	-	jedinica formiranih kolonija po mililitru ispitivanog uzorka
GI	-	gastro-intestinalni uslovi
GIT	-	gastro-intestinalni trakt
GRAS	-	materijal prepoznatljiv kao bezbedan za primenu u prehrambenoj industriji (eng. Generally Recognized As Safe)
G'	-	modul čuvanja (elastičnosti)
G''	-	modul gubitaka (viskoznosti)
EE	-	efikasnost postupka inkapsulacije
IBS	-	Sindrom iritabilnog creva (eng. Irritable Bowel Syndrome)
FTIR	-	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
SEM	-	skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. Scanning Electron Microscopy)
SGF	-	simulirani gastrični fluid (eng. Simulated Gastric Fluid)
SIF	-	simulirani intestinalni fluid (eng. Simulated Intestinal Fluid)
ζ	-	površinsko naelektrisanje čestica, mV
MRS	-	bujon za određivanje broja ćelija (eng. De Man, Rogosa, Sharpe)

**SADRŽAJ**

1. UVOD .....	6
TEORIJSKI DEO .....	8
2. PROBIOTICI .....	8
2.1. Opšti i tehnološki kriterijumi za primenu probiotika .....	9
2.2. Dejstvo probiotskih kultura na ljudsko zdravlje .....	12
3. INKAPSULACIJA PROBIOTSKIH KULTURA .....	15
3.1. Definicija i ciljevi postupka inkapsulacije .....	15
3.2. Tehnike za inkapsulaciju probiotskih bakterija .....	17
3.2.1. Ekstruzione tehnike .....	18
3.2.1.1. Elektrostaticka ekstruzija .....	19
3.2.1.2. Vibraciona metoda .....	19
3.2.2. Tehnike emulzifikacije .....	19
3.2.3. Tehnika sprej-sušenja .....	21
3.2.4. Liofilizacija .....	23
3.2.5. Oblaganje u fluidizovanom sloju .....	24
3.3. Materijali za inkapsulaciju probiotskih kultura .....	26
3.3.1. Alginat .....	26
3.3.2. Proteini surutke .....	29
3.3.3. Pektin .....	30
3.3.4. Mleko i mlečni proteini .....	30
3.3.5. Hitozan .....	30
3.4. Primena starter kultura u fermentisanim proizvodima i značaj postupka inkapsulacije .....	32

EKSPERIMENTALNI DEO.....	38
4. MATERIJALI I METODE .....	38
4.1. Materijali .....	38
4.2. Metode .....	39
4.2.1. Priprema suspenzije sa probiotskom starter kulturom (ABY 6).....	39
4.2.2. Priprema nosača za inkapsulaciju probiotske starter kulture .....	39
4.2.3. Inkapsulacija probiotske starter kulture elektrostatičkom ekstruzijom.....	40
4.2.4. Inkapsulacija probiotske starter kulture tehnikom sprej-sušenja .....	41
4.2.5. Inkapsulacija probiotske kulture tehnikom sušenja smrzavanjem.....	42
4.3. Primena i karakterizacija nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom .....	43
4.3.1. Optička mikroskopija i sferičnost nosača .....	43
4.3.2. Veličina i raspodela veličine nosača .....	44
4.3.3. Bubrenje prirodnih hidrogel sistema sa i bez inkapsulirane kulture.....	45
4.3.4. Rastvorljivost inkapsulata dobijenih sprej-sušenjem i liofilizacijom .....	45
4.3.5. Površinska morfologija nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom - skenirajuća elektronska mikroskopija.....	45
4.3.6. Naelektrisanje na površini mikronosača i liofilizovane starter kulture.....	46
4.3.7. Liofilizacija .....	47
4.3.8. Efikasnost inkapsulacije i određivanje broja živih ćelija.....	47
4.3.9. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom .....	48
4.3.10. Određivanje mehaničkih karakteristika nosača.....	48
4.3.11. Reološka svojstva nosača.....	49
4.3.12. Primena matematičkih modela za modelovanje reološkog ponašanje nosača u gastro-intestinalnim uslovima .....	50
4.3.13. Određivanje broja živih ćelija .....	51
4.3.13.1. Određivanje broja živih ćelija nakon fermentacije slobodnom kulturom .....	51
4.3.13.2. Određivanje broja živih ćelija nakon fermentacije inkapsuliranom kulturom	52
4.3.14. Implementacija nosača u napitke na bazi surutke .....	52

4.3.14.1. Priprema probiotske starter kulture za fermentaciju slobodnom i inkapsuliranom kulturom .....	53
4.3.14.2. Fermentacija slobodnom i inkapsuliranom kulturom.....	53
4.3.14.3. Otpuštanje probiotske starter kulture iz nosača u fermentacioni medijum ....	53
4.3.14.4. Određivanje promene u vrednosti pH fermentacionog medijuma .....	53
4.3.14.5. Vijabilnost probiotske kulture u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima	54
4.3.14.6. Određivanje stabilnosti proizvoda tokom čuvanja .....	55
4.3.15. Statistička analiza.....	55
REZULTATI I DISKUSIJA .....	56
5. KARAKTERIZACIJA NOSAČA SA INKAPSULIRANOM PROBIOTSKOM STARTER KULTUROM .....	56
5.1. Karakterizacija nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom dobijenih tehnikom ekstruzije.....	56
5.1.1. Izgled i veličina hidrogel nosača.....	56
5.1.2. FTIR analiza.....	60
5.1.2.1. FTIR analiza Alg/S hidrogel nosača .....	60
5.1.2.2. FTIR analiza Alg/S/P hidrogel nosača .....	65
5.1.3. SEM analiza .....	69
5.1.3.1. SEM analiza Alg, Alg/S i Alg/S/P nosača .....	69
5.1.4. Efikasnost inkapsulacije probiotske starter kulture u hidrogel nosače .....	76
5.1.5. Uticaj procesa fermentacije na strukturu hidrogel nosača i rast inkapsulirane kulture .....	79
5.1.6. Bubrenje hidrogel nosača i otpuštanje inkapsulirane kulture tokom procesa fermentacije.....	80
5.1.7. Vijabilnost probiotske starter kulture u hidrogel nosačima tokom skladištenja napitka na bazi surutke .....	83
5.1.8. Uticaj inkapsulacije probiotske starter kulture u nosače na probiotski karakter proizvoda.....	84

5.1.9. Promena srednjeg prečnika nosača usled bubrenja u simuliranim gastro - intestinalnim uslovima.....	86
5.1.10. Uticaj simuliranih gastro-intestinalnih uslova na reološko ponašanje hidrogel nosača.....	88
5.1.11. Matematičko modelovanje reološkog ponašanja hidrogel nosača u gastro-intestinalnim uslovima.....	90
5.1.12. Mehaničke karakteristike hidrogel nosača sa i bez inkapsulirane kulture.....	95
5.1.12.1. Uticaj inkapsulirane kulture na mehanička svojstva nosača.....	99
5.1.12.2. Uticaj procesa fermentacije na mehanička svojstva hidrogel nosača.....	100
5.2. Karakterizacija nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom dobijenih tehnikom sprej-sušenja.....	104
5.2.1. Veličina i površinsko naelektrisanje nosača.....	104
5.2.2. SEM analiza nosača sa probiotskom starter kulturom.....	105
5.2.3. Efikasnost inkapsulacije probiotske starter kulture.....	107
5.2.4. Rastvorljivost prahova sa inkapsuliranom starter kulturom.....	108
5.2.5. Sadržaj vlage u nosačima sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom.....	109
5.2.6. Priprema napitaka na bazi surutke sa dodatkom nosača.....	109
5.2.6.1. Vijabilnost probiotske starter kulture pre i posle fermentacije.....	110
5.2.6.2. Vijabilnost probiotske starter kulture tokom skladištenja napitka i prahova.....	110
5.2.7. Vijabilnost probiotske starter kulture u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima.....	113
5.3. Karakterizacija nosača sa inkapsuliranom probiotskom kulturom dobijenih tehnikom sušenja smrzanjem.....	114
5.3.1. Veličina i naelektrisanje nosača.....	114
5.3.2. SEM analiza nosača sa probiotskom starter kulturom.....	116
5.3.3. Efikasnost inkapsulacije i vijabilnost kulture.....	119
5.3.4. Rastvorljivost prahova i prisustvo vlage u uzorcima sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom.....	120



5.3.5. Priprema napitka na bazi surutke sa dodatkom nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom.....	121
5.3.5.1. Vijabilnost probiotske starter kulture pre i posle fermentacije .....	121
5.3.5.2. Vijabilnost kulture u napitku i u nosaču tokom vremenskog perioda skladištenja .....	122
5.3.5.3. Vijabilnost probiotske starter kulture i preživljavanje u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima .....	124
6. ZAKLJUČAK .....	125
7. LITERATURA.....	133
Spisak slika.....	152
Spisak tabela.....	158
Prilozi .....	160
Biografija.....	164

## 1. UVOD

Savremeni potrošač ima visoka očekivanja u pogledu kvaliteta hrane i njenog terapijskog uticaja na ljudsko zdravlje. Zbog toga, prehrambena industrija je sve više usmerena na proizvodnju različite funkcionalne hrane sa probiotskim bakterijama. Probiotske bakterije predstavljaju žive mikroorganizme, koji primenjeni u odgovarajućim količinama ispoljavaju pozitivne efekte na ljudsko zdravlje (FAO/WHO, 2002). Funkcionalni proizvodi sa dodatkom probiotika predstavljaju oko 65,0 % svetskog tržišta funkcionalne hrane (Agrawal, 2005; Jankovic i sar., 2010). Na tržištu se može naći širok asortiman hrane sa dodatkom probiotika: mlečni proizvodi (jogurt, kefir, sir, sladoled, mlečni deserti), proizvodi dobijeni od čokolade i žitarica (Anal i Singh, 2007). Takođe, u poslednje vreme veliku pažnju privlače funkcionalni napici koji su obogaćeni probioticima, a pri tome da ne sadrže laktozu i soju zbog sve većeg broja potrošača koji pokazuju intoleranciju na laktozu kao i na neke aditive u proizvodima (Gawkowsky i Chikindas, 2013). Istraživanjima je ustanovljeno da brojne bakterije mlečne kiseline, izolovane iz različitih sredina (gastrointestinalni trakt, fermentisani biljni proizvodi, tradicionalni mlečni proizvodi, itd.), poseduju probiotske karakteristike. Vrste bakterija koje pripadaju rodovima *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp. su ostvarile najveću primenu kao probiotske bakterije. Da bi probiotske bakterije primenjene u prehrambenim proizvodima ostvarile terapijski efekat, neophodno je da se unesu u odgovarajućem broju, odnosno neophodno je održati vijabilnost probiotika tokom proizvodnje i skladištenja proizvoda na nivou većem od  $10^6$  CFU/g, kako bi se konzumiranjem namirnica ostvario dnevni unos probiotskih bakterija na nivou  $10^8$ - $10^9$  ćelija. U dosadašnjim istraživanjima je pokazano da je veoma slabo preživljavanje slobodnih probiotskih bakterija u proizvodima (De Vos i sar., 2010). U tom smislu, sve više se primenjuje zaštita probiotskih bakterija primenom različitih tehnika inkapsulacije. Inkapsulacijom probiotika se može pružiti zaštita ćelijama tokom nepovoljnih uslova proizvodnog procesa i čuvanja proizvoda (Kailasapathy, 2009, Borgogna i sar., 2010). Takođe, pomenutim postupkom je moguće i maskirati neke nepoželjne arome koje su proizvodi metabolizma mikroorganizama (Prisco i Mauriello, 2016). Posebnu pažnju treba posvetiti odabiru adekvatnog materijala za inkapsulaciju kako bi se omogućila zaštita probiotske kulture.

U zavisnosti od vrste materijala mogu se dobiti nosači različite poroznosti što može biti od velikog značaja za ciljano otpuštanje ćelija (Picot i Lacroix, 2004).

Najčešće korišćeni materijali za inkapsulaciju probiotika su alginat, hitozan, pektin, škrob, karagenan, želatin i proteini mleka (Burgain i sar., 2011, Martin i sar., 2015). Navedeni materijali su korišćeni zbog svoje biodegradibilnosti, netoksičnosti i biokompatibilnosti. Postupak inkapsulacije pored navedenih prednosti ima i nedostatke sa aspekta cene koštanja izvođenja postupka u industrijskim uslovima, zbog čega je i potrebno izvršiti optimizaciju procesa. Ekstruzija, sprej-sušenje i liofilizacija su najčešće korišćene tehnike za inkapsulaciju probiotika. Predmet istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije odnosi se na karakterizaciju i formulaciju prirodnih hidrogel sistema za inkapsulaciju probiotske starter kulture. Konkretno, u predloženim istraživanjima rađena je inkapsulacija mešane starter kulture ABY 6 u čiji sastav ulaze četiri vrste bakterija u sledećem odnosu (*Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* 80,0 %, *Lactobacillus acidophilus* 13,0 %, *Bifidobacterium bifidum* 6,0 % i *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 1,0 %), u prirodne biopolimerne sisteme koji su pripremani sa dodatkom surutke i proteina surutke. Surutka je tečni sporedni proizvod koji zaostaje nakon proizvodnje sira i kazeina i sadrži više od 55,0 % sastojaka koji su prisutni u mleku, uključujući proteine surutke, laktozu, vitamine rastvorljive u vodi i minerale. Proteini i peptidi surutke imaju pozitivan uticaj na imuni, kardiovaskularni, nervni i gastro-intestinalni sistem (Rakin i sar., 2016). Uzimajući u obzir veliki potencijal surutke kao polazne sirovine, sve je više funkcionalnih napitaka na bazi surutke pri čemu su nosioci procesa mikroorganizmi iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* od kojih većina spada u probiotike (Bulatović i sar., 2012). Kalcijum-alginat je najčešće primenjivani nosač za inkapsulaciju kultura probiotskog karaktera zbog svoje biokompatibilnosti, netoksičnosti kao i niske cene sirovine. Međutim, pokazano je i da primena alginata kao materijala za inkapsulaciju kultura ima svoje nedostatke sa aspekta poroznosti nosača odnosno efikasnosti procesa inkapsulacije i pH osetljivosti u gastričnim uslovima (Chen i sar., 2017; Gouin i sar., 2004; Shori i sar., 2017). Upravo iz navedenih razloga, predmet naučnog istraživanja u okviru predložene teme je ispitivanje značaja dodatka surutke i proteina surutke u obložene i neobložene alginatne nosače, pri čemu se novi nosač analizira s aspekta unapređenja efikasnosti postupka inkapsulacije, rasta probiotske starter kulture, mehaničke i hemijske stabilnosti sistema, kontrolisanog otpuštanja kulture i preživljavanja u uslovima gastričnog soka. Kako pomenuti biopolimerni sistemi sa inkapsuliranom kulturom predstavljaju funkcionalne aditive hrane sa velikim potencijalom, predmet predloženog istraživanja biće formulacija i karakterizacija ovih sistema.

## TEORIJSKI DEO

### 2. PROBIOTICI

Probiotici su mikroorganizmi koji uneti u adekvatnim količinama u organizam pozitivno utiču na zdravlje domaćina. Termin "probiotik" obuhvata širok spektar mikroorganizama, uglavnom bakterije, ali i kvasce. Međutim, probiotske bakterije se vezuju se za fermentisane proizvode. Pozitivan efekat fermentisane hrane je poznat od antičkog vremena, čovek je pripremao i konzumirao funkcionalnu hranu koja je sadržala probiotike. Najstarija vrsta proizvoda sa probiotskim bakterijama su fermentisani proizvodi od mleka. Fermentisana hrana se dobijala usled dejstva bakterija mlečne kiseline, kao i kvasaca. Naučnici iz antičkog doba su primetili da se pojedine bolesti digestivnog trakta poput gastroenteritisa mogu izlečiti pomoću fermentisanog mleka. U kasnijem periodu, sve je bilo veće interesovanje za razumevanjem kako probiotske bakterije utiču na ljudsko zdravlje. Početkom dvadesetog veka ruski mikrobiolog Elie Metchnikoff je došao do zaključka da Bugari žive zdravije zbog redovnog konzumiranja fermentisanih proizvoda od mleka, tj. jogurta. Metchnikoff je identifikovao bakterije koje ostvaruju pozitivan efekat na ljudsko zdravlje i zaključio da je za ljudsko zdravlje neophodna ravnoteže između „dobrih” probiotskih bakterija i „loših” bakterija. Pomenuta teorija se zasniva na inhibiciji toksina „loših” bakterija od strane bakterija mlečne kiseline. Takođe, bakterije mlečne kiseline produkcijom mlečne kiseline sprečavaju rast pojedinih mikroorganizama.

Fuller (1989) je definisao probiotike kao „žive mikroorganizme koji se dodaju hrani u cilju održavanja ravnoteže intestinalne mikroflore. Kasnije su probiotici definisani kao dijetesko pomoćno sredstvo koje pozitivno utiče na domaćina i sistemski imunitet, kao i poboljšanjem nutritivne i mikrobiološke ravnoteže u gastrointestinalnom traktu (Naidu i sar., 1999). Bakterije mlečne kiseline su gram pozitivne bakterije sa probiotskim karakteristikama i uglavnom su deo enterične mikroflore gastro-intestinalnog trakta, i veruje se da imaju značajnu ulogu u takvom tipu ekosistema (Holzapfel i sar., 2001; Anal i Singh, 2007; Mirković, 2016).

Probiotske aktivnosti mogu da obuhvataju hranljivo, fiziološko i antimikrobno dejstvo. Pri čemu je ovo saznanje dovelo do razvoja funkcionalne hrane koja sadrži bakterije mlečne kiseline sa probiotskim karakteristikama. Ostale bakterije mlečne kiseline (npr., *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, itd.) i bakterije koje se ne svrstavaju u bakterije mlečne kiseline (npr., *Escherichia coli*, kultura *nissle*), ali i neki kvasci (npr. *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, itd.) se smatraju probioticima. Terapeutski značaj probiotika je specifičan za svaku kulturu (Canani i sar., 2007; Kekkonen i sar., 2007). Svaka kultura ostvaruje terapijski efekat na sebi svojstven način. Probiotici mogu unaprediti imunitet pojedinca tako što vrše inhibiciju patogena proizvodnjom kiseline i/ili bakteriocina što zavisi od vrste bakterija (Chen i Chen, 2007). U zavisnosti od vrste probiotika vrši se i njegovo doziranje ali je za sada ustanovljeno da je količina  $10^6$ - $10^7$  cfu/g po proizvodu na dan zadovoljavajuća (Krasaekoopt i sar., 2003, Rossier-Miranda i sar., 2010, Šipailienė i Petraitytė, 2018).

Većina izolovanih i ispitivanih probiotika dostupnih na tržištu su humanog porekla ali sve veći značaj pridaje se i potencijalnim probiotskim bakterijama mlečne kiseline, izolovanih iz različitih tradicionalnih proizvoda (Karami i sar., 2017; Suganya i sar., 2013; Duangjitcharoen i sar., 2008).

## 2.1. Opšti i tehnološki kriterijumi za primenu probiotika

Prilikom selekcije potencijalnih probiotskih bakterija neophodno je uzeti u obzir opšte kriterijume koji podrazumevaju (Salminen i sar., 1998; Saarela i sar., 2000; Shewale i sar., 2014):

- ✓ Poreklo, karakterizaciju i identifikaciju
- ✓ GRAS (eng. Generally Recognized As Safe) status probiotika
- ✓ Stabilnost soja, odnosno odgovarajuća vijabilnost u proizvodu i preživljavanje pri niskim vrednostima pH i u prisustvu žučnih soli i tokom skladištenja
- ✓ Ne poseduju rezistentne gene na određene antibiotike i da su klinički potvrđene
- ✓ Da ne vrše dekonjugaciju žučnih soli (Marteau i sar., 1995)

Odabrane probiotske bakterije trebalo bi da budu sposobne za vezivanje za epitelne ćelije gastro-intestinalnog trakta, stimulišu imuni odgovor domaćina, da imaju antimikrobno dejstvo na patogene mikroorganizme, da poseduju selektivnu stimulaciju poželjnih i inhibiciju nepoželjnih mikroorganizama. Prilikom odabira kulture potrebno je uzeti u obzir i rast kulture u jednostavnim medijumima i tokom fermentacije, sposobnost da se zadrže u visokom broju tokom procesa skladištenja, sposobnost da rastu u aerobnim i mikroaerofilnim uslovima, sposobnost proizvodnje mlečne kiseline kao i hidrolize proteina (Shewale i sar., 2014).

U cilju primene probiotskih bakterija u proizvodnim procesima neophodno je ispitati njihove tehnološke karakteristike (fermentacija šećera, acidogena sposobnost, rast na različitim temperaturama, produkcija aromogenih jedinjenja, sinteza egzopolisaharida, rast na različitim koncentracijama soli i proteolitičke karakteristike).

Prilikom selekcije starter kultura za proizvodnju fermentisanih proizvoda od mleka, veoma je bitna acidogena sposobnost bakterija mlečne kiseline. Na osnovu ispitivanja bakterija mlečne kiseline, demonstrirano je da laktokoke imaju izraženiju acidogenu sposobnost, zbog čega se one i više primenjuju kao starter kulture u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka. S druge strane, laktobacili uglavnom imaju umerenu do izraženu acidogenu sposobnost što je specifično za probiotske bakterije i korisno u drugim prehrambenim proizvodima gde nisu zastupljene niske pH vrednosti a slaba acidogena sposobnost je poželjna osobina.

Rasta probiotskih kultura na različitim temperaturama ima veliki značaj u proizvodnji prehrambenih proizvoda. Optimalna temperatura za rast probiotskih bakterija je najčešće u opsegu od 30-37 °C. Temperaturni opseg može da bude veoma različit, a sve u zavisnosti od uzorka odakle su izolovane probiotske bakterije. S obzirom na to da tokom proizvodnje fermentisanih proizvoda na bazi mleka postoji širok temperaturni opseg (od trenutka inokulisanja na 40 °C, pa do hlađenja na 4 °C), veoma je bitno ispitati sposobnost rasta probiotskih bakterija na niskim, ali i visokim temperaturama. Takođe, u proizvodnji konditorskih proizvoda je zastupljena primena visokih temperatura, zbog čega je bitno ispitati termorezistentnost probiotskih kultura. Ispitivanje sposobnosti preživljavanja ćelija na visokim temperatura je važno i za inkapsulaciju probiotskih bakterija, pogotovo u slučaju primene tehnike sprej-sušenja.

Produkcija egzopolisaharida (EPS), je bitna osobina bakterija mlečen kiseline. Najčešće su kovalentno povezani s površinom bakterijske ćelije ili u obliku rastvornih sluzi (Jolly i Stingle, 2000; Mirković i sar., 2016). Sposobnost produkcije EPS je bitna za starter kulture koje se koriste u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka, s obzirom da EPS doprinose teksturalnim svojstvima proizvoda, kao i punoći ukusa. Produkcija EPS je primećena kod pojedinih sojeva *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *St. thermophilus*, itd. (Jolly i Stingle, 2000; Radulović, 2007; Mirković, 2016). Kod probiotskih bakterija, sposobnost produkcije EPS je od značaja u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka, dok je u proizvodnji sireva nepoželjna, usled pojave sluzi koja negativno utiče na sinerezis grušā i željenu teksturu proizvoda.

Bakterije mlečne kiseline (BMK) poseduju posebne nutritivne zahteve kako bi se omogućio njihov adekvatan rast. Ovaj tip bakterija ima blagu proteolitičku aktivnost koja im pruža dovoljnu količinu azota neophodnog za sintezu ćelijskih proteina. Uzimajući u obzir da ove bakterije su uglavnom prisutne u mleku i mlečnim proizvodima koji su bogata proteinima, neophodna količina azota se obezbeđuje hidroilizom proteina mleka. Proizvodi metaboličkih funkcija BMK, odnosno produkti proteolize kazeina, glikolize i lipolize masti, dovode do formiranja specifičnog ukusa sireva i drugih mlečnih proizvoda.

Tehnološki kriterijimi za primenu probiotika su od velikog značaja u cilju unapređenja proizvodnih procesa kao i načinu čuvanja i skladištenja ovog tipa proizvoda. Poseban akcenat se daje i na uticaj kulture na finalna senzorna svojstva proizvoda.

- ✓ Odabir probiotske kulture je veoma bitan kako bi se dobio proizvod adekvatnog probiotskog karaktera. Neophodno je da kultura bude odgovarajuća u odnosu na specifikaciju proizvoda i da može da preživi uslove definisane proizvodnim procesom.
- ✓ Dosadašnja analize tržišta proizvoda sa probiotskim kulturama su pokazala da prisustvo probiotskih bakterija u konditorskim i mlečnim proizvodima nema uticaj na senzorna svojstva proizvoda u poređenju sa onima koji nemaju ovaj tip kulture.
- ✓ Probiotske bakterije treba da ostvare odgovarajuću vezu sa starter kulturama koje se koriste za proizvodnju različitih fermentisanih proizvoda. Interakcija između probiotskih bakterija i starter kulture je veoma bitna i utiče na senzorna svojstva proizvoda kao i na vijabilnost tokom skladištenja proizvoda.

Takođe, prisustvo starter kulture može da ima pozitivan uticaj na vijabilnost probiotika zbog proizvoda njihovog metabolizma koji pospešuju rast probiotske kulture (Bulatović i sar., 2014).

- ✓ Pored praćenja vijabilnosti probiotika tokom proizvodnog procesa neophodno je analizirati i uticaj uslova skladištenja i čuvanja (Prisco i Mauriello, 2016; Avila-Reyesa i sar., 2014). Posebno je potrebno obratiti pažnju na uticaj temperature, vlažnosti vazduha kao i pH proizvoda tokom skladištenja. Pokazano je i da korišćena ambalaža ima značajan uticaj na vijabilnost kulture tokom čuvanja proizvoda (Karimi i sar., 2011).
- ✓ Prisustvo kiseonika ima značajan uticaj na vijabilnost probiotika. Može biti direktno toksičan za određene vrste ćelija koje su senzitivne na kiseonik ili da indirektno podstiče lučenje peroksida u medijum koji ima isti efekat. Kao zaštita probiotskih bakterija od uticaja kiseonika koriste se antioksidansi (npr., askorbinska kiselina) ili odgovarajuća ambalaža koja sprečava prodiranje kiseonika u proizvod (Weinbreck i sar., 2010).
- ✓ Dodatak stimulatora rasta može dodatno unaprediti vijabilnost probiotskih kultura tokom čuvanja proizvoda (amino kiseline, peptidi i prebiotici).
- ✓ Prisustvo soli, npr u pojedinim mlečnim proizvodima ima značajan uticaj na vijabilnost probiotskih kultura. Pri čemu sa porastom koncentracije soli u proizvodu smanjuje se vijabilnost ćelija.

## 2.2. Dejstvo probiotskih kultura na ljudsko zdravlje

Probiotske bakterije mogu da imaju širok spektar pozitivnih efekata na ljudsko zdravlje. Ove bakterije imaju primenu u lečenju različitih poremećaja crevne mikroflore, metaboličke promene izazvane radioterapijom, promene u razvoju kancera debelog creva, smanjenju nivoa holesterola u krvi, itd. Probiotske bakterije se odlikuju produkcijom širokog spektra metaboličkih proizvoda, od masnih kiselina kratkog lanca do folne i orotične kiseline (pirimidin karboksilna kiselina). Ova jedinjenja dovode do pada pH vrednosti i na taj način podešavaju niz fizioloških uslova u korist domaćina. Razni enzimi koje probiotske bakterije oslobađaju u lumen creva ublažavaju simptome crevnih poremećaja.



Saavedra i sar. (1994) su takođe pratili kontrolisane placebo studije koje su ispitivale efikasnost probiotika u smanjenju sekundarnih bolesti kod novorođenčadi i odojčadi. Kao zaključak ovog istraživanja navodi se da konzumiranje adaptirane formula sa *B. bifidum* i *St. thermophilus* dovodi do smanjenja pojave dijareje (Canani i sar., 2007). Istraživanja su takođe pokazala da probiotske bakterije sprečavaju dijareju uzrokovanu dugotrajnom primenom antibiotika (Gorkiewicz, 2009). Probiotske bakterije imaju pozitivan efekat na stabilizaciju mikroflore debelog creva i stimulacijom imunog odgovora.

Sindrom iritabilnog creva IBS (eng. Irritable Bowel Syndrome) je veoma čest gastroenteroloških poremećaja. IBS je gastrointestinalni poremećaj sa hroničnim bolom ili simptomima bola u stomaku, uz nedostatak redovne stolice kod pacijenata. Rezultati iz prakse su pokazali da acidofilno mleko pomaže pacijentima obolelim od IBS-a uspostavljanjem ravnotežne crevne flore (Sartor, 2006, 2008).

Netolerancija na laktozu je prisutna kod velikog broja ljudi. Kod ljudi koji su netolerantni na laktozu nakon što konzumiraju mleko imaju izrazite grčeve i nadimanje u stomaku, a može doći i do pojave dijareje kao posledice nemogućnosti hidrolize laktoze ili slabe apsorpcije. Pokazano je probiotske bakterije ublažavaju simptome netolerancije na laktozu i olakšavaju varenje ovog tipa fermentisanih proizvoda.

Pokazano je i da konzumiranje fermentisanih proizvoda od mleka ili probiotskih bakterija može dovesti do antitumorskih efekata. Različita istraživanja iz humanih studija ukazuju da neki sojevi probiotskih bakterija mogu da izmene aktivnost fekalnih enzima ( $\beta$ -glukuronidaze, azoreduktaze i nitroreduktaze) koje su povezane s rakom debelog creva. Buduća istraživanja probiotskih bakterija trebalo bi da ustanove mehanizme delovanja na definisane zdravstvene efekte kroz kliničke studije, s obzirom na to da je većina utvrđenih efekata sprovedena u *in vitro* uslovima.

Probiotske bakterije svoj pozitivni efekat ostvaruju i tako što luče mlečnu kiselinu i proizvode antibakterijske komponente (bakterocini) koji mogu da usled snižavanja pH i smanjenje permeabilnosti membrane pojedinih bakterija da zaštite digestivni trakt od bakterija koje su osetljive na pomenute supstance (Bierbaum i Sahl, 2009; Makras i sar., 2006).

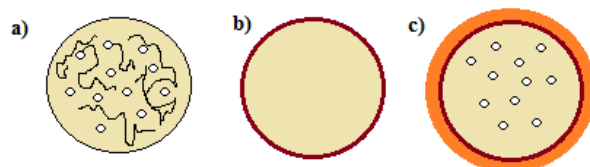
Takođe, mogu da se takmiče sa patogenim bakterijama za moguća mesta vezivanja na epitelu creva i na taj način spreče kolonizaciju bakterijama poput *B. vulgatus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* i neke kulture *E. coli* (Sherman i sar., 2005; Collado i sar., 2007; Lin i sar., 2008).

Analizirana je i mogućnost primene probiotskih sojeva u stimulaciji i regulisanju nekoliko aspekata prirodnog i stečenog imunog odgovora organizama. Pokazano je da postoji značajna razlika između sposobnosti uticaja sojeva *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* na funkcionisanje imunog sistema. Unos specifičnih sojeva probiotika je takođe pokazao pozitivan uticaj na imuni odgovor na prirodne infekcije i sistematsku ili oralnu imunizaciju kod ljudi. Stoga je i predložena primena probiotika u zaštiti od enteropatogena stimulacijom proizvodnje citokina; povećanjem fagocitnog kapaciteta polimorfonuklearnog ćelije i mikrofagi kao i poboljšanjem odgovor specifičnog antitela na patogene (Dunne i sar., 2001; Kosin i Rakshit, 2006).

### 3. INKAPSULACIJA PROBIOTSKIH KULTURA

#### 3.1. Definicija i ciljevi postupka inkapsulacije

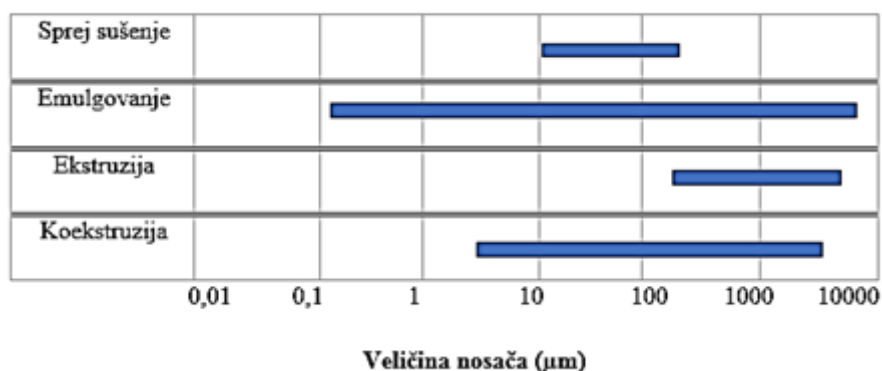
Moderni potrošači preferiraju prehrambene proizvode koji su zdraviji, ukusniji i praktični za konzumaciju. Inkapsulacija kao proces imobilizacije ćelija i bioaktivnih komponenata u nosače, jedan je od načina da se ispune zahtevi potrošača. Ovaj tip tehnologije se već duži niz godina primenjuje u prehrambenoj tehnologiji, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji za imobilizaciju ćelija, enzima, itd. U prehrambene svrhe, inkapsulacijom se mogu unaprediti senzorna svojstva proizvoda, maskirati nepoželjne arome, stabilizovati prehrambeni sastojci i/ili povećati bioraspoloživost pojedinih sastojaka (Gouin, 2004, Zuidam i Shimoni, 2010, Fiore i sar. 2012; Pravilović, 2016). Metoda inkapsulacije podrazumeva obuhvatanje živih ćelija ili biološki aktivnih suspatnci unutar nosača sa polupropusnom membranom. Materijal korišćen za inkapsulaciju može biti čista supstanca ili smeša različitih jedinjenja i naziva se još jezgro ili unutrašnja faza. Unutrašnja faza sistema može biti u formi hidrogela ili rastopa. Sa druge strane, materijal koji se koristi za inkapsulaciju tj. kapsula, membrana, nosač i najčešće se sastoji od ugljenih hidrata, prirodnih guma, proteina, prirodnih ili modifikovanih polisaharida, lipida ili sintetskih polimera (Gibbs i sar. 1999; Mozafari, 2006; Fang i Bhandari, 2010; Trifković, 2016). Nosači koji imaju primenu u inkapsulaciji probiotičkih ćelija mogu se svrstati u nekoliko osnovnih tipova (Slika 3.1): (a) čestice tipa matrice; (b) čestice tipa kapsula koje imaju jezgro obavijeno omotačem (tip “rezervoara”) i (c) multi-membrana.



Slika 3.1. Šematski prikaz tipova nosača (a) nosači tipa matrice; (b) nosači tipa “rezervoara” (c) multi-membrana.

Postupak inkapsulacije probiotskih ćelija podrazumeva tri koraka: (1) Mešanje probiotskih ćelija sa materijalom za inkapsulaciju koji može biti u tečnom ili čvrstom stanju (2) Dispergovanje tečne matrice ili pulverzacija (3) Hemijska (polimerizacija), fizičko-hemijska (geliranje) i fizička stabilizacija dobijenog sistema (Poncelet i Dreffier, 2007).

U zavisnosti od primenjene tehnike za inkapsulaciju probiotika mogu se dobiti nosači različitih karakteristika i veličina. Na slici 3.2. je prikazan uticaj primenjenog postupka inkapsulacije ćelija na veličinu dobijenih nosača. Pri čemu se može uočiti da emulgovanjem je moguće dobiti nosače veličine 0,2-5000  $\mu\text{m}$  za razliku od ekstruzije kod koje se mogu dobiti i manje veličine  $\sim 300 \mu\text{m}$  (Burgain i sar., 2011).



Slika 3.2. Zavisnost veličine nosača od primenjenog postupka za inkapsulaciju probiotskih ćelija.

Na odabir tehnike inkapsulacije utiče više faktora ali se posebna pažnja posvećuje svojstvima aktivne komponente, materijalu kao i nameni inkapsulata. Inkapsulacije ima značajnu ulogu u zaštiti bakterijskih ćelija tokom proizvodnog procesa kao i skladištenja (Borgogna i sar., 2010; Nedović i sar., 2016). Rezultati istraživanja ukazuju na lošije preživljavanje slobodnih probiotskih bakterija u prehrambenim proizvodima (Krunić i sar., 2016; De Vos i sar., 2010). Vijabilnost probiotskih bakterija je od izuzetnog značaja, s obzirom na to da probiotici su izloženi različitim uslovima u toku proizvodnog procesa, skladištenja, kao i u gastro-intestinalnom traktu pri čemu je bitno da prežive u određenom broju kako bi ostvarili svoje pozitivno dejstvo na zdravlje domaćina. Zbog toga postoji veliko interesovanje za primenu različitih metoda inkapsulacije koje bi obezbedile odgovarajuću zaštitu probiotskih bakterija (Kailasapathy, 2009; Martín i sar., 2015).

Spoljašnji faktori koji mogu negativno da utiču na vijabilnost kulture su: sastav prehrambenog proizvoda, pH, prisustvo kiseonika kao i uslovi pri proizvodnji i skladištenju proizvoda. Unutrašnji faktori su: odabir kulture za dati proces, faza rasta ćelija, oštećenja ćelija usled toplote ili osmotskog stresa (Soukoulis i sar., 2014). Vijabilnost inkapsulisanih probiotika zavisi od fizičko-hemijskih osobina nosača (čestica). Kako bi se ostvario zadovoljavajući stepen inkapsulacije kao i zaštita kulture neophodno je odabrati adekvatan materijal za inkapsulaciju (Chen i sar., 2007). Inkapsulacijom bakterija se omogućava zaštita kulture i u gastro-intestinalnim uslovim (GI) zbog čega je potrebno uraditi i analizu broja ćelija i nakon simuliranih GI uslova (Manojlović i sar., 2010), pre njihove primene u prehrambenoj industriji.

U slučaju inkapsulacije probiotika u nosača tehnikama sprej-sušenja kao i sušenja smrzavanjem (liofilizacija) primećeno je da sa samanjeje sadržaja vlage u nosačima kao i prisustva kiseonika se dodatno pospešuju vijabilnost kultura. Međutim, zbog primene visokih i niskih temperatura u toku inkapsulacije pomenutim tehnikama vrlo često se dodaju prebiotici (npr. inulin, maltodekstrin, oligosaharidi fruktana, galaktooligosaharidi) kako bi se pospešila vijabilnost ćelija (Avila-Reyes i sar., 2014; Fritzen-Freire i sar., 2012; De Prisco i Mauriello, 2016).

### **3.2. Tehnike za inkapsulaciju probiotskih bakterija**

Postoji mnogo tehnika za inkapsulaciju probiotskih ćelija, pri čemu prilikom odabira adekvatne metode potrebno je uzeti u obzir (Martin i sar., 2015; Zuidam i Shimoni, 2010):

- Uslove proizvodnog procesa i skladištenja
- Veličinu i mehaničku stabilnost nosača koja je potrebna za dati prehrambeni proizvod
- Mehanizam otpuštanja ćelija
- Optimizaciju troškova izvođenja proizvodnog procesa

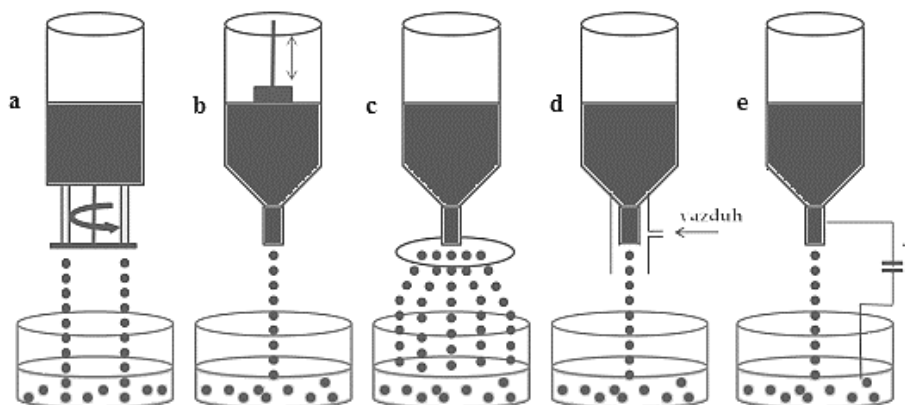
U skladu sa već navedenim, potrebno je imati u vidu da se u toku proizvodnje omogući adekvatna brzina mešanja, pH medijuma, temperatura, kontroliše prisustvo vlage i kiseonika kako bi se održala željena vijabilnost kulture. Pre samog skladištenja je neophodno ispitati optimalne uslove za čuvanje proizvoda. Nosači treba da obezbede potrebnu zaštitu ćelija ali je bitna i njihova veličina koja se može odraziti na teksturalna svojstva proizvoda.

Mehanizam otpuštanja ćelija zavisi od odabranog materijala za nosač, pri čemu je pokazano da promena pH kao i prisustvo enzima imaju veliki uticaj na mehanizam otpuštanja ćelija. Neophodno je uraditi i ekonomsku analizu isplativosti primenjenog postupka s obzirom da neke od tehnika zahtevaju posebnu opremu kao i materijale što značajno utiče na cenu koštanja proizvodnog procesa.

U nastavku će biti dat opis najznačajnijih postupka za inkapsulaciju probiotskih ćelija.

### 3.2.1. Ekstruzione tehnike

Tehnike ekstruzije se svrstavaju u najpopularnije metode za inkapsulaciju probiotskih ćelija zbog jednostavnosti postupka, niske cene koštanja kao i blagim uslovima koji omogućavaju visoku vijabilnost ćelija (Krasaekoopt, Bhandari, i Deeth, 2003). Uopšteno, tehnike ekstruzije se zasnivaju na ukapavanju hidrokolooidnog rastvora sa dodatkom ćelija u rastvor za geliranje (Heidebach, Först i Kulozik, 2012). Ukapavanje se može izvoditi na različite načine, jednostavno korišćenjem pipete, šprica, vibrirajućeg raspršivača, presecanjem mlaza, rotirajućeg diska, uz dejstvo koaksijalnog, tj. sekundarnog toka vazduha, ili uz primenu električnog potencijala (Slika 3.3) (Zuidam i Shimoni, 2010).



Slika 3.3. Šematski prikaz ekstruzijskih tehnika: a) tehnika presecanja mlaza; b) tehnika vibrirajućeg raspršivača; c) tehnika raspršivanja uz pomoć rotirajućeg diska; d) tehnika ukapavanja uz dejstvo koaksijalnog toka vazduha; e) tehnika elektrostatičke ekstruzije.

### 3.2.1.1. Elektrostatička ekstruzija

Tehnika elektrostatičke ekstruzije spada u novije tehnike. Prednost elektrostatičke ekstruzije nad ostalim ekstruzionim tehnikama jeste što se može koristiti za dobijanje mikročestica (nosača) manjih od 300  $\mu\text{m}$ , sa uskom raspodelom veličina, i sa potencijalom izvođenja eksperimentalne procedure u sterilnim uslovima (Bugarski i sar. 2004). Takođe, modifikacijom geometrije eksperimentalnog sistema, u smislu korišćenja sistema igala, moguće je uspostaviti kontinualnu proizvodnju uniformnih mikročestica, uz veći kapacitet proizvodnje. Ova metoda se zasniva na potiskivanju suspenzije kroz iglu uz primenu elektrostatičkog polja u rastvor za geliranje. Prednost ove tehnike se ogleda u optimalnim uslovima procesa (temperatura i pH), jednostvanoj aparaturi i visokoj vijabilnost kultura. Variranjem primenjenog napona može se uticati na veličinu nosača sa inkapsuliranom komponentom.

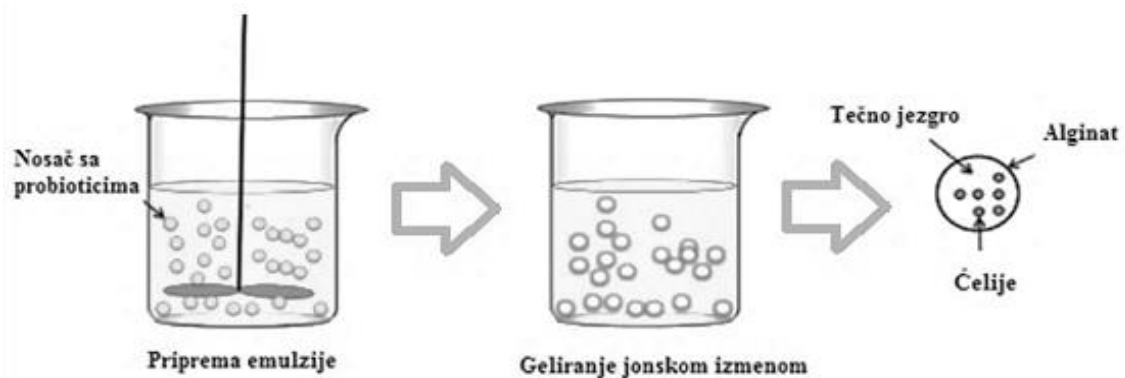
### 3.2.1.2. Vibraciona metoda

Vibracionom metodom se dobijaju nosači primenom vibracija različitih frekvencija. Od primenjene frekvencije kao i protoka rastvora zavisi veličina dobijenih nosača (slika 3.3.b). Pomenutom metodom moguće je dobiti nosače prečnika manjeg od 1mm. Ova tehnika se kombinuje uz primenu električnog polja kao što je to slučaj sa inkapsulatorom B-395 (BÜCHI Labortechnik, Flawil, Švajcarska). Navedeni inkapsulator je imao primenu u inkapsulaciji probiotskih kultura (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938) (Prisco i sar., 2014). Ovom tehnikom je moguće dobiti veće količine nosača sa inkapsuliranom kulturom.

### 3.2.2. Tehnike emulzifikacije

Emulzifikacija je tehnika kojom se može vršiti inkapsulacija bakterijskih ćelija u nosače tipa hidrokoloida (npr. alginat, karagenan, pektin, itd.). Tehnika se bazira na primeni adekvatnog odnosa kontinualne i diskontinualne faze. Kao uljana komponenta se najčešće koristi sojino, kukuruzno i suncokretovo ulje (Krasaekoopt i sra., 2003). U cilju uspešne inkapsulacije neophodna je primena emulgatora i površinski aktivnih supstanci (Chen i Chen, 2007; Kailasapathy, 2009; De Vos i sar., 2010). Na kraju procesa formiranja emulzije se dodaje sredstvo za geliranje i to najčešće kalcijum-hlorid (slika 3.4.).

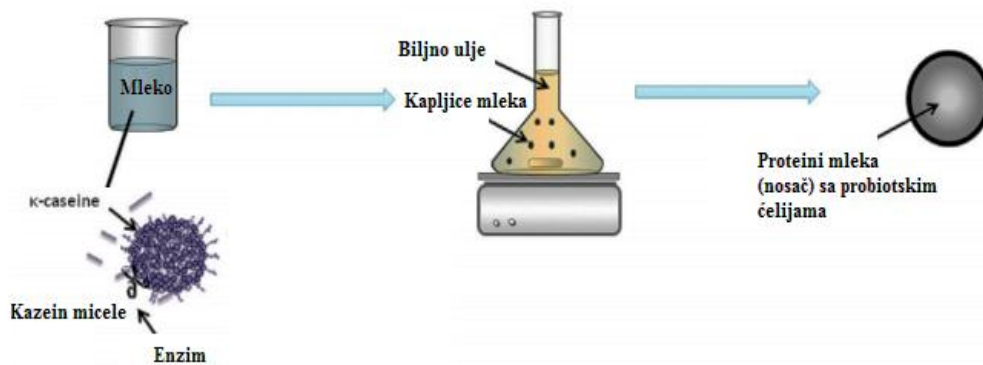
Smeša se potom homogenizuje dok se ne dobije emulzija tipa voda u ulju u kojoj se nalaze gel čestice sa inkapsuliranom kulturom. Ova tehnika se odlikuje visokim stepenom preživljavanja bakterijskih ćelija i moguće je primeniti i u industrijskim uslovima. Nedostatak ove tehnike se ogleda u neujednačenosti veličine i oblika nosača. U cilju formiranja nosača iste veličine potrebno je uskladiti mešanje i odnos uljane i vodene faze (Kailasapathy, 2009). Ovakav tip nosača se može dodatno obložiti u cilju poboljšanja njegovih organoleptičkih svojstava.



Slika 3.4. Šematski prikaz postupka emulzifikacije.

Inkapsulacija ćelijskih kultura je moguća i emulzifikacijom u prisustvu enzima. Ovom tehnikom se kao nosač za probiotske ćelije koriste mlečni proteini koji imaju sposobnost geliranja (Livney, 2010; Heidebach i sar., 2009 a, b). Uz prisustvo enzima se dodatno inicira proces geliranja i formiranja nosača sfernog oblika nerastvorljivih u vodi (slika 3.5.). Na početku procesa mlečni proteini su u kontaktu sa enzimima pri niskoj temperaturi kako bi sistem bio u tečnom obliku. Potom se rastvor dodaje u hladno ulje i formira emulzija tipa voda u ulju. Zagrevanjem emulzije dolazi do koagulacije enzima (denaturacije proteinskog dela enzima) usled čega se odvija flokulacija proteina i dolazi do mikroinkapsulacije ćelija.





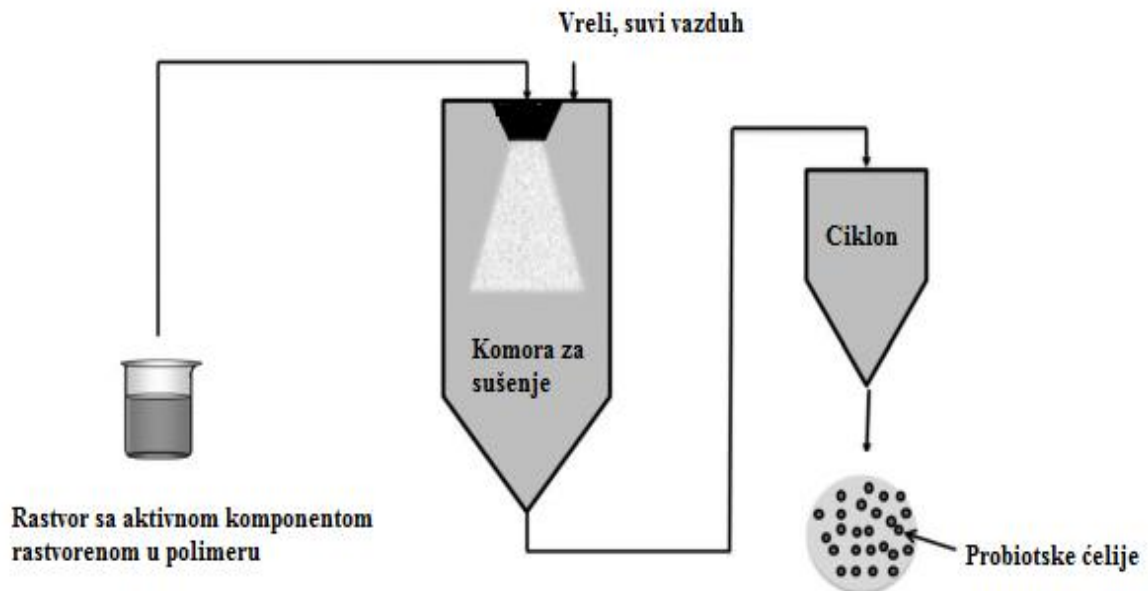
Slika 3.5. Šematski prikaz mikroinkapsulacije probiotskih ćelija u nosače dobijene geliranjem mlečnih proteina u prisustvu enzima.

Pored pomenutih tehnika emulzifikacije, inkapsulaciji probiotika je moguća primenom i emulzifikacije sa interfacijalnom polimerizacijom. Proces polimerizacije se odvija na međufaznoj površini dve tečnosti koje se ne rastvaraju jedna u drugoj. Ovom metodom se vodeni rastvor sa probiotskim ćelijama (diskontinualna faza) meša sa kontinulanom fazom koja je u ovom slučaju organski rastvarač. Polimerizacija se inicira dodatkom biokompatibilne supstance u kontinulanu fazu. Na ovaj način se dobijaju nosači gde su ćelije smeštene iza tanke membrane. Ovaj tip sistema ima primenu za različite tipove fermentacija u cilju povećanja produktivnosti procesa (Yanez-Fernandez i sar., 2008; Kailasapathy, 2002). Nedostatak ove metode se ogleda u primeni organskih rastvarača ali su skorija istraživanja pokazala da se mogu koristiti i monomeri koji nisu toksični i na taj način pospešiti ovaj postupak inkapsulacije za različite vrste ćelija.

### 3.2.3. Tehnika sprej-sušenja

Sprej-sušenje je tehnika za dobijanje nosača sa inkapsuliranim ćelijama raspršivanjem prethodno pripremljene suspenzije sa ćelijama u komori koja se zagreva, pri čemu dolazi do formiranja čvrstih nosača usled otparavanja rastvarača. Može se reći da je ovo jedna od najzastupljenijih metoda za inkapsulaciju ćelija i različitih aktivnih supstanci (aroma, antioksidanasa, vitamina, prehrambenih boja, masnih kiselina i esencijalnih ulja), u cilju obezbeđivanja zaštite ovih osetljivih jedinjenja, kao i produžavanja roka trajanja proizvoda u

toku skladištenja. Proces inkapsulacije aktivnih komponenti sprej-sušenjem ima niz prednosti: dostupnost opreme, niska cena procesa, raznovrsnost dostupnih materijala koji se mogu koristiti kao nosači za inkapsulaciju, stabilnost dobijenog proizvoda, kao i mogućnost kontinualne proizvodnje na industrijskom nivou (Burgain i sar., 2011).

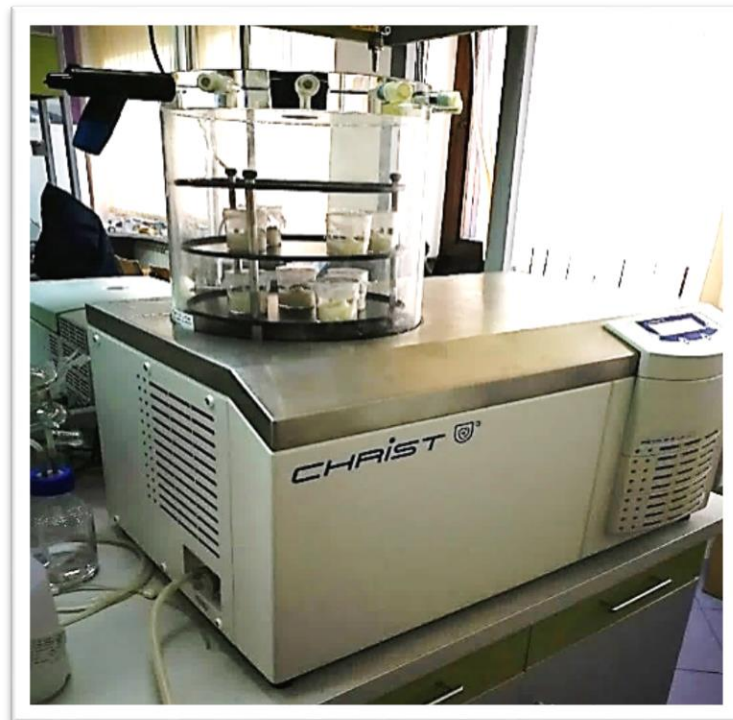


Slika 3.6. Šematski prikaz inkapsulacije probiotskih ćelija tehnikom sprej-sušenja.

Probiotske kulture se mogu inkapsulisati primenom različitih nosača kao što su obrano mleko (Radulović i sar., 2012), maltodekstrini ili neka od prirodnih guma (Manojlović i sar., 2010). Nedostatak ove metode je primena temperatura viših od 100 °C koje negativno utiču na preživljavanje bakterijskih ćelija zbog čega je neophodna optimizacija procesa kao i adekvatan odabir materijala za inkapsulaciju. Nosači na bazi skroba su pokazali dobre rezultate u pogledu zaštite ćelija kao i dodatak proteina i trehaloze (Chen and Chen, 2007; Kailasapathy, 2009; De Vos i sar., 2010). Takođe, u cilju efikasnije inkapsulacije i preživljavanja kulture radi se i oblaganje nosača (Semyonov i sar., 2010).

### 3.2.4. Liofilizacija

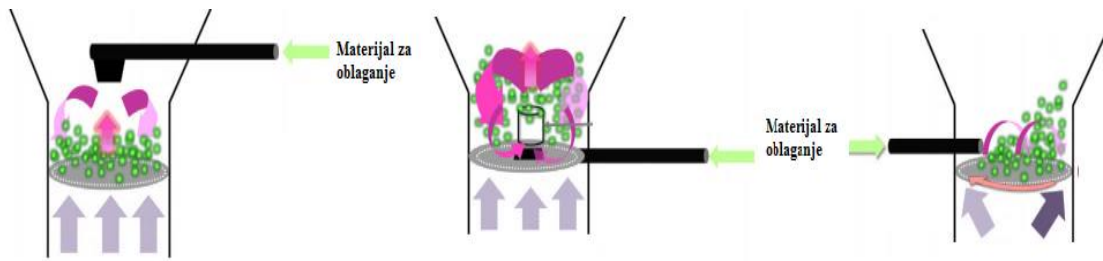
Uklanjanje rastvarača na niskim temperaturama (ispod tačke mržnjenja rastvarača) pod vakuumom se može koristiti za inkapsulaciju bioaktivnih komponenti i ćelija. Smeša nosača (koji je rastvoren u pogodnom rastvaraču najčešće voda) i aktivne kompone ili ćelija se prvo zamrzne a zatim se pod uticaja vakuuma i uslovima redukovane temperature vrši direktno otparavanje rastvarača sublimacijom (slika 3.7). Temperature koje se koriste za zamrzavanje materijala pre liofilizacije se kreću u opsegu od  $-90$  do  $-40^{\circ}\text{C}$  u zavisnosti od vrste kulture pri čemu zadržavanje u ovim uslovima je do 2h. Zbog činjenice da se proces odvija pod vakuumom i da zahteva primenu niskih temperatura kao i zbog dužine trajanja procesa, liofilizacija se smatra 30-50 puta skupljim procesom u poređenju sa postupkom sprej-sušenjem (Zuidam i Shimoni, 2010). S druge strane, neke osetljive komponente a posebno žive ćelije (npr. bakterije) zahtevaju posebnu pažnju pri inkapsulaciji. Takođe, u toku postupka inkapsulacije nije moguće dobiti kontrolisanu veličinu čestica.



Slika 3.7. Uređaj za liofilizaciju (Christ Beta 2-8 LD Freeze Dryer, Nemačka).

### 3.2.5. Oblaganje u fluidizovanom sloju

Oblaganje u fluidizovanom sloju je proces stvaranja zaštitnog omotača oko probiotske kulture koja se nalazi u fluidizovanom stanju, pri čemu se zaštitni materijal raspršuje po kulturi (Champagne i Fustier, 2007 a; De Vos i sar., 2010). Prednost ove tehnike je laka izvodljivost postupka u industrijskim uslovima. Materijal koji se nanosi na površinu nosača sa probioticima se može dispergovati sa dna ili sa vrha komore u kojoj se vrši oblaganje (Zuidam i Shimoni, 2010) ili se materijal nosača može uvoditi u komoru tangencijalno (Dewettinck i Huyghebaert, 1999; Lakkis, 2007) (Slika 3.8). Ovom tehnologijom inkapsulacije je moguće dobiti probiotske proizvode koji su otporni na gastrične uslove, različite temperature i mehaničke sile.



Slika 3.8. Različite konfiguracije sistema za oblaganje u fluidizovanom sloju: a) oblaganje sa vrha komore; b) oblaganje sa dna komore; c) tangencijalno oblaganje.

Tabela 3.1. Tehnike inkapsulacije probiotskih kultura: prednosti i nedostaci

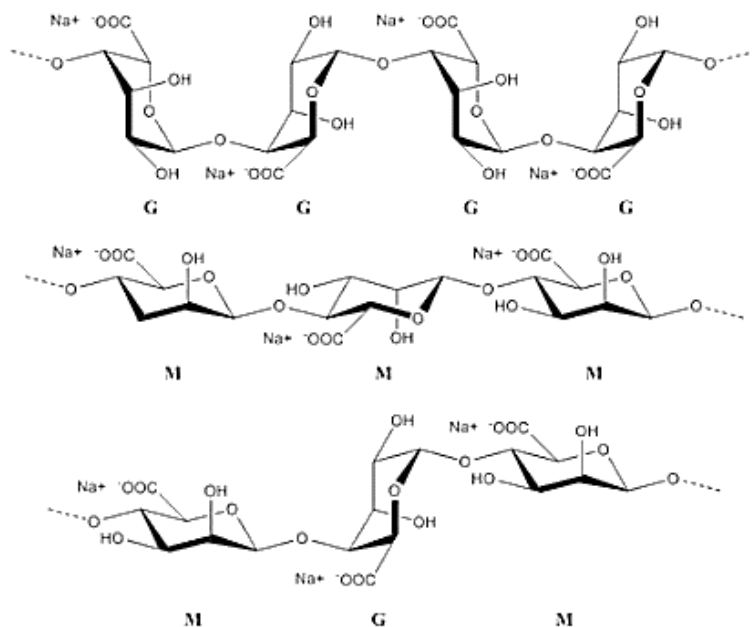
<i>Tehnika</i>	<i>Veličina čestica</i>	<i>Materijal</i>	<i>Dodatak postupku</i>	<i>Fizička i hemijska stabilnost</i>	<i>Tehnička ograničenja</i>	<i>Tip proizvoda</i>	<i>Referenca</i>
<i>Ekstruzija</i>	1,89 mm	Alginat	Hitozan (male molekulske mase)	Hitozan je unapredio stabilnost sistema	Veličina čestica i izvođenje postupka u industrijskim uslovima	Jogurt	Krasaekoopt i sar. (2006)
<i>Emulzifikacija</i>	0,5-1mm	Alginat + skrob	Rezistentan skrob+glicerol	Bakterije nisu bile zaštićene pri niskim vrednostima pH	Neuniformna veličina čestica. Osećaju se u ustima pri testiranju proizvoda	Jogurt	Sultana i sar. (2000), Kailasapathy (2006)
<i>Oblaganje u fluidizovanom sloju</i>	15-40 $\mu$ m	Proteini surutke	Palmino ulje+cellets®	Inkapsulacijom nije postignuta stabilnost tokom skladištenja proizvoda;	Vreme trajanja procesa	Dohrana za bebe	Weinbreck, Bodnár, i Marco (2010)
<i>Liofilizacija</i>	-	Saharoza, laktoza, celobioza, trehaloza	-	Laktoza i saharoza lošije štite kulturu od trehaloze i celobioze u GI uslovima	Oštećenja smrzavanjem i dužina trajanja procesa	Pasterizovano mleko sa niskim sadržajem masti: Sok od cvekles i grožđa	Basholli-Salihi i sar. (2014)
<i>Sprej-sušenje</i>	3-75 $\mu$ m 11,23 $\mu$ m	Proteini surutke Proteini surutke	Primena mlečne masti	Mlečna masti nisu unapredila vijabilnost kulture  Mikroinkapsulacija nije unapredila preživljavanje kulture u prisustvu žučnih soli	Oštećenja u prisustvu visokih temperatura	Jogurt  Mlečni dezert	Picot and Lacroix (2004)  Picinin De Castro-Cislaghi, Dos Reis E Silva, Fritzen-Freire, Goulart Lorenz, i Sant'Anna (2012)

### 3.3. Materijali za inkapsulaciju probiotičkih kultura

Postoji veliki broj materijala koji se mogu koristiti za inkapsulaciju biološki aktivnih supstanci i ćelija. Međutim, samo mali broj njih je dozvoljeno koristiti u prehrambenoj industriji, a to su materijali koji su od strane odgovarajućih stručnih tela kao što je Američka uprava za hranu i lekove proglašeni za sigurne i kao takve primenjive, tj. “GRAS” materijale.

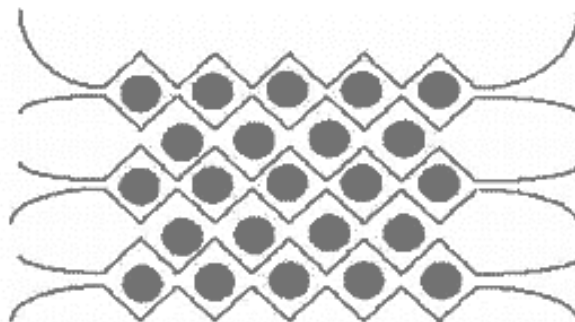
#### 3.3.1. Alginat

Najzastupljeniji alginat u prirodi je polisaharid iz smeđih morskih algi. Vrste smeđih algi iz kojih se izdvajaju komercijalni alginati su *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* i *Ascophyllum nodosum*. Alginati su linearni polisaharidi rastvorni u vodi i sastoje se od ostataka  $\beta$ -D-manuronske (M) i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G), koji su međusobno povezani 1,4'-glikozidnim vezama. U strukturi polimera postoje blokovi alternirajućih kopolimera i homopolimera (Slika 3.9) (Trifković, 2016; Manojlović i sar. 2006; Pasparakis i Bouropoulos 2006).



Slika 3.9. Izgled strukture natrijum alginata (G – guluronska kiselina; M – manuronska kiselina) (Trifković, 2016).

Umrežavanje se odvija razmenom jona natrijuma sa dvovalentnim katjonima i obrazovanjem specifičnih struktura između guluronskih grupa, tzv. kutija za jaja („egg-box“) (slika 3.10). Pomenuta struktura je dobijena tako što se dva ili više poliuronatnih lanaca međusobno vezuju i stvaraju šupljine za smeštanje dvovalentnih katjona (Pravilović, 2016).



Slika 3.10. Izgled struktura između guluronskih grupa (crni krugovi predstavljaju Ca<sup>2+</sup> jone između susednih ostataka guluronske kiseline).

Alginatni nosači se dobijaju u rasponu veličina od 100  $\mu\text{m}$  do 3 mm. U zavisnosti od načina formiranja čestica i od tehnike inkapsulacije koja se primenjuje. Poznavanje difuzionih karakteristika nosača je od posebnog značaja za unapređenje i efikasnost postupka inkapsulacije kao i na brzinu prenosa molekula iz spoljašnje sredine kroz matricu gela. Pore alginatnih nosača imaju dimenzije od nekoliko nanometara pa do 200 nm (Smidsrod i Skjaek-Braek, 1990). Njihova veličina zavisi od koncentracije alginata, hemijske strukture gela i kinetike formiranja gela (Willaert i sar. 1996). Zapaženo je da su najveća brzina difuzije proteina u alginatnim nosačima sa visokim procentom G segmenata (Willaert i sar. 2008).

Mehanička stabilnost čestica gela zavisi od sastava alginata. Najbolju mehaničku stabilnost su pokazale alginatne čestice kod kojih je sadržaj  $\alpha$ -L-guluronske kiseline viši od 70% i nosači kod kojih je srednja dužina GG segmenata oko 15 jedinica povezanih monomera. Takođe, pokazano je da i koncentracija alginata ima uticaj na mehanička svojstva nosača kao i da pri višim vrednostima brzine kompresije materijala se dobijaju veće vrednosti za maksimalnu silu i modul elastičnosti (Tomović i sar., 2015). Alginatni nosači sa inkapsuliranom kulturom se dobijaju ukapavanjem suspenzije alginata i probiotske kulture u rastvora za geliranje gde usled izmene jona dolazi do formiranja trodimenzionalne hidrogel strukture.

Prednosti ovog materijala se ogledaju pre svega u biokompatilnosti, ne-toksičnim i biodegradabilnim svojstvima pri oralnoj primeni kao i u ceni koštanja sirovine. Na veličinu i sferičnost čestica utiču viskoznost pripremljenog rastvora kao i rastojanje od igle do rastvora za geliranje. Takođe je pokazano da procenat zastupljenosti strukturnih jedinica ima uticaj na finalnu veličinu nosača (Krasaekoopt i sra., 2003). Nedostaci u primeni alginatnih nosača su proznost materijala kao i osetljivost ovakvih sistema pri promeni vrednosti pH rastvora (Gouin, 2004). Teorijski, hidrogelovi na bazi alginata se skupljaju pri niskim vrednostima pH (tj. u želucu), pri čemu ne dolazi do otpuštanja inkapsulirane aktivne komponente (Chen i sar. 2004). U uslovima u želucu, hidratisani natrijum-alginat se prevodi u poroznu, nerastvornu alginsku kiselinu. Nakon prolaska kroz intestinalni deo GI trakta, sa višim vrednostima pH, alginska kiselina se prevodi u rastvorno jedinjenje. Problem koji je neophodno pri tome prevazići jeste brzo raspadanje alginata pri većim pH vrednostima, što može dovesti do brzog otpuštanja inkapsulirane kulture.

Efikasnost alginatnih nosača se može unaprediti kombinovanjem sa drugim materijalima kao i oblaganjem hitozanom (Sultana i sar., 2000; Obradović i sar., 2015). Pripremom blendi alginata sa rezistenim skrobom, dobijeni su zadovoljavajući rezultati u pogledu vijabilnosti probiotskih kultura kao i preživljavanja u GI uslovima. Pomenuti tip skroba je otporan na dejstvo amilaze i na taj način je inkapsulirana kultura zaštićena i omogućeno je ciljano otpuštanje u tankom crevu (Anal i Singh, 2007).



Slika 3.11. Izgled alginatnih čestica sa probiotskom starter kulturom.



### 3.3.2. Proteini surutke

Veliku primenu kao materijali za pripremu nosača imaju proteini surutke zahvaljujući njihovim izuzetnim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima (Gunasekaran, Ko, i Xiao, 2007). Proteini imaju sposobnost interakcije sa drugim molekulima što pruža čitav niz mogućnosti unapređenja ovog tipa nosača.

Ukupno naelektrisanja proteina surutke je na minimumu pri njihovoj izoelektričnoj tački pri kojoj se smanjuje elektrostatičko odbijanje proteinskih lanaca i dolazi do agregacije i prisutne ćelije bivaju zarobljene (inkapsulirane) u nosač. Ovaj postupka geliranja proteina se zove "hladno geliranje" i odvija se u dve faze. U prvoj fazi se pripremljeni rastvor blago zagreva i zatim se u drugoj fazi vrši dodavanje soli (Navarra i sar., 2009; Wu, Arosio, Podolskaya, Wei, i Morbidelli, 2012) ili snižava pH (Rabiey i Britten, 2009; Sadeghi, Madadlou i Yarmand, 2014). Uzimajući u obzir da su ovakvi sistemi osetljivi na promene pH, pruža se mogućnost pripreme nosača za ciljano otpuštanje bakterijskih kultura. Ovaj tip materijala podleže enzimskoj hidrolizi usled čega se dobijaju bioaktivni peptidi. Doherty i sar. (2011) su pokazali da nosači sa ovim proteinima mogu da pruže zaštitu probiotskih ćelija u trajanju od 3h u simuliranim u gastro-intestinalnim uslovima.

U proteinima surutke je najzastupljeniji globularni protein  $\beta$ -laktoglobulin, koji u prirodnom obliku ima zatvorenu konformaciju koja omogućava i zaštitu ovog tipa proteina od enzima i samim tim bolju zaštitu sistema u GI uslovima (Lorieau i sar., 2018). Gerez i sar. (2012) su pokazali da proteini surutke u kombinaciji sa pektinom mogu poslužiti kao nosači za probiotsku kulturu. Takođe, autori su istakli da se proces geliranja odvijao pri vrednosti pH 4 što je manje od vrednosti pH koja odgovara izoelektričnoj tački (pI) proteina surutke (pH 5,2-5,4). Tako su protonisane  $-\text{NH}_3^+$  grupe iz proteina surutke formirale elektrostatske interakcije sa karboksilnim grupama pektina. Ovaj tip interakcije je povećao gustinu umrežavanja što je rezultiralo boljom zaštitom kulture *L. rhamnosus* u simuliranoj želudačnoj tečnosti.

### 3.3.3. Pektin

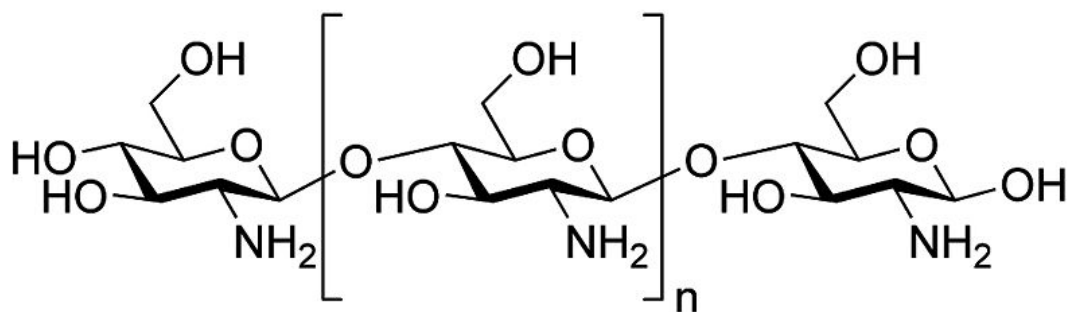
Pektin je heteropolisaharid koji se uglavnom ekstrahuje iz voća i ima primenu kao gelirajuće sredstvo i izvor vlakana u prehrambenoj industriji. Gebare i sar. (2013) su pripremali nosače na bazi pektina obložene proteinima surutke u cilju inkapsulacije *Lactobacillus acidophilus* pri čemu su rezultati pokazali da je inkapsulacijom postignut bolji rezultatu pogledu preživljavanja kulture u poređenju sa slobodnom kulturom.

### 3.3.4. Mleko i mlečni proteini

Čisto mleko je takođe korišćeno kao materijal za inkapsulaciju probiotskih kultura. Shi, Li, Li i sar., (2013) i Shi, Li, Zhang i sar., (2013) su napravili nosače na bazi mleka za inkapsulaciju *Lactobacillus bulgaricus*. U toku pripreme su kombinovali mleko sa karagenanom i semenom rogača. Nedostatak ovakvog tipa nosača se ogleda u neuniformnosti dobijenih nosača kao i izuzetno lošim mehaničkim svojstvima materijala za inkapsulaciju.

### 3.3.5. Hitozan

Hitozan je linearni kopolimer polisaharidne prirode, koji se sastoji od  $\beta$  [1→4] povezanih ostataka 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoze (D-glukozamina) i 2-acetamido-2-deoksi-D-glukopiranoze (N-acetil-D-glukozamina) i jedan od najzastupljenijih polimer u prirodi (Roberts, 1992) (slika 3.12). Hitozan se komercijalno proizvodi deacetilovanjem hitina, koji je strukturni element egzoskeletona ljuskara. Hitozan ima veliku primenu u procesima inkapsulacije biološki aktivnih jedinjenja zbog karakteristika kao što su biokompatibilnost, biodegradabilnost, zatim mukoadhezivnost i netoksičnost (Trifković i sar., 2012, 2014).



Slika 3.12. Hemijska struktura hitozana ( $\beta$  [1 $\rightarrow$ 4] glikozidna veza između ostataka 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoze (D-glukozamina) i 2-acetamido-2-deoksi-D-glukopiranoze (N-acetil-D-glukozamina) (Trifković, 2016).

Hitozan se može svrstati u grupu pH osetljivih nosača zbog velikog broja amino grupa u njegovom polimernom lancu. Naime, mehanizam pH-zavisnog bubrenja hitozana je posledica protonovanja amino grupa pri niskim pH vrednostima zbog čega dolazi do elektrostatickog odbijanja polimernih lanaca, difuzije protona i jona zajedno sa molekulima vode u unutrašnjost gela na bazi hitozana, kao i do disocijacije sekundarnih veza u polimernom lancu (Yao i sar. 1994; Trifković, 2016). Zbog svoje osetljivosti na promenu pH okolnog medijuma, ovaj materijal je atraktivan za kontrolisano otpuštanje aktivnih komponenti pri čemu da bi se omogućilo ciljano otpuštanje u tankom crevu neophodno je izvršiti modifikaciju ovakvog tipa materijala.

U slučaju primene za inkapsulaciju probiotskih kultura, primećena je inhibitorna aktivnost ovog tipa materijala na primeru nekih bakterija mlečne kiseline zbog čega se ovaj prirodni polimer uglavno koristi kao materijal za oblaganje nosača. Alginat u kombinaciji sa hitozanom se pokazao kao adekvatan sistem za zaštitu bakterija u GI uslovima (Chávarri i sar., 2010; Krnić i sar., 2016). Takođe, alginat/hitozan sistem nosača je primenjen u pripremi napitaka na bazi surutke i pokazao je dobre rezultate u pogledu zaštite probiotske kulture ABY 6 tokom procesa fermentacije i skladištenja proizvoda u vremenskom intervalu od 28 dana (Obradović i sar., 2015).

### 3.4. Primena starter kultura u fermentisanim proizvodima i značaj postupka inkapsulacije

Fermentisane namirnice obogaćuju ljudsku ishranu pružajući neophodnu količinu nutrijenta u sveobuhvatnoj mešavini ukusa, arome i teksture proizvoda. Tradicionalnim postupkom fermentacija unapređuje se ukupni sadržaj ili dostupnost aminokiselina, vitamina, mineralnih materija koje imaju značajan uticaj na zdravlje potrošača (Steinkraus, 2002). Većina fermentisanih proizvoda su dobijena fermentacijom pomoću funkcionalnih i nefunkcionalnih mikroorganizmima koji menjaju sastav polaznih sirovina, čime se poboljšava ukus, aroma kao i nutritivna i farmakološka vrednost u nekim fermentisanim namirnicama koje su tradicionalno i društveno prihvatljive od strane potrošača. Većina ovih tradicionalnih procesa pripreme navedenih tipova proizvoda prenosi se generacijama i ima tendenciju da budu specifična za različite zemlje i kulture (Tamang i sar., 2015). BMK su široka grupa bakterija koje pripadaju rodovima *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Veissella* (Holzapfel & Vood, 2014; Tamang i sar., 2015) (Tabela 3.2). U tradicionalnim proizvodima, fermentacija se uglavnom postiže primenom BMK iz raspoloživih resursa koje pospešuju proces fermentacije u odsustvu dodate industrijske starter kulture. Selektivnim dodavanjem starter kulture kontroliše se proces fermentacije i smanjuje rizik od neuspešne fermentacije uz unapređenje kvaliteta krajnjeg proizvoda.

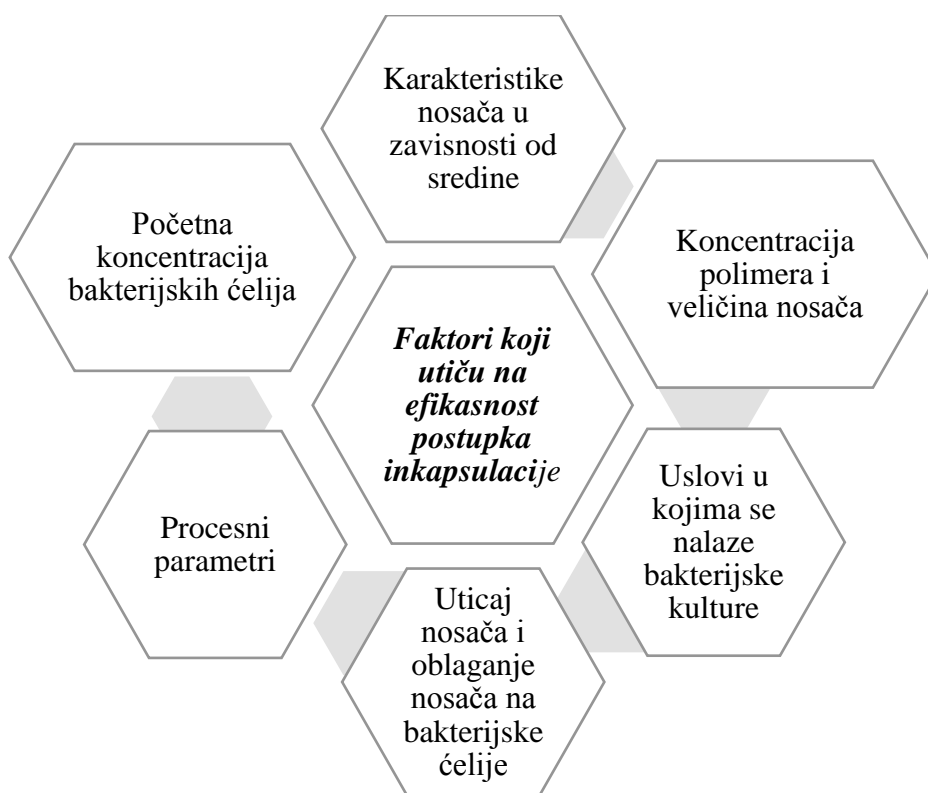
Literaturno je pokazano da BMK imaju antioksidativnu aktivnost (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) (Mishra i sar., 2015), kao i antimikrobna svojstva za bakterije iz roda *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Veissella* (Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2010). Dokazano je i da BMK iz roda *Lactococcus sp.* i *Lactobacillus sp.* učestvuju u proizvodnji peptida (Brown i sar., 2016), mlečne kiseline (*Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus bulgaricus*) (Ghaffaret i sar., 2014) a probiotski efekat ostvaruju: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *B. longum* and *B. breve* etc. (Quinto i sar., 2014). Navedena svojstva BMK imaju značajnu ulogu u odabiru starter kulture u proizvodnji funkcionalne hrane.

Tabela 3.2. BMK kao starter kultura u fermentisanim proizvodima

Tip proizvoda	Polazna sirovina	Starter kultura	Reference
Fermentisano mleko	Mleko	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. bulgarius</i> , <i>L. casei</i>	Sodini i sar., 2002
Jogurt	Ovčije mleko	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> <i>Bifidobacterium spp.</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i>	Ong i sar., 2006, Michaylova i sar., 2007
Kefir	Mleko, zrna kefira	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb.</i> <i>brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroids</i> , <i>Acetobacter acet</i>	Assadi i sar., 2000
Čedar sir	Mleko	<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	Blanan i sar., 2014
Kiselo testo	Pšenično brašno	<i>L. brevis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i> .	Paramithiotis i sar., 2005
Fermentisani napitak	Skrob i Sirak	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus cellobiosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Mugula i sar., 2003
Sok od ananasa	Voćni sok	<i>Bifidobacterium lactis Bb12.</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> 299V, <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus La5</i>	Nguyen i sar., 2019

Inkapsulacija ima veliku primenu u prehrambenoj industriji kao efikasna barijera za bioaktivne komponente i kulture koje su pokazale osetljivost na prisustvo kiseonika, svetlosti kao i slobodnih radikala (Desai i Park, 2005). Na osnovu veličine dobijenih nosača, može se izvršiti podela inkapsulacije na dva tipa, tj. makroinkapsulaciju (milimetri do centimetara) i mikroinkapsulacija (1–1000  $\mu\text{m}$ ) (Heidebach, Forst, i Kulozik, 2012).

U slučaju makroinkapsulacije, bakterijske ćelije će normalno rasti na površini nosača ali zbog iscrpljenosti hranljivih materija to neće biti slučaj za ćelije koje se nalaze u središnjem delu nosača kako zbog lošije difuzije ali i nakupljanja ćelijskih proizvoda metabolizma. Postoji nekoliko faktora koji utiču na efikasnost postupka inkapsulacije koji su dati na slici 3.13. U cilju unapređenja efiksanosti postupka inkapsulacije potrebno je odabrati adekvatnu metodu, nosač i prema potrebi materijal za oblaganje.



Slika 3.13. Šematski prikaz faktora koji utiču na efikasnost postupka inkapsulacije bakterijskih kultura.

Efikasnost postupka inkapsulacije se može proceniti i na osnovu vijabilnosti inkapsuliranih ćelija u različitim sredinama, broja otpuštenih ćelija iz nosača. Pravi izbor nosača u odnosu na medijum u koji će se dodavati je od velikog značaja. Na primer, otpuštanje kalcijumovih jona iz nosača dovodi do razgradnje nosača i samim tim potrebno je izbegavati interakciju ovakvog tipa strukture sa okruženjem niske vrednosti pH i koje sadrži gelirajuće agense. Međutim, u medijumima na bazi mleka zbog dostupnosti visokog nivoa kalcijumovih jona, ispiranje kalcijumovih jona iz struktura gela može biti znatno inhibirana i pri tome gel nosači održavaju svoj oblik i strukturu (Truelstrup-Hansen i sar., 2002).

Upotrebom skroba kao materijala za nosače pokazano je da su ovi nosači otporni na enzimsku digestiju (Dimantov i sar., 2003). Pri čemu je poželjno da probiotske ćelije ostanu zaštićene pri niskim vrednostima pH medijuma i budu otpuštene u debelom crevu. Međutim, to nije uvek lako ostvarivo zbog ograničenja u hemijskim karakteristikama materijala za inkapsulaciju (Sun i Griffiths, 2000; Mortazavian i sar., 2006 c). Takođe, za određene tipove proizvoda je poželjno koristiti materijala sa hidrofobnim karakteristikama za inkapsulaciju kako bi se dobili nosači koji su otporni i na vlagu (Truelstrup-Hansen i sar., 2002).

Koncentracija polimernih rastvora i veličina nosača takođe imaju značajnu ulogu na efikasnost postupka inkapsulacije probiotskih ćelija. Primećeno je da sa povećanjem veličine nosača se povećava i zaštitni efekat pomenutog postupka (Lee i Heo, 2000; Chandramouli i sar., 2004). Sultana i sar., (2000) su zapazili da nosači u opsegu veličine od 0,5 -1,0 mm u prečniku imaju pozitivan uticaj na vijabilnost inkapsuliranih bifidobakterija u jogurtu tokom skladištenja proizvoda u frižideru, ali ne i u simuliranim uslovima u želucu. Međutim, veličina mora biti limitirana zbog senzornih svojstava proizvoda i uticaja na digestiju nosača što može biti slučaj sa nosačima koji su pripremani sa dodatkom skroba. Chandramouli i sar., 2004 su razmatrali i uticaj koncentracije alginatnog rastvora u opsegu 0,75-1,8 mas. % na vijabilnost *L. acidophilus* u simuliranim gastričnim uslovima; pri čemu su isključeni nosači dobijeni od alginata koncentracije > 2,0 mas. % jer nije bilo moguće napraviti sferne i homogene nosače zbog viskoznosti dobijene suspenzije. Takođe, u nekim slučajevima nosači pripremani sa većim koncentracijama alginat i kukuruznog skroba (sadržaj amiloze 2-4 mas. %) su pokazali da navedene koncentracije nemaju značajni uticaj na zaštitna svojstva u odnosu na analizirane uslove (Sultana i sar., 2000).

Uslovi u kojima se nalaze kulture imaju najveći uticaj na efikasnost inkapsulacije ćelija. Literaturno je pokazano da nosači mogu podneti niske vrednosti pH koje odgovaraju medijumu poput jogurta međutim u simulirani gastričnim uslovima, alginatni nosači ne mogu da pruže adekvatnu zaštitu kulture (Sultana i sar., 2000; Truelstrup-Hansen i sar., 2002). Cui i sar., 2000, su pokazali da alginatni nosači koji imaju srednju vrednost prečnik od 100  $\mu\text{m}$  su efikasani za za pripremu fermentisanih proizvoda, ali ne i za simulirane gastrične uslove. Dati rezultati ukazuju da nije dovoljno samo prilagoditi veličinu nosača za potrebe senzornih svojstava proizvoda ako se ne može ostvariti željeni broj vijabilnih ćelija u GI uslovima.

Hemijska modifikacija materijala za potrebe inkapsulacije je uobičajena praksa za unapređenje efikasnosti inkapsulacije kulture. Strukturna modifikacija se može izvršiti najčešće dodavanjem aditiva. Dodavanje glicerola kao krioprotektanta može se poboljšati zaštita ćelija u kriogenim uslovima (Kearney i sar., 1990). Istraživanja su pokazala da dodatkom glicerola kao aditiva je moguće dostići vijabilnost soja *Bifidobacterium* i *L. acidophilus* do 88,5 % (Kebari i sar., 1998) i 90 % (Sheu i Marshall, 1993). Krioprotektanti su supstance koje imaju nižu tačku mržnjenja i vezuju slobodne molekule vode i onemogućavaju stvaranje kristala leda koji bi na ovako niskim temperaturama oštetili ćeliju.

Nosači pripremani sa glicerolom su imali 43,0 % manje zapremine nakon postupka sušenja smrzavanjem. SDS i Tween 80 su takođe korišćeni kao aditivi koje unapređuju otpornost ćelija u uslovima procesa liofilizacije. Primećeno je da sa porastom koncentracije ova dva aditiva se smanjuje veličina dobijenih nosača i smanjuje rastvorljivost materijala u puferskim rastvorima i štite ćelije od prisustva mlečne kiseline (Krasaekoopt i sar., 2003).

Prilikom postupka inkapsulacije, neophodno je dozirati i početnu koncentraciju ćelija u polimernom rastvoru. Sa povećanjem koncentracije ćelija se povećava efikasnost procesa ali pri većim koncentracijama ćelija može doći i do omekšavanja nosača što se može odraziti i na senzorna svojstva proizvoda (Mortazavian i sar., 2007). Na stepen efikasnost inkapsulacije može uticati i redosled sjedinjavanja komponenti, mešanje, prisustvo mehaničkih sila koje mogu oštetiti nosače kao i uslovi tokom skladištenja i čuvanja proizvoda.



Kim i sar., (2016) su postupkom inkapsulacije, primenom tehnike ekstruzije unapredili preživljavanje kulture (*Lactobacillus acidophilus*) u procesnim uslovima, GI uslovima kao i u periodu čuvanja proizvoda. Postupkom emulzifikacije su takođe postignuti željeni rezultati inkapsulacijom živih ćelija pri čemu se veličina nosača reguliše promenom koncentracije rastvora polimera kao i brzinom mešanja u postupku pripreme emulzije. Dobijeni nosači sa kulturom *Bifidobacterium BB-12* su pokazali zadovoljavajuću zaštitu ćelija u GI uslovima kao i u periodu od 120 dana čuvanja u frižideru (Holkem i sar., 2017).

Sprej-sušenje je tehnika koja ima veliku primenu u industriji uzimajući u obzir brzinu rada, cenu koštanja i visoku reproduktivnost. Upotreba visokih temperatura je glavni nedostatak u sušenju raspršivanjem zbog negativnog uticaja na vijabilnost ćelija (Rai i sar., 2016). Za primenu u prehrambenim proizvodima, obično se koriste probiotske kulture dobijene metodama sprej-sušenja ili liofilizacijom (Holzapfel i Wood, 2014). Literaturno je pokazana efikasna inkapsulacija primenom tehnike sprej-sušenjem na primerima: *Bifidobacterium ruminantium* (O'Riordan i sar., 2001) i *L. rhamnosus* (Corcoran i sar., 2004). Međutim, temperature iznad 100°C kao i osmotski uslovi tokom procesa inkapsulacije oštećuju ćelijske membrane.

Behboudi-Jobbehdar, Soukoulis, Ionekura i Fisk (2013) su upoređivali vijabilnost kulture *L. acidophilus* nakon inkapsulacije postupkom sprej-sušenja pri čemu su kao materijali za inkapsulaciju koristili natrijum alginat, hitozan i hidroksipropil metilcelulozu (HPMC). Rezultati su pokazali da natrijum alginat i HPMC nisu značajno uticali na unapređenje vijabilnost ćelija.

Primenom hitozana se povećava vijabilnost kulture tokom skladištenja u vremenskom periodu od 35 dana. Takođe, primećeno da se dodatkom proteina surutke se pospešuje vijabilnost kulture *Bifidobacterium lactis Bb-12* u simuliranim GI uslovima kao i stabilnost tokom skladištenja u periodu od 12 nedelja (de Castro-Cislaghi i sar., 2012). Dodavanje termoprotektanta kao što je trehaloza pre sprej-sušenja zajedno sa skrobom i rastvorljivim vlaknima unapređuje se vijabilnost kulture tokom skladištenja (Vivek, 2013). Pokazani su i pozitivni rezultati primenom proteina surutke kao krioptotektanta pri inkapsulaciji kulture *Lactobacillus paracasei* u postupku liofilizacije kao i tokom skladištenja uzoraka (Heidebach, Först i Kulozik, 2012).

## EKSPERIMENTALNI DEO

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Materijali

U eksperimentalnom delu rada korišćena je liofilizovana probiotska starter kultura ABY 6 (sastava: *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* 80,0 % *Lactobacillus acidophilus* 13,0 % *Bifidobacterium bifidum* 6,0 % , *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* 1,0 % ).

Prirodni polimeri korišćeni za inkapsulaciju su natrijum-alginat srednje viskoznosti (Medium viscosity alginic acid sodium salt from brown algae, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i za oblaganje hitozan molekulske mase 100000-300000 Da (Acros Organic, SAD). Kalcijum-hlorid di-hidrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Acros organics, SAD) korišćen je kao izvor jona  $\text{Ca}^{2+}$  u rastvoru za geliranje. Kao dodatak nosačima u postupku inkapsulaciju korišćen su prirodna surutka (Imlek, Beograd, Srbija), surutka u prahu (LENIC Laboratories, Beograd, Srbija; Macrobiotic Prom, Beograd, Srbija) kao i koncentrat proteini surutke (DMV International, Holandija). Za podešavanje pH vrednosti rastvora hitozana korišćena je glacijalna sirćetna kiselina (Zorka, Srbija). Kalijum-di hidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) i kalijum-hidrogenfosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) su korišćeni od proizvođača Kemika, Zagreb, Hrvatska. Kalijum-hlorid (KCl) i hlorovodonična kiselina (HCl) su proizvodi kompanije Fluka (Nemačka) i korišćeni su za pripremu rastvora različite pH vrednosti za simulaciju uslova gastro-intestinalnog trakta. Pepsin i žučne soli su korišćeni od proizvođača Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA a pankretain od kompanije Fluka (Nemačka). Hemijski sastav 100 ml surutke: suva materija 9,8 mas. %; belančevine 2,6 mas. %; masti 1,1% i laktoza 5,6 mas. %, 0,4 mas. % kalcijuma. Hemijski sastav 100 ml mleka (sa 0,5 % m.m. iz mlekare AD Imlek (Beograd, Srbija)): suva materija 9,7 mas. %; belančevine 2,9 mas. %; masti 0,5 mas. %, kalcijum 0,12 mas. % i laktoza 5,6 mas. %. Za određivanje broja ćelija korišćeni su De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) bujon, Torlak, Beograd, Srbija, bakteriološki agar (Torlak, Beograd, Srbija) kao i M17 bujon (Torlak, Beograd, Srbija), natrijum-hidrogen-karbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) Centrohem, Beograd, Srbija, magnezijum-hlorid ( $\text{MgCl}_2$ ), Acros Organics, New Jersey, SAD, natrijum-hlorid (NaCl), Centrohem, Beograd, Srbija.

## **4.2. Metode**

### **4.2.1. Priprema suspenzije sa probiotskom starter kulturom (ABY 6)**

Liofilizovana kultura koja nije prethodno aktivirana je dodata u suspenziju u koncentraciji 1,0 mas. %. Koncentracija alginata u dobijenim suspenzijama je 1,6 mas. %. Suspenzije su pripremane sa prirodnom surutkom i surutkom u prahu u koncentraciji 8,0 mas. % što odgovara sastavu korišćene prirodne surutke.

Za potrebe poređenja fermentacije sa slobodnom i inkapsuliranom kulturom, pre fermentacije sa slobodnom kulturom, 1,0 mas % kultura je aktivirana u mleku nakon čega je vršena inkubacija u vodenom kupatilu u trajanju od 40 min na temperaturi 42 °C. Ovako aktivirana kultura korišćena je za inokulaciju uzoraka.

### **4.2.2. Priprema nosača za inkapsulaciju probiotske starter kulture**

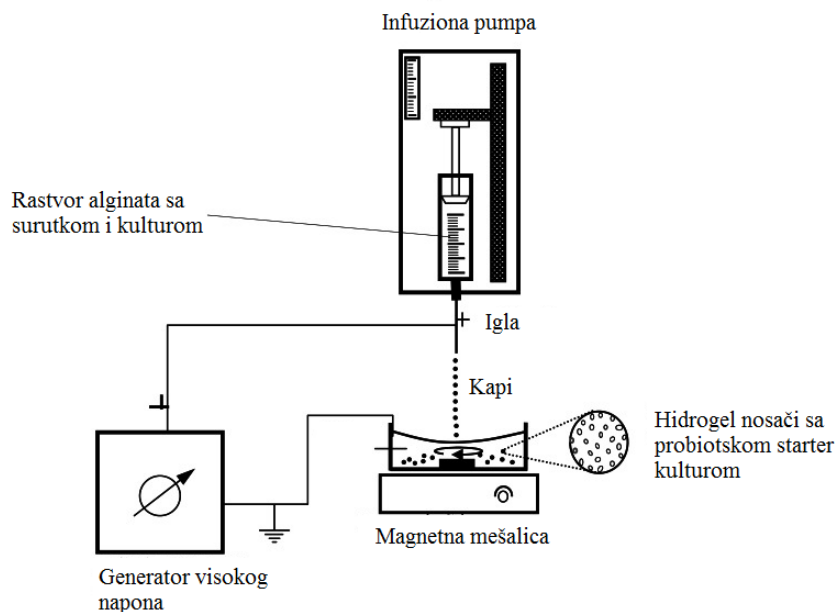
Rastvor alginata je dobijen rastvaranjem 4,0 g natrijum alginata u 150 mL destilovane. Dobijeni rastvor se potom pasterizuje u vodenom kupatilu na 70 °C u periodu od 30 min.

Rastvor hitozana je pripreman prema postupku opisanom u literaturi (Zhou i sar. (1998)). Odmeri se 0,4 g hitozana niske molekulske mase i potom se rastvori u destilovanoj vodi i doda 0,4 mL glacijalne sirćetna kiseline kako bi se postigla konačna koncentracija hitozana od 4,0 g/l. Rastvor je autoklaviran na 120 °C u trajanju od 30 minuta. Surutka u prahu (8,0 mas %) je neposredno pre korišćenja pasterizovana u vremenskom intervalu od 60 min na temperaturi od 60 °C. Nakon procesa pasterizacije surutka je hlađena do odgovarajuće temperature potrebne za procesa fermentacije. Prirodna surutka je čuvana na temperaturi  $-18,0 \pm 1,0$  °C do primene.

Koncentrat proteina surutke je rastvoren u destilovanoj vodi i potom pasterizovan u vodenom kupatilu na 70 °C u periodu od 30 minuta. Rastvor je zatim ohlađen na sobnu temperaturu i korišćen za inkapsulaciju.

### 4.2.3. Inkapsulacija probiotske starter kulture elektrostatičkom ekstruzijom

Pripremljen rastvor natrijum-alginata srednje viskoznosti se meša sa rastvorom surutke i probiotske starter kulture. Dobro homogenizovana smeša se uzima špricem od 10 mL i potom potiskuje protokom 39.3 mL/h kroz metalnu iglu tupog vrha i prečnika 22 G. Špric se postavlja u infuzionu pumpu (Razel, Scientific Instruments, Stamford, SAD), a igla šprica se povezuje sa generatorom visokog napona (Model 30R, Bertan Associates, Inc., Njujork, SAD) preko pozitivne elektrode. Nakon povezivanja uzemljenja sa rastvorom za geliranje, primenjuje se visoki napon 5,5 kV, u cilju stvaranja razlike potencijala između vrha igle i rastvora za geliranje (rastojanje između vrha igle i rastvora za geliranje je bilo 3 cm). Na ovaj način dobijeni nosači imaju veličinu ~ 800  $\mu\text{m}$ . Takođe su pripremani nosači bez primene visokog napona i u tom slučaju dobijeni nosači imaju veličinu u opsegu 2-3 mm u zavisnosti od prečnika primenjene igle.



Slika 4.1. Šematski prikaz inkapsulacije probiotske starter kulture u hidrogel nosače primenom postupka elektrostatičke ekstruzije.

Kao rastvor za geliranje korišćen je 2,0 mas. % kalcijum-hlorid. Nosači ostaju u rastvoru za geliranje u vremenskom periodu od 30 min i nakon toga se ispiraju destilovanom vodom i čuvaju do dalje primene.

Nosači koji se oblažu hitozanom se potapaju u pripremljeni rastvor hitozana (0,4-0,6 mas. %) prema postupku opisanom u odeljku 4.2.2. u vremenskom periodu od 40 min.

#### *Inkapsulacija probiotske starter kulture u alginatne nosače sa dodatkom surutke*

Inkapsulacija probiotske starter kulture u alginatne nosače sa dodatkom surutke je vršena pomoću ekstruzione tehnike. Pripremljeni rastvor natrijum alginata zapremine 150 ml se pomeša sa 8 mas. % rastvora surutke sa dodatkom 1,0 mas.% starter kulture. Na ovaj način pripremljena suspenzija se potiskuje kroz špric prečnika 22 G u 2,0 mas. % rastvor kalcijum-hlorida.

#### *Inkapsulacija probiotske starter kulture u alginatne nosače sa dodatkom surutke i koncentrata proteina surutke*

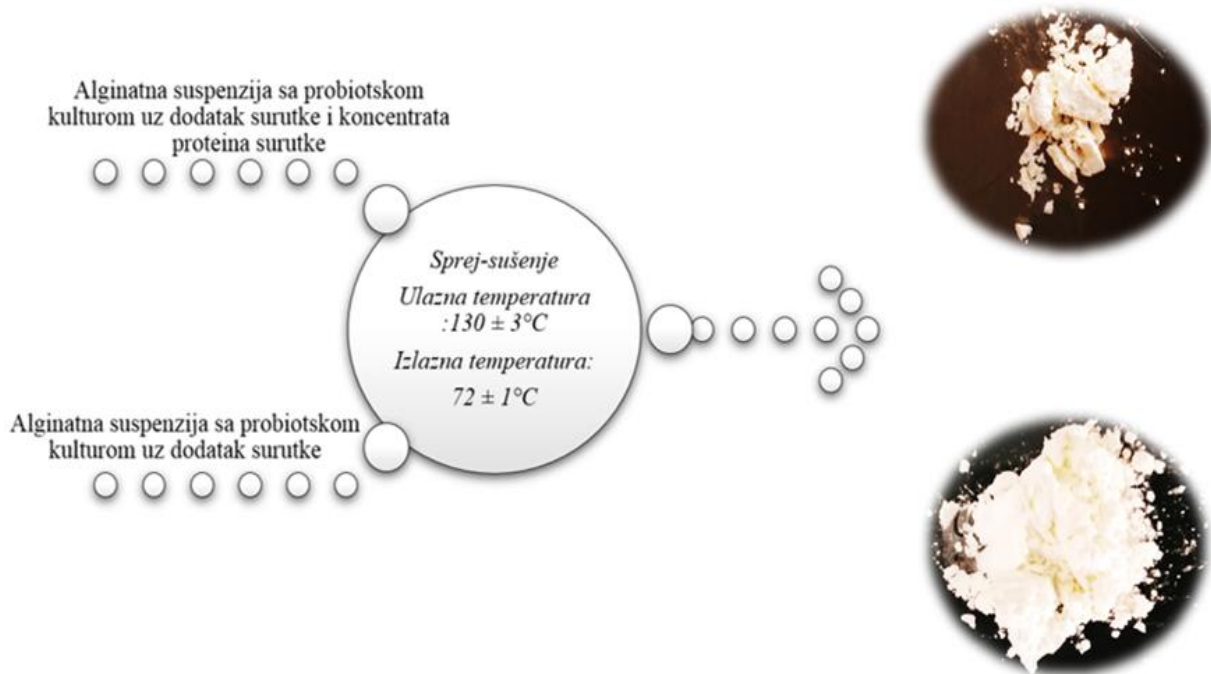
Za razliku od inkapsulacije opisane u prethodnom odeljku (4.2.3), suspenzija sa probiotskom kulturom se priprema sa dodatkom koncentrata surutke u različitim polaznim koncentracijama. Probiotska starter kultura se dodaje u pripremljeni rastvor proteina (50 ml) potom se pomeša sa rastvorom surutke (50 ml) i nakon toga sjedini sa 150 ml rastvora alginat do finalne koncentracije polimera (1,6 mas. %). Pripremljena suspenzija se potom potiskuje kroz nerđajuću iglu prečnika 22 G i 18 G u zavisnosti od željene veličine uzoraka.

#### **4.2.4. Inkapsulacija probiotske starter kulture tehnikom sprej-sušenja**

Za inkapsulaciju probiotske starter kulture primenom tehnike sprej-sušenja korišćeni su rastvori pripremani prema uputstvima datim u poglavljima 4.2.1 i 4.2.2.

Inkapsulacija probiotske starter kulture je izvedena postupkom sprej-sušenje korišćenjem Büchi sprej-sušača (Büchi mini B-290, Büchi Labortechnik AG, Švajcarska), sa mlaznicom prečnika 0,7 mm. Ulazna i izlazna temperatura pri postupku sušenja su iznosile  $130 \pm 3^{\circ}\text{C}$  i  $72 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , datim redosledom. Pripremljeni rastvor se do mlaznice doprema korišćenjem peristaltičke pumpe, i dobijene kapi, zajedno sa vrućim vazduhom se prenose u komoru gde dolazi do isparavanja rastvarača iz kapljica i njegovog izvođenja iz sistema. Osušene čestice se prikupljaju u predviđenom prihvatnom sudu.

Na slici 4.2 je šematski prikazan postupak dobijanja mikronosača sa inkapsuliranom kulturom procesom sprej-sušenja. Prisustvom proteina kao i jona kalcijuma omogućeno je umrežvanje mikročestica alginata pomenutog sastava.



Slika 4.2. Postupak dobijanja mikronosača tehnikom sprej-sušenja.

#### 4.2.5. Inkapsulacija probiotske kulture tehnikom sušenja smrzavanjem

Inkapsulacija probiotske starter kulture primenom liofilizacije je izvedena pomoću uređaja za sušenje smrzavanjem (Christ Beta 2-8 LD Freeze Dryer, Nemačka). Pripremljen rastvor natrijum-alginata srednje viskoznosti se meša sa rastvorom surutke i kulture i za drugi tip uzoraka sa koncentratom proteina surutke i kulturom u navedenim odnosima u Odeljaku 4.2.3.

Dobijene suspenzije se pre procesa liofilizacije zamrzavaju na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$ . Zamrznuti uzorci se postavljaju na police za sušenje i na uređaju definišu vrednost pritiska u komori za vreme perioda primarnog sušenja od 0,011 mbar i temperatura od  $-60^{\circ}\text{C}$ . Za vreme sekundarnog sušenja pritisak je 0,0012 mbar i temperatura  $-75^{\circ}\text{C}$ . Dobijeni uzorci su do upotrebe i dalje karakterizacije čuvani u eksikatoru u prisustvu silika gela.

### **4.3. Primena i karakterizacija nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom**

#### **4.3.1. Optička mikroskopija i sferičnost nosača**

Uvid u sferičnost i dimenzije nosača dobijen je pomoću optičkog mikroskopa (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemačka). U toku analize uzoraka, nosači su potapani u destilovanu vodi kako ne bi došlo do njihovog sušenja i skupljanja. Makroskopska struktura hidrogelova ispitivana je korišćenjem i optičkog mikroskopa Motic BA210 Series, koji poseduje softver Motic Images Plus 2.0 ML za analizu dobijenih slika. Takođe, sferičnost uzoraka je analizirana i pomoću bezdimenzionih parametara opisanih u literaturi (Chan i sar., 2009).



Slika 4.3. Optički mikroskop Motic BA210 Series.

#### 4.3.2. Veličina i raspodela veličine nosača

Veličina dobijenih mikronosača, kao i njihova raspodela veličina, određena je korišćenjem uređaja čiji se rad zasniva na difrakciji laserskih zraka, Zetasizer Nano Series, Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Veličina uzoraka je određena primenom NIBS tehnologije (eng. (Non-Invasive Back Scatter)).

Za hidrogel nosače veće od 1 mm korišćen je optički mikroskop Motic BA210 Series u kombinaciji sa softverom (Motic Images Plus 2.0 ML) kao i nonijus (Electronic LCD Digital Vernier Caliper Gauge Micrometer, Germany).

Sferičnost dobijenih nosača je određivana prema jednačini koja je data u literaturi (Chan, 2011):

$$\text{Faktor sferičnosti} = \frac{D_{\max} - D_{\text{per}}}{D_{\max}}$$

Gde vrednost za  $D_{\max}$  predstavlja najveći prečnik hidrogel nosača, dok  $D_{\text{per}}$  predstavlja prečnik koji je upravan u odnosu na označeni prečnik  $D_{\max}$ .

Analizirani su suvi i vlažni uzorci nosača sa kulturom i bez, na osnovu kojih je računat i koeficijent skupljanja ( $k_{\text{SF}}$ ) dobijenih nosača prema izrazu:

$$\text{Faktor skupljanja} = \frac{D_h - D_o}{D_h}$$

gde je  $D_h$  predstavlja srednji prečnik nosača nakon inkapsulacije, a  $D_o$  srednji prečnik nosača nakon sušenja.



#### **4.3.3. Bubrenje prirodnih hidrogel sistema sa i bez inkapsulirane kulture**

Bubrenje hidrogelova je analizirano volumetrijski pomoću optičkog mikroskopa Motic BA210 Series i softvera za analizu dobijenih slika (Motic Images Plus 2.0 ML). Uzorci su analizirani pre i posle postupka fermentacije kao i u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima u vremenskom periodu od 4h. Na osnovu dobijenih vrednosti prečniku uzoraka je određena i promena u zapremini nosača za pomenute eksperimentalne uslove.

#### **4.3.4. Rastvorljivost inkapsulata dobijenih sprej-sušenjem i liofilizacijom**

Rastvorljivost inkapsulata dobijenih sprej-sušenjem je određena prema metodi opisanoj u literaturi (Eastman i Moore, 1984), sa izvesnim modifikacijama. U 100 mL destilovane vode je rastvoren 1g dobijenog praha pomoću magnetne mešalice brzinom 200 obr/min u intervalu od 10 min. Rastvor se ubacuje u odgovarajuće falkone i centrifugira brzinom 3000g u periodu od 5 min. Nakon centrifugiranja izdvojeni supernatant se prebaci u prethodno izmerenu Petri šolju i stavi u sušnicu (Memmert UF55, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Germany) na 105 °C u intervalu od 5 h. Rastvorljivost prahova se izražava u (%) na osnovu dobijene razlike u masi pre i posle postupka sušenja.

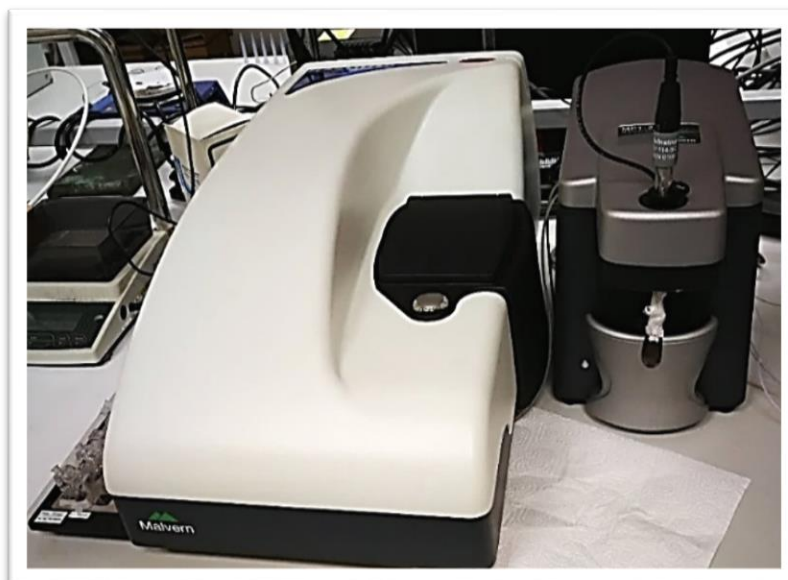
#### **4.3.5. Površinska morfologija nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom - skenirajuća elektronska mikroskopija**

Površinska morfologija nosača ispitivana je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (eng. Scanning Electron Microscopy, SEM) (Tescan Mira3 XMU, Cranberry Township, SAD). Uzorci hidrogelova su analizirani pre i posle fermentacije, pre i nakon postupka inkapsulacije kao i suvom obliku za uzorke dobijene sprej-sušenjem i liofilizacijom. Neposredno pred SEM analizu, uzorci su napareni legurom zlata i platine u uslovima vakuuma, korišćenjem uređaja Polaron SC502. Takođe za potrebe analize poroznosti strukture nosača kao i raspodele kulture u hidrogel strukturi, uzorci su pripremani primenom sistema gel u gelu kako bi se dobio adekvatan presek nosača za SEM analizu na 20 keV. Ovakav postupak pripreme nosača je opisan u radu autora Stojkowska i sar., 2014.

#### **4.3.6. Naelektrisanje na površini mikronosača i liofilizovane starter kulture**

Površinsko naelektrisanje mikročestica, tj.  $\zeta$ -potencijal je meren po principu foton-korelacione spektroskopije, za šta je korišćen uređaj Zetasizer Nano Series, Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Uzorci su pre analize razblaženi ultračistom vodom dobijenom dejonizacijom i sonicirani korišćenjem ultrazvučnog kupatila u trajanju od 5 min.

Merenja su vršena na sobnoj temperaturi, pri čemu je svaki uzorak meren tri puta, a srednje vrednosti su prikazane kao rezultat. Naelektrisanje na površini nosača je rađeno za uzorke dobijene sprej-sušenjem i liofilizacijom. Dobijeni rezultati su korišćeni u cilju analize hemijske stabilnosti hidrogel sistema.



Slika 4.4. Zetasizer Nano Series, Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.).

#### 4.3.7. Liofilizacija

Liofilizacija uzoraka (nosača) je rađena sa ciljem pripreme uzorka za FTIR analizu. Pre početka postupka liofilizacije uzorci se zamrzavaju na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$  i potom postavljaju na police za sušenje i nakon toga definišu parametri za primarno i sekundarno sušenje. Pritisak u komori za vreme primarnog sušenja je 0,011 mbar i temperatura  $-60^{\circ}\text{C}$ . Za vreme sekundarnog sušenja pritisak je 0,0012 mbar i temperatura  $-75^{\circ}\text{C}$ . Liofilizacija je vršena pomoću laboratorijskog liofilizatora (Christ, model Beta 2-8 LDplus, Nemačka). Uzorci su do upotrebe čuvani u eksikatoru u prisustvu silika gela.

#### 4.3.8. Efikasnost inkapsulacije i određivanje broja živih ćelija

Za kvantitativno određivanje broja živih ćelija u nosačima prethodno je bilo neophodno dobijene nosače (1,0 g) rastvoriti u 9,0 ml sterilnog rastvora natrijum citrata (2,0 mas. %) uz blago mešanje na temperaturi ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) u vremenskom periodu od 10 min. Zatim je 1,0 ml ovako rastvorenih čestica prenošen u 9,0 ml sterilnog rastvora NaCl (0,85 mas. %). Nakon toga je po 1,0 ml prethodnog razblaženja dodat u novih 9,0 mL sterilnog rastvora NaCl pomenute koncentracije da bi se dobila serija od ukupno 8 razblaženja pri čemu je svako sledeće deset puta veće od prethodnog. U zavisnosti od pretpostavljene koncentracije bakterija u nosaču, pripremljenoj suspenziji kao i fermentacionog medijuma birana su tri razblaženja iz kojih je po 1,0 ml prenošen u Petri šolje.

Uzorci u Petri šoljama su zatim prelivani odgovarajućim hranljivim agarom. Nakon formiranja prvog sloja agara, u Petri šolje se nanosi još jedan sloj agara, radi obezbeđivanja mikroaerofilnih uslova za rast bakterija ukoliko je to neophodno, u zavisnosti od ispitivane bakterije. Nakon obeležavanja, Petri šolje su inkubirne u termostatu na optimalnoj temperaturi rasta mikroorganizama ( $37^{\circ}\text{C}$ ) u trajanju od 48 h. Broj izraslih kolonija je određivan Kohovom metodom. U slučaju pojave kolonija na više Petri šolja, broj ćelija je računat kao srednja vrednost dobijenih rezultata (Vrboški i Markov, 1993).

Efikasnost inkapsulacije (EE) je računata prema sledećem izrazu datom u radu autora Sandoval-Castilla i sar., 2010:

$$EE = \frac{A}{B} \times 100$$

gde je  $A$  ukupan broj bakterija u nosačima (CFU/g) izračunata u odnosu na masu nosača dobijenih od 100 ml polazne suspenzije sa kulturom;  $B$  je ukupan broj bakterija u suspenziji pre postupka inkapsulacije. Dobijene vrednosti za broj ćelija su preračunate u odnosu na logaritamsku vrednost dobijenog broja ćelija.

#### 4.3.9. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (eng. Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) je korišćena u cilju utvrđivanja eventualnih promena i hemijskih veza između nosača i fermentacionog medijuma. Takođe je analiziran i uticaj dodatka surutke, proteina surutke i kulture na hemijsku stabilnost hidrogel strukture kao i međusobne interakcije sastavnih komponenti nosača.

Za FTIR analize korišćeni su liofilizovani uzorci nosača. Uzorci se sprae sa 100 mg kalijum bromida u tarioniku i nakon toga prah komprimuje u formi tablete za dalju analizu na uređaju Bomem MB 100 FTIR spektrofotometra. FTIR spektri su dobijeni u opsegu talasnih brojeva između 4000 i 400  $\text{cm}^{-1}$  i pri rezoluciji od 4  $\text{cm}^{-1}$ , na temperaturi od 25 °C. Za analizu je korišćen i uređaj Nicolet iS10 spektrometar pri čemu su analizirani uzorci bili u praškastoj formi i mase ~2 mg.

#### 4.3.10. Određivanje mehaničkih karakteristika nosača

Mehaničke karakteristike hidrogel nosača (u opsegu srednjeg prečnik 1,0-3,0 mm) su određene metodom kompresije, primenom uređaja AG-Xplus Universal Testing Machine (Shimadzu, Japan), opremljenog sa mernom ćelijom od 100 N. Eksperiment je izveden tako što su nosači potapani u Petri-šolji sa destilovanom vodom, a brzina kompresije je unapred definisana i iznosi 1-50 mm/min. Ispitivani su nosači sa i bez inkapsulirane kulture kao i hitozanom obloženi i neobloženi sistemi.

Za analizu prikupljenih eksperimentalnih podataka i definisanja polaznih parametara korišćen je softver (Trapezium X 1.13, Shimadzu, Japan). U cilju neutralisanja uticaj vodene sredine na dobijene vrednosti sile i napona, kao i obezbeđivanja potpuno istih uslova merenja za sve testirane nosače u softverskom paketu je definisana i vrednost sile pred-testa koja je za ove tipove uzoraka iznosila 0,1 N. U trenutku kada se tokom testiranja dostigne sila vrednosti od 0,1 N počinje kompresija uzorak za zadatu vrednost deformacije (30 %). Kompresioni disk je cilindar od nerđajućeg čelika, velike kontaktne površine (prečnik 50 mm). Sva merenja su rađena na 30 uzoraka na sobnoj temperaturi. Ispitivani su uzorci pre i posle procesa fermentacije kao i u toku perioda skladištenja dobijenih napitaka.



Slika 4.5. Oprema za ispitivanje mehaničkih svojstava hidrogel sistema, AG-Xplus Universal Testing Machine (Shimadzu, Japan).

#### 4.3.11. Reološka svojstva nosača

Reološka ispitivanja ponašanja hidrogel nosača izvedena su pomoću Haake MARS reometra (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany). Prilikom merenja korišćene su paralelne ploče (PP35S, 35 mm prečnika, zazora od 1 mm). Odgovor materijala je zabeležen u opsegu 1–10 Hz pri naponu od 10 Pa (što odgovara viskoelastičnom ponašanju materijala).

#### 4.3.12. Primena matematičkih modela za modelovanje reološkog ponašanje nosača u gastro-intestinalnim uslovima

Reološko ponašanje nosača sa i bez kulture tokom gastro-intestinalnih uslova je opisano primenom modifikovane jednačine Kelvin-Vojtovog modela (Đorđević i sar., 2003):

$$\sigma(t, \tau) = \eta(\tau) D^{\alpha(\tau)} \varepsilon(t, \tau) \quad (1)$$

Gde je  $\tau$  duži vremenski interval praćenja ponašanja nosača u gastro-intestinalnim uslovima  $\tau \in [0, 240 \text{ min}]$ ,  $t$  je vreme izvođenja eksperimenta i može se predstaviti  $t = \frac{2\pi}{\omega}$ ,  $\sigma(t, \tau)$ ,  $\sigma$  je napon,  $\varepsilon(t, \tau)$  je deformacija materijala,  $\eta(\tau)$  je efektivni modul,  $D^{\alpha(\tau)} \varepsilon(t, \tau) = \frac{d^{\alpha} \varepsilon(t, \tau)}{dt^{\alpha}}$  su frakcioni izvodi, i  $\alpha(\tau)$  je koeficijent prigušenja.

Jednačin (1) je transformisana iz vremenskog domena u frekventni primenom Furijerove integralne transformacije, pri čemu je dobijen sledeći izraz:

$$F[\sigma(t, \tau)] = G^*(\omega, \tau) F[\varepsilon(t, \tau)] \quad (2)$$

Gde  $F[\cdot]$  predstavlja Furijevu transformaciju,  $\omega$  je ugaona brzina i  $G^*(\omega, \tau)$  je kompleksna promenljiva modula i može se predstaviti jednačinom:

$$G^*(\omega, \tau) = G'(\omega, \tau) + i G''(\omega, \tau) \quad (3)$$

Gde je  $G'(\omega, \tau)$  modul čuvanja (elastičnosti) koji predstavlja merilo zadržane energije tokom merenja koja se posle može osloboditi,  $G''(\omega, \tau)$  modul gubitaka (viskoznosti) koji je merilo rasute ili izgubljene energije i  $i = \sqrt{-1}$  je imaginarna jedinica.

Dinamički moduli su predstavljeni jednačinama:

$$G'(\omega, \tau) = \eta(\tau) (\omega)^{\alpha(\tau)} \cos\left(\frac{\pi\alpha}{2}\right) \quad (4)$$

$$G''(\omega, \tau) = \eta(\tau) (\omega)^{\alpha(\tau)} \sin\left(\frac{\pi\alpha}{2}\right) \quad (5)$$

### *Postavljeni parametri modela*

Efektivni modul  $\eta(\tau)$  i koeficijent prigušenja  $\alpha(\tau)$  su definisani poređenjem eksperimentalnih rezultata  $G'(\omega, \tau)$  u zavisnosti od  $\omega$  i  $G''(\omega, \tau)$  u zavisnosti od  $\omega$  za različite vremenske intervale  $\tau$  u gastro-intestinalnim uslovima.

## **4.3.13. Određivanje broja živih ćelija**

### **4.3.13.1. Određivanje broja živih ćelija nakon fermentacije slobodnom kulturom**

Broj živih ćelija je određen pripremom serije razblaženja fermentacionog medijuma pod sterilnim uslovima pomoću sterilnog 0,85 % (m/v) rastvora NaCl. U zavisnosti od pretpostavljene koncentracije bakterija u fermentacionom medijumu birana su tri odgovarajuća razblaženja iz kojih je po 1,0 mL prenošen u Petri šolje. Uzorci u Petri šoljama su zatim prelivani odgovarajućim hranljivim agarom i nakon formiranja prvog sloja agara, u Petri šolje se nanosi još jedan sloj agara kako bi se obezbedili mikroaerofilnih uslova za rast bakterija u zavisnosti od ispitivane bakterije. Nakon obeležavanja, Petri šolje sa uzorcima su inkubirane u termostatu na optimalnoj temperaturi rasta mikroorganizama (37 °C) u trajanju od 48 h. Broj izraslih kolonija je određivan Kohovom metodom. Ukupan broj živih ćelija u 1 mL fermentacionog medijuma računat je množenjem ukupnog broja kolonija izraslih na Petri šolji sa odgovarajućim razblaženjem (Vrbaški i Markov, 1993).

### **Priprema MRS i M17 bujona**

Odmerena količina M17 bujona je rastvorena u destilovanoj vodi (1 L) nakon čega je držan u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20 min. Podloga je potom sterilisana u autoklavu na 120 °C i p=1,5 bar, 30,0 min.

MRS bujon je pripremljen prema istom postupku kao i M17 bujon i sterilisan pri istim uslovima.

### **Priprema MRS i M17 agara**

Prema uputstvima proizvođača, MRS bujon (51,0 g/L) i agar (18,0 g/L) su rastvoreni u destilovanoj vodi i držani u vodenom kupatilu u trajanju od 20 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120 °C i p=1,5 bar, 30 min. M17 bujon (42,0 g/L) i agar (18,0 g/L) su rastvoreni u destilovanoj vodi i sterilisani prema principu već datom za MRS bujon i agar. Dobijena podloga je sterilisana u autoklavu na 120 °C u periodu od 30 min.

#### **4.3.13.2. Određivanje broja živih ćelija nakon fermentacije inkapsuliranom kulturom**

Nakon postupka inkapsulacije probiotske starter kulture, dobijeni nosači su ispirani fiziološkim rastvorom. Broj živih ćelija je računat u odnosu na 1,0 g dobijenih hidrogel nosača koji se na početku postupka rastvara u 9,0 mL sterilnog 2,0 mas. % rastvora natrijum citrata. Zatim je 1,0 mL ovako rastvorenih nosača je prenošen u 9,0 mL sterilnog 0,85 mas. % rastvora NaCl. Nakon toga vršeno je prenošenje po 1,0 ml prethodnog razblaženja u novih 9,0 mL sterilnog rastvora NaCl. Postupak je dalje identičan onom opisanom u odeljku 4.3.13.1.

#### **4.3.14. Implementacija nosača u napitke na bazi surutke**

Dobijeni nosači su korišćeni za implementaciju probiotske starter kulture u napitke na bazi surutke u cilju unapređenja kvaliteta ovog tipa proizvoda. Ovim postupkom implementacije se dobija proizvod sa dodatom vrednošću pri čemu se može nazvati fermentisani funkcionalni napitak na bazi surutke.

Pomenuti inkapsulati dobijeni ekstruzionom tehnikom, sprej-sušenjem i liofilizacijom su dodati u fermentacioni medijum sastava 70 % surutke i 30 % kravljeg mleka sa niskim sadržajem masti (0,5 mas. %). Odabrani sastava za fermentacioni medijum se pokazao kao najbolji sa aspekta senzornih svojstava koja su opisana u radu Rakin i sar., 2016.



#### **4.3.14.1. Priprema probiotske starter kulture za fermentaciju slobodnom i inkapsuliranom kulturom**

Komercijalna ABY 6 kultura je pre primene aktivirana pripremom 1,0 mas. % rastvora kulture u mleku (0,5 % mlečne masti), nakon čega je vršena inkubacija u vodenom kupatilu u trajanju od 40 min na temperaturi od 42 °C. Ovako aktivirana kultura korišćena je za inokulaciju uzoraka. Uzorci sa inkapsuliranom kulturom se pre primene u procesu fermentacije ne aktiviraju. Liofilizovana kultura je dodata u pasterizovanu prirodnu surutku kao i u surutku od praha u koncentraciji 1,0 mas. % .

#### **4.3.14.2. Fermentacija slobodnom i inkapsuliranom kulturom**

U pripremljenu količinu mešavine surutke i mleka je dodata odgovarajuća količina inokuluma koja je iznosila 6,0 mas. % inkapsulirane kulture odnosno 6,0 mas. % aktivirane slobodne kulture, i na taj način je dobijen kontrolni uzorak. Uzorci su zatim inkubirani u vodenom kupatilu na 42 °C sve do postizanja pH  $\approx$  4,6 i nakon čega je fermentacija zaustavljena naglim hlađenjem uzoraka. Promena pH vrednosti je praćena sterilnim uzorkovanjem (3 mL) medijuma na svakih 1 h vremena.

#### **4.3.14.3. Otpuštanje probiotske starter kulture iz nosača u fermentacioni medijum**

Otpuštanje kulture određivano je kao odnos broja slobodnih bakterija u fermentacionom medijumu nakon fermentacije i ukupnog broja živih ćelija. Izraz prema kome je urađen proračun je dat u nastavku:

$$\text{Br. otpuštenih ćelija} = \frac{\text{br. živih slobodnih ćelija (CFU/ml)}}{\text{br. živih inkapsuliranih (CFU/g) + br. živih slobodnih (CFU/ml)}}$$

#### **4.3.14.4. Određivanje promene u vrednosti pH fermentacionog medijuma**

Vrednost pH uzoraka određivana je pomoću pH metra (Inolab, WTW 82362, Wellheim, Nemačka). Merenje je izvedeno u sterilnim uslovima koji su obezbeđeni sterilnim uzorkovanjem fermentacionog medijuma.

#### 4.3.14.5. Vijabilnost probiotske kulture u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima

Otpuštanje probiotske starter kulture iz hidrogel sistema praćeno je u simuliranim gastro-intestinalnim (GI) uslovima, tj. u uslovima simulirane želudačne tečnosti (eng. Simulated Gastric Fluid, SGF) i u uslovima simuliranog intestinalnog fluida (eng. Simulated Intestinal Fluid, SIF), na 37 °C.

*In vitro* simulacija gastro-intestinalnih uslova je urađena prema metodi opisanoj u literaturi Minekus i sar., 2014. U tabeli 4.1 su date komponente rastvora korišćene u pripremi simulirane želudačne i intestinalne tečnosti prema recepturi datoj u pomenutom radu. Otpuštanje je praćeno u vremenskom intervalu od 4 h prema sledećoj šemi: a) prva 2h u SGF-u, a zatim naredna 2 h u SIF-u (hidrogelovi su odmah prebaćeni u odgovarajuću zapreminu SIF). Uzeti alikvoti medijuma i 1 g nosaća su dalje analizirani primenom postupka opisanog u odeljku (4.3.9)

Tabela 4.1. Koncentracije i zapremine elektrolita korišćenih u pripremi SGF i SIF tečnosti.

Komponente rastvora	Koncentracije * rastvora (g/L)	SGF Zapremina komponenti (mL)	SIF Zapremina komponenti (mL)
<i>KCl</i>	37,3	6,9	6,8
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	68	0,9	0,8
<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	84	12,5	42,5
<i>NaCl</i>	117	11,8	9,6
<i>MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub></i>	30,5	0,4	1,1
<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></i>	48	0,5	-

\* Koncentracije rastvora su date u odnosu na finalnu zapreminu rastvora od 500 ml

Korekcije finalnih vrednosti pH rastvora su vršene pomoću NaOH koncentracije 1mol/l i HCl koncentracije 6 mol/l. Pripremljeni uzorci su prvo mešani sa SGF u odnosu 1:1 uz dodatak CaCl<sub>2</sub> čija finalna koncentracija u rastvoru iznosi 1,5 mmol/l. pH rastvora je podešen na 1,5 i neposredno pre dodatka uzoraka je dodat enzim pepsin (2000 U/mL u finalnom rastvoru).

Uzorci su mešani pri brzini od 120 obr/min korišćenjem orbitalnog šejkera (IKA KS 4000i control, Staufen, Germany). Nakon dva sata uzorcima se dodaje SIF u odnosu 1:1 i finalna vrednost pH iznosi 7. Takođe se dodaje i pankretin čija aktivnost se izračunava u odnosu na enzim tripsin (100 U/mL u finalnom rastvoru). U intestinalni fluid se dodaju i žučne soli u koncentraciji 0,3 mas. % u odnosu na finalnu zapreminu rastvora.

#### 4.3.14.6. Određivanje stabilnosti proizvoda tokom čuvanja

Stabilnost napitaka praćena je određivanjem ključnih parametara kvaliteta (pH vrednosti i broja živih ćelija) tokom čuvanja na  $4 \pm 1$  °C u vremenskom intervalu od 28 dana. Napici su pod sterilnim uslovima uzorkovani u pomenutom periodu i na osnovu vrednosti parametara određen je period u kome napitak zadržava zadovoljavajući kvalitet. Takođe je analiziran uticaj tipa nosača na stabilnost proizvoda odnosno analizirane parametre. Analizirana je i vijabilnost inkapsuliranih kultura u prahovima dobijenim inkapsulacijom postupcima sprej-sušenja i liofilizacijom. Vijabilnost probiotske kulture u praškastim formama uzorka je praćena u periodu od 45 dana čuvanja u sobnim uslovima.

#### 4.3.15. Statistićka analiza

Eksperimenti su ponavljani minimum tri puta, a dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost sa standardnim devijacijama. Tukey test je korišćen za određivanje znaćajne razlike između pripremanih uzoraka, pri ćemu je analizirani prag bio na nivou  $p < 0,05$ . Obrada eksperimenatlnih podataka je uraćena korišćenjem softvera Origin Pro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, SAD) i Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, WA, SAD).

Numerićki podaci za matematićko modelovanje analizirani su korišćenjem softvera Matlab R2011b. Metoda najmanjih kvadrata korišćena je za minimizaciju odstupanja eksperimentalnih i raćunskih vrednosti  $\ln(G'(\omega))$  i  $\ln(G''(\omega))$  i na osnovu toga za određivanje optimalnih vrednosti parametara modela.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### 5. KARAKTERIZACIJA NOSAČA SA INKAPSULIRANOM PROBIOTSKOM STARTER KULTUROM

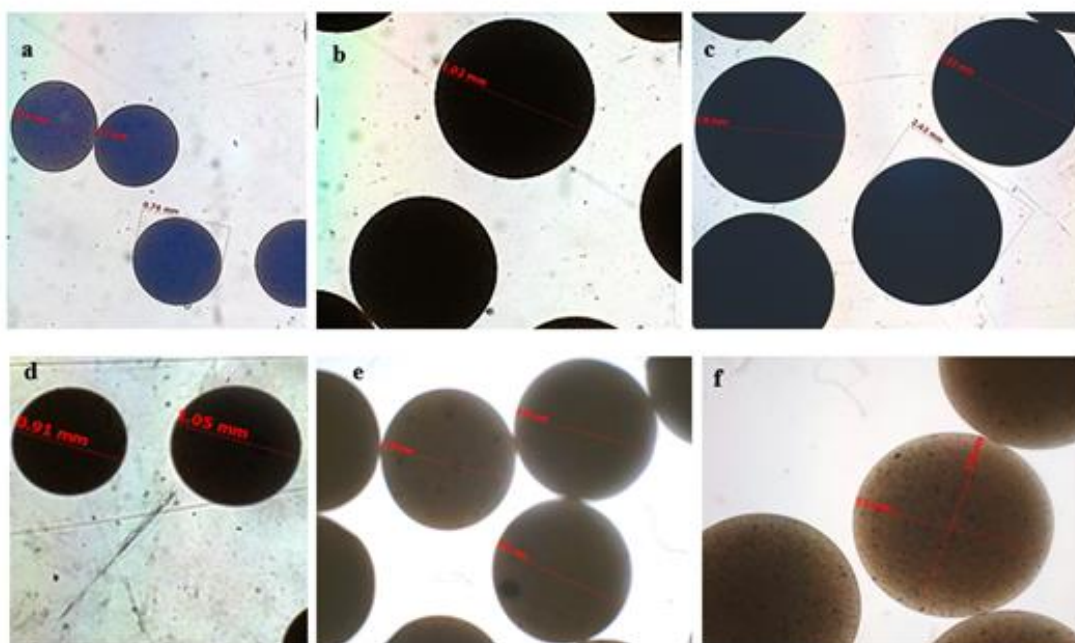
#### 5.1. Karakterizacija nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom dobijenih tehnikom ekstruzije

Nosači na bazi alginata su pripremani uz dodatak surutke i koncentrata proteina surutke primenom tri vrste tehnike: (1) ekstruzije, (2) sprej-sušenje i (3) liofilizacija pri čemu su za umreženje alginata i proteina surutke korišćeni joni kalcijuma. Nosači dobijeni pomenutim postupcima su podvrgnuti različitim metodama karakterizacije. Takođe, dobijeni nosači su implementirani u fermentacioni medijum na bazi surutke i analiziran doprinos postupka inkapsulacije na kvalitet funkcionalnog napitka i stabilnost ovakvog tipa proizvoda. Za inkapsulaciju je korišćena probiotska starter kultura sastava: *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* 80,0 %, *Lactobacillus acidophilus* 13 %, *Bifidobacterium bifidum* 6,0 % i *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 1,0 %. Pri čemu su u ovom sastavu zastupljene tri probiotske kulture: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

##### 5.1.1. Izgled i veličina hidrogel nosača

Veličina dobijenih nosača je veoma bitna sa aspekta bubrenja i otpuštanja probiotske kulture. Takođe, veličina nosača ima važnu ulogu kada se govori o njihovoj primeni u prehrambenim proizvodima uzimajući u obzir teksturu i senzorne karakteristike prehrambenih proizvoda zbog čega je neophodno uspostaviti balans kako bi se zadovoljile želje potrošača. Na slici 5.1 prikazane su slike hidrogel nosača koje su dobijene optičkim mikroskopom. U pitanju su kalcijum-alginatni nosači obogaćeni dodatkom surutke (Alg/S) i koncentratom proteina surutke (Alg/S/P) kao i nosači sa dodatkom surutke i obloženi hitozanom (Alg/S/Ch). S obzirom da se inkapsulacija za pojedine uzorke izvodila sa i bez primene generatora napona dobijeni nosači su u opseg prečnika od 0,7-3,0 mm. Primenom generatora napona tokom ekstruzije dobijeni su mikronosači veličine do 1mm. Uticaj primene napona na veličinu hidrogel sistema je takođe opisan u radu autora Kostić i sar., 2012.

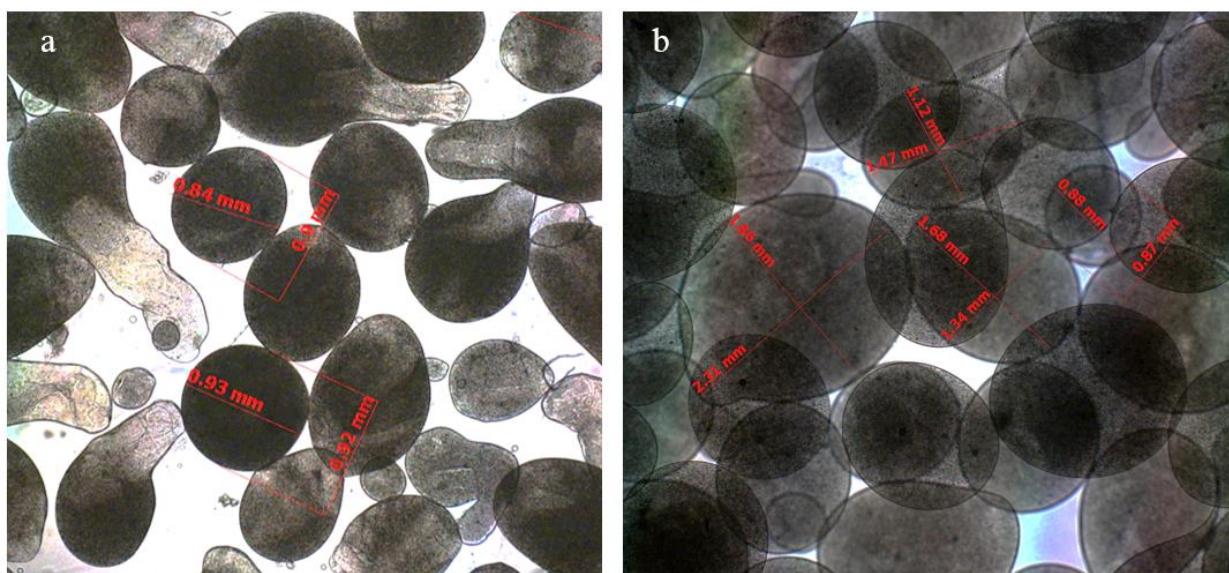
Na osnovu eksperimentalnih zapažanja moguće je zaključiti da sa prisustvom i povećanjem napona za pomenute tipove suspenzija sa inkapsuliranom kulturom se dobijaju mikronosači koji su dati na slici 5.1 a, b, d. Srednji prečnik nosača pri naponu od 6,6 kV je  $0,71\pm 0,01$  mm dok pri naponu od 5,5 kV su dobijeni Alg/S nosači veličine  $\sim 1$  mm. Za nosače sa i bez dodatka proteina usled nedostatka napona dobijene su nosači većeg srednjeg prečnika za isti prečnik igle od 22 G. Vrednosti srednjih prečnika su  $2,42\pm 0,06$  mm i  $2,60\pm 0,02$  mm za Alg/S i Alg/S/P, respektivno pri istim uslovima postupka inkapsulacije. Oblaganjem nosača Alg/S sa hitozanom dobijeni su nosači srednje veličine  $0,91\pm 0,03$  mm dok je izmerena srednja vrednost prečnika kod nosača obogaćenih koncentratom proteina iznosila  $1,05\pm 0,02$  mm. Usled oblaganja nosača dobijenih bez primene elektrostatičkog potencijala srednje vrednosti prečnika iznose  $2,95\pm 0,11$  mm i  $3,08\pm 0,03$  mm za Alg/S i Alg/S/P, respektivno. Kao što se sa slike 5.1 može videti, dobijeni hidrogel nosači Alg/S i Alg/S/P obloženi i neobloženi sa hitozanom su sfernog oblika i glatke površine. Koncentracija alginata u pripremanim suspenzijama za nosače iznosi 1,6 mas. % .



Slika 5.1. Izgled i veličina hidrogel nosača dobijenih ekstruzionom tehnikom (a) Alg/S nosač dobijen uz primenu elektrostatičkog napona (5,5 kV) (b) hidrogel nosači Alg/S dobijeni primenom napona 6,6 kV (c) Alg/S bez primene elektrostatičkog napona tokom inkapsulacije (d) Alg/S/P primenom elektrostatičkog napona 6,6 kV (e) hidrogel nosači Alg/S/P bez korišćenja elektrostatičkog napona (f) hitozanom obloženi Alg/S nosači dobijeni bez primene elektrostatičkog napona tokom inkapsulacije.

Eksperimentalno je pokazano da i koncentracija korišćenog natrijum-alginata u pomenutom odnosu sa surutkom i koncentratom proteina ima uticaj na vrednost prečnika nosača i izgledu dobijenih hidrogel nosača za iste uslove postupka inkapsulacije. U radu je analiziran i uticaj finalne koncentracije natrijum-alginata u pripremanoj suspenziji za inkapsulaciju kulture.

Pripremani su rastvori natrijum-alginata koncentracije 1,0 mas. %, 1,6 mas. % i 2,0 mas. %. Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da koncentracija alginata i viskoznost suspenzije utiču na sferičnost nosača, pri čemu su nosači sa finalnom koncentracijom alginata 1,6 mas. % imali sferan oblik dok pri koncentracijama 1,0 mas. % i 2,0 mas. % su dobijeni nosači elipsoidnog oblika i sa prisustvom “repića” (slika 5.2 a, b).



Slika 5.2. Izgled hidrogel nosača dobijenih primenom natrijum alginata koncentracije a) 1,0 mas. % i b) 2,0 mas. %.

Promene u veličini nosača su analizirane i pre posle prirodnog sušenja uzoraka. U tabeli 5.1. su date vrednosti veličine nosača pre i posle sušenja, sferičnost nosača kao i faktor skupljanja. Analizirani su hidrogel nosači sa i bez dodatka proteina kao i sa i bez dodatka inkapsulirane kulture.

Tabela 5.1. Srednji prečnik (D), faktor sferičnosti (SF) i faktor skupljanja ( $k_{SF}$ ) za Alg/S i Alg/S/P nosače sa i bez inkapsulirane kulture

Vrsta nosača	Srednji prečnik (D), hidrogel nosača <sup>a</sup> (mm)	Faktor Sferičnosti (SF) hidrogel nosača	Srednji prečnik (D), suvih nosača (mm)	Faktor skupljanja, ( $k_{SF}$ )
Alg/S sa kulturom	2,611	0,009	1,331	0,490
	0,912*	0,011	0,391	0,571
Alg/S/P sa kulturom	2,486	0,021	1,693	0,318
	1,051*	0,012	0,622	0,409
Alg sa kulturom	2,513	0,013	0,802	0,681
	0,843*	0,003	0,306	0,636
Alg/S/P bez kulture	2,352	0,012	1,273	0,459
	0,895*	0,011	0,392	0,562
Alg bez kulture	2,503	0,013	0,712	0,715
	0,866*	0,005	0,223	0,742
Alg/S bez kulture	2,589	0,005	1,115	0,569
	0,908*	0,009	0,323	0,655
Alg/P bez kulture	2,531	0,015	0,885	0,650
	0,891*	0,008	0,320	0,641
Alg/P sa kulturom	2,597	0,011	1,050	0,596
	0,905*	0,007	0,345	0,619

\*vrednosti za prečnike nosača dobijenih elektrostatičkom ekstruzijom

<sup>a</sup> vrednosti prečnika nosača dobijenih sa i bez elektrostatičkog napona, n=30 uzoraka

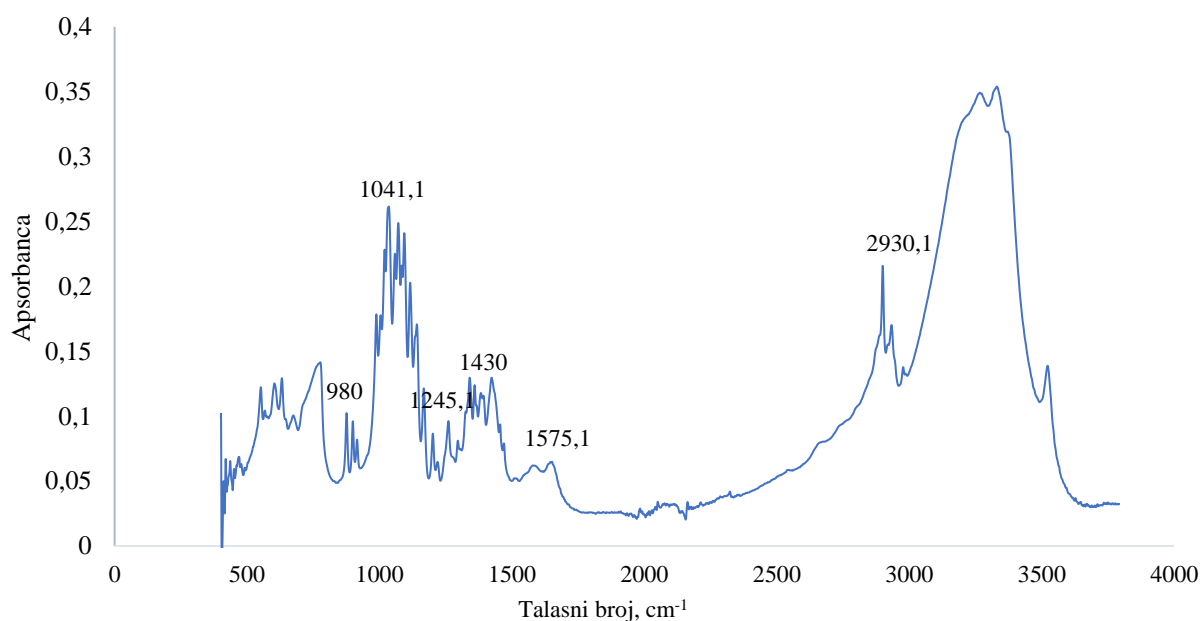
Na osnovu prikazanih rezultat se može zaključiti da na veličinu dobijenog sušenog uzorka najviše utiče količina unete praškaste komponente u postupku pripreme hidrogel nosača. Odnosno, nosači sa dodatom kulturom, surutkom i koncentratom proteinima (Alg/S/P) imaju najveći prinos nakon prirodnog sušenja uzorka i najmanju vrednost za koeficijent skupljanja hidrogelova. Poređenjem rezultatima za kalcijum-alginatne nosače sa i bez kulture, primetno je da u nosačima sa kulturom koji su obogaćeni surutkom i kombinacijom surutke i proteina je i do 5 % manje skupljanje i 15 %, za navedeni redosled pomenutih nosača.

### 5.1.2. FTIR analiza

Analiza uzoraka korišćenjem FTIR spektroskopije se radi u cilju identifikacije funkcionalnih grupa, zatim veza nastalih u samom nosaču, tj. interakcija polimer-proteini surutke ili polimer-fermentacioni medijum, kao i za identifikaciju veza uspostavljenih između polimera i inkapsulirane probiotske starter kulture.

#### 5.1.2.1. FTIR analiza Alg/S hidrogel nosača

Na slikama 5.3-5.8. prikazani su FTIR spektri čiste kulture kao i hidrogel nosača u čiji sastav ulaze natrijum-alginat, surutka i probiotska starter kultura. Analizirana je struktura praznih nosača, zatim hidrogelova sa inkapsuliranim ćelijama kao i spektri nosača nakon procesa fermentacije. FTIR spektar starter kulture korišćene za inkapsulaciju je dat na slici 5.3.



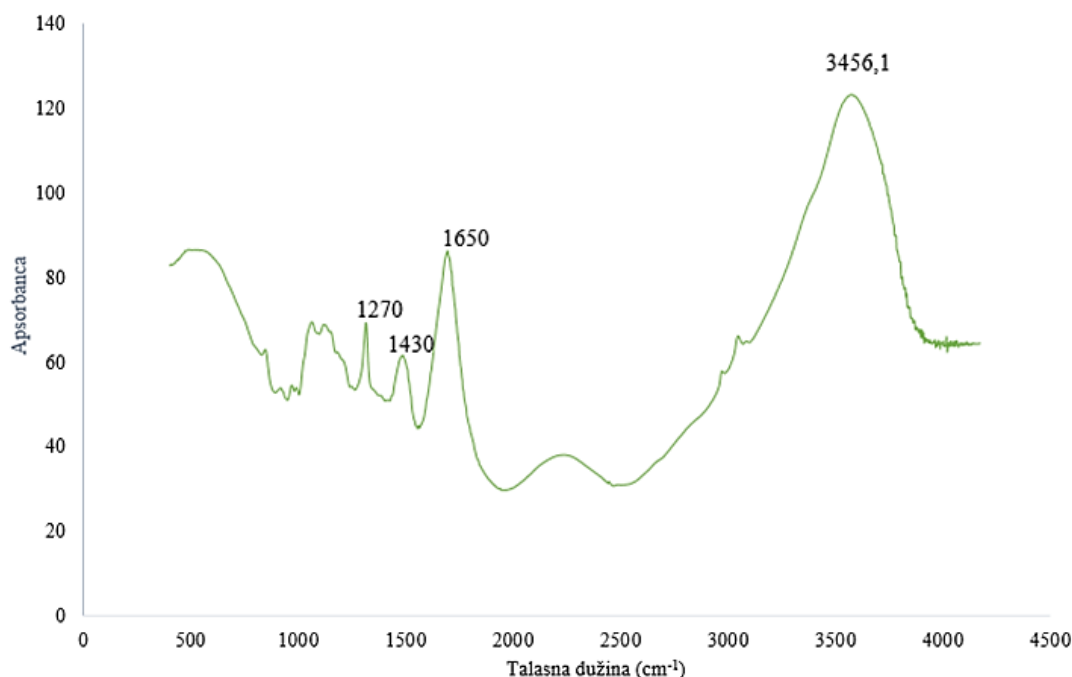
Slika 5.3. FTIR analiza spektra probiotske starter kulture (ABY 6).

FTIR spektri mikroorganizama najčešće obuhvataju 5 regiona koji se analiziraju (Oust i sar., 2004). Ovi regioni ukazuju na različite komponente ćelijskog zida mikroorganizama (1) 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  govori o prisustvu masnih kiselina ćelijske membrane bakterija (2) 1500-1800  $\text{cm}^{-1}$  prisustvo amidnih veza od proteina i peptida (3) 1200-1500  $\text{cm}^{-1}$  region ukazuje na prisustvo proteina i masnih kiselina (4) 900-1200  $\text{cm}^{-1}$  region koji se odnosi na polisaharide u ćelijskom zidu (5) 500-900  $\text{cm}^{-1}$  je region koji ukazuje na veze koje se ne mogu dodeliti specifičnim funkcionalnim grupama.



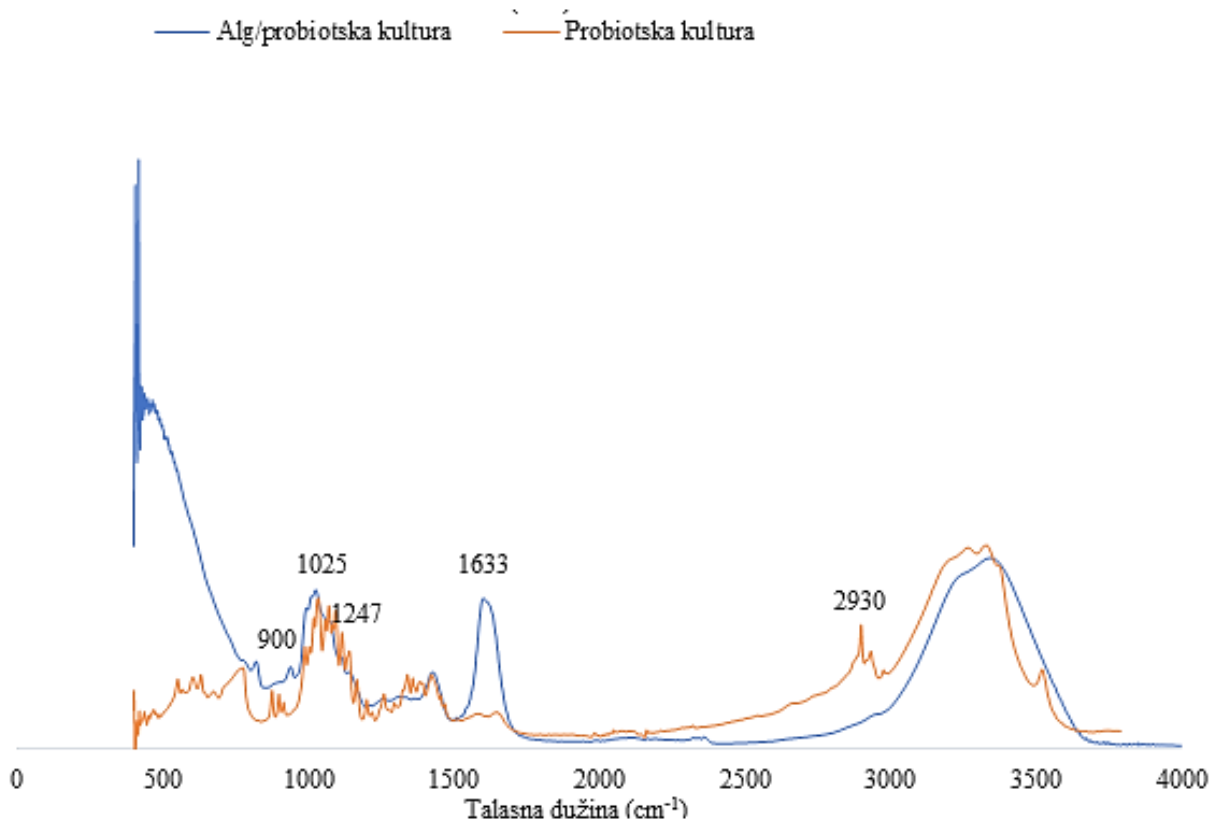
Naznačene oblasti pomenutih talasnih dužina mogu se videti na slici 5.3. Uticaj i interakcije između starter kulture i nosača su analizirane na osnovu FTIR spektara slobodne kulture i nakon inkapsulacije ćelija (slika 5.3. i slika 5.5). Karakteristični apsorpcioni pikovi praćeni za kulturu su u oblastima koje odgovaraju talasnim dužinama  $1041\text{ cm}^{-1}$  i  $1245\text{ cm}^{-1}$  (ukazuju na simetrično i asimetrično istežanje  $\text{P}=\text{O}$  od  $\text{PO}_2^-$ ) (Dianawati i sar., 2012; Erukhimovitch i sar., 2005). Takođe su razmatrani pikovi u oblastima  $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$  i  $2930\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  simetrične i asimetrične vibracije istežanja, redom) (Williams i Fleming, 1989). Na prisustvo sekundarnih proteina ukazuje frekvencija amida II u oblasti  $1430$  do  $1575\text{ cm}^{-1}$  (CN istežanje i NH savijanje) (Leslie i sar., 1995). Nakon inkapsulacije su praćene promene u pomenutim oblastima i utvrđivali tipovi interakcija i uticaj kulture na strukturu nosača (slika 5.3).

Analiziran je i FTIR spektar čistog kalcijum-alginatnog nosača i karakteristične talasne dužine su prikazane na slici 5.4. Očekivane talasne dužine koje bi učestvovala u interakcijama su oblasti koje odgovaraju talasnim dužinama  $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$  (prisustvo – OH valencione vibracije),  $1270\text{-}1430\text{ cm}^{-1}$  (vibracije koje ukazuju na deformaciju -OH). Za alginat je specifična i rekativna sposobnost  $\text{COO}^-$ , zbog čega su praćene i promene u oblasti koja odgovara talasnim dužina  $\sim 1550\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  (Lawrie, 2007; Pongjanyakul i Puttipipatkachorn, 2007) (slika 5.4).



Slika 5.4. FTIR spektar kalcijum-alginatnog nosača.

Interakcije između inkapsuliranih ćelija i strukture nosača su opisane spektrima koji su dati na slici 5.5. Prisustvo ćelija je demonstrirano simetričnim i asimetričnim istezanjem koje potiče od fosforne kiseline na talasnim dužinama  $1025\text{ cm}^{-1}$  i  $1247\text{ cm}^{-1}$  zajedno sa C-O-C deformacionim vibracijama koje potiču od polisaharida ( $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ ) vezanih za glikopeptide i lipopolisaharide ćelijskog zida (Smilkov i sar., 2014).

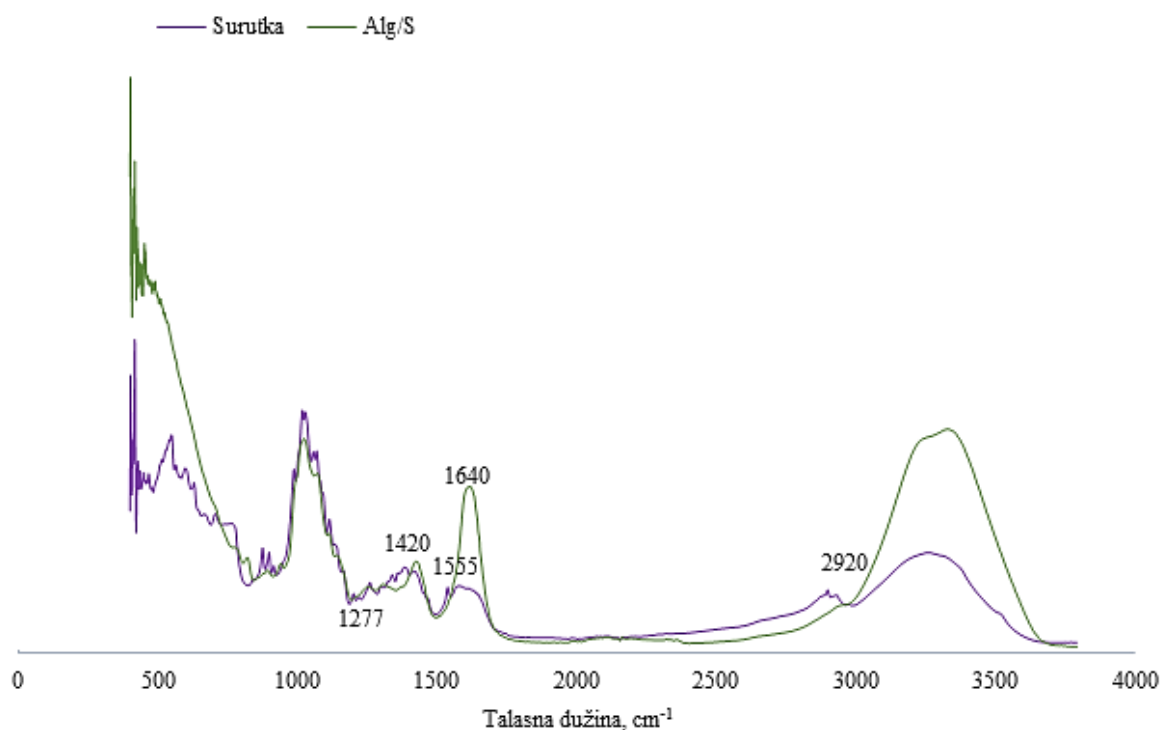


Slika 5.5. Uporedni FTIR spektri čiste probiotske kulture i kalcijum-alginatnog nosača sa inkapsuliranom kulturom

Takođe, može se primetiti rastezanje vibracija peptidne C=O grupe na  $\sim 1633\text{ cm}^{-1}$ , što je karakteristično za amidne I trake. Ovi tipovi vibracija mogu ukazati na interakcije između ćelija i karboksilne grupe polisaharidnog dela nosača. Istaknuti pikovi u oblasti  $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$  za čistu kulturu nisu vidljivi u sistemu sa nosačem što može da ukazuje da su analizirane ćelije prekrivene nosačem i da se iz tog razloga date oblasti ne mogu detektovati.

Na osnovu prikazanih spektara kalcijum-alginatnih nosača sa kulturom primetne su interakcije između nosača i inkapsulirane kulture ali ne i dovoljno intenzivne što je potvrđeno u nastavku rada sa stepenom efikasnosti inkapsulacije.

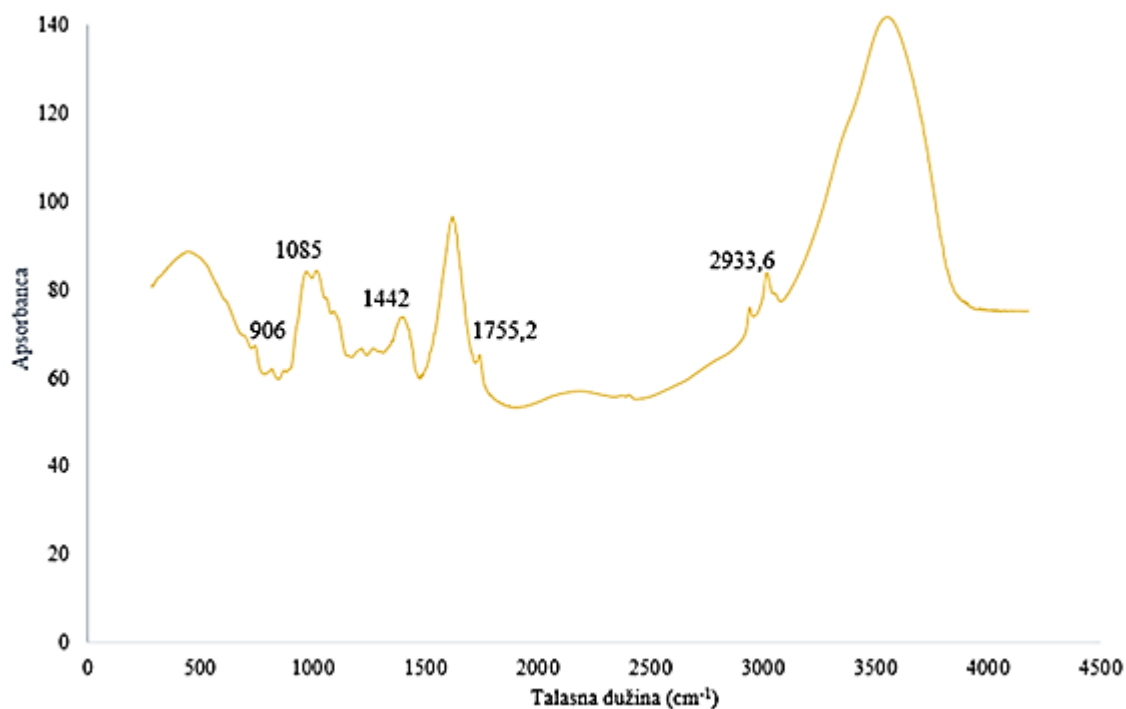
Analizirane su i hemijske interakcije između nosača i dodate surutke. Pik na talasnoj dužini  $\sim 1420 \text{ cm}^{-1}$  je posledica deformacionih vibracija C-H veze u sklopu  $\text{CH}_2$  grupe u uzorku surutke. Pik na spektru u oblasti  $\sim 1277 \text{ cm}^{-1}$  je posledica amid III veza usled lipidnih komponenti surutke. U oblasti  $900\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$  su pikovi nastali usled prisustva C-O i C-O-C veze šećernih komponenti surutke. Specifičan pik na  $1555 \text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo peptida i proteina u sastavu korišćene surutke.



Slika 5.6. Uporedni FTIR spektri surutke i Alg/S nosača bez kulture.

Na datom spektru nosača Alg/S se može uočiti pik na  $1640 \text{ cm}^{-1}$  koji ukazuje na prisustvo amid I veza od interakcije proteinskih komponenti surutke ( $\alpha$  heliks i  $\beta$  struktura proteina) i reaktivne  $\text{COO}^-$  grupe nosača. Takođe, na spektru za surutku se može uočiti karakterističan pik na talasnoj dužini  $2920 \text{ cm}^{-1}$  koji ukazuje na prisustvo lipida u sastavu surutke.

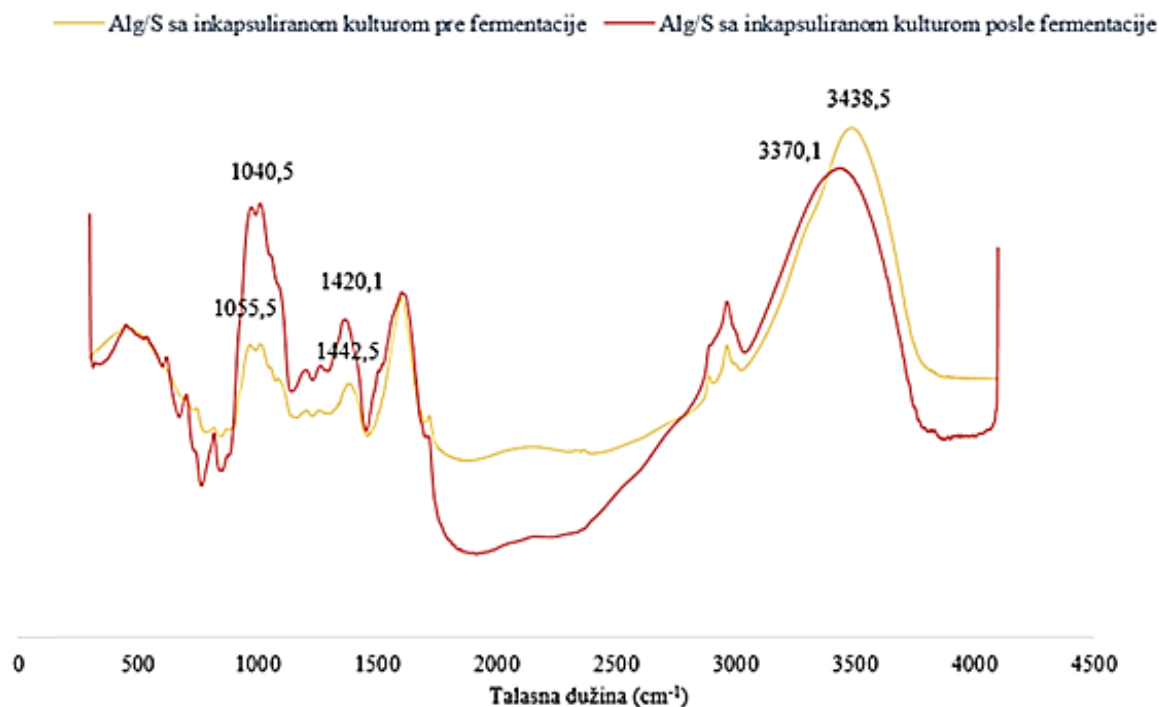
Na slici 5.7, se može videti doprinos dodatka surutke u uspostavljanju bolje interakcije nosača i inkapsulirane kulture. Sa slike u nastavku se može uočiti pikovi u oblasti  $\sim 2930 \text{ cm}^{-1}$ , što nije slučaj sa samo kalcijum-alginatnim nosačima koji ukazuje na prisustvo mikroorganizama (masnih kiselina ćelijske membrane). Uočen je i novi pik na talsnoj dužini  $\sim 1442 \text{ cm}^{-1}$ , što ukazuje na građenje amidne veze. Pik koji se javlja na  $1755,2 \text{ cm}^{-1}$  ukazuju na prisustvo amidnih veza (Le Tien i sar., 2000).



Slika 5.7. FTIR spektar Alg/S nosača sa inkapsuliranom kulturom.

Na slici 5.8 su dati FTIR spektri Alg/S nosača pre i posle fermentacije. Na osnovu dobijenih rezultata je analiziran uticaj i interakcije nosača sa fermentacionim medijumom. Traka pri  $3370,1 \text{ cm}^{-1}$  odgovara vibracijama istezanja –OH vezanim za  $-\text{NH}_2$  grupu. Pad u intezitetu pika u oblasti  $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$  koji je karkterističan za vodonične veze je posledica proteolitičke sposobnosti inkapsulirane kulture. Traka na  $1420 \text{ cm}^{-1}$  (vezana za asimetričnu  $\text{COO}^-$  istezanje vibracija) postala je šira nakon interakcije nosača sa fermentacionim medijumom (Sarai i sar., 2013). Rezultati su pokazali promene u pikovima amino i karboksilnih grupa pre i posle fermentacije, što ukazuje na interakcije između karbonilne grupa alginata i amino grupa proteina. Hidrogelovi su potencijalni apsorberi jona prisutnih u medijumu (Poreda i sar., 2013).

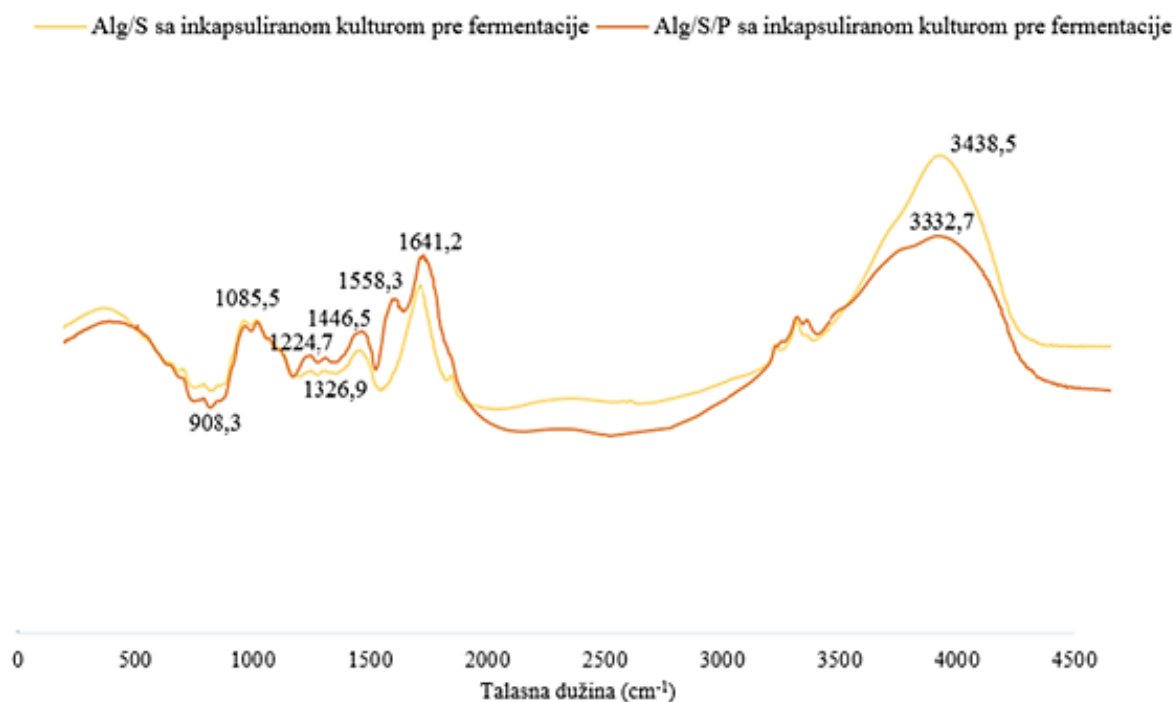
Difuzija  $\text{Ca}^{2+}$  u alginatnu mrežu potvrđuje pomeranje vibracija  $-\text{CO}$  i  $\text{C}-\text{O}-\text{H}$  na niže frekvencije; dodatno, došlo je do promene spektra u regionima  $\text{COO}^-$  antisimetričnih i simetričnih vibracija. Trake oko  $1400\text{ cm}^{-1}$  i  $1000\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju  $-\text{C}-\text{O}$ ,  $-\text{C}-\text{C}$  i  $-\text{C}-\text{OH}$  grupama (Gbassi i sar., 2012).



Slika 5.8. FTIR analiza spektra Alg/S nosača pre i posle fermentacije.

### 5.1.2.2. FTIR analiza Alg/S/P hidrogel nosača

Na prikazanim spektrima na slici 5.9-11 se može videti uticaj procesa fermentacije na svojstva nosača Alg/S/P kao i interakcija između proteina i alginata u biopolimernom sistemu. Uočeni pikovi u oblastima koji odgovaraju talasnim dužinama  $3600-3000$  i  $1700-1400\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na prisustvo amidnih veza (Le Tien i sar., 2000; Jiang i sar., 2010). Na slici 5.9 se mogu uočiti i razlike u interakcijama pri poredenju nosača tipa Alg/S i Alg/S/P pre fermentacije koje takođe ukazuju i na uticaj inkapsulirane kulture na veze u hidrogel sutrukturama.



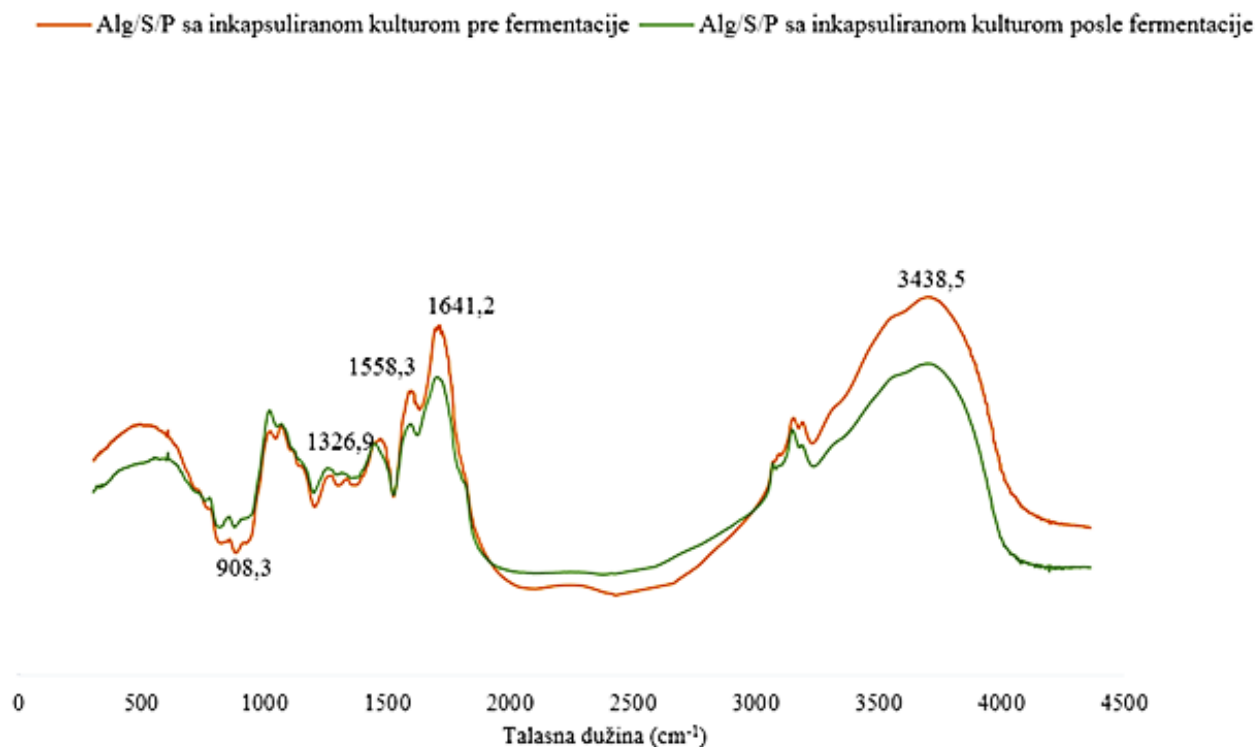
Slika 5.9. Uporedni prikaz FTIR spektara nosača Alg/S i Alg/P sa inkapsuliranom kulturom pre procesa fermentacije.

FTIR spektri dati na slici 5.9. ukazuju da dodati koncentrat proteina u pripremi nosača je imao dopinosu u pogledu formiranja amidnih veza, pri čemu pikovi karakteristični za proteine mnogo intenzivniji u ovakvim sistemima. Mogu se uočiti intenzivniji pikovi u oblasti talasnih dužina 1641,2 cm<sup>-1</sup> kao posledica – C=O valencionih i –NH deformacionih vibracija amidne veze. Za razliku od Alg/S nosača primetan je pik u oblasti 1558 cm<sup>-1</sup> koji je posledica istežanja amidne veze karakteristične za sve proteine. U ovom spektru prisutne su i druge trake karakteristične za proteine (od 1220 do 1330 cm<sup>-1</sup> koje su posledica istežanja C-N veze i savijanja N-H veze) na kojima se mogu primetiti intenzivniji pikovi u pomenutim oblastima za hidrogel nosača tipa Alg/S/P (Rodriguez, 2015; Dianawati i sar., 2012).

Uticao je na demonstraciju C-O-C deformacionim vibracijama koje potiču od polisaharida u oblasti talasnih dužina 900-1200 cm<sup>-1</sup> kao posledica vezivanja polisaharida za glikopeptide i lipopolisaharide ćelijskog zida korišćene kulture (Smilkov i sar., 2014).

Analiziran je i uticaj uslova fermentacije na svojstva nosača kao i na formiranje novih veza nakon fermentacije. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 5.10.

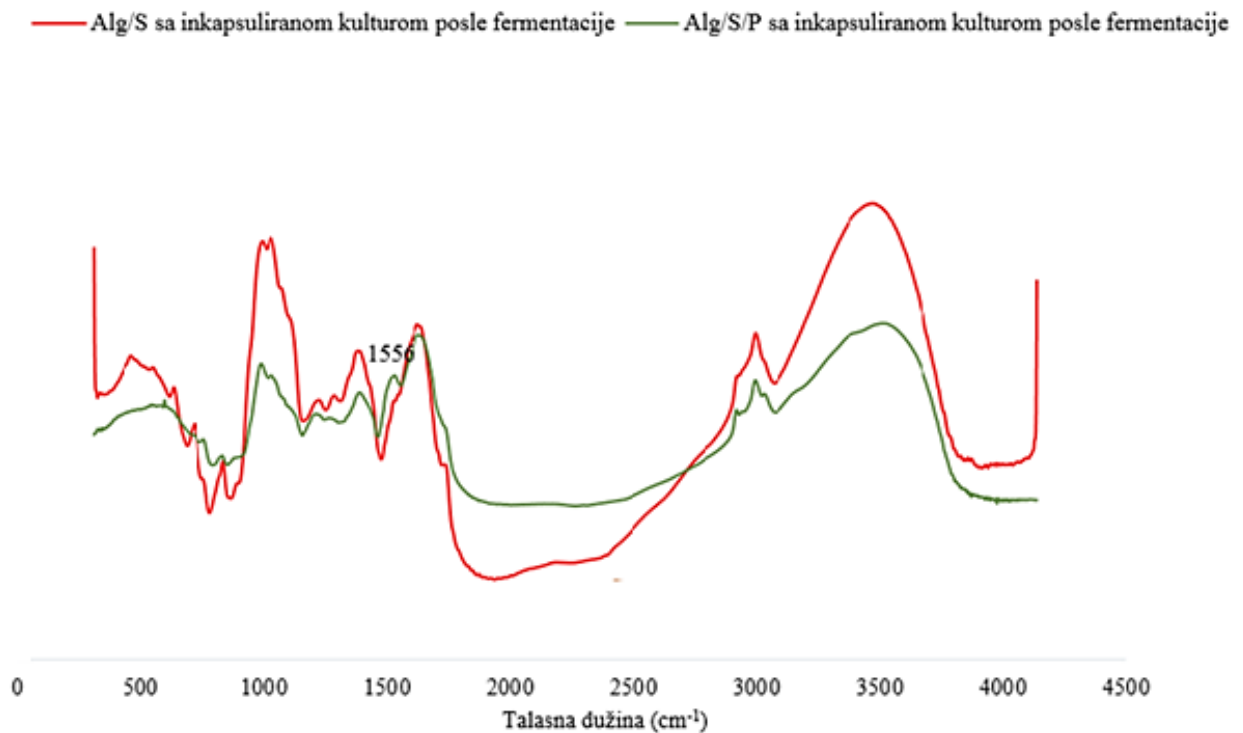
Na sumiranim FTIR spektrima ističu se trake na  $1641\text{ cm}^{-1}$ , karakteristične za proteine, pri čemu su dobijene trake posledica  $\text{C=O}$  i  $\text{NH}$  vibracija amidne veze.



Slika 5.10. Uporedni prikaz FTIR spektara za Alg/S/P nosače sa inkapsuliranom kulturom pre i posle fermentacije.

Dobijeni pikovi u oblastima karakterističnim za proteine se smanjuju nakon fermentacije što može da bude i posledica proteolitičkog svojstva korišćene starter kulture (Rodriguez, 2015; Van der Ven i sar., 2002). Na spektru dobijenom nakon fermentacije se takođe mogu uočiti pomenute oblasti s tim da su dobijeni pikovi na  $1558\text{ cm}^{-1}$  i  $3438,5\text{ cm}^{-1}$  ne značajno intenzivniji u nosačima pre fermentacije. U oblasti talasnih dužina  $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ ,  $1220\text{--}1330\text{ cm}^{-1}$  su intenzivniji pikovi nosača nakon inkapsulacije što ukazuje na uspostavljanja novih amidnih veza. Uticaj  $\text{Ca}^{2+}$  jona iz fermentacionog medijuma na svojstva nosača je vidljiv u oblasti  $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ , gde su nakon fermentacije primetni intenzivniji pikovi kao posledice uspostavljanja novih veza.

Na slici 5.11 je dato poređenje FTIR spektara nosača Alg/S i Alg/S/P posle fermentacije.



Slika 5.11. Uporedni prikaz FTIR spektara posle fermentacije za nosače tipa Alg/S i Alg/S/P sa inkapsuliranom kulturom.

Na osnovu prikazanih rezultata moguće je zaključiti da nosači sa dodatim koncentratom proteina imaju manji intenzitet pikova u oblastima  $\sim 3438,5 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$  kao i  $1220\text{-}1330 \text{ cm}^{-1}$ . Pad u intenzitetu pikova se može objasniti kao rezultat proteolitičke aktivnosti probiotske starter kulture u toku procesa fermentacije, što je u nastavku i potvrđeno značajno većim rastom kulture u Alg/S/P nosačima nakon procesa fermentacije. Primetan je i pik u oblasti talasnih dužina  $1556 \text{ cm}^{-1}$  koji ukazuje na građenje novih amidnih veza u nosačima Alg/S/P nakon procesa fermentacije. U oblasti talasnih dužina  $900 \text{ cm}^{-1}$  se mogu uočiti pikovi ne značajno većeg intenziteta za nosače sa dodatim koncentratom proteina surutke.



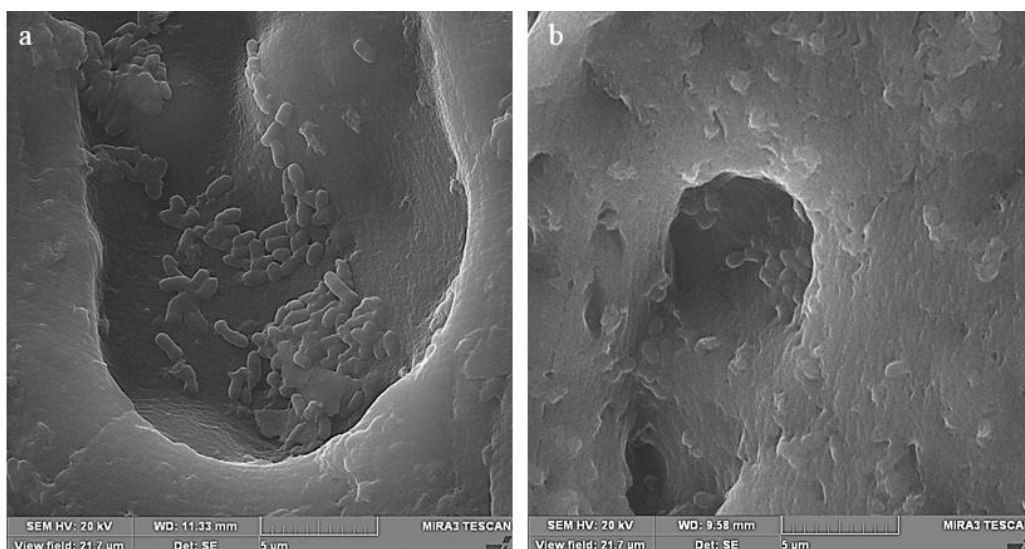
### 5.1.3. SEM analiza

Primenom Skenirajuće Elektronske Mikroskopije (SEM) analizirana je površinska morfologija uzoraka kao i uticaj fermentacionog medijuma na svojstva nosača. Takođe je analiziran položaj inkapsulirane kulture kao i način njihovog vezivanja za pomenute tipove nosača. Ovaj tip karakterizacije je bitan kako bi se stekao uvid u unutrašnju strukturu sistema kao i samu poroznost sistema što je značajno kod unapređivanja stepena inkapsulacije primenjenog tipa nosača i korišćene tehnike.

#### 5.1.3.1. SEM analiza Alg, Alg/S i Alg/S/P nosača

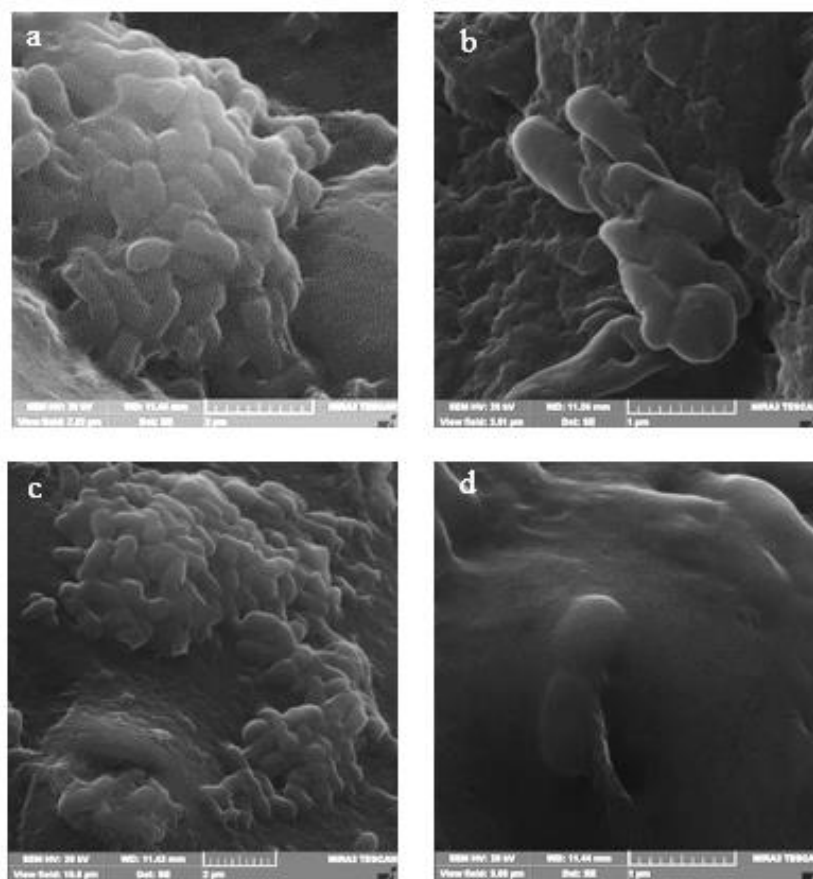
Na slici 5.12 je prikazana unutrašnjost hidrogelova koja je posebno očuvana primenom postupka pripreme uzoraka za SEM analizu koji je opisan u radu Stojkowska i sar., 2015. Sa pomenute slike je moguće videti raspored i način grupisanja bakterijskih ćelija kao, način vezivanja za nosače kao i afinitet.

Bakterijske kulture imaju afinitet prema ispitivanim tipovima nosača i grupišu se u šupljinama materijala u vidu kolonija. Na mestima gde su inkapsulirane ćelije moguće je primetiti i uticaj njihovog rasta na strukturu nosača (slika 5.12).



Slika 5.12. SEM mikrografija preseka hidrogel nosača Alg/S i Alg/S/P a) raspored kulture u nosaču Alg/S ( $\times 20000$ ); b) raspored ćelija u Alg/S/P nosaču ( $\times 20000$ ).

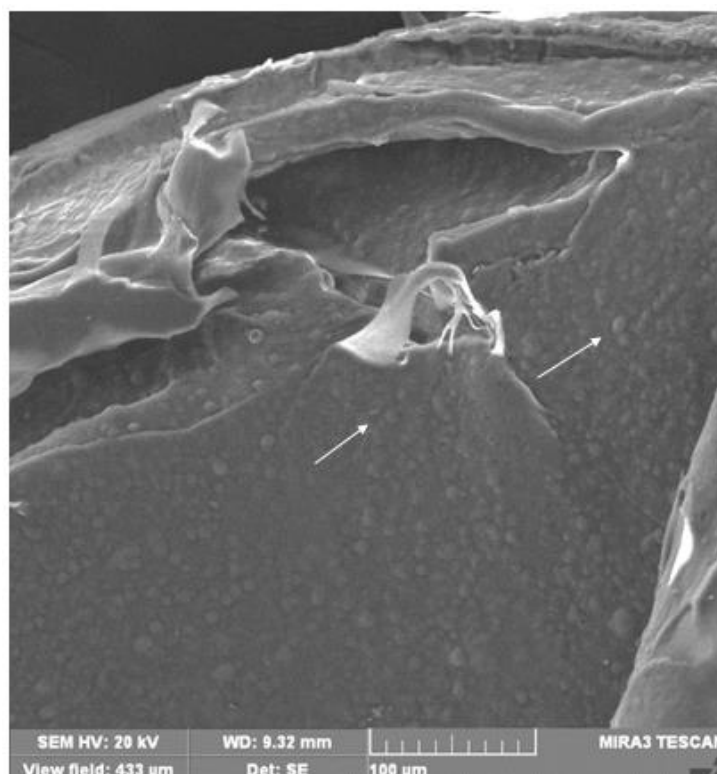
Kako bi se postigao željeni stepen i efikasnost postupka inkapsulacije neophodno je da postoji afinitet inkapsulirane kulture prema nosaču. Inkapsulirana probiotska starter kultura (ABY 6) se sastoji iz 4 vrste bakterijskih ćelija pri čemu se one prema slici 5.13 u analiziranim nosačima grupišu u zavisnosti od njihovog afiniteta prema nosaču i međusobnih interakcija. *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum* rastu sporo u medijumu na bazi mleka, jer im nedostaje esencijalna proteolitička aktivnost i obično se kombinuju sa *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (Casarotti i sar., 2014). Međusobne interakcije bakterijskih ćelija u pomenutim tipovima hidrogel nosača su date na slikama preseka 5.13 (a-d). SEM mikrografija nosača ukazuje na efikasnost postupka inkapsulacije kulture primenom tehnike ekstruzije kao i prisustvo većih i manjih kolonija nakon inkapsulacije kao i u periodu čuvanja od 28 dana.



Slika 5.13. SEM mikrografija preseka hidrogel nosača a) presek Alg/S nosača sa starter kulturom u periodu čuvanja od 4 nedelje ( $\times 20000$ ) (b) izdvojene štapićaste bakterije u Alg/S nosaču nakon postupka inkapsulacije ( $\times 20000$ ) c) presek Alg/S/P nosača sa bakterijskim ćelijama starter kulture ( $\times 20000$ ) d) prekrivne štapićaste bakterije slojem nosača tipa Alg/S.

Prikazana mikrostruktura nosača sa inkapsuliranom starter kulturom je vrlo slična strukturama datim u radovima autora Muthukumarasami i sar. (2006), Gbassi i sar., (2009) gde su probiotske bakterije takođe nasumično raspoređene u alginatnim nosačima. Na slici 5.12 (d) moguće je uočiti da su bakterije prekrivene slojem nosača i pokazale afinitet za vezivanje za nosač.

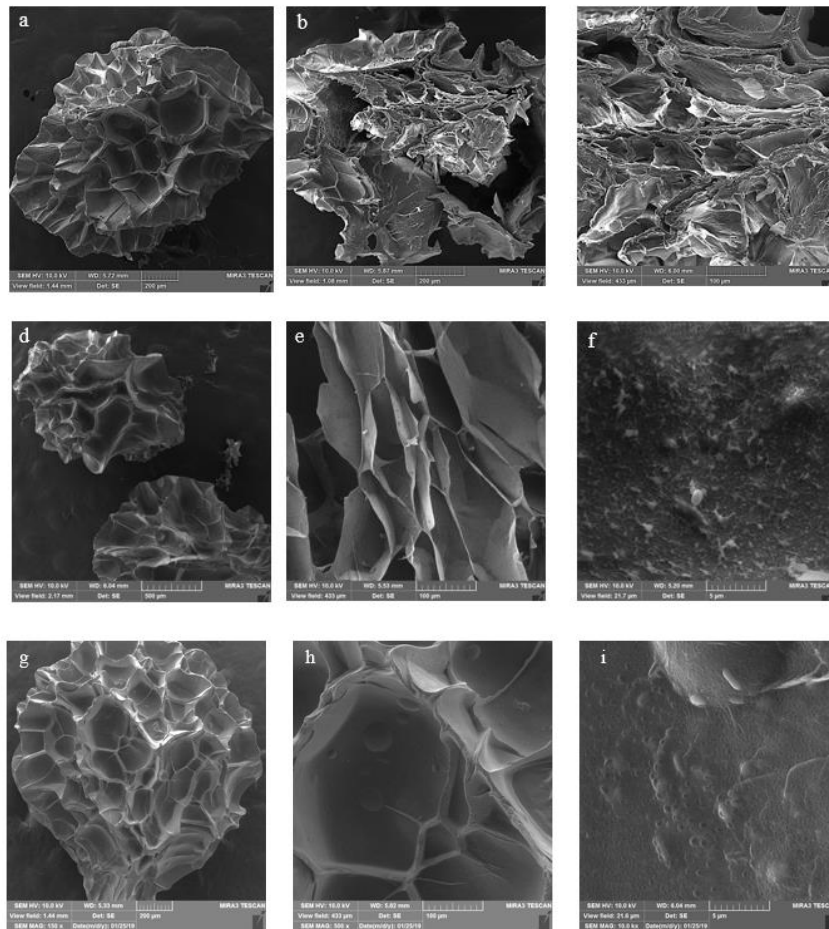
Raspored bakterijskih ćelija na površini nosača može se videti na slici 5.14. Inkapsulirana kultura se u velikom broju raspoređuje i na površini nosača zbog dostupnosti nutrijentima koji se nalaze u fermentacionom medijumu. Takođe, površina nosača je blago hrapava i male poroznosti.



Slika 5.14. Izgled površinske morfologije Alg/S nosača ( $\times 20000$ ).

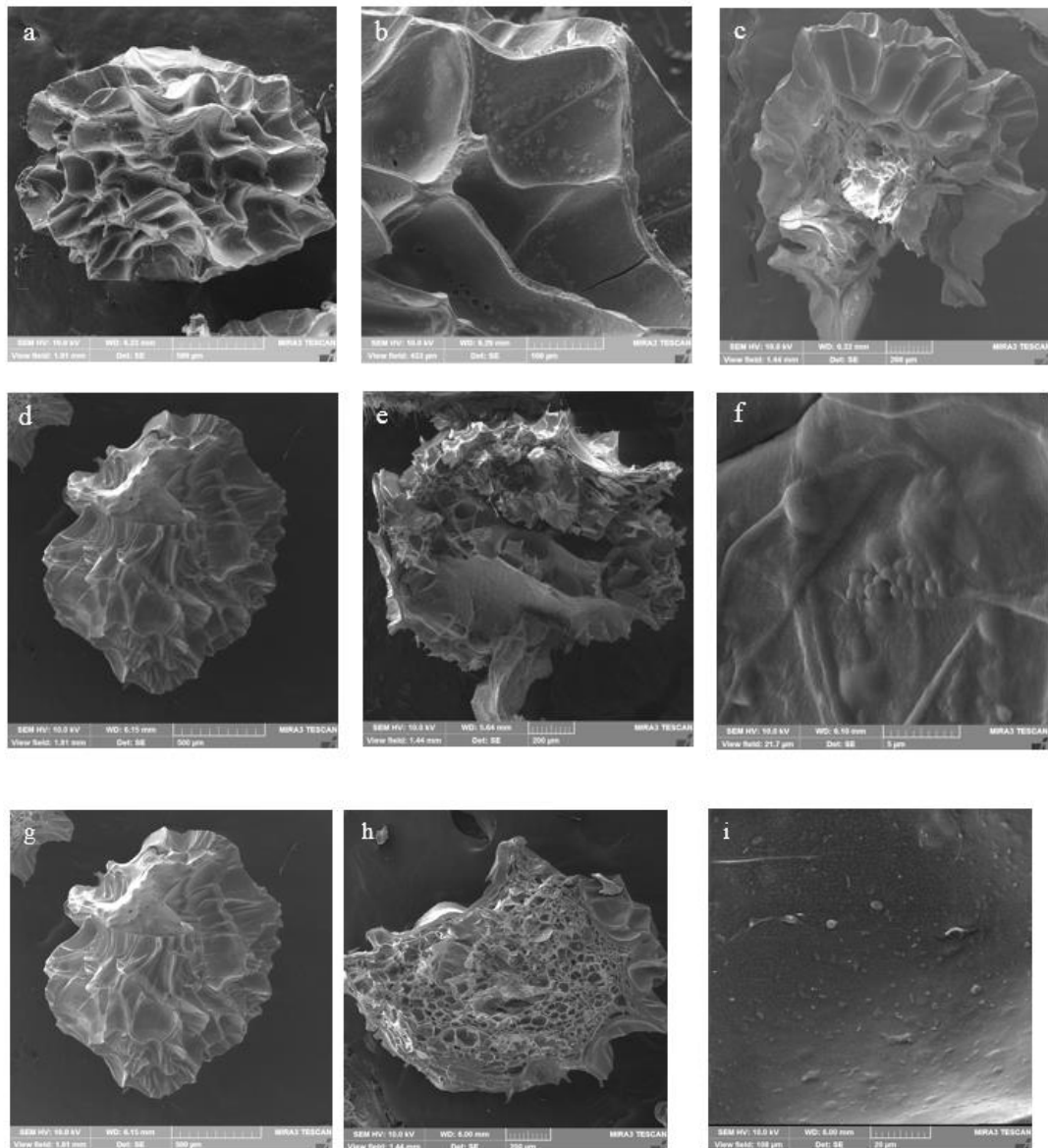
Izgled površinske strukture nosača je analiziran i nakon liofilizacije uzoraka pre i posle fermentacije. Takođe je moguće uočiti i uticaj uslova sušenja na strukture nosača (Slika 5.15). Promene u obliku nosača na bazi kalcijum-alginata nakon sušenja su već zabeležene u literaturi (Belščak-Cvitanović i sar., 2015; Stojanović i sar., 2012). Liofilizacijom poroznih kalcijum-alginatnih nosača dolazi do skupljanja nosača i promene u obliku istog. Prema slici 5.15-18 može se zaključiti da se sa dodatkom surutke i koncentrata proteina surutke može uticati da se zadrži prvobitni oblik hidrogel nosača.

Na slici 5.15 je dat uporedni prikaz izgleda čistog kalcijum-alginatnog nosača sa i bez ABY 6 kulture kao i promene u obliku i strukturi pre i posle procesa fermentacije. Nakon sušenja Alg nosača postupkom liofilizacije na slikama 5.15 (a-c) se može videti porozna struktura nosača kao i da su nosači izgubili prvobitan oblik usled gubitka vode. Dodatkom kulture (slika 5.15 (d-f)) se ne vide značajne promene u poroznosti i mikrostrukturi nosača na datom preseku. Nakon procesa fermentacije površina i unutašnjost nosača je rastresitija i glatkija, što znači da fermentacioni medijum reaguje i sa unutrašnjim delovima nosača a ne samo spoljašnjim.



Slika 5.15. SEM mikrografija čistog i liofilizovanog kalcijum-alginatnog nosača bez starter kulture a) izgled liofilizovanog nosača ( $\times 10000$ ) b) izgled strukture nosača na preseku ( $\times 10000$ ) c) mikrostruktura nosača na preseku, ( $\times 10000$ ); SEM mikrografija Alg nosača sa ABY 6 kulturom d) pre fermentacije ( $\times 10000$ ), e) izgled preseka nosača pre fermentacije ( $\times 10000$ ) f) raspored inkapsulirane kulture u delovima nosaču ( $\times 10000$ ) g) izgled nosača nakon fermentacije ( $\times 10000$ ) h) površinska morfologija nosača nakon fermentacije ( $\times 10000$ ) i) raspored inkapsulirane kulture u površinskim delovima nosača posle fermentacije ( $\times 10000$ ).

Uticaj dodatka surutke na strukturu nosača je dat na slici 5.16.

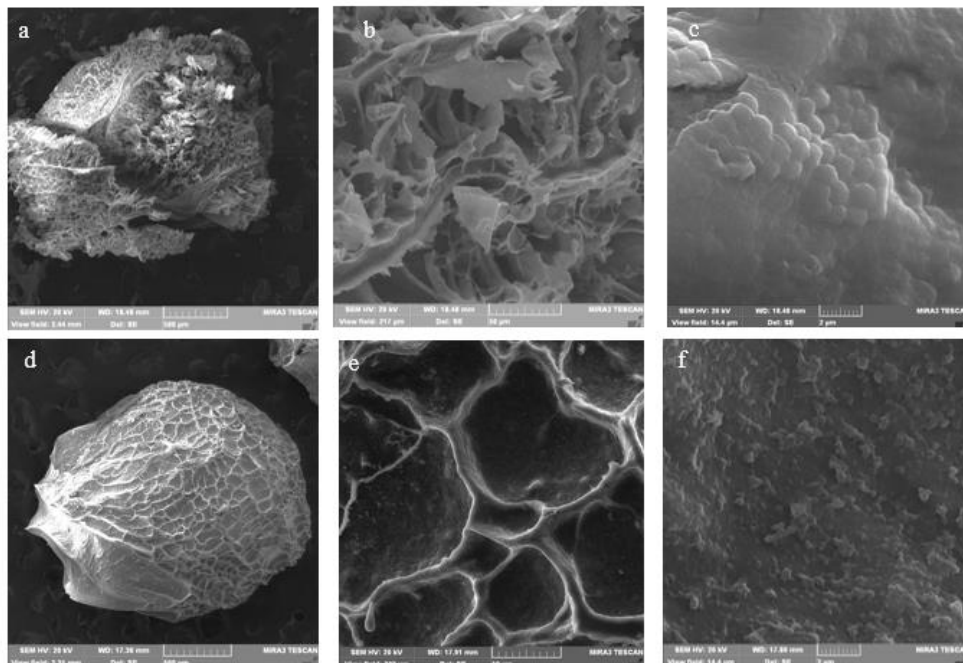


Slika 5.16. SEM mikrografija liofilizovanih Alg/S nosača sa i bez inkapsulirane kulture a) Alg/S nosači bez inkapsulirane kulture ( $\times 10000$ ) b) površinska morfologija Alg/S nosača bez kulture ( $\times 10000$ ) c) poprečni presek Alg/S nosača bez kulture ( $\times 10000$ ) d) Alg/S nosači sa inkapsuliranom kulturom pre fermentacije ( $\times 10000$ ) e) izgled preseka Alg/S nosača sa inkapsuliranom kulturom pre fermentacije f) izgled inkapsuliranih kolonija na preseku nosača ( $\times 10000$ ) g) površinska morfologija nosača nakon fermentacije ( $\times 10000$ ) h) prikaz poprečnog preseka nosača nakon fermentacije i) glatka površina nosača nakon fermentacije sa ćelijama na površini ( $\times 10000$ ).

Sa dodatkom surutke nosači imaju pravilniji oblik u poređenju sa nosačima bez dodatka surutke. Površinska morfologija je glatkija sa nasumično raspoređenim ćelijama (Slika 5.16i).

Na slikama 5.15 i 5.16 je dat uporedni prikaz izgleda kalcijum-alginatnih nosača sa i bez dodatka surutke. Dodatak surutke je imao pozitivan uticaj na strukturu nosača, što se može videti na datim presecima nosača (Slika 5.15 b i Slika 5.16 e).

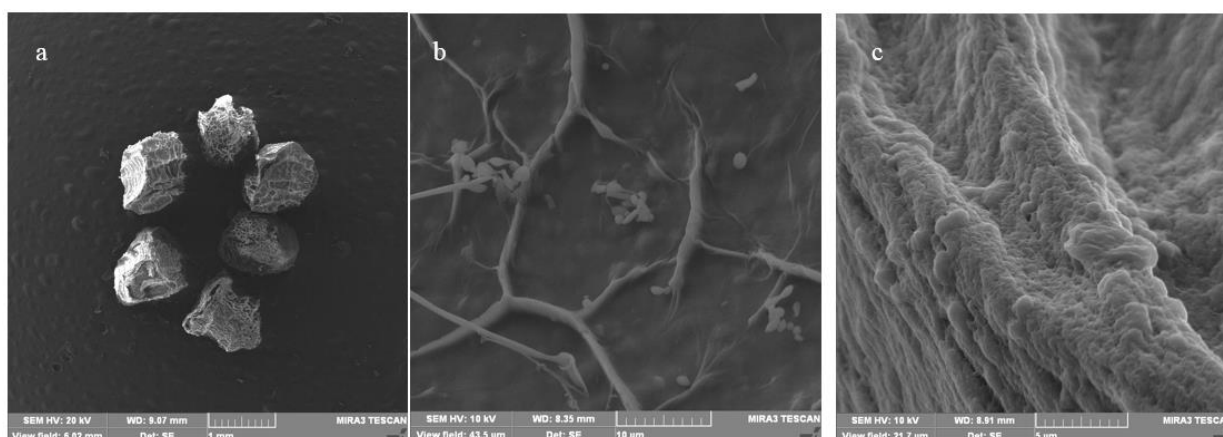
Na porečnom preseku nosača sa surutkom je kompaktnija struktura u poređenju sa strukturom čistog nosača koja je krtija. Prisutvo i raspored inkapsulirane kulture u oba nosača se vidi na slikama 5.16 c i 5.15 e. Na primeru nosača sa surutkom se vidi i veći broj kolonija prekrivenih slojem materijala što ukazuje i na veći afinitet bakterijskih ćelija prema alginatnom nosaču koji je obogaćen dodatkom surutke. Prisustvo laktoze u surutci u toku pripreme nosača imala je i dodatno krioprotektivno svojstvo. Značajni doprinos dodatka laktoze kao krioprotektanta u sistem pre inkapsulacije kulture postupkom liofilizacijom je opisan i u radovima (Nag & Das, 2013; Jofré i sar., 2015).



Slika 5.17. SEM mikrografija liofilizovanih Alg/S/P nosača sa inkapsuliranom kulturom, ( $\times 20000$ ) a) izgled nosača pre fermentacije ( $\times 20000$ ) b) mikrostruktura na preseku nosača ( $\times 20000$ ) c) izgled bakterijskih kolonija na segmentima preseka nosača ( $\times 20000$ ) d) izgled nosača nakon fermentacije ( $\times 20000$ ) e) prikaz delova površinske morfologije nosača nakon fermentacije ( $\times 20000$ ) f) raspored kulture na poprečnom preseku nosača nakon fermentacije ( $\times 20000$ ).

Prema slici 5.17. dodatak koncentrata proteina je imao pozitivan uticaj na očuvanje sfernog oblika nosača tokom procesa liofilizacije. Ova pojava se može objasniti uticajem proteina kao krioprotektanta koji zamenjuju molekule vode pri procesu sublimacije i na taj način omogućava da se u većoj meri zadrži prvobitna struktura hidrogel nosača. Takođe, prisustvo proteina surutke smanjuje veličinu kristala leda tokom procesa liofilizacije zbog čega je i prisustvo kulture zabeleženo u nosaču. Uticaj izolata proteina surutke na smanjenje veličine kristala leda dobijenih nakon sušenja smrzanjem je opisano u radu Chun i sar., 2012.

Poređenjem preseka mikrostrukture nosača sa i bez dodatka koncentrata proteina (Slika 5.16e i 5.17b) moguće je primetiti da je veća poroznost sistema kod nosača sa dodatkom koncentrata proteina što se odražava i na efikasnost postupka inkapsulacije. Za hidrogel sisteme veće poroznosti poželjno je oblagati ih kako bi se postigao zadovoljavajući stepen inkapsulacije kao i veća zaštita u proizvodnim procesima poput fermentacije kao i u simuliranim GI uslovima. SEM mikrografija nosača oblaganih hitozanom je data na slici 5.18.



Slika 5.18. SEM mikrografija liofilizovanih Alg/S/P nosača obloženih hitozanom ( $\times 20000$ ) a) izgled nosača nakon liofilizacije pre procesa fermentacije ( $\times 20000$ ) b) izgled površinske morfologije nosača pre fermentacije sa nasumično raspoređenom kulturom ( $\times 20000$ ) c) izgled površinske morfologije nosača nakon procesa fermentacije ( $\times 20000$ ).

Na osnovu datih slika (5.18a-c) oblaganjem nosača hitozanom je postignuta manja poroznost sistema i samim tim i kontrolisano otpuštanje kulture tokom procesa fermentacije. Kultura je na površini uglavnom izdvojena u odnosu na nosač što ukazuje da ovaj tip starter kulture nema afinitet prema ovom tipu materijala (Slika 5.18b). Nakon fermentacije na površini se može videti da je kultura prekrivena blagim slojem fermentacionog medijuma i da je površina hrapavija.

#### 5.1.4. Efikasnost inkapsulacije probiotske starter kulture u hidrogel nosače

Efikasnost inkapsulacije probiotske starter kulture u nosače je računat prema jednačini datoj u Odeljku 4.3.8. U tabeli 5.2. u nastavku je dat uporedni prikaz uticaja sastava nosača veličine (2,0-3,0 mm) na stepen inkapsulacije kulture. Takođe je dat i broj ćelija u nosačima nakon inkapsulacija. Odnos alginata i komponenti dodvanih u pripremi nosača je 60:40 %. Broj ćelija je određivan rastvaranjem 1g dobijenih nosača u 2,0 mas. % rastvoru natrijum-citrata i dobijeni rastvor je dalje korišćen za seriju razblaženja prema postupku opisanom u odeljku 4.3.8.

Tabela 5.2. Broj ćelija u nosačima nakon inkapsulacije log (CFU/g) i efikasnost postupka inkapsulacije starter kulture, %

<i>Vrsta nosača</i>	<i>Broj ćelija u nosačima nakon postupka inkapsulacije, log (CFU/g)</i>	<i>Efikasnost postupka inkapsulacije, EE, %</i>
<i>Alg</i>	6,79±0,05	77,75±1,50
<i>Alg/S</i>	7,95±0,01	92,41±0,11
<i>Alg/P</i>	7,52±0,02	87,44±2,10
<i>Alg/S/P</i>	7,63±0,14	88,72±0,10
<i>Alg/S (obloženi hitozanom)</i>	7,92±0,16	92,09±0,06
<i>Alg/S/P (obloženi hitozanom)</i>	7,66±0,02	89,07±0,08

Na osnovu datih rezultata za efikasnost postupka inkapsulacije, može se zaključiti da dodatak surutke i proteina surutke je imao pozitivan efekat na stepen inkapsulacije probiotske starter kulture. Pri čemu su nosači sa samo dodatkom surutke pokazali najbolje rezultate dok oblaganje hitozanom nije imalo značajan doprinos u tom pogledu ( $p > 0,05$ ). Uticaj oblaganja nosača je analiziran i na primerima drugih probiotskih kultura u alginatne sisteme i pokazao je da dodatak obloge nema značajan uticaj na efikasnost postupka inkapsulacije (Zanjani i sar., 2014).



Alginatni nosači bez dodatka surutke i proteina su pokazali i do 15 % manju efikasnost inkapsulacije. Nemogućnost uspostavljanja stabilnih veza između probiotskih kultura i strukture nosača je doprinela nižem procentu inkapsulacije starter kulture.

Literaturno je pokazano da alginat kao nosač ne stupa u interakciju sa ćelijskim kulturama nakon njihovog dodatka u rastvor alginata, zbog čega i dominiraju interakcije ćelija-ćelija, što dovodi do agregacije ćelija i stvaranja nehomogene mreže gela (Hadzieva i sar., 2017; Burgain i sar., 2013). Međutim, u prisustvu dodatog ligand modifikovanog alginata stvara se homogena mreža zbog specifičnih interakcija receptora-liganda i na taj način uspostavlja interakcija između strukture nosača i ćelija. Dodatak proteina surutke mehanički ojačava strukturu sa aspekta interakcija tako što ima ulogu liganda i omogućava ćelijsku adheziju, s obzirom na njegov potencijal za steričke i elektrostatske interakcije i sile kratkog dometa kao što su van der Waals, vodonične veze i biospecifične interakcije sa alginatom i ćelijama (Burgain i sar., 2013). Interakcija koja se ostvaruje između proteina surutke i inkapsulirane kulture je demonstrirana i FTIR spektrima prikazanih u odeljku 5.1.2. Afinitet inkapsulirane probiotske starter kulture prema nosačima obogaćenim surutkom i proteinima surutke se vidi na SEM slikama datim u poglavlju 5.1.3.

Doprinos dodatka koncentrata proteina na efikasnost postupka inkapsulacije je analiziran i sa aspekta variranja finalne koncentracije proteina u nosaču (Tabela 5.3). Finalna koncentracija alginata u pripremanim nosačima je 1,6 mas. %.

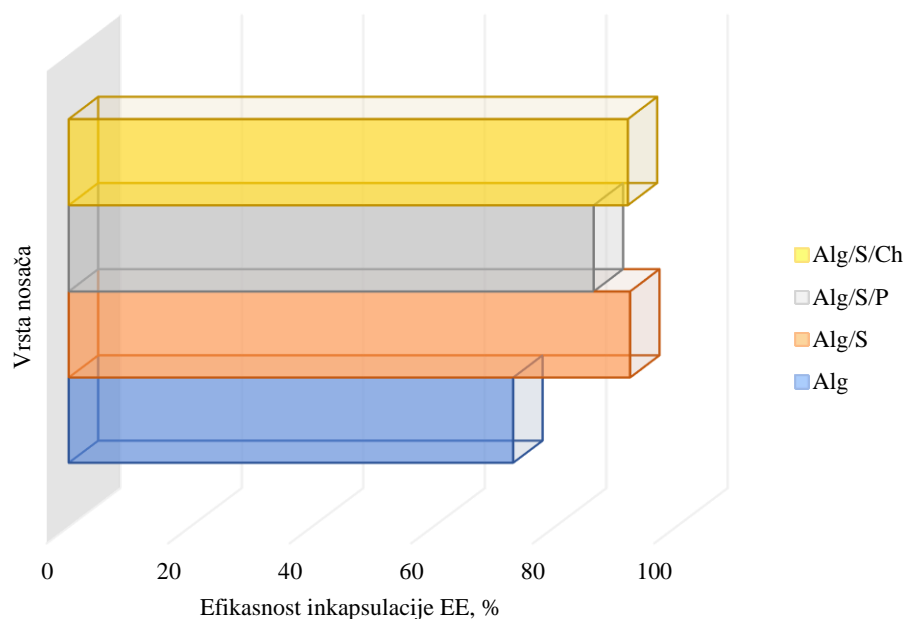
Tabela 5.3. Uticaj povećanja sadržaja koncentrata proteina u nosaču na efikasnost postupka inkapsulacije (EE, %)

<i>Vrsta nosača</i>	<i>Broj ćelija u nosačima nakon postupka inkapsulacije, log (CFU/g)</i>	<i>Efikasnost postupka inkapsulacije, EE, %</i>
<i>Alg/P (2,4 mas. %)</i>	7,52±0,02	87,44±3,10
<i>Alg/S/P (2,4mas. %)</i>	7,63±0,14	88,72±0,10
<i>Alg/P (4,8 % mas. %)</i>	7,58±0,02	88,14±0,08
<i>Alg/S/P (4,8 % mas. %)</i>	7,98±0,16	92,79±0,06

Xu i sar. (2016), su inkapsulirali *Lactobacillus casei* u nosače na bazi proteina graška i pokazali da proteinski sistemi mogu da pruže visok stepen inkapsulacije bakterijskih ćelija (85,69 %).

Çabuk i Harsa (2015), su inkapsulirali probiotsku kulturu *L. acidophilus* NRRL-B 4495 u nosače na bazi proteina surutke kao i u sisteme koji predstavljaju kombinaciju proteina surutke i polisaharida pululana i dobijene vrednosti za efikasnost inkapsulacije su iznosile 93,57 i 93,72 %, datim redom. Kao i u navedenoj literaturi i prema datim ekperimentalnim rezultatima datim u tabeli 5.3, sa povećanjem koncnetracije proteina u smeši se povećava efikasnost inkapsulacije kulture. U nosačima koji predstavljaju kombinaciju surutke i koncentrata proteina povećanje koncentracije koncentrata proteina nije imao statistički značajan uticaj na efikasnost inkapsulacije.

Takođe, analiziran je uticaj veličine nosača na stepen inkapsulacije probiotske starter kulture. U nastavku je dat pregled uticaja veličine nosača na efikasnost inkapsulacije (Slika 5.19).



Slika 5.19. Efiksantost postupka inkapsulacije probiotske starter kulture za nosače veličine ~ 800  $\mu\text{m}$ .

Na osnovu datih rezultat na slikama 5.18. i 5.19 je pokazano da veličina pripremanih nosača nema statistički značajan uticaj na efikasnost postupka inkapsulacije korišćenog tipa kulture.

### 5.1.5. Uticaj procesa fermentacije na strukturu hidrogel nosača i rast inkapsulirane kulture

Dobijeni hidrogel nosači sa inkapsuliranom kulturom se dodaju u fermentacioni medijum na bazi surutke i potom se prati rast probiotske starter kulture u sistemima kao i otpuštanje ćelija u toku fermentacije. Eksperimentalni rezultati pokazuju da dodatak proteina surutke u nosače ima pozitivan uticaj na zaštitu i rast kulture u uslovima definisanim fermentacijom. Zbog postepenog pada pH vrednosti medijuma u toku procesa fermentacije, primetne su promene i u strukturi nosača. Neke od vidljivih promena u mikrostrukturi su opisane i prikazane na SEM slikama u poglavlju 5.1.3. Uticaj fermentacije na rast ćelija je dat u tabeli 5.4. Dobijeni rezultati su poređeni i sa rezultatima za slobodnu kulturu u istim uslovima, pri čemu je i pokazan značaj primene ovih sistema u cilju zaštite bakterijski ćelija za pomenute uslove.

Tabela 5.4. Uticaj procesa fermentacije na rast inkapsulirane kulture u nosaču

Vrsta nosača	Broj ćelija u nosačima nakon postupka inkapsulacije, log (CFU/g)	Broj ćelija u nosačima posle fermentacije, log (CFU/g)
Alg	6,79±0,05	7,29±0,01
Alg/S	7,95±0,01	8,27±0,06
Alg/P	7,52±0,02	8,32±0,03
Alg/S/P	7,63±0,14	8,83±0,08
Alg/S (obloženi hitozanom)	7,98±0,16	8,47±0,29
Alg/S/P (obloženi hitozanom)	7,66±0,02	8,89±0,10

Pripremljeni su napici na bazi surutke i sa slobodnom ABY 6 kulturom i uočeno je da vremenski period trajanja fermentacije kraće sa slobodnom kulturom. Fermentacija slobodnom kulturom traje ~ 4,0 h dok sa inkapsuliranom kulturom traje ~5,5 h. Broj ćelija pre fermentacije slobodnom probiotskom starter kulturom iznosi 7,43±0,09 dok nakon fermentacije je dostignut broj 9,08±0,20 (log (CFU/mL)).

Na osnovu datih rezultat primetno je da čist kalcijum-alginatni nosač ima najmanji doprinos u cilju rasta i zaštite kulture tokom fermentacije. Najbolje rezultate su pokazali nosači Alg/S/P obloženi i neobloženi hitozanom. Kod pomenutih nosača se broj ćelija uvećao za  $1,22 \pm 0,02$ , što ukazuje i na afinitet inkapsulirane kulture prema korišćenim nosačima.

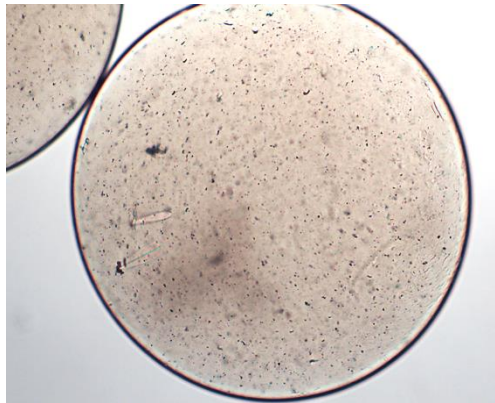
### 5.1.6. Bubrenje hidrogel nosača i otpuštanje inkapsulirane kulture tokom procesa fermentacije

Izlaganje nosača uslovima fermentacije ima uticaj na strukturu nosača. Promene u zapremini nosača pre i posle fermentacije su zabeležene pomoću optičkog mikroskopa. Zapremina nosača je izračunata na osnovu izmerenog prečnika nosača. Do promena u veličini nosača tokom fermentacije dolazi usled promena pH vrednosti fermentacionog medijuma u opsegu od 6,7 do 4,5. U ovom slučaju, za pH vrednosti medijuma iznad izoelektrične tačke alginata i proteina surutke (5,3 i 3,4-3,7, datim redosledom) uočeno je bubrenje hidrogel nosača usled čega je došlo do većeg otpuštanja ćelija iz nosača. Ispod izoelektrične tačke (pH=4,5), proteini surutke su pozitivno naelektrisani i stupaju u interakciju sa negativno naelektrisanim alginatom što ima pozitivan uticaj na kontrolisano otpuštanje inkapsulirane kulture u nosaču tokom fermentacije (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Bubrenje nosača sa i bez inkapsulirane kulture tokom procesa fermentacije

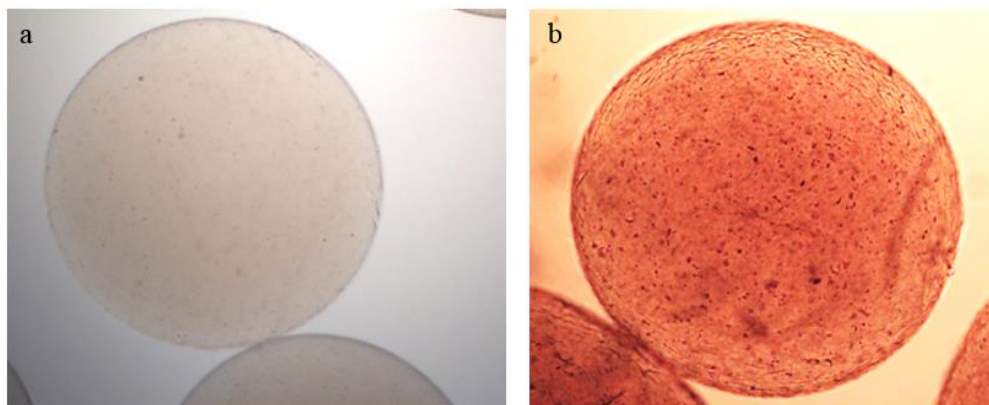
Vrsta nosača	Veličina nosača pre fermentacije	Veličina nosača nakon fermentacije
<i>Alg</i>	1,91±0,07	2,19±0,04
<i>Alg/S</i>	1,96±0,01	2,09±0,11
<i>Alg/P</i>	1,98±0,04	2,20±0,10
<i>Alg/S/P</i>	1,96±0,14	2,14±0,08
<i>Alg/S (obloženi hitozanom)</i>	2,18±0,06	2,23±0,09
<i>Alg/S/P (obloženi hitozanom)</i>	2,26±0,02	2,30±0,07

Uticaj promene pH rastvora na ponašanje sistema sa proteinom je takođe analiziran od strane Fioramonti i sar., (2014) i pokazana je pH osetljivost sistema u opsegu ispod i iznad izoelektrične tačke za korišćene proteine surutke. Dobijeni rezultati ukazuju da nosači sa koncentratom proteina kao i sa čistim alginatom najviše bubre u pomenutim uslovima. Takođe, rezultati potvrđuju da je do otpuštanja ćelija iz nosača došlo usled bubrenja ovih sistema tokom fermentacije. Na primerima nosača obloženih hitozanom, takođe je primetan porast veličine nosača ali manje nego u slučaju neobloženih kao i manji broj otpuštenih ćelija u medijumu (slika 5.20).



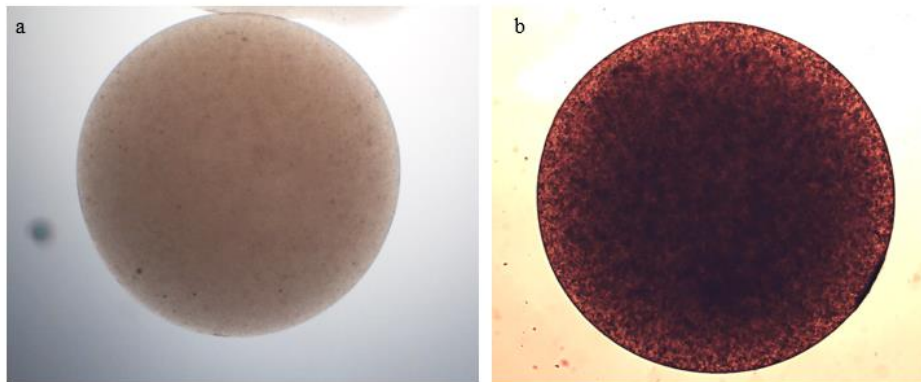
Slika 5.20. Izgled kalcijum-alginatnog nosača obloženog hitozanom.

Kako bi se uzeo u obzir i uticaj kulture na samu strukturu tokom fermentacije, pripremani su i kalcijum-alginatni nosači bez kulture i simuliran je uticaj fermentacije na nosače tako što je ispitivan nosač (čist kalcijum-alginat) bio potapan u medijum sa slobodnom kulturom. Promene u veličini i na površini nosača su date na slikama 5.21 i 5.22.

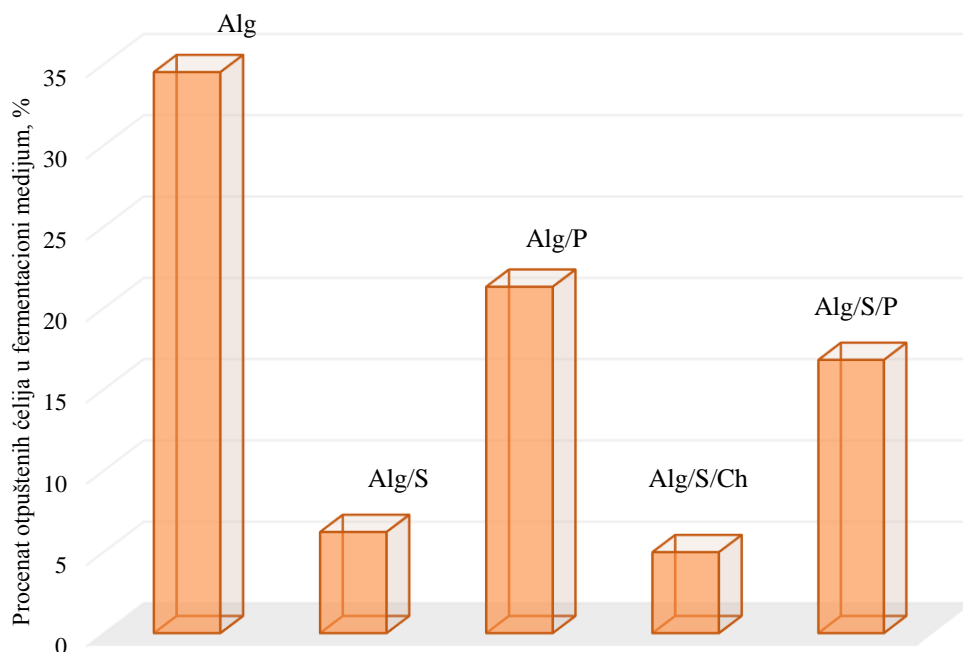


Slika 5.21. Izgled kalcijum-alginatnog nosača (Alg) a) pre fermentacije i b) posle fermentacije

Na površini nosača se mogu videti neravnine i mikrooštećenja kao posledica promene pH vrednosti medijuma tokom fermentacije. Povećanje broja ćelija pre i posle fermentacije se vidi na slici 5.22.



Slika 5.22. Izgled kalcijum-alginatnih nosača sa surutkom (Alg/S) sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom a) pre fermentacije b) posle fermentacije.



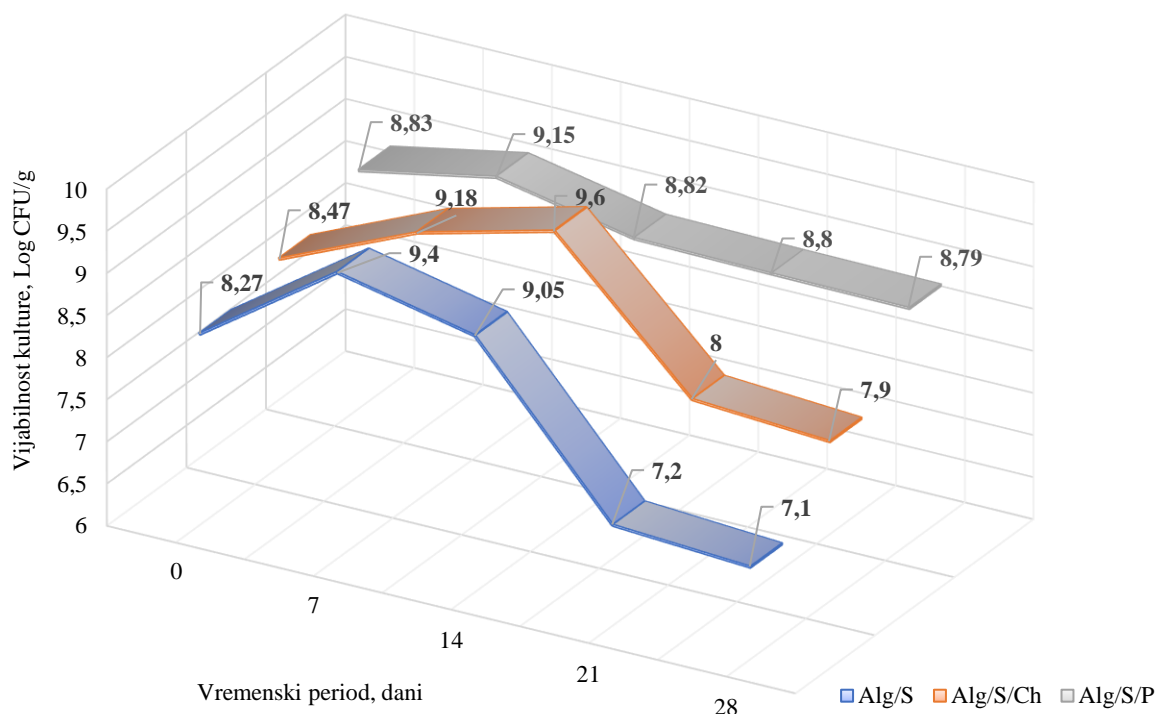
Slika 5.23. Procenat otpuštenih ćelija tokom procesa fermentacije u zavisnosti od vrste nosača

Na osnovu rezultata datih na slici 5.23. može se zaključiti da uslovi fermentacije imaju uticaj na otpuštanje ćelija iz nosača koji su obogaćeni koncentratom proteina surutke. Najveće otpuštanje je kod čistog kalcijum-alginatnog nosača, što je ujedno i posledica porozne strukture ovakvog tipa nosača.

Dodatak surutke je imao pozitivan efekat i unapredio je nosač sa aspekta kontrolisanog otpuštanja ćelija. Oblaganjem nosača hitozanom je statistički bez značaja ( $p < 0,05$ ) kada je u pitanju otpuštanje ćelija iz sistema tokom procesa fermentacije.

### 5.1.7. Vijabilnost probiotske starter kulture u hidrogel nosačima tokom skladištenja napitka na bazi surutke

Značaj hidrogel nosača sa aspekta očuvanja vijabilnosti kultura tokom skladištenja je prikazan na slici 5.24. Napici sa implemetiranom probiotskom kulturom su praćeni u vremenskom periodu od 28. dan, što je najčešće predviđen period čuvanja ovakvog tipa proizvoda na rafovima u hladnim uslovima. Oblaganjem nosača hitozanom je imalo pozitivan efekat na vijabilnost kulture u periodu skladištenja napitka. Nakon 21 dana, primetan je veći broj preživelih bakterija nego što je to slučaju u nosačima koji nisu obloženi. Ovi rezultatu su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima za inkapsulaciju probiotiskog soja *L. plantarum* u alginatnim česticama obloženim hitozanom (Trabelsi i sar., 2014).



Slika 5.24. Uticaj vremenskog perioda skladištenja proizvoda na vijabilnost inkapsulirane probiotske starter kulture u hidrogelovima implementiranim u napitak na bazi surutke.

Prema datim rezultatima oblaganje hitozanom nije imao značaj efekat na vijabilnost kulture tokom fermentacije ali je u periodu skladištenja omogućio preživljavanje inkapsulirane kulture u zadovoljavajućem broju duži vremenski period.

U poređenju sa druga dva tipa nosača, u nosačima sa hitozanom je najveći rast kulture zabeležen u prvih 14 dana, što znači da je oblaganjem nosača omogućena povoljnija mikrosredina i zaštita od neželjenih efekata okoline.

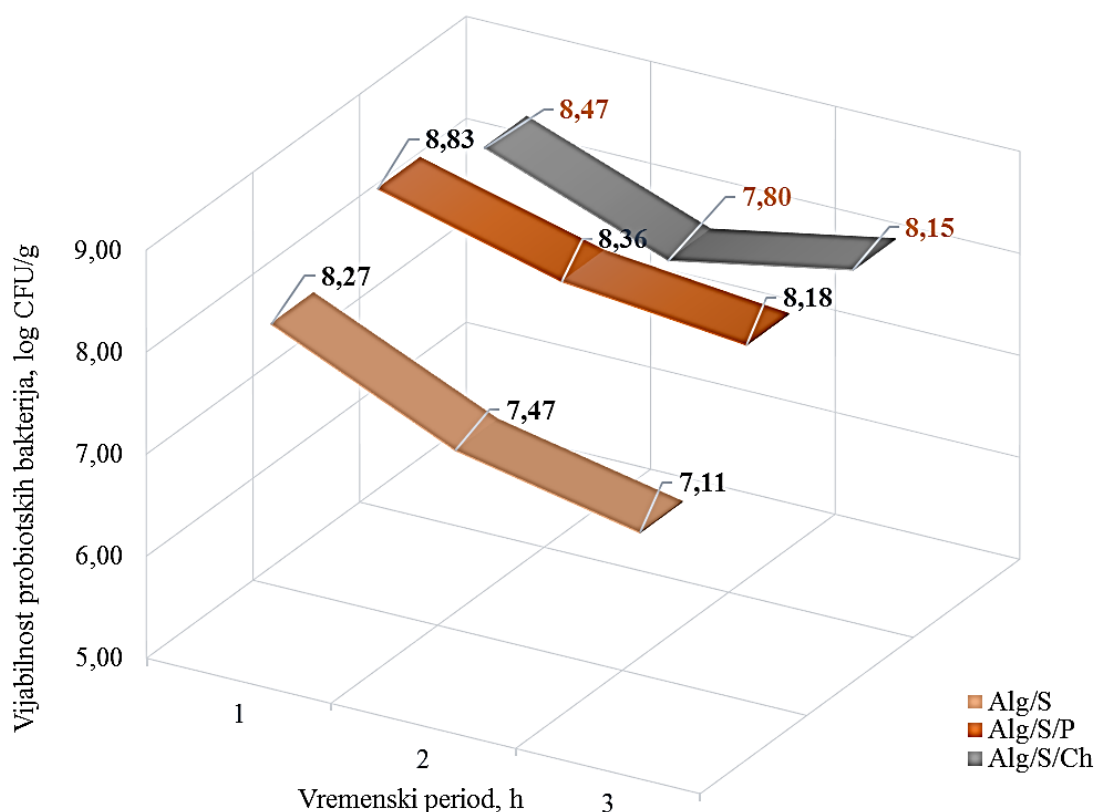
Nosači koji su pripremani sa dodatkom koncentrata proteina surutke su u prvih sedam dana skladištenja imali porast u broju ćelija za 0,32 ( $\Delta \log\text{CFU/g}$ ). Nakon ovog perioda je primetan blagi pad u broju ćelija da bi se u vremenskom intervalu zaključno sa 28. danom broj ćelija zadržavao skoro na istom broju. Ovaj tip nosača je omogućio umerenu fluktuaciju u broju ćelija u ispitivanom vremenskom intervalu što je od velikog značaja za deklarisanje napitaka sa implementiranim probiotskim ćelijama i pri tome se zadržava željeni broj ćelija kako bi ovi proizvodi mogli da imaju probiotski karakter. U nosačima sa dodatim koncentratom proteinima, nakon 28. dana je zabeležen najveći broj ćelija dok u nosačima koji nisu obloženi hitozanom najmanji.

#### **5.1.8. Uticaj inkapsulacije probiotske starter kulture u nosače na probiotski karakter proizvoda**

*In vitro* eksperimenti koji simuliraju uslove ljudskog GI trakta su pokazali da hidrogel sistemi koji su proteinsko-polisharidne strukture imaju veliki potencijal za zaštitu probiotskih kultura od štetnih efekata gornjeg GI trakta.

Probiotici su izloženi stresnim uslovima tokom: (1) fermentacije i (2) njihovog transporta kroz GI trakt, što bi moglo uticati na njihovu vijabilnost i funkcionalnost. Tokom prolaska kroz želudac, probiotske ćelije su izložene niskoj vrednosti pH usled čega može doći do oštećenje ćelijske membrane i proteina u njenom sastavu (Amund, 2016). Pored toga, prisustvo mlečne kiseline i drugih organskih kiselina u fermentisanim probiotskim proizvodima takođe smanjuje pH fermentacionog medijuma i imaju negativan efekat na bakterijske ćelije (Sanchez i sar, 2007). Na slici 5.25. su date logaritamske vrednosti broja vijabilnih probiotskih ćelija dobijenih u vremenskim intervalima na 2h u periodu od 4h izlaganja nosača u simuliranim uslovima.





Slika 5.25. Uticaj simuliranih GI uslova na vijabilnost probiotičkih bakterija u hidrogel nosačima u vremenskom intervalu od 4h.

Broj vijabilnih ćelija (*Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus acidophilus*) se smanjivao tokom prva dva sata (simulirani želudačni sok sa dodatkom pepsina, pH 2,5) za uzorke tipa Alg/S/Ch i Alg/S/P i pri tome ostao stabilan naredna dva sata (simulirana intestinalna tečnost sa pankreatinom i 0,3 % goveđe žuči, pH 7,0). Nosači obloženi hitozanom su pokazali preživljavanje 96,2 % dok nosači Alg/S/P i Alg/S 93,6 % i 85,9 % datim redosled nakon 4h simulacije GI u odnosu na početni broj ćelija dobijenih u nosačima nakon fermentacije (slika 5.25). Za sva tri tipa nosača je specifično da u prvih 2h dolazi do pada u broju ćelija pri čemu u nosačima koji su obloženi hitozanom je najbolje preživljavanje probiotičkih ćelija kao posledica zaštite alginatne strukture nosača koja podložna razgradnji u prisustvu enzima pepsina. Interakcije između lanaca pepsina i polisaharida sa nižom vrednošću izoelektrične tačke kao što je to slučaj sa alginatom su intenzivnije. Za razliku od alginata, hitozan kao i  $\beta$ -laktoglobulini (koji predstavljaju glavni sastojak proteina surutke), su otporaniji na napad pepsina (Lorieau i sar., 2018).

Rezultati pokazuju da je bolje preživljavanje u nosačima koji su obloženi a pripremani sa dodatkom proteina u poređenju sa onim koji nisu bili obogaćeni proteinom ili samo obloženi. U obloženim nosačima je primetan i blag porast ćelija nakon simuliranih uslova u prisustvu pankreatina i žučnih soli. Oblaganjem nosača hitozanom formira se kompleks hitozana sa alginatom koji smanjuje poroznost alginatnog nosača i samim tim i curenje inkapsulirane kulture i omogućava adekvatna vijabilnost u širokom opsegu pH. Chávarri i sar. (2010), su takođe pokazali da alginatni nosači obloženi hitozanom mogu pružiti adekvatnu zaštitu probiotskih bakterija (*L. gasseri* i *B. bifidum*) i preživljavanje u simuliranim GI uslovima.

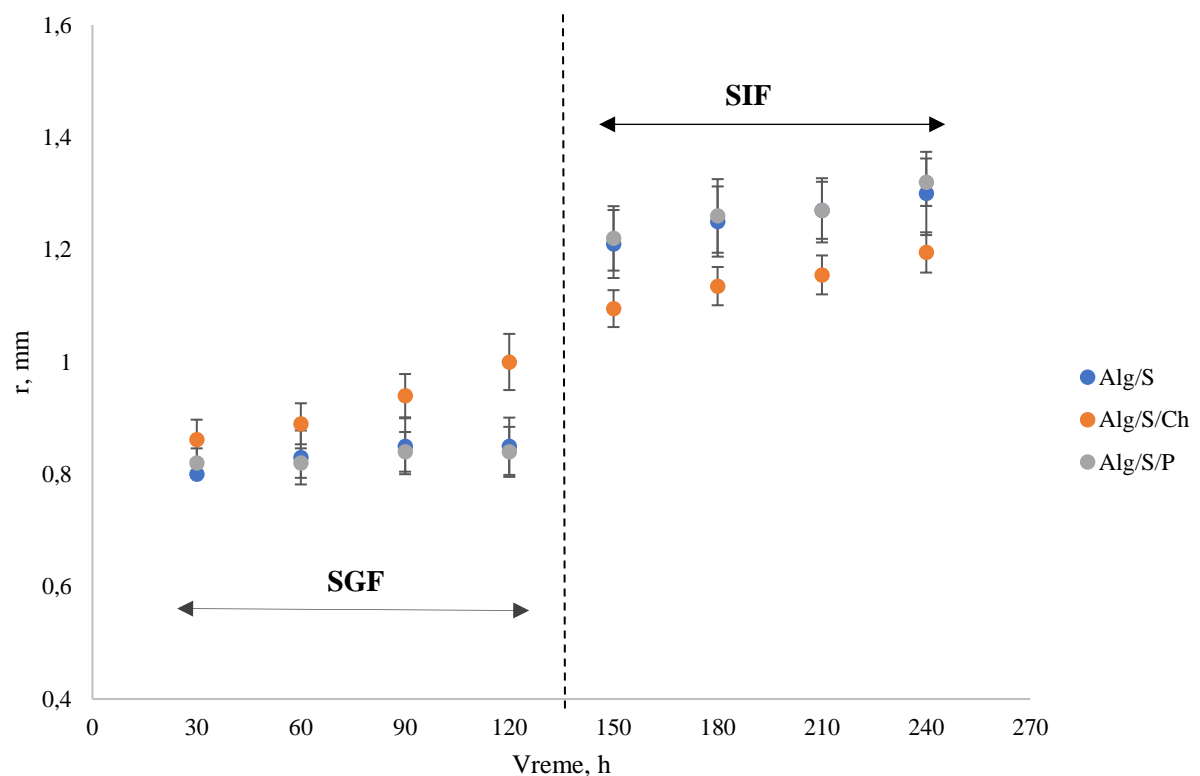
Takođe u nosačima sa dodatim proteinima nije značajniji pad u zadnja dva sata baš zbog pozitivnog uticaja proteina i na rast kulture. Manje fluktuaciju u broju ćelija kod nosača sa dodatim koncentratom proteina u analiziranom period je od velikog značaja jer se može na ovakvom tipu proizvoda garantovati skoro isti broj ćelija za vremenski period predviđen stajanjem na polici. Pad u broju ćelija u poslednjih dva sata za nosače tipa Alg/S/Ch i Alg/S/P je statistički zanemarljiv ( $p < 0,05$ ) što nije slučaj sa nosačima koji nisu obloženi ili dodatno obogaćeni proteinima. Na osnovu pokazanih rezultata može se zaključiti da oblaganjem nosača hitozanom kao i unapređenjem strukture nosača sa dodatkom proteina surutke može se pružiti adekvatna zaštita probiotskih ćelija u procesu fermentacije kao i u simuliranim GI uslovima.

Poređenjem dobijenih rezultata sa inkapsuliranom kulturom sa rezultatima za slobodnu kulturu, moguće je primetiti značajan doprinos postupka inkapsulacije u pogledu vijabilnosti kulture tokom simuliranih GI uslova. Krunić i sar., (2019) su pokazali da u istim simuliranim uslovima slobodne probiotske bakterije su preživele 37,4 % nakon 2h u simuliranim uslovim dok nakon 4h broj slobodnih vijabilnih bakterija je iznosi 25,7 %.

#### **5.1.9. Promena srednjeg prečnika nosača usled bubrenja u simuliranim gastro - intestinalnim uslovima**

Promene poluprečnika nosača sa inkapsuliranim ćelijama u odnosu na vremenski period koji su izložene simuliranim GI uslovima je data na slici 5.26. Za sve analizirane nosače je primetano skupljanje nosača u prvih 2h u gastričnom soku u prisustvu pepsina. Do ovakvih promena dolazi usled protonovanja karboksilne grupe alginata zbog čega nema odbijanja lanca i dolazi do skupljanja nosača odnosno smanjenja prečnika nosača.

Nosači koji su obloženi hitozanom se manje skupljaju u poređenju sa ne obloženim nosačima. Svi nosači su zadržali početni oblik nakon 2h provedenih u simuliranim gastrointestinalnim uslovima. Kod nosača koji su obloženi hitozanom je primetno veće bubrenje u simuliranim SGF uslovima, kao posledica protonovanja amino grupa hitozana do  $\text{NH}_3^+$  oblika. Nakon formiranja novog istoimenog naelektrisanja molekula polimera dolazi do stvaranja odbojnih sila između lanaca polimera i na taj način se povećava veličina nosača (Kim i sar., 2003). Takođe, usled prisustva proteina u nosaču je manje bubrenje nosača kao posledica interakcije između proteina i i alginata pri niskim vrednostima pH.



Slika 5.26. Uticaj gastro-intestinalnih uslova na promenu prečnika nosača u vremenskom intervalu od 4h.

Potapanjem nosača u stimilirane GI fluide u prisustvu enzima pankretina i žučnih soli može se uočiti da su nosači koji su obloženi hitozanom uglavnom zadržali početnu formu što i nije slučaj sa neobloženim nosačima. U slučaju neobloženih sistema povećano bubrenje se može objasniti difuzijom  $\text{Ca}^{2+}$  jona iz hidrogel mreže i formiranja soli kalcijum fosfata.

Uzimajući u obzir da su joni kalcijuma bitni za umrežavanje hidrogel strukture usled njihovog gubitka dolazi do smanjenja gustine umreženja zbog čega hidrogel mreže postaju fleksibilnije i samim tim se dolazi do relaksacija lanca i izlaganja hidrofilnih karboksilnih grupa i bubrenja gela (Bajpai i sar., 2006). Takođe u oblasti pH oko 7 alginat i proteini su istoimenog naelektrisanja usled čega dolazi do odbijanja lanaca i intenzivnijeg bubrenja nosača (Zhang i sar., 2016; Obradović i sar., 2019). Sa slike 5.26. se može primetiti da nosači sa dodatim proteinima više bubre u poređenju sa onim bez dodatih proteina.

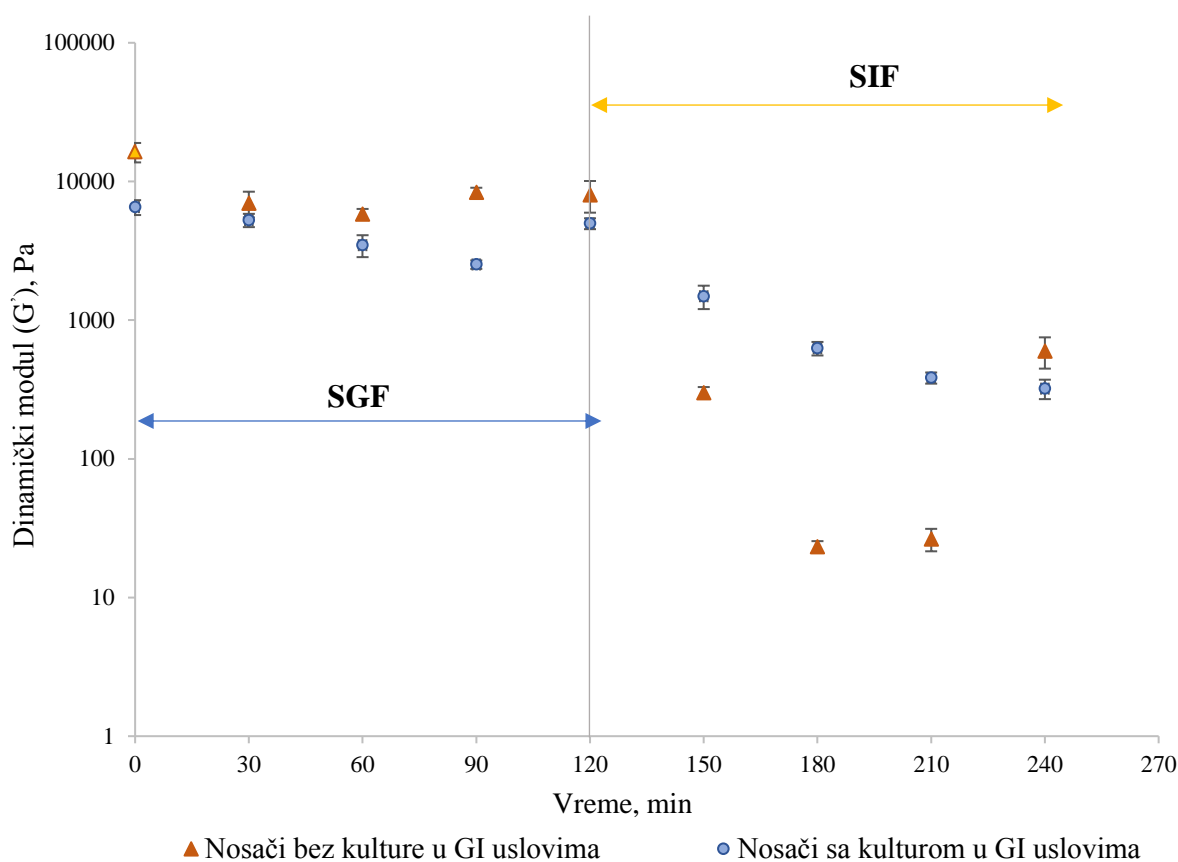
#### **5.1.10. Uticaj simuliranih gastro-intestinalnih uslova na reološko ponašanje hidrogel nosača**

Uzimajući u obzir da su nosači koji su obloženi hitozanom pokazali najbolja svojstva sa aspekta vijabilnosti i hemijske stabilnosti, analizirana su i reološka svojstva ovakvog tipa nosača u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima. Na osnovu dobijenih vrednosti dinamičkih modula je razmatran uticaj simuliranih sredina na reološko ponašanje nosača. Dobijene vrednosti za modul čuvanja (elastičnosti) ( $G'$ ) ukazuju na krutost materijala u posmatranim uslovima.

Smanjenje vrednosti modula elastičnosti kao i povećanje volumena nosača ukazuju na parcijalnu razgradnju nosača u razmatranim simuliranim uslovima. Do slabljenja nosača dolazi usled rasta ćelija, uslova procesa fermentacije kao i gastro-intestinalnih uslova. Uticaj rasta ćelija na mehanička svojstva nosača je kvantifikovan razlikom u vrednosti modula čuvanja koja iznosi 2 235 kPa poređenjem rezultata dobijenih za nosača sa i bez ćelija. Vrednosti za dinamički modul čuvanja ( $G'$ ) za nosače sa i bez kulture u analiziranim uslovima su dati na slici 5.27.

Na slici 5.27 se može videti pad u vrednosti modula za simulirane uslove gastričnog soka, pri čemu dobijene niže vrednosti za modul u slučaju hidrogel nosača sa inkapsuliranim ćelijama. Dinamički modul ( $G'$ ) se neznatno smanjuje tokom 1 h u gastričnim uslovima usled hidrolize polisaharida i proteina surutke u prisustvu enzima pepsina.

Efikasnost hidrolize polisaharida zavisi od: (1) broja glikozidnih veza koje koreliraju sa dužinom lanca i (2) fleksibilnosti lanaca. Hitozan kratkog lanca (korišćen u ovom radu) je otporniji od alginata zbog: (1) manjeg broja glikozidnih veza po lancu i (2) više izoelektrične tačke. Izoelektrična tačka: (1)  $\alpha$ -L-guluronske kiseline je 3,65 i  $\beta$ -D-manuronska kiselina je 3,38, a (3) za hitozan je 5,14 (Draget i sar., 1999; Kalliola i sar., 2017). Interakcije između lanaca pepsina i polisaharida su intenzivnije za molekule sa nižom vrednošću izoelektrične tačke kao što je alginat u poređenju sa hitozanom.  $\beta$ -laktoglobulin, glavni sastojak proteina surutke, otporan je na napad pepsina u njegovom prirodnom obliku (Lorieau i sar., 2018).



Slika 5.27. Uticaj gastro-intestinalnih uslova na vrednosti dinamičkog modula ( $G'$ ) za hidrogel nosače u vremenskom intervalu od 4h.

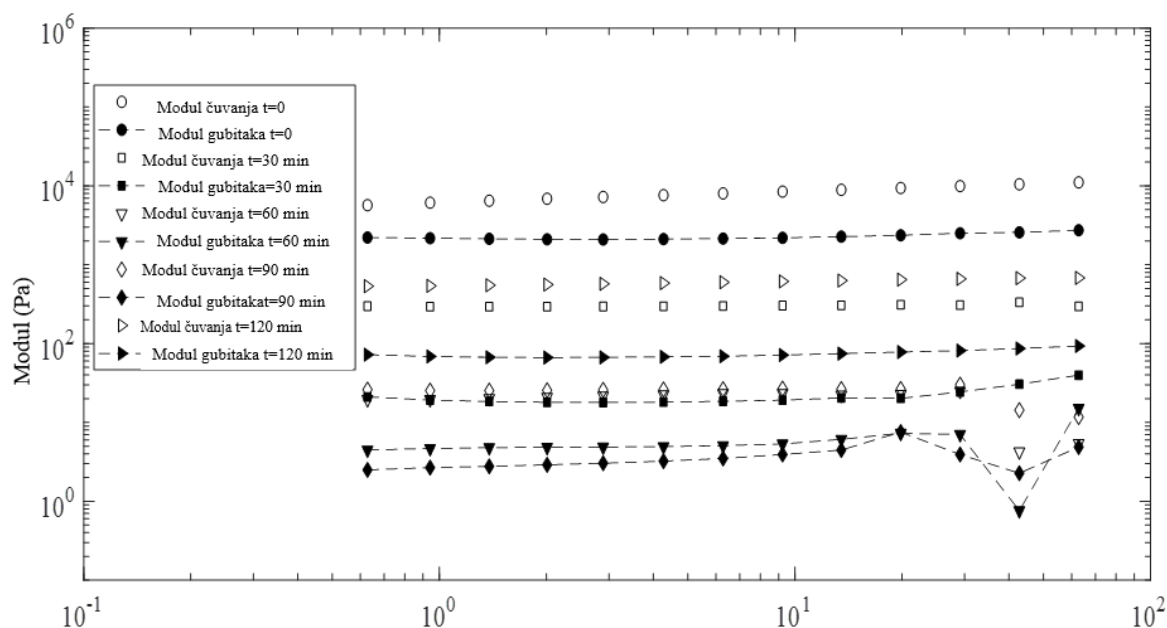
Sličan trend za modul čuvanja ( $G'$ ) je dobijen za nosače bez i sa ćelijama u simuliranim intestinalnim uslovima pri čemu je veći pad modula zabeležen za nosače bez ćelija. Takođe, mnogo je izraženiji pad navedenog modula za oba tipa nosača u simuliranim intestinalnim uslovima u poređenju sa gastričnim.

#### **5.1.11. Matematičko modelovanje reološkog ponašanja hidrogel nosača u gastro-intestinalnim uslovima**

Na primeru nosača obloženih hitozanom su razmatrane mehaničke karakteristike hidrogel nosača kako bi se dobila reološka konstitutivna modelna jednačina za opisivanje nepovratnih strukturnih promena u simuliranim GI uslovima. Nosači sa inkapsuliranim ćelijama pod želudačnim i intestinalnim uslovima kao i nosači bez ćelija u želudačnom soku zadovoljavaju dva reološka uslova: (1) modul čuvanja je veći od modula gubitaka, tj.  $G'(\omega) / G''(\omega) > 1$  koji ukazuje na viskoelastično ponašanje čvrstog materijala i (2) dinamički moduli se povećavaju sa uglom brzinom kao  $G'(\omega) \sim \omega^\alpha$  i  $G''(\omega) \sim \omega^\alpha$ , što ukazuje na anomalije pri disipaciji energije tokom strukturnih promena nosača. Prisutne anomalije disipacije energije kod nosače bez ćelija su uzrokovane (1) konformacijskim promenama krutih polielektrolitnih lanaca polisaharida i proteina (2) elektrostatičkim interakcijama spoljašnjih i unutrašnjih delova lanaca komponenti nosača.

Na disipaciju energije kod nosača sa inkapsuliranim ćelijama dodatno utiče i interakcija ćelija i nosača usled rasta inkapsuliranih ćelija. Anomalije u disipaciji energije tokom ovih strukturnih promena su opisane frakcionim derivatima primenom jednačina datih literaturom (Podlubny, 1999).

Na osnovu rezultat koji su dati na slici 5.28, može se uočiti da su nosači bez inkapsuliranih ćelija podložniji degradaciji u intestinalnim uslovima posle 60 min i 90 min.

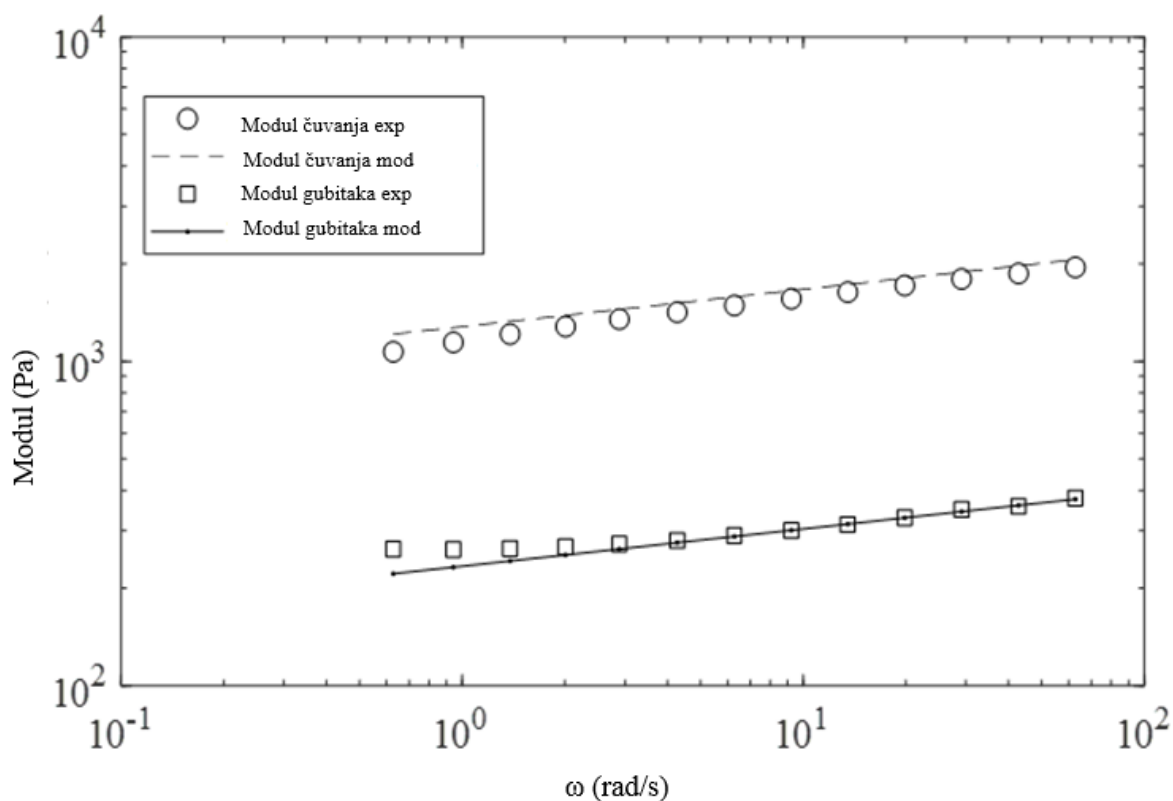


Slika 5.28. Zavisnost dinamičkih modula od ugaone brzine za nosače obložene hitozanom bez inkapsulirane kulture u vremenskom intervalu od 120 min u simuliranim intestinalnim uslovima.

Dobijeni rezultati ne zadovoljavaju drugi reološki uslov neophodan za matematičko modelovanje. Odstupanje za vrednosti  $G''(\omega) \sim \omega^a$  je posebno primetno za vrednosti pri većim ugaonim brzinama (Slika 5.28). Zbog navedenih odstupanja za modelovanje ovakvog tipa sistema je korišćena modifikovana frakciona Kelvin-Voigtova jednačina koja zadovoljava pomenute uslove za modelovanje reološkog ponašanja nosača.

Modifikovana jednačina Kelvin-Voigtovog modela je prethodno opisana u Odeljku 4.3.12. Dinamički moduli se upoređuju sa vrednostima dobijenim predviđanjima matematičkog modela. Predviđene vrednosti modula su izračunate primenom konstitutivne jednačine (2) date u prethodno pomenutom odeljku 4.3.12.

Na slici 5.29 su date eksperimentalne vrednosti kao i rezultati predviđanja postavljenog modela za slučaj nosača sa inkapsuliranim ćelijama nakon 30 min u simuliranim uslovima želudačnog soka. Predstavljene su samo rezultati za nosače sa inkapsuliranim ćelijama s obzirom da su i ostali analizirani sistemi pokazali slično reološko ponašanje.



Slika 5.29. Uporedni prikaz eksperimentalnih rezultata i vrednosti dobijenih primenom modela za hitozanom obložene nosače sa inkapsuliranom kulturom u simuliranim uslovima želudačnog soka u vremenskom intervalu od 30 min.

Sa slike 5.29 se može primetiti da vrednosti predviđene matematičkim modelom za nosače sa ćelijama dobro koreliraju sa eksperimentalnim podacima, uz relativnu grešku od 10 %. Predviđene vrednosti za dinamičke module su izračunate primenom jednačina datih u Odeljku 4.3.12. Dobijeni eksperimentalni rezultati su analizirani primenom metode najmanjih kvadrata.

Optimalne vrednosti parametara modela omogućavaju najbolje slaganje između eksperimentalnih podataka i predviđanja modela. Optimalni parametri modela dobijeni primenom pomenute metode omogućavaju najbolje poređenje sa eksperimentalnim podacima za nosače sa i bez inkapsuliranih ćelija. Parametri modela su dati u tabeli 5.6.



Tabela 5.6. Parametri modela koji opisuju viskoelastična svojstva nosača

<i>Nosači bez ćelija</i>			
<i>tečnost</i>	<b>vreme (min)</b>	<b><math>\eta</math>(Pas<sup>a</sup>)</b>	<b><math>\alpha</math> (-)</b>
<i>gastrični uslovi</i>	0	$(1.35 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.120 ± 0.002
<i>gastrični uslovi</i>	30	$(0.63 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.122 ± 0.002
<i>gastrični uslovi</i>	60	$(0.50 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.121 ± 0.002
<i>gastrični uslovi</i>	90	$(0.80 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.123 ± 0.002
<i>gastrični/intestinalni</i>	120	$(0.76 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.123 ± 0.002
<i>intestinalni</i>	150	$(0.020 \pm 0.002) \cdot 10^4$	0.125 ± 0.002
<i>intestinalni</i>	180	/	/
<i>intestinalni</i>	210	/	/
<i>intestinalni</i>	240	$(0.047 \pm 0.002) \cdot 10^4$	0.126 ± 0.002
<i>Nosači sa ćelijama</i>			
<i>tečnost</i>	<b>vreme (min)</b>	<b><math>\eta</math>(Pas<sup>a</sup>)</b>	<b><math>\alpha</math> (-)</b>
<i>gastrični uslovi</i>	0	$(0.59 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.133 ± 0.002
<i>gastrični uslovi</i>	30	$(0.63 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.132 ± 0.002
<i>gastrični uslovi</i>	60	$(0.30 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.131 ± 0.002
<i>gastrični uslovi</i>	90	$(0.18 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.131 ± 0.002
<i>gastrični/intestinalni</i>	120	$(0.44 \pm 0.02) \cdot 10^4$	0.130 ± 0.002
<i>intestinalni</i>	150	$(0.13 \pm 0.01) \cdot 10^4$	0.119 ± 0.002
<i>intestinalni</i>	180	$(0.045 \pm 0.002) \cdot 10^4$	0.118 ± 0.002
<i>intestinalni</i>	210	$(0.033 \pm 0.002) \cdot 10^4$	0.118 ± 0.002
<i>intestinalni</i>	240	$(0.025 \pm 0.002) \cdot 10^4$	0.117 ± 0.002

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da veće vrednosti efektivnog modula odgovaraju strukturi tvrdih nosača. Najtvrdža struktura odgovara nosačima bez ćelija pri  $t = 0$ . Rast ćelija tokom fermentacije indukuje slabljenje nosača što dovodi do smanjenja efektivnog modula za 2,28 puta. Enzimski indukovana parcijalna degradacija nosača dobijenih u gastričnim uslovima uzrokuje smanjenje efektivnog modula nosača sa i bez ćelija tokom prvih 60-90 min. Nakon toga se povećava efektivni modul usled inaktivacije pepsina izazvanog interakcijama sa alginatnim lancima.

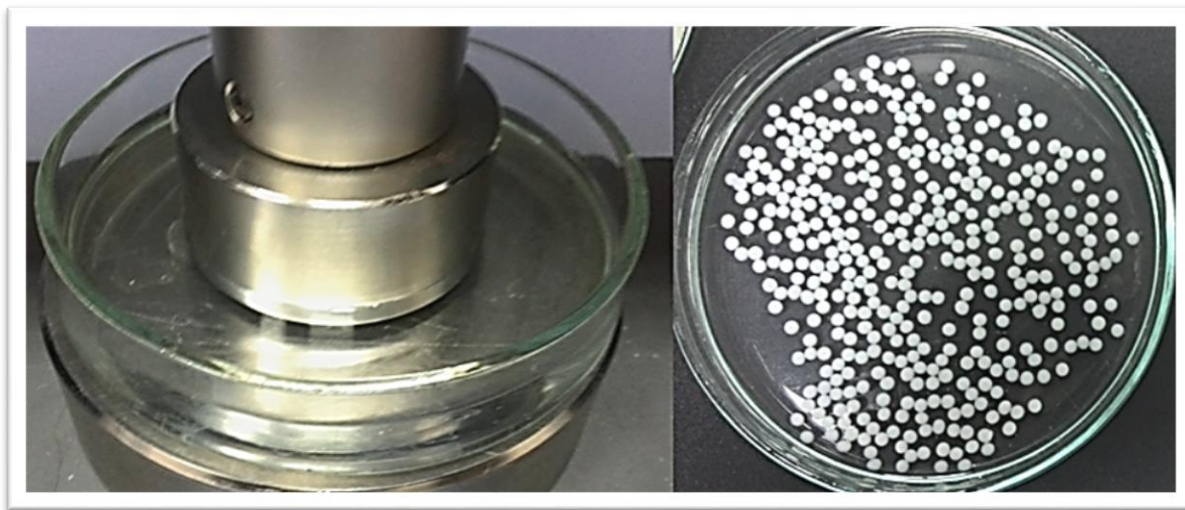
Efektivni modul za nosače sa i bez ćelija se smanjuje u simuliranim intestinalnim uslovima. Ovo smanjenje je intenzivnije na primeru nosača bez ćelija. Ovaj fenomen je uzrokovan nemogućnošću ćelija da formiraju stabilne adhezione kontakte sa proteinima surutke pod gastričnim uslovima. Efektivni modul nosača sa ćelijama je 1,88 puta veći nakon 2 h u intestinalnim uslovima.

Koeficijent prigušenja  $\alpha(t)$  predstavlja meru disipacije energije tokom nepovratnih strukturnih promena nosača. Ako je parametar  $\alpha(t) = 0$ , reološki odgovor nosača pod oscilatornim deformacijama je elastičan. Međutim, ako je parametar  $\alpha(t) \rightarrow 1$ , disipativni fenomen postaje dominantan. Veća vrednost parametra  $\alpha(t)$  ukazuje na intenzivniju degradaciju nosača. Shodno tome, viša vrednost parametra modela  $\alpha(t)$  se dobija za nosače bez ćelija u poređenju sa nosačima sa ćelijama pri  $t = 0$ . Enzimski izazvana degradacija nosača utiče na blago povećanje vrednosti parametar modela  $\alpha(t)$  u GI uslovima. Veće vrednosti parametra modela  $\alpha(t)$  dobijene su za iste nosače u intestinalnim uslovima u poređenju sa gastričnim uslovima. Usled prisustva ćelija u nosačima dolazi do unapređenja mehaničkih svojstava nosača u intestinalnim uslovima usled čega su приметne niže vrednosti parametra  $\alpha(t)$  u poređenju sa nosačima bez ćelija.

### 5.1.12. Mehaničke karakteristike hidrogel nosača sa i bez inkapsulirane kulture

U toku proizvodnih procesa hidrogel sistemi mogu biti izloženi različitim mehaničkim silama zbog čega je bitno da pomenuti sistemi poseduju odgovarajuća mehanička svojstva kako bi pružili adekvatnu zaštitu inkapsuliranoj kulturi što predstavlja njihovu primarnu ulogu. Ispitivanje mehaničkih karakteristika je urađeno primenom metode kompresije između dve ravne ploče pomoću uređaja AG-Xplus (Shimadzu, Japan). U postupku testiranja uzorka korišćena je merna ćelija opsega 0,01-100 N. Kompresija je izvedena do 30 % deformacije uzorka pri brzini kompresije 1-50 mm/min i temperaturi okoline od  $25 \pm 1$  °C.

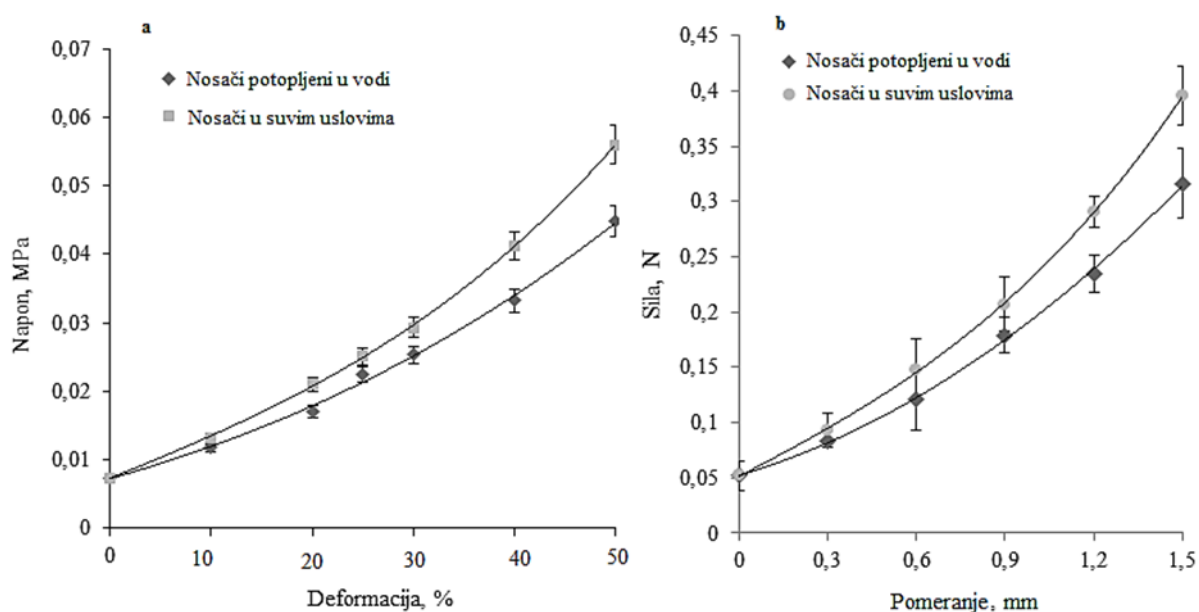
Uzimajući u obzir hidrogel strukturu nosača i veliki procentualni sadržaj vode u uzorcima, ispitivanja su obavljena potapanjem pojedinačnih nosača u vodu. U cilju adekvatne optimizacije ispitivanja, ispitani su i uzorci koji nisu bili potapani u vodu tokom kompresije (slika 5.30). Trideset uzoraka pojedinačnih čestica je testirano metodom kompresije i u sklopu metode je predviđen i pred-test koji podrazumeva automatsku detekciju kontaktne površine između ploče i uzorka pri sili od 0,1 N. Vrednosti za modul elastičnosti i maksimalne sile određene su na osnovu dobijenih inženjerskih krivih napona i deformacije kao i sile i deformacije.



Slika 5.30. Kompresija hidrogel nosača potapanjem pojedinačnih hidrogel uzorka u destilovanu vodu u Petri šolji.

Mehaničke osobine hidrogelova su takođe prethodno ispitivane metodom kompresije potapanjem uzoraka u destilovanu vodu i na sobnoj temperaturi (Obradović i sar., 2015; Chan i sar., 2011; Tomović i sar., 2015).

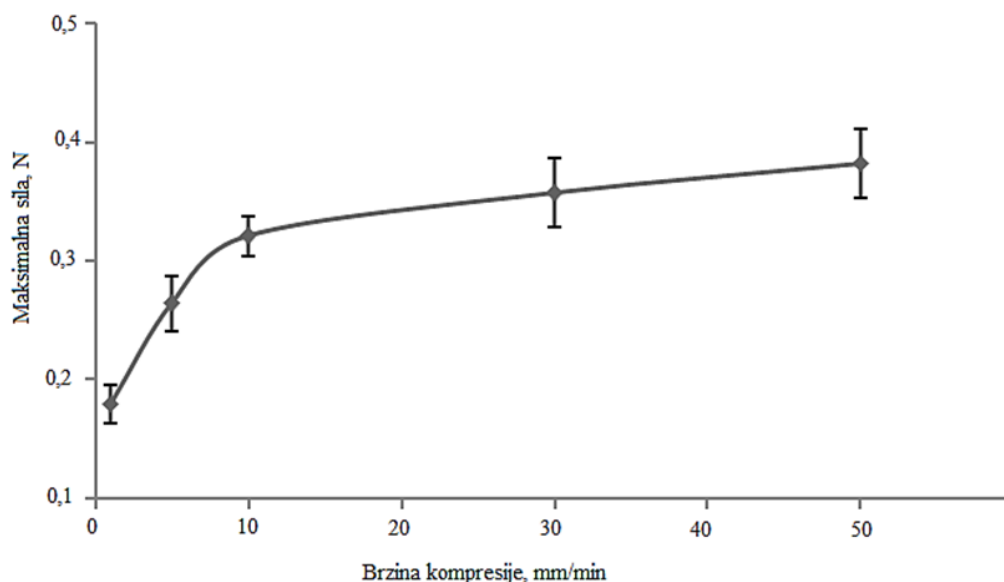
Tomović i sar., (2015), su uradili niz eksperimenata gde je pokazano da brzina kompresije uzoraka ima značajan uticaj na mehanička svojstva nosača. Na osnovu dobijenih rezultata je demonstrirano da se hidrogel nosači različito ponašaju prilikom ispitivanja mehaničkih svojstava u suvim i vlažnim uslovima. Usled gubitka sadržaja vode s vremenom uzorci ispitivani u suvim uslovima su veće čvrstoće u poređenju sa onim u vodenoj sredini (slika 5.31). Eksperimentima je utvrđeno da je u slučaju hidrogel uzoraka neophodno uraditi ispitivanje u vodenoj sredini kako bi se dobili što merodavniji rezultati za ovaj tip materijala.



Slika 5.31. Dijagrami zavisnosti a) napona od deformacije b) sile od pomeranja hoda klipa za kalcijum-alginatne nosače pri brzini kompresije od 1 mm/min i deformaciji uzorka od 50 %.

Za ispitivane hidrogel uzorke je definisana kontaktna sila 0,05 N pri kojoj je se ostvaruje kontakt između cilindričnog klipa i uzorka. Navedena vrednost kontaktne sile je ustanovljena na osnovu ispitivanja velikog broja uzoraka gde je u trenutku kontakta uzorka primetan nagli rast sile i vizuelno potvrđen kontakt za uvek isto rastojanje klipa od uzorka na početku eksperimenta. U trenutku kada se dostigne pomenuta sila kreće kompresija uzorka za zadatu deformaciju zbog čega i dati dijagrami kreću od 0,05 N (slika 5.31).

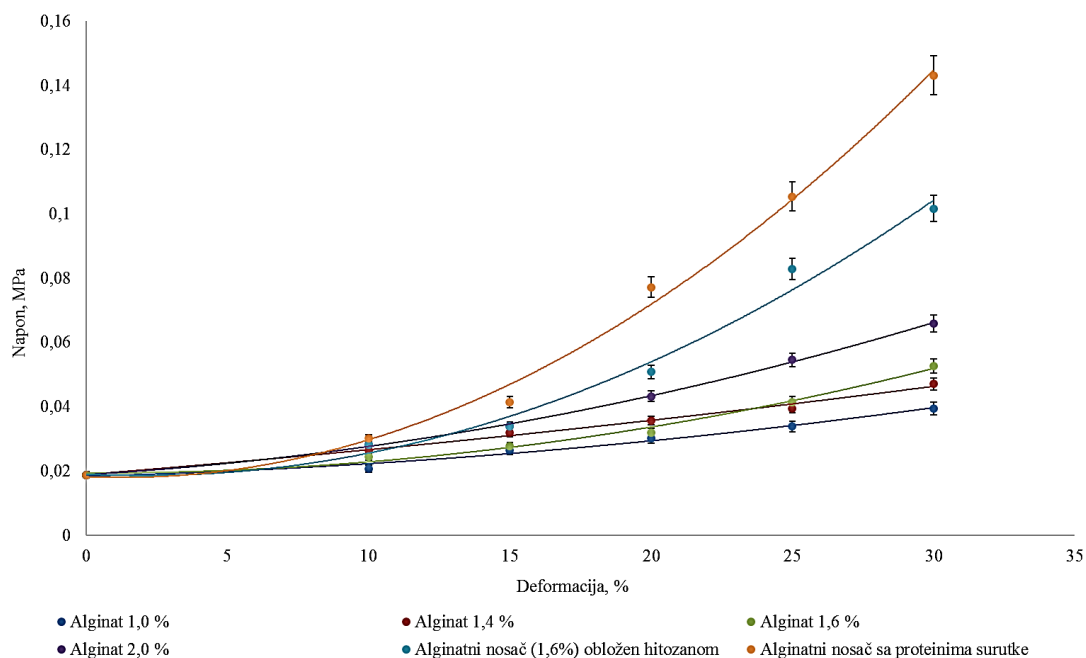
Povećanjem brzine kompresije hidrogel uzorka raste i odgovor materijala za isti stepen deformacije nosača. Primenom brzine kompresije veće od 30 mm/min dolazi do stagnacije u rastu modula elastičnosti materijala. Na slici 5.32 je data zavisnost maksimalne sile od brzine kompresije (1-50 mm/min) za kalcijum-alginatne nosače potopljene u vodi.



Slika 5.32. Zavisnost maksimalne sile od brzine kompresije za kalcijum-alginatne nosače pri deformaciji uzorka od 30%.

Na slici 5.33. su dati rezultati za vrednost napona hidrogel nosača u zavisnosti od deformacije uzorka za različite tipove nosača pri čemu je uzeta u obzir koncentracija alginata, dodatak koncentrata proteina surutke i da li su nosači obloženi hitozanom. S obzirom da je definisana kontaktna sila 0,1 N, dobijene krive zavisnosti sile od deformacije počinju od vrednosti sile 0,1 N.

Na osnovu datih rezultata najveći doprinos na čvrstoću nosača ima dodatak koncentrata proteina surutke. Pozitivan uticaj dodatka proteina može se objasniti afinitetom proteina surutke da grade gel strukturu u prisustvu  $\text{Ca}^{2+}$  jona (Chen i sar., 2006; Messaoud i sar., 2015). Takođe, Ouwerx i sar., 1998, su pokazali da koncentracija polimera ima uticaj na mehanička svojstva hidrogelova, pri čemu je primetan rast modula elastičnosti sa povećanjem koncentracije alginata.



Slika 5.33. Uticaj koncentracije alginata, dodatka surutke i oblaganja hitozanom na vrednost napona za hidrogel nosače pri deformaciji uzorka od 30 %.

Ispitivani hidrogel uzorci imaju viskoelastično ponašanje zbog čega su nagibi određeni u oblasti krivih koja odgovara elastičnom ponašanju materijala (za deformacije u opsegu 10-20 %). Usvojeni opseg je u saglasnosti sa već definisanim granicama za elastičnost ovog tipa materijala (Kostov i sar. 2010; Chan i sar. 2011). Modul elastičnosti je određen na osnovu nagiba inženjerskih krivih zavisnosti napona i deformacije uzorka u linearnoj oblasti. Za krive koje imaju nelinearno ponašanje, modul elastičnosti je izračunat primenom softvera uređaja povlačenjem tangente na krivu u pomenutom opsegu deformacije uzorka. Rezultati za modul elastičnosti su dati u Tabeli 5.7.

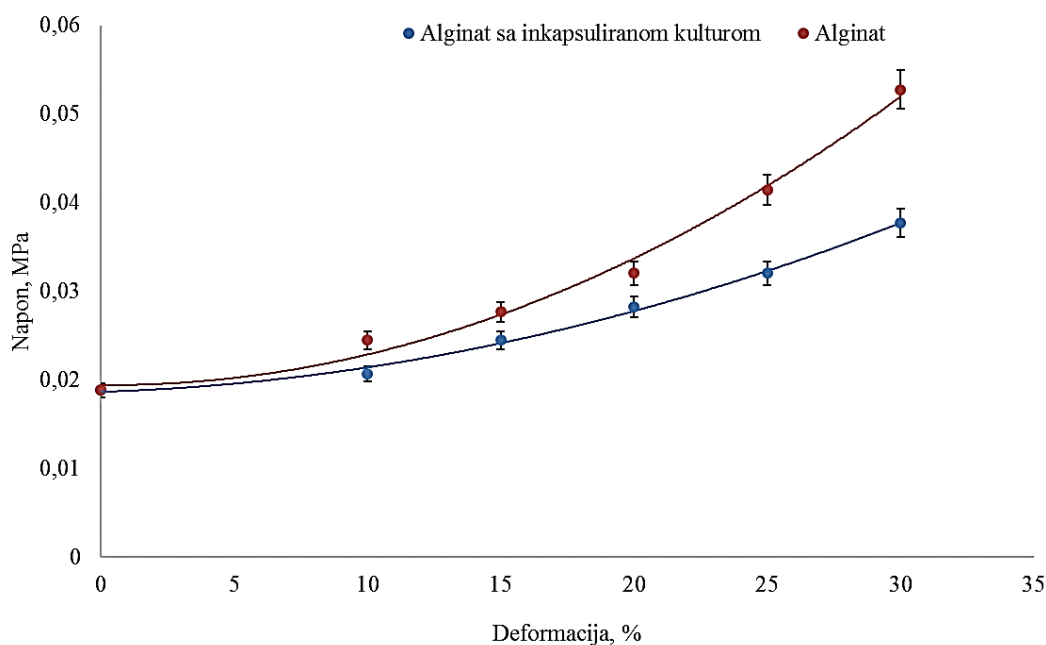
Tabela 5.7. Vrednosti modula elastičnosti za kalcijum-alginatne nosače prečnika ~ 2,60 mm pri deformaciji od 30 % pripremljenih sa različitim koncentracijama rastvora natrijum-alginata.

Koncentracija kalcijum-alginatnih nosači (mas. %)	Modul elastičnosti (MPa)
1,0	0,0384±0,0028
1,4	0,0438±0,0067
1,6	0,0476±0,0049
2,0	0,0478±0,0057

Dobijeni rezultati ukazuju da sa povećanjem koncentracije alginata raste i vrednost modula elastičnosti, pri čemu se daljim povećanjem koncentracije alginata u suspenziji ( $> 1,6$  mas. %) ne dolazi do značajnog povećanja modula elastičnosti materijala. Pri koncentraciji natrijum-alginata od 1,6 mas. % se dobijaju hidrogel nosači zadovoljavajuće sferičnosti, što nije slučaj za nosače pripremane sa koncentracijom alginata od 2,0 mas. %. Izgled nosača za dva prethodno pomenuta uzorka (1,6 i 2,0 mas %) može se videti u odeljku 5.1.1.

### 5.1.12.1. Uticaj inkapsulirane kulture na mehanička svojstva nosača

Nakon inkapsulacije kulture u hidrogel nosače dolazi do promena u mehaničkim svojstvima nosača. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da inkapsulacijom kulture u čiste kalcijum-alginatne nosače dolazi do opadanja čvrstoće hidrogel nosača. Fenomen opadanja čvrstoće hidrogel sistema se može objasniti prisustvom odbojnih interakcija između slobodnih delova alginatnih lanaca i negativno naelektrisane ćelijske membrane inkapsulirane kulture (Pajić-Lijaković i sar., 2015). Promene u vrednosti napona za nosače pripremane sa natrijum-alginatom koncentracije 1,6 mas. % su dati na slici 5.34.

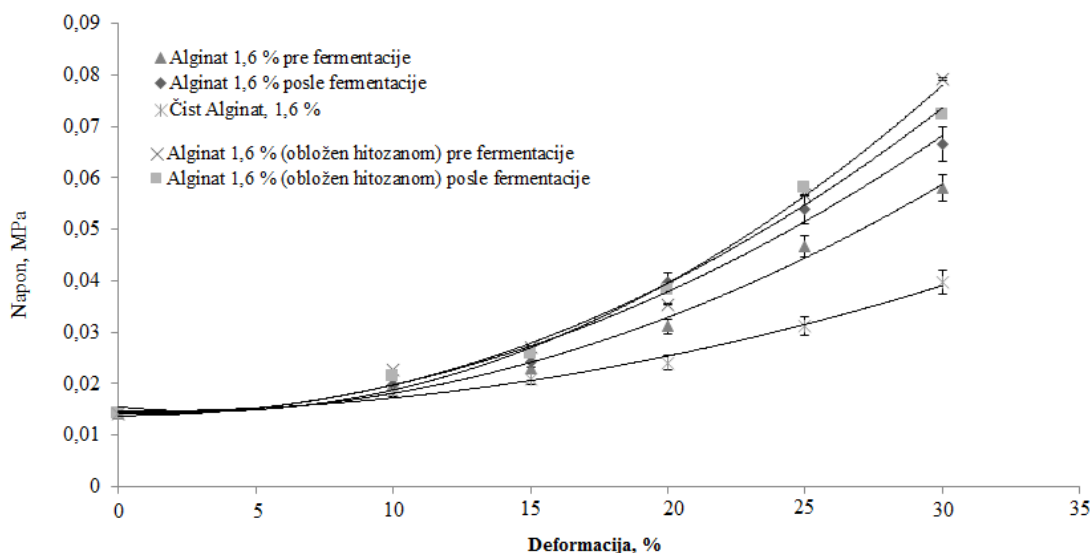


Slika 5.34. Uticaj inkapsulirane kulture na mehanička svojstva nosača (pripremani sa natrijum-alginatom koncentracije 1,6 mas %), metoda kompresije pri brzini 1,0 mm/min.

Sa slike 5.34. se može uočiti pad vrednosti napona pri deformaciji od 30 % za nosače sa kulturom u poređenju sa onim bez ćelija. Usled rasta inkapsulirane kulture u šupljinama nosača kao što je dato na SEM slikama u poglavlju 5.1.3, dolazi do narušavanja strukture nosača i pojave odbojnih sila između strukture nosača i inkapsulirane kulture. Veći afinitet kulture prema nosaču je primetan kod nosača sa dodatkom surutke i proteina surutke. Usled većeg afiniteta kulture prema obogaćenim nosačima dolazi do rasta čvrstoće tog tipa nosača usled adhezije ćelija za prisustne proteine. Interakcije između proteina i probiotskih ćelija su analizirane u novijim studijama te tematike i pokazno je da probiotske ćelije imaju afinitet prema proteinima surutke i da dolazi do njihovog vezivanja za taj tip supstrata usled postojanja elektrostatičkih interakcija (Soukoulis i sar., 2017; Burgain i sar., 2013). Na osnovu dobijenih inženjerskih krivih određeni su moduli elastičnosti pri čemu je nakon inkapsulacije kulture primetan ne statistički značajan pad u vrednosti modula elastičnosti ( $p < 0,05$ ). Vrednosti modula elastičnosti pre inkapsulacije iznosi  $0,0476 \pm 0,0049$  MPa dok posle inkapsulacije  $0,0435 \pm 0,0719$  MPa.

### 5.1.12.2. Uticaj procesa fermentacije na mehanička svojstva hidrogel nosača

Pripremljeni hidrogel sistemi sa inkapsuliranom kulturom su bili izlagani uslovima fermentacije i pratile su se promene u mehaničkim svojstvima nosača kao posledice promena u pH vrednosti medijuma i porasta broja ćelija u hidrogel sistemima u datim uslovima. Na slici 5.35 su prikazane inženjerske krive zavisnosti napona od deformacije za Alg/S i Alg/S/Ch nosače pre i posle procesa fermentacije.

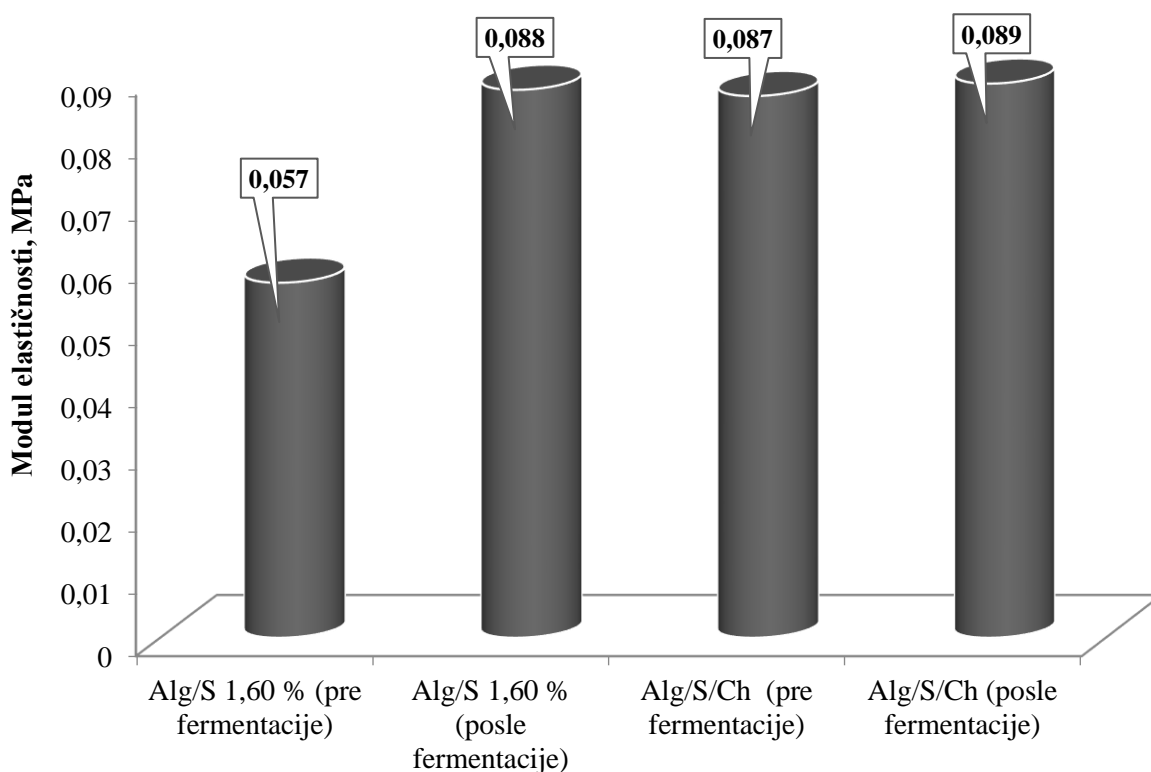


Slika 5.35. Zavisnost napona od deformacije za hidrogel nosače pre i posle fermentacije na bazi surutke.



Rezultati ukazuju da značajnu ulogu u promeni mehaničkih karakteristika ima interakcija između fermentacionog medijuma i nosača. Poređenjem rezultata čistih nosača i nosača sa dodatkom surutke i kulture može se zaključiti da dodatak surutke ima pozitivan uticaj na mehanička svojstva nosača i samim tim i na stabilizaciji hidrogel sistema. Ovaj efekat se može objasniti sposobnošću proteina surutke da formiraju gel sa alginatnim lancima u prisustvu jona  $\text{Ca}^{2+}$ . Ovaj tip gela nastaje kao rezultat dimerne asocijacije regiona guluronske kiseline sa  $\text{Ca}^{2+}$  jonima (Wichchukit i sar., 2013, Chen i Subirade, 2007).

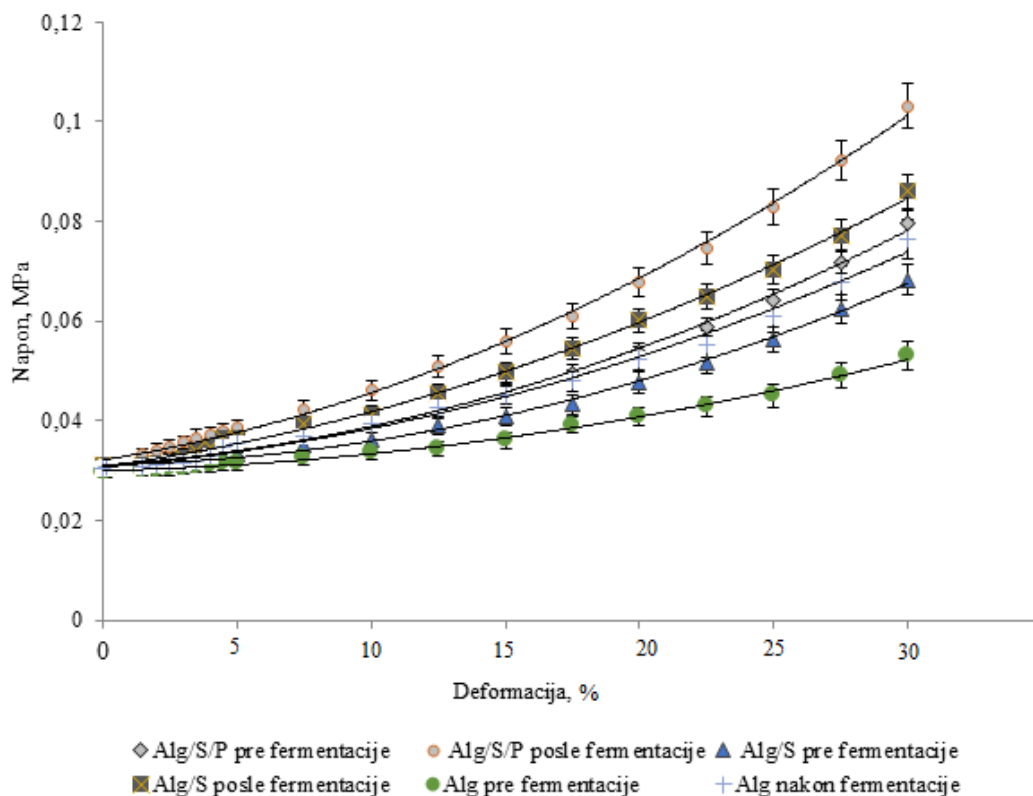
pH je takođe važan faktor tokom procesa fermentacije i utiče na mehaničku stabilnost hidrogel strukture. Proteini iz mleka i surutke su pH osetljivi i mogu pospešiti proces geliranja u opsegu pH 4,5–5,5 (Turgeon i Beaulieu, 2001). Poređenjem rezultata dobijenih za napon pre i posle fermentacije, može se zaključiti da je proces fermentacije uticao na povećanje čvrstoće hidrogel nosača. Modul elastičnosti nosača je izračunat iz nagiba inženjerskih krivih zavisnosti napona od deformacije (slika 5.36).



Slika 5.36. Modul elastičnosti hidrogel nosača (Alg/S) i (Alg/S/Ch) pre i posle fermentacije.

Vrednosti za modul elastičnosti su veće nakon fermentacije što ukazuje da sam proces i fermentacioni medijum imaju uticaj na mehanička svojstva hidrogel sistema. Fermentacioni medijum sastava 70 mas. % surutke i 30 mas. % mleka ima značajnu ulogu pre svega zbog prisustva jona kalcijuma koji dodatno podstiču geliranje u prisustvu nosača na bazi alginata.

Takođe, razmatran je i doprinos dodatka koncentrata proteina surutke na mehanička svojstva nosača kao i uticaj uslova fermentacije na ovaj tip hidrogel sistema. Na slici 5.37. su date inženjerske krive zavisnosti napona od deformacije za nosače obogaćene proteinima. Rezultati ukazuju da je njihov dodatak imao pozitivan efekat na mehanička svojstva sistema. Joni kalcijuma  $\text{Ca}^{2+}$  iz medijuma kao i promene pH su uticale na hemijske interakcije proteina i alginata. Glavni sastojak koncentrata proteina,  $\beta$ -laktoglobulin, stupa u interakciju sa natrijum-alginatom i formira nerastvorni kompleks na  $\text{pH} = 4$ , gde proteini i polisaharidi imaju suprotne električne naboje (Harnsilavat i sar., 2006, Fioramonti i sar., 2014). Ovaj tip interakcija je pozitivno uticao na povećanje mehaničke čvrstoće nosača.



Slika 5.37. Uticaj procesa fermentacije na mehanička svojstva nosača sa i bez dodatka koncentrata proteina (inženjerske krive zavisnosti napona od deformacije).

Uspostavljanje novih veza tokom fermentacije je analizirano u odeljku 5.1.2, gde je primenom FTIR analize prikazano građenje novih veza koje su se u ovom slučaju pozitivno odrazile i na mehanička svojstva nosača.

Na slici 5.37. su date krive i za alginatne nosače bez dodatka surutke i proteina i primetan je isti trend kao što je slučaj i sa ostalim nosačima, odnosno nakon fermentacije su dobijeni čvršći nosači kao posledica interakcije jona kalcijuma i alginatne strukture nosača sa inkapsuliranom kulturom. Vrednosti za modul elastičnosti su prikazane tabelarno (Tabela 5.8).

Tabela 5.8. Vrednosti za modul elastičnosti hidrogel nosača (Alg, Alg/S i Alg/S/P) pre i nakon fermentacije.

<b>Tip nosača</b>	<b>Modul elastičnosti (MPa)</b>
Alg/S/P (pre fermentacije)	0,052±0,003
Alg/S/P (posle fermentacije)	0,086±0,004
Alg/S (pre fermentacije)	0,042±0,002
Alg/S (posle fermentacije)	0,064±0,003
Alg (pre fermentacije)	0,043±0,071
Alg (posle fermentacije)	0,048±0,006

Prema rezultatima datim u tabeli 5.8, dobijene su najmanje vrednosti za modul elastičnosti na primeru nosača koji su pripremani samo sa alginatom uz dodatak kulture, što ukazuje da proces fermentacije nije statistički značajno uticao na ovaj tip hidrogel nosača. Znatno povećanje vrednosti modula elastičnosti je zabeleženo u slučaju nosača koji su obogaćeni sa dodatkom surutke ili kombinacijom surutke i koncentrata proteina surutke.

## 5.2. Karakterizacija nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom dobijenih tehnikom sprej-sušenja

Sprej-sušenje je najčešće korišćeni postupak za inkapsulaciju probiotskih kultura u prehrambenoj industriji jer se svrstava u ekonomski najisplativije tehnike (Martin i sar., 2015). Polisaharidi poput pektina (Nualkaekul i sar., 2013), hitozana (Cook i sar., 2011; Lin i sar., 2008), skroba (Sabikhi i sar., 2010) i natrijum alginata (Amine i sar., 2014) su najčešće korišćeni za mikroinkapsulaciju BMK primenom tehnike sprej-sušenja. Tehnika sprej-sušenja omogućava brzu inkapsulaciju kulture u industrijskim uslovima ali nedostatak ove metode se ogleda u uticaju povišenih temperatura na vijabilnost kulture zbog čega je neophodna optimizacija procesa kao i obogaćenje nosača komponentama koje bi pružile zaštitu probiotskim kulturama tokom sušenja. Zadovoljavajući procenat preživljavanja kulture je ostvaren optimizacijom ulazne i izlazne temperature i dodatkom zaštitnih agenasa pre postupka sušenja (Ananta i sar. 2005; Chavez i Ledebouer, 2007). Literaturno je pokazano da dodatkom obranog mleka, oligofruktoze i polidekstroze u formulacije sa probioticima je omogućeno > 60 % preživljavanje *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (ATCC53103) prilikom sprej-sušenja. Optimizacijom ulazne i izlazne temperature za preparate pripremane sa obranim mlekom, maltodekstrinom, guma Arabikom, laktozom, izolatom proteina sojinog mleka je omogućeno 100 % preživljavanje kulture *Bifidobacterium lactis* BB12 primenom tehnike sprej-sušenja (Chavez i Ledebouer, 2007). Takođe je pokazano da zaštitna formulacija za proces sušenja ne garantuje i adekvatnu zaštitu tokom skladištenja proizvoda zbog čega je potrebno uraditi optimizaciju nosača kako bi se zaštitila kultura i tokom skladištenja. U cilju zaštite inkapsulirane kulture tokom skladištenja proizvoda ispitivani su alginatni nosači obogaćeni sa surutkom i proteinima surutke.

### 5.2.1. Veličina i površinsko naelektrisanje nosača

Površinsko naelektrisanje ( $\zeta$ -potencijal) i veličina mikročestica, određeni su primenom uređaja Zetasizer Nano Series, Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). U tabeli 5.9 su date vrednosti  $\zeta$ -potencijala kao i veličina dobijenih mikronosača tehnikom sprej-sušenja. Na osnovu dobijenih rezultata za površinsko naelektrisanje stiče se uvid u stabilnost sistema. Takođe je određeno i površinsko neelektrisanje probiotske starter kulture i korišćene surutke i dobijene su rezultati  $10,01 \pm 0,4$  mV i  $8,69 \pm 0,7$  mV, datim redosledom.

Tabela 5.9. Veličina i naelektrisanje nosača ( $\zeta$ -potencijal) dobijenih tehnikom sprej-sušenja

Tip nosača	Veličina nosača, $\mu\text{m}$	$\zeta$ -potencijal (mV)
Alg/S/P	7,23 $\pm$ 0,5	52,53 $\pm$ 0,6
Alg/S	5,06 $\pm$ 0,2	56,91 $\pm$ 0,5

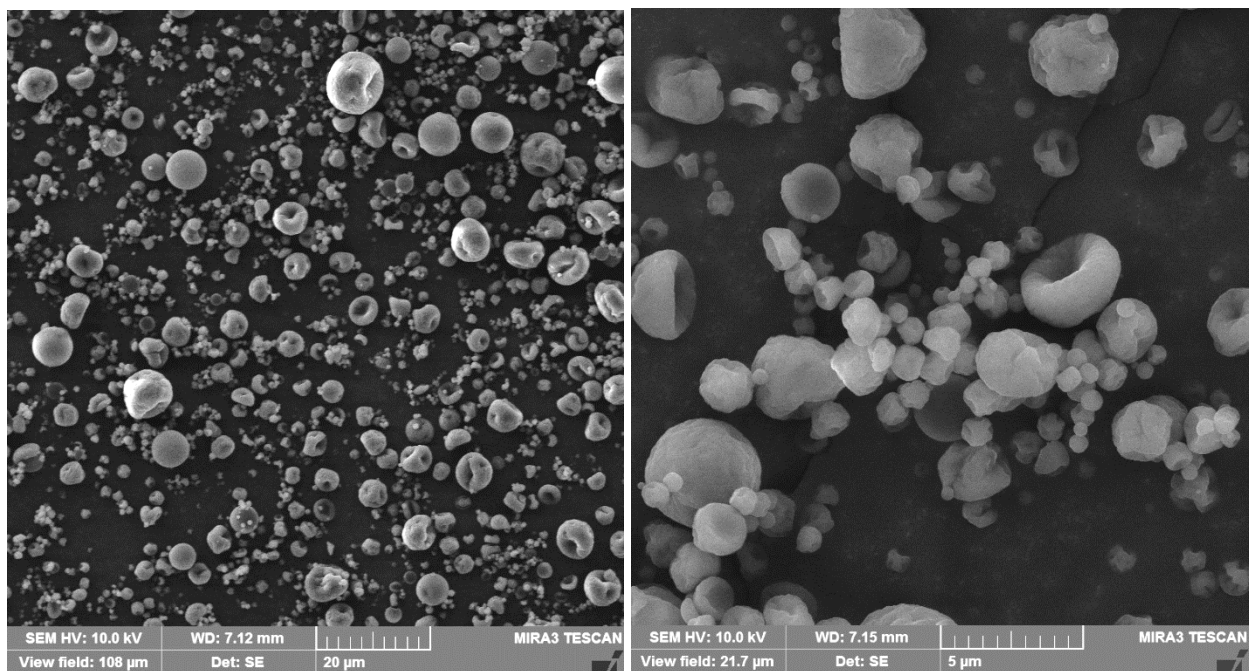
Na osnovu datih rezultata u tabeli 5.9, pripremom nosača sa dodatkom protein surutke se postiže veća hemijska stabilnost sistema s obzirom da dolazi do pada u naelektrisanju čestica odnosno u vrednosti  $\zeta$ -potencijal. Ovakav zaključak je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja (Desai i Park, 2006). Do povećanja stabilnosti sistema dolazi usled uspostavljanja novih veza između proteina, kulture i alginatnog dela nosača što je pokazano i FTIR analizama u poglavlju 5.1.2.2. Veličina nosača dobijena ovom tehnikom ne utiču na senzorna svojstva proizvoda. Prema literaturnim saznanjima preporučena veličina nosača je manja od 100  $\mu\text{m}$ , jer su dovoljno veliki da obuhvatne probiotske ćelije a sa druge strane minimalno utiču na teksturalna svojstva proizvoda nakon implementacije (Martin i sar., 2015).

### 5.2.2. SEM analiza nosača sa probiotskom starter kulturom

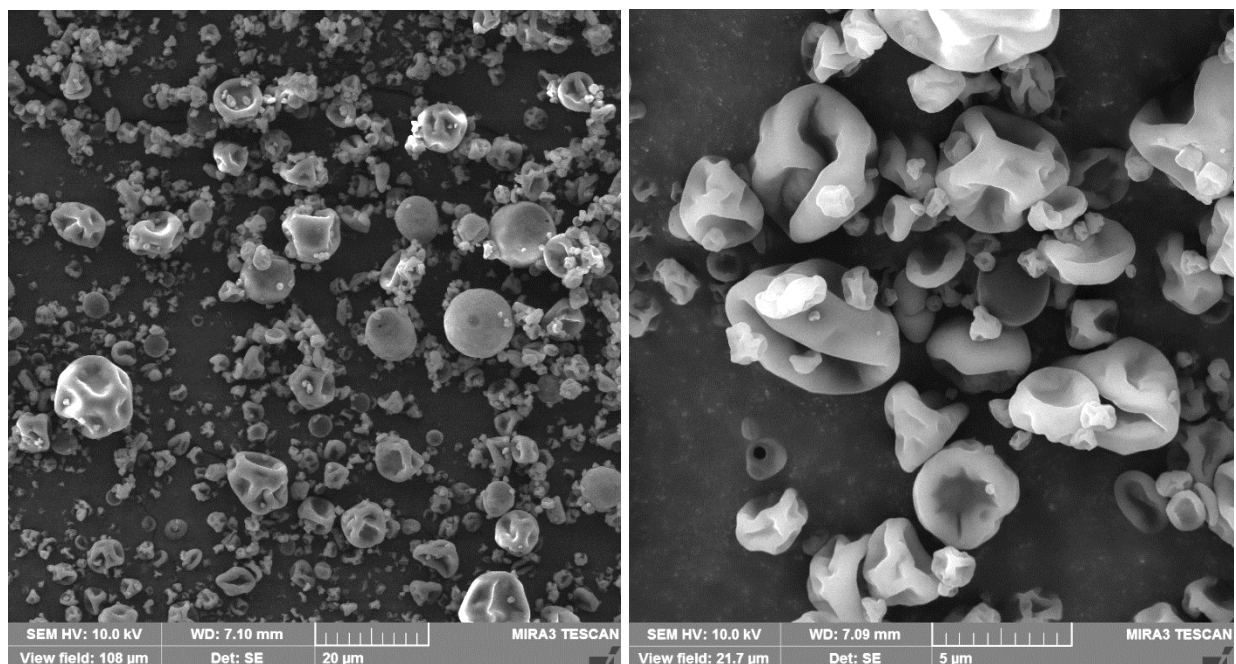
Nakon inkapsulacije probiotske starter kulture urađena je i SEM analiza dobijenih nosača. Na slici 5.38 je data izgled dobijenih Alg/S nosača sa inkapsuliranom kulturom postupkom sprej-sušenja.

Na osnovu dobijenih SEM mikrografija se može zaključiti da i nosači dobijeni sprej-sušenjem zadržavaju sferni oblik, s tim da na površini kao i kod nosača dobijenih ekstruzijom su uočljive neravnine i udubljenja. Literaturno je pokazano da do formiranja udubljenja u materijalu dolazi usled dehidracije nosača u procesu sprej-sušenja (Jinapong i sar., 2008).

Na slici 5.39 je dat izgled nosača Alg/S/P nakon sprej-sušenja, pri čemu kao i kod nosača bez dodatka proteina su primetne neravnine i udubljenja na površini nosača, s tim da je to kod ovog tipa nosača izražajnije. Do sličnih promena u strukturi nosača sa dodatim proteina je već uočeno kod nosača pripremanih sa proteinima mleka pri čemu se prvobitni oblik bolje zadržava dodatkom glukoze ili trehaloze (Soukoulis i sar., 2013).



Slika 5.38. SEM mikrografija nosača Alg/S dobijenih tehnikom sprej-sušenja, ( $\times 20000$ ); ( $\times 10000$ ).



Slika 5.39. SEM mikrografija nosača Alg/S/P dobijenih tehnikom sprej-sušenja, ( $\times 20000$ ); ( $\times 10000$ ).

### 5.2.3. Efikasnost inkapsulacije probiotske starter kulture

Nakon sprej-sušenja rastvora bez dodatka proteina dobijeno je 15,3 g suve faze (prah) dok je od rastvora pripremanog sa koncentratom proteina polazeći od iste zapremine rastvora dobijeno 15,9 g praha. Preračunavanjem dobijenog praha u odnosu na čvrstu fazu polaznog rastvora, gubici iznose 30 % za nosače bez proteina i 43 % za nosače pripremane sa dodatkom koncentrata proteina.

Vijabilnost bakterijskih ćelija je određena metodom već opisanom u odeljku 4.3.13. Prah dobijen nakon sprej-sušenja (0,1 g) je dispergovan u 10 mL sterilnog rastvora 2,0 mas. % natrijum-citrata i rastvoren blagim mešanjem. Zatim je 1,0 mL ovako rastvorenih nosača je prenošen u 9,0 mL sterilnog 0,85 mas. % rastvora NaCl. Nakon toga vršeno je prenošenje po 1,0 mL prethodnog razblaženja u novih 9,0 mL sterilnog rastvora NaCl da bi se dobila serija od ukupno 8 razblaženja pri čemu je svako sledeće deset puta veće od prethodnog. Dobijeni uzorci su u Petri šoljama prelivani hranljivim agarom i inkubirani u termostatu na optimalnoj temperaturi rasta mikroorganizama (37 °C) u trajanju od 48 h.

Efikasnost inkapsulacije je određena prema sledećem izrazu:

$$\text{Efikasnost inkapsulacije} = \frac{\log (\text{CFU/g (prah)})}{\log (\text{CFU/g (liofilizovane kulture u polaznom rastvoru)})} \cdot 100, \%$$

Gde je, CFU/g (prah) je broj vijabilnih bakterijskih kolonija u dobijenom prahu nakon sprej-sušenja i CFU/g predstavlja broj vijabilnih ćelija u 1g liofilizovane kulture dodate u polazni rastvor. Dobijene vrednosti za broj su logaritmovane u cilju lakšeg predstavljanja rezultata. U tabeli 5.10 su date vrednosti za efikasnost postupka inkapsulacije kulture nakon sprej-sušenja.

Tabela 5.10. Efikasnost inkapsulacije probiotske starter kulture u nosače nakon postupka sprej-sušenja

Tip nosača	CFU/g (prah)	Efikasnost inkapsulacije (%)
<b>Alg/S</b>	7,04±0,08	76,8
<b>Alg/S/P</b>	7,44±0,04	79,6

Prema datim rezultatima (tabela 5.10), može se primetiti da prisustvo dodatnih proteina ima pozitivan efekat na broj ćelija nakon sprej-sušenja i samim tim i na efikasnost procesa inkapsulacije. Dobijeni rezultati ukazuje da su temperaturne pomene imale pozitivan uticaj na strukturu proteina i pospešile efikasnost inkapsulacije što nije bio slučaj sa primenom tehnike ekstruzije koja se izvodi u sobnim uslovima. Takođe je pokazano da primenom surutke kao i kombinacije surutke i proteina može pružiti adekvatna zaštita starter kulture i omogućiti efikasna inkapsulacija ćelija.

Bolje preživljavanje u nosačima sa dodatkom koncentrata proteina je literaturno objašnjeno kao posledica promena u obliku nosača i prisustvom pukotina usled čega toplota tokom sušenja lakše napušta nosač i na taj način dolazi do manjeg oštećenja mikroorganizama i boljeg preživljavanja bifidobakterija nakon sprej-sušenja (Lian i sar., 2002).

Dobijeni prahovi sa inkapsuliranom kulturom se čuvaju na sobnoj temperaturi u eksikatoru. Moayyedi i sar., (2018) su takođe pokazali doprinos dodatka proteina surutke prilikom pripreme rastvora metodom sprej-sušenja u cilju zaštite probiotskih kultura.

#### **5.2.4. Rastvorljivost prahova sa inkapsuliranom starter kulturom**

Rastvorljivost je određena prema metodi opisanoj od starane Cano-Chauca i sar, (2005) sa određenim modifikacijama. Dobijeni prahovi (1g) su rastvoreni u 100 mL destilovane vode i mešani na magnetnoj mešalici 5 min. Rastvori su potom prebačeni u epruvete za centrifugiranje i ostavljeni na 3000 g u periodu od 5 min. Supernatanti su prebačeni u izmerene Petri šolje i ostavljeni u sušnicu na 105 °C, u periodu od 5h.



Nakon toga su izmerene Petri šolje sa ostatkom i izračunata rastvorljivost dobijenih prahova (%). Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata prahovi sa proteinima su pokazali lošiju rastvorljivost za 2,0 %. Prahovi bez dodatih proteina imaju rastvorljivost 87,0 % za razliku od prahova sa koncentratom proteina 85,0 %. U ovom slučaju dodatak proteina je smanjio rastvorljivost prahova.

### **5.2.5. Sadržaj vlage u nosačima sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom**

Sadržaj vlage u uzorcima dobijenih sprej-sušenjem je određen prema metodi Rajam i sar., (2012) sa izvesnim modifikacijama. Odmerena masa uzoraka (0,5 g) je ostavljen u Petri šoljama u sušnicu na  $105 \pm 2$  °C tokom perioda od 24 h. Dobijeni uzorak se odmah merio i dobijena vrednost upoređena sa prvobitnom masom uzorka. Eksperimenti su izvedeni u triplikatima i prosečne vrednosti su uzete. Poređenjem eksperimentalnih rezultata za prahove bez dodatih proteina sadržaj vlage u uzorcima je iznosio  $4,7 \pm 0,31$  %, a za uzorke sa dodatkom proteina  $3,87 \pm 0,11$  %.

Rezultati sadržaja vlage u uzorcima, ukazuju da dodati proteini smanjuju difuziju vlage u prahovima. U literaturi je potvrđeno da usled denaturacije proteina dolazi do formiranja čvrstog sloja poput “kore” usled čega je smanjena difuzija vlage u ovakvim sistemima (Rajam i sar., 2012).

### **5.2.6. Priprema napitaka na bazi surutke sa dodatkom nosača**

Prahovi sa inkapsuliranom kulturom su korišćeni u pripremi napitka na bazi surutke. Sastav fermentacionog medijuma je 70 mas. % surutka i 30 mas. % mleko. U oba slučaja se fermentacija odvijala na 42 °C dok se ne dostigne pH medijuma 4,6. Fermentacija prahom obogaćenim proteinima je trajala ~ 6 h dok je fermentacija prahom bez dodatih proteina trajala ~ 5 h. U slučaju aktivacije kulture u mleku 1 h pre početka fermentacije je za slučaj praha sa koncentratom proteina skratilo vreme trajanja za 30 min dok u nosačima bez dodatih proteina aktivacija nije imala značajan doprinos u pogledu vremena trajanja procesa. Denaturacija proteina nakon sprej-sušenja je uticala na poroznost nosača zbog čega je i fermentacija trajala duže u nosačima sa dodatim koncentratom proteina. Millkvist-Furebi i sar., (2001) su pokazali da toplota prilikom sprej-sušenja može uticati i na površinsku aktivnost proteina, što takođe objašnjava slabiju interakciju sa fermentacionim medijumom tokom procesa. Dodavanjem nosača sa kulturom u fermentacioni medijuma koji je bogat jonima  $Ca^{2+}$  dolazi do dodatnog umrežavanja i jonske izmene između nosača i medijuma i rehidratacije strukture nosača.

### 5.2.6.1. Vijabilnost probiotske starter kulture pre i posle fermentacije

Vijabilnost kulture u prahu pre fermentacije kao i u medijumu nakon fermentacije je određena prema metodama opisanim u odeljku 4.3.13. U tabeli 5.11. su date vrednosti za vijabilnost kulture pre i posle fermentacije.

Na osnovu datih rezultata primetan je porast u broju ćelija na primeru nosača bez dodatog koncentrata proteina. Razlika u broju ćelija ( $\Delta \log$  (CFU/g)) za Alg/S iznosi 2,13 dok u slučaju nosača sa dodatkom proteina iznosi 1,4.

Tabela 5.11. Vijabilnost probiotske starter kulture pre i posle procesa fermentacije, (log (CFU/g))

Tip nosača	Broj ćelija (log (CFU/g))	Broj ćelija (log (CFU/g))
	pre fermentacije	posle fermentacije
<b>Alg/S</b>	7,04±0,08	9,17±0,09
<b>Alg/S/P</b>	7,44±0,07	8,84±0,04

Dobijeni rezultati za broj ćelija nakon fermentacije su u skladu sa vremenom odvijanja procesa koje takođe ukazuje na rast kulture. Prahovi sa inkapsuliranom probiotskom kulturom su korišćeni i u pripremi jogurta i na ovaj način je dobijen zadovoljavajući broj bakterija pri čemu je optimizacija postupka sušenja veoma bitna (Utami i sar., 2016).

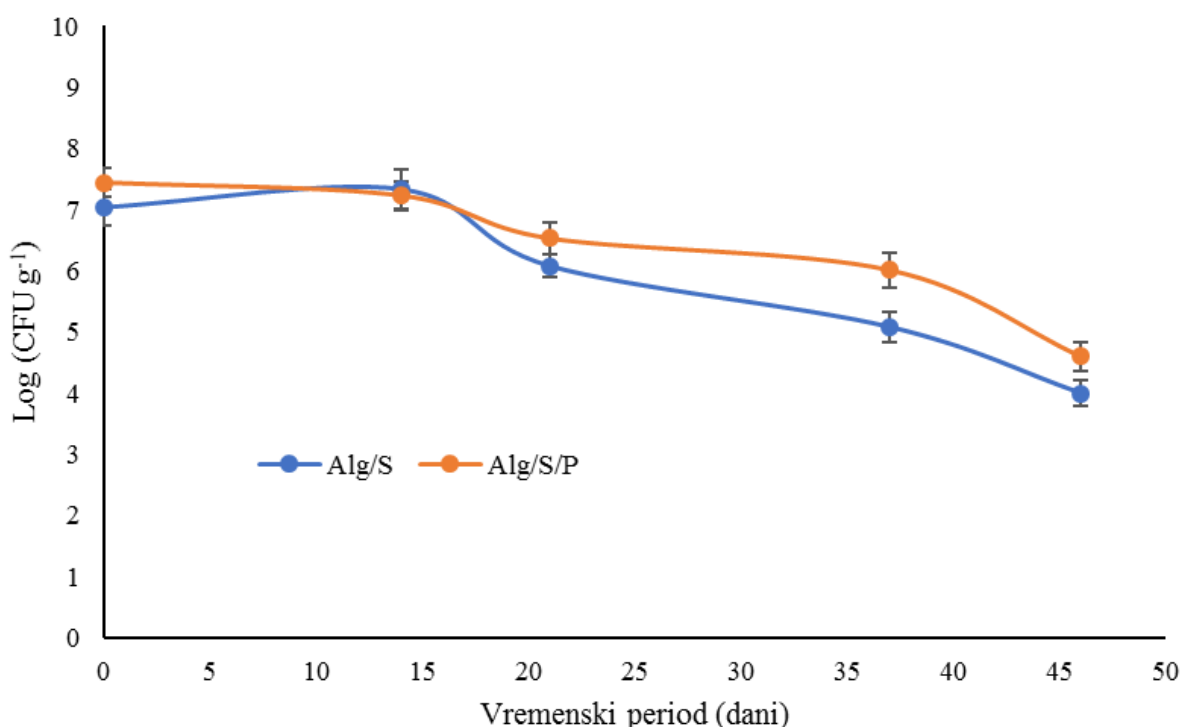
### 5.2.6.2. Vijabilnost probiotske starter kulture tokom skladištenja napitka i prahova

Praškasti uzorci su čuvani u vremenskom periodu od 45 dana kao i dobijeni napici na bazi surutke. Analizirana je vijabilnost kulture u datom vremenskom periodu. Na slici 5.40 je dat dijagram uticaja vremenskog perioda skladištenja na vijabilnost kulture čuvane u praškastom uzorku na sobnoj temperaturi.

Na slici 5.40 se može videti da se broj ćelija za oba nosača održava na istom broju u periodu od 14 dana, s tim da su manje fluktuacije u broju kod nosača sa dodatim koncentratom proteina. Nakon 14 dana je primetan pad u broju ćelija za obe vrste nosača ali je i dalje izražajniiji kod nosača pripremanih sa dodatkom surutke.

Intenzivniji pad nastupa nakon tri nedelje i posebno u slučaju nosača bez dodatih proteina. Takođe, su primetne manje fluktuacije u broju ćelija kod nosača sa dodatim koncentratom proteina u poređenju sa onim samo sa surutkom. U prahovima sa dodatim proteinima održan je zadovoljavajući broj u periodu do 37 dana za razliku od nosača sa surutkom gde se optimalan broj ostvario u periodu do 21 dana.

Talib i sar., (2013), su takođe uočili pad u broju probiotskih ćelija u periodu nakon dve nedelje analizom različitih vrsta kultura. Ova pojava se objašnjava kapacitetom nosača da zaštiti kulturu od povišenih temperatura kao i osetljivosti kulture na uslove čuvanja.

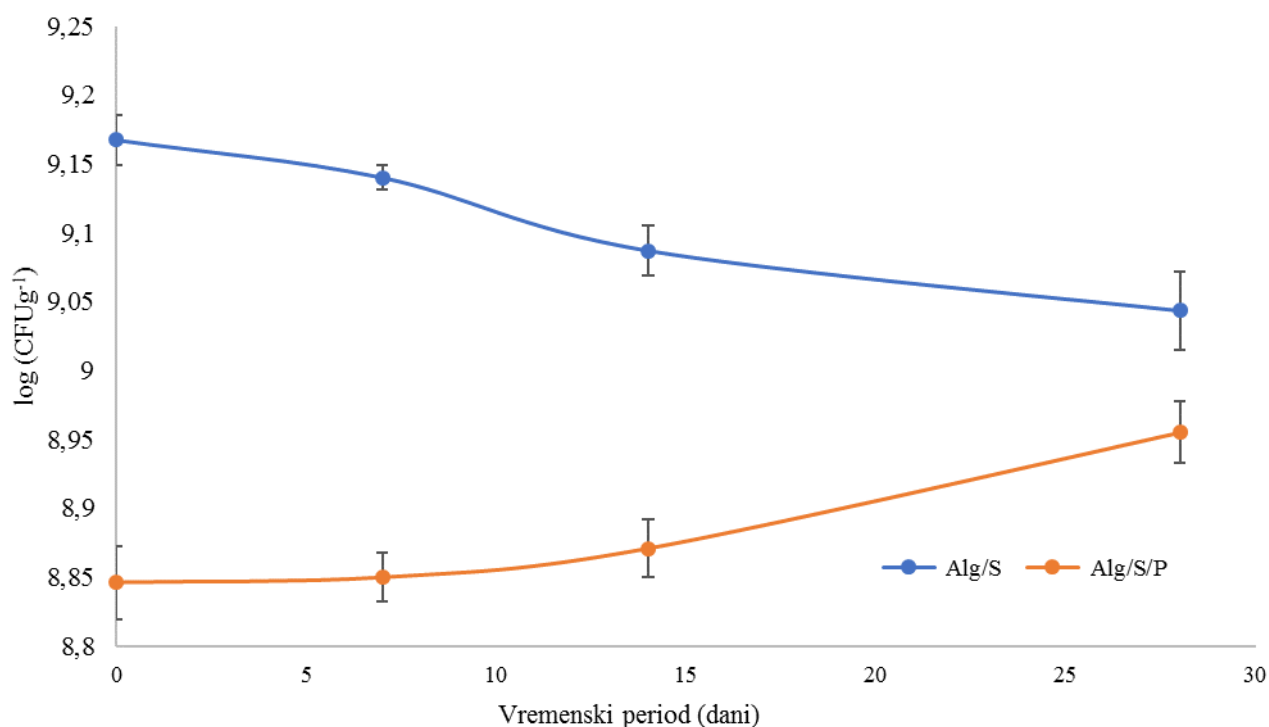


Slika 5.40. Uticaj vremenskog perioda skladištenja (45 dana) na vijabilnost probiotske starter kulture.

Poseban akcenat se daje na uticaj prisustva vlage, pri čemu sa povećanjem vlage opada vijabilnost u prahovima tokom perioda čuvanja. Na osnovu dobijenih rezultata za prisustvo vlage u uzorcima nakon sušenja (odjeljak 5.2.5), primetno je da usled denaturacije proteina se povećava njihova zaštitna uloga od vlage a samim tim i bolje preživljavanje bakterijskih ćelija.

Analizirana je i vijabilnost kulture u napicima tokom vremenskog perioda od 28 dana. Pri čemu su dobijene fluktuacije u broju za dati period statistički zanemarljive ( $p < 0,05$ ). U prve dve nedelje je primetan pad u broju ćelija u fermentacionom medijumu (CFU/mL) u nosačima bez dodatih proteina dok u nosačima koji su obogaćeni proteinima je primetan porast broja ćelija koji se održava do 28. dana čuvanja napitka.

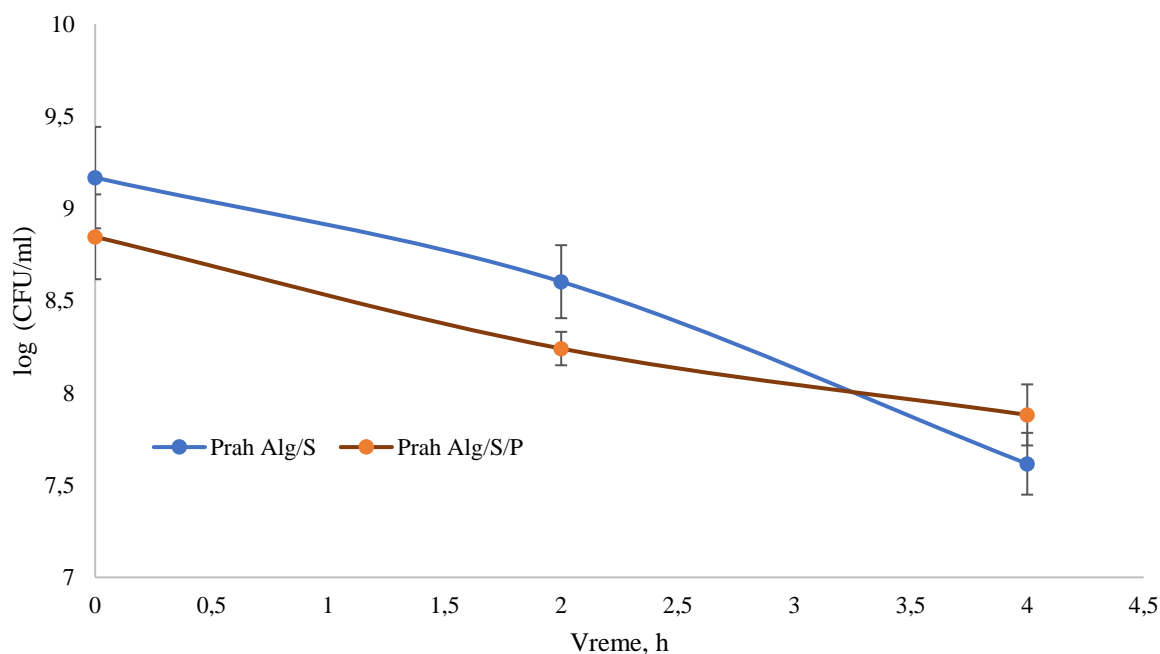
U napicima pripremanim sa prahovima bez dodatih proteina, uočljiva je stagnacija u broju u vremenskom periodu 14-28 dana. U oba slučaja dostignut je zadovoljavajući broj probiotskih bakterija nakon predviđenog perioda čuvanja napitka, za prah Alg/S 9,04 (log (CFU/mL)) i za prah Alg/S/P 8,95 (log (CFU/mL)). Uz promene u rastu i padu vijabilnosti kulture, nakon predviđenog perioda skladištenja nema značajnih razlika između broja ćelija u napicima na bazi surutke. U odnosu na polazni broj probiotskih bakterija veći pad je zabeležen u prahu Alg/S u poređenju sa prahom Alg/S/P. Kao i u prethodnom primeru dodatak koncentrata proteina imao je pozitivan efekat na vijabilnost kulture tokom skladištenja proizvoda. Na slici 5.41 su date promene u vijabilnosti kulture u predviđenom vremenskom periodu skladištenja.



Slika 5.41. Uticaj vremenskog perioda skladištenja (28 dana) na vijabilnost probiotske kulture u napitku na bazi surutke sa inkapsuliranom kulturom tehnikom sprej-sušenja.

### 5.2.7. Vijabilnost probiotske starter kulture u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima

Vijabilnost kulture je određivana tehnikom već opisanom u prethodnim poglavljima. Prilikom ispitivanja je korišćen uzorak dobijenog napitka nakon procesa fermentacije. Promene u vijabilnosti probiotskih kultura su date na slici 5.42. Uprvih 2h je primetan pad u broju ćelija u odnosu na početni broj za 5,0 % za napitak pripreman sa prahom Alg/S dok je za napitke dobijene sa prahom Alg/S/P primetan pad za 7,0 %. Nakon 4h izlaganja uzoraka u simuliranim uslovima u odnosu na početni broj ćelija preživljavanje kulture u nasicima je 83,03 % i 89,04 % za nosače Alg/S i Alg/S/P datim redosledom. U periodu od 2h do 4h u simuliranim intestinalnim uslovima mnogo je veći pad u vijabilnost kulture inkapsulirane u nosačima tipa Alg/S (1,0 ( $\Delta\log$  (CFU/mL))) nego što je to slučaj za kulturu inkapsuliranu u nosače tipa Alg/S/P (0,36 ( $\Delta\log$  (CFU/mL))). U gastričnim uslovima pri niskoj vrednosti pH, alginat i proteini su istoimenog naelektrisanja usled čega se smanjuje zaštitni efekat proteina i dolazi do pada u vijabilnosti kulture što nije slučaj u intestinalnim uslovima.



Slika 5.42. Promene u vijabilnosti probiotskih kultura ( $\log$  (CFU/mL)) u uslovima simuliranih GI uslova.

### 5.3. Karakterizacija nosača sa inkapsuliranom probiotskom kulturom dobijenih tehnikom sušenja smrzanjem

Sušenje smrzanjem (liofilizacija) je tehnika sušenja koja se tradicionalno koristi za očuvanje starter kultura i probiotskih bakterija (Champagne i sar., 1991; Gardiner i sar., 2000; Kurtmann i sar., 2009; Saadatzaheh i sar., 2013). Tehnika sušenja smrzanjem je u velikoj meri zastupljena zato što se smatra da niske temperature imaju manje štetan efekat za osetljive mikroorganizme nego što je to slučaj pri sušenju na sobnoj ili višim temperaturama (Ying i sar., 2010). U poređenju sa sprej-sušenjem, liofilizacija je dala bolje rezultate za preživljavanje bakterija mlečne kiseline (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus acidophilus*) i bifidobakterija (*Bifidobacterium longum* i *Bifidobacterium infantis*) koje su bile korišćene za fermentaciju u sojinom mleku (Wang i sar., 2004). Larena i sar. (2003), su demonstrirali 100 % preživljavanje kulture nakon liofilizacije u poređenju sa 20 % lošijim preživljavanjem sa tehnikom sprej-sušenja. U pogledu isplativosti primenjene tehnologije, sprej-sušenje je najčešća alternativa s obzirom da je trošak proizvodnje istih preparata pomenutom tehnikom do 20 % manji (Ying i sar., 2010).

Tehnika sušenja smrzanjem zahteva primenu krioprotektanata koji će omogućiti odgovarajuću zaštitu kulture. Krioprotektanti treba da budu prihvatljivi za primenu u prehrambenim proizvodima, da difunduju kroz ćelijsku membranu i da ne sadrže toksične komponente. Neophodno je da se uradi optimizacija rastvora krioprotektanata kako bi se omogućilo očuvanje kulture i tokom skladištenja proizvoda. Pokazano je da sinergistički efekat trehaloze u kombinaciji sa saharozom, glicerolom i proteinima omogućava najbolju zaštitu kulture tokom skladištenja proizvoda (Haffner i sar., 2016). U cilju zaštite probiotske starter kulture tokom sušenja i skladištenja proizvoda analiziran je uticaj koncentracije polisaharidne komponente (alginata) kao i proteina (koncentrat proteina).

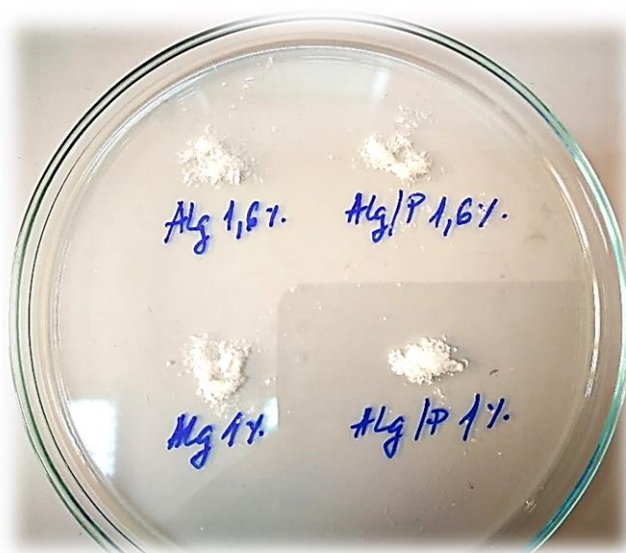
#### 5.3.1. Veličina i naelektrisanje nosača

Nakon postupka sušenja je određeno naelektrisanje i veličina nosača. Dobijeni rezultati su predstavljeni u tabeli 5.12. Koncentracija proteina u pripremanim suspenzijama sa proteinima iznosi 2,4 mas. %.

Tabela 5.12. Veličina i naelektrisanje ( $\zeta$ -potencijal) dobijenih nosača nakon postupka sušenja smrzavanjem

Tip nosača	Veličina nosača, $\mu\text{m}$	$\zeta$ -potencijal (mV)
Alg/S/P (1,0 mas. % Alg)	3,22 $\pm$ 0,1	-42,1 $\pm$ 0,3
Alg/S/P (1,6 mas. % Alg)	5,22 $\pm$ 0,2	-44,3 $\pm$ 0,4
Alg/S (1,0 mas. % Alg)	2,98 $\pm$ 0,6	-45,2 $\pm$ 0,2
Alg/S (1,6 mas. % Alg)	3,24 $\pm$ 0,3	-46,4 $\pm$ 0,6

Izgled dobijenih prahova je dat na slici 5.43.

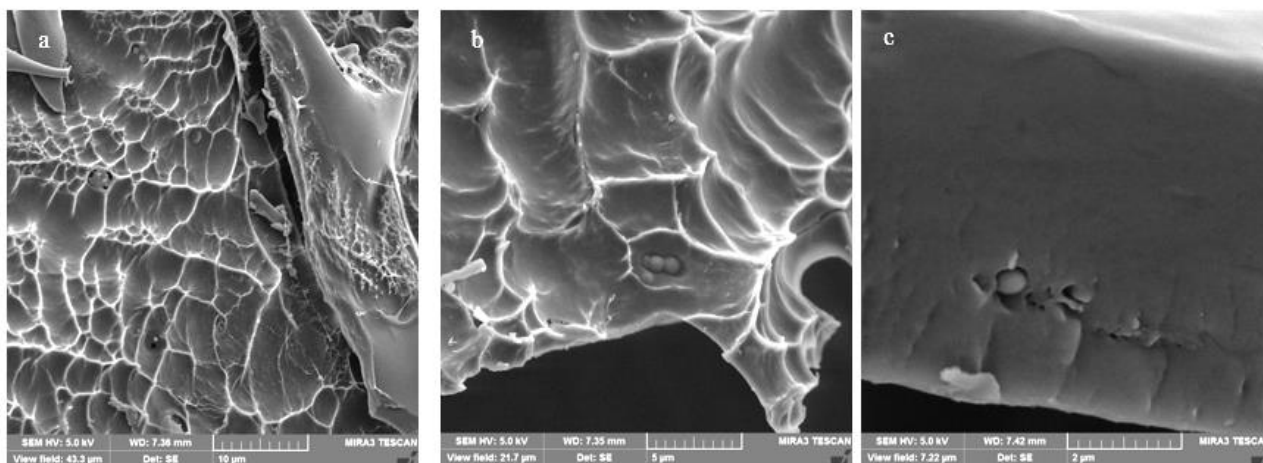


Slika 5.43. Izgled praškastih uzoraka dobijenih sa različitim koncentracijama alginata (1,6 mas. % i 1,0 mas. %).

Na osnovu datih rezultat je vidljivo da sistemi sa dodatim proteinima imaju manje vrednosti  $\zeta$ -potencijala, što ukazuje i na njihov dopinos sa aspekta stabilnosti sistema kao posledice uspostavljanja novih veza u novonastalim sistemima. Takođe je primetno da sa dodatkom proteina kao i povećanjem koncentracije polisaharidne komponente (alginata) se povećava veličina dobijenih nosača. Literaturno je takođe pokazano da variranjem koncentracije hidrokoloida se mogu dobiti različite veličine nosača postupkom liofilizacije (Hansen i sar., 2002). Veličina nosača je bitna s obzirom da sa smanjenjem veličine nosača se povećava površina nosača koja je izložena vlazi koja ima negativan uticaj na vijabilnosti inkapsulirane kulture.

### 5.3.2. SEM analiza nosača sa probiotskom starter kulturom

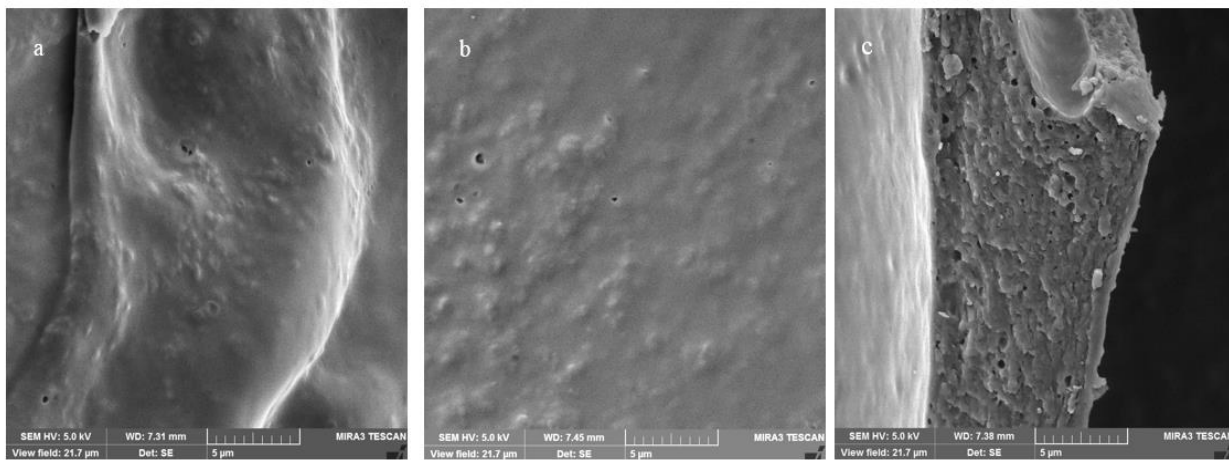
Izgled dobijenih uzoraka nakon liofilizacije je analiziran pomoću SEM mikrografa koji su dati na slikama 5.44-47. Na slikama (5.44a, b i c) se mogu videti neravnine na nosaču sa inkapsuliranom kulturom. Inkapsulirana kultura je smeštena u šupljinama nosača. Dobijena mikrostruktura nosača je kompaktna i male poroznosti (slika 5.44 c).



Slika 5.44. SEM mikrografija uzoraka Alg/S (koncentracije 1,6 mas. %, Alg); a) izgled uzorka nakon sprej-sušenja x 5000 b) inkapsulirana kultura u nosaču x 10000 c) poprečni presek nosača sa inkapsuliranom kulturom x 30000.



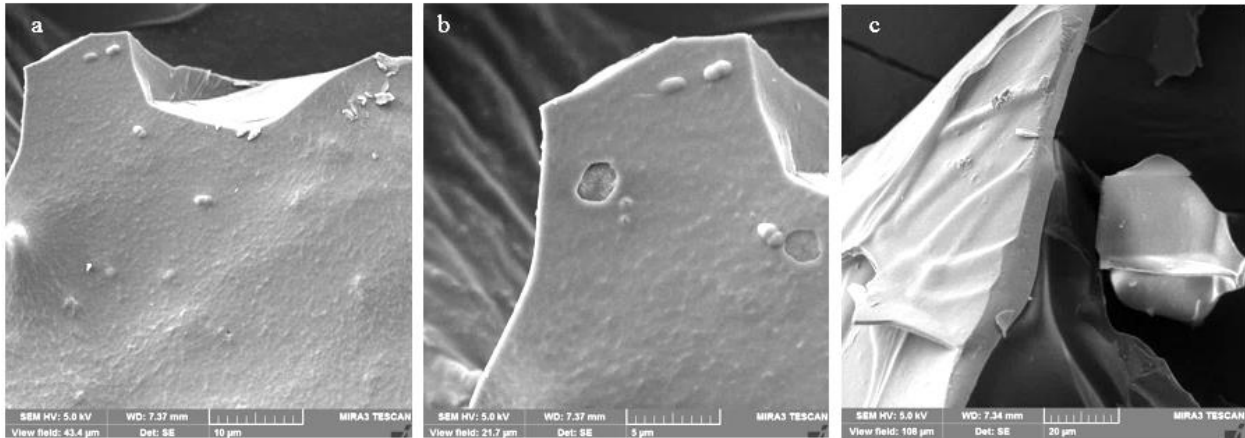
Izgled nosača sa dodatim koncentratom proteina (Alg/S/P) za koncentraciju alginat 1,6 mas. % u polaznoj suspenziji je dat na slici 5.45.



Slika 5.45. SEM mikrografija nosača Alg/S/P (koncentracija alginata 1,6 mas. %) a) izgled nosača x 10000 b) inkapsulirana kultura x 10000 c) poprečni presek nosača x10000.

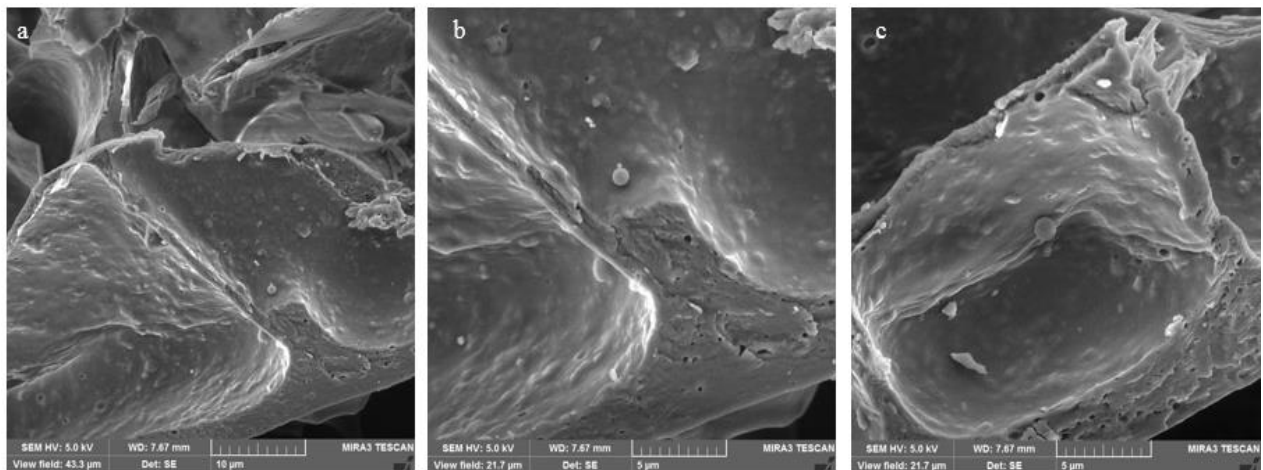
Na osnovu date slike 5.45 je vidljiv doprinos dodatka proteina na datu mikrostrukturu nosača kao i veći afinitet kulture prema datom nosaču. Površina nosača je glatka sa manjim udubljenjima u poređenju sa mikrografijama dobijenim za nosač Alg/S. Nije uočljiva jasna granica na mestu kulture i nosača što potvrđuje da sastav suspenzije zadovoljavajući za rast kulture kao i da postoji adhezijska tendencija ćelija prema nosaču.

Uticaj koncentracije je razmatran za slučaj suspenzije pripremane i sa manjom koncentracijom alginata 1,0 mas. %. Na slikama 5.46 i 5.47 je dat izgled nosača sa i bez dodatka koncentrata proteina u kombinaciji sa već pomenutom koncentracijom alginata. Sa slike 5.46 se može uočiti da sa smanjenjem koncentracije su приметne manje neravnine na površini nosača. Afinitet kulture je veći prema nosaču i moguće je videti da je inkapsulirana kultura prisutna i da je u pojedinim segmentima prekrivena slojem nosača. Na poprečnom preseku nosača je vidljiva mikrostruktura male poroznosti gde se kultura nalazi inkapsulirana u šupljinama. Sa dodatkom proteina kao i kod slučaja sa većom koncentracijom proteina приметna je površinska morfologija sa manje udubljenja ali sa većim brojem vidljivih bakterijskih ćelija. Mogu se uočiti ćelije unutar i na površini nosača. Veći broj ćelija ukazuje i na bolju vijabilnost ćelija u nosačima. Na preseku na slici 5.47 c je vidljiva veća poroznost sistema u poređenju sa presekom nosača bez dodatka proteina (5.46 c).



Slika 5.46. SEM mikrografija nosača Alg/S (koncentracija alginata 1,0 mas. %) a) površinska morfologija nosača b) inkapsulirana kultura u nosaču x10000 c) poprečni presek nosača x2000.

Dodati proteini su imali pozitivan uticaj zbog čega je površinska morfologija kao i afinitet kulture bio veći u ovom tipu nosača u oba slučaja. Proteini surutke imaju sposobnost da inhibiraju rast kristala leda i pomažu u stabilizaciji ćelijske membrane. Primenom smeše krioprotektanata, kao što su kombinacija proteina i šećera, povećava se temperatura staklastog prelaza u odnosu na ugljene hidrate i na taj način fizički stabilizuju nosač i pozitivno utiče na vijabilnost mikroorganizama (Hoobin i sar., 2013).



Slika 5.47. SEM mikrografija nosača Alg/S/P (koncentracija alginata 1,0 mas. %) a) površinska morfologija nosača x 5000 b) inkapsulirana kultura u nosaču x 10000 c) poprečni presek nosača sa inkapsuliranom kulturom x 10000.

### 5.3.3. Efikasnost inkapsulacije i vijabilnost kulture

Nakon postupka sušenja smrzavanjem od polazne suspenzije su dobijeni prahovi nosača Alg/S i Alg/S/P za koncentracije alginata 1,0 mas. % i 1,6 mas. %. Za ispitivane suspenzije gubici su 12,0 % i 16,0 % za nosače bez proteina pri koncentracijama alginata 1,0 mas. % i 1,6 mas. %, navedenim redosledom. Za slučaj nosača sa dodatim proteinima surutke gubici nakon inkapsulacije iznose 22,0 % i 19,0 % za nosače pri koncentraciji alginat 1,0 mas. % i 1,6 mas. %, datim redosledom. Efikasnost inkapsulacije je određivana prema izrazu datom u odeljku 5.2.3. Efikasnost inkapsulacije ujedno ukazuje na vijabilnost inkapsulirane kulture nakon postupka sušenja. Dobijeni rezultati za efikasnost su dati u tabeli 5.13.

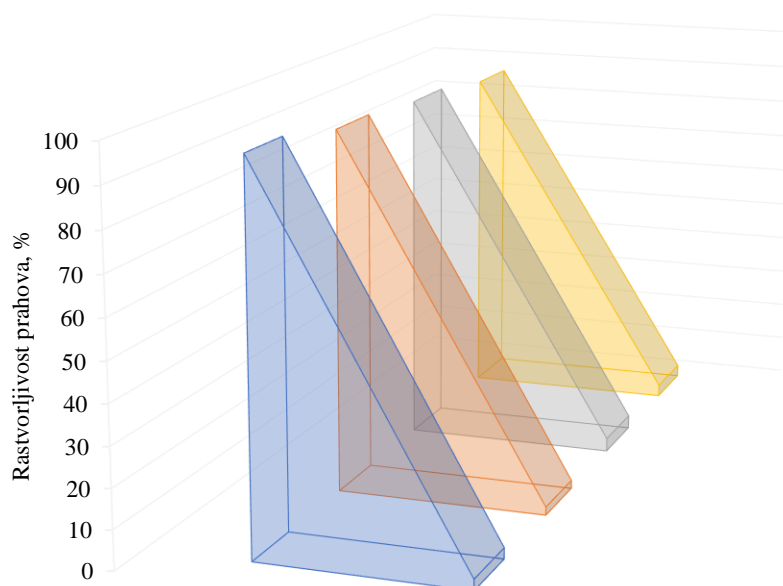
Tabela 5.13. Efikasnost inkapsulacije i vijabilnost probiotske starter kulture nakon postupka sušenja smrzavanjem

Tip nosača	CFU/g (prah)	Efiksnost inkapsulacije (%)
Alg/S (1,0 mas. %, Alg)	7,55±0,01	81,36
Alg/S (1,6 mas. %, Alg)	7,40±0,09	79,57
Alg/S/P (1,0 mas. %, Alg)	7,71±0,10	82,46
Alg/S/P (1,6 mas. %, Alg)	7,65±0,08	80,95

Na osnovu datih rezultata u tabeli 5.13 primetno je da sa smanjenjem koncentracije alginata je bolje preživljavanje kulture kao i da poređenjem nosača sa i bez dodatka proteina je uočena veća efikasnost inkapsulacije u slučaju sistema sa dodatim proteinima. Dobijeni rezultati ukazuju da je tehnika liofilizacije pokazala bolje preživljavanje kulture u poređenju sa tehnikom sprej-sušenja posebno u slučaju nosača bez dodatih proteina. Literaturno je takođe pokazano da inkapsulacijom probiotika u hidrokolojne suspenzije se ostvaruje visok stepen preživljavanja kulture kao npr. *Lactobacillus plantarum* (Tee i sar., 2013).

### 5.3.4. Rastvorljivost prahova i prisustvo vlage u uzorcima sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom

Dobijeni prahovi liofilizacijom su analizirani kao i na primeru prahova dobijenih sprej-sušenjem primenom tehnika opisanih u poglavljima 5.2.4 i 5.2.5. Rezultati za rastvorljivost uzoraka i sadržaj vlage su prikazani na slici 5.48. Uzorci sa dodatim proteinima imaju manji procenat rastvorljivosti u vodi u poređenju sa uzorcima bez dodatih proteina (Alg/S). Takođe, bolja je rastvorljivost za nosače pripremane sa manjom koncentracijom alginata.



	Rastvorljivost, %	Prisustvo valage, %
■ Alg/S (1,0 mas. % Alg)	96	2,8
■ Alg/S/P (1,0 mas. % Alg)	92	2,1
■ Alg/S (1,6mas. % Alg)	90	3,4
■ Alg/S/P (1,6mas. % Alg)	87	3,1

Slika 5.48. Rastvorljivost (%) i prisustvo vlage (%) u prahovima nakon postupka sušenja smrzavanjem.

Dobijene vrednosti za prisustvo vlage su opsegu određenom za prahove koji imaju primenu u mlekarскоj industriji. Dozvoljena količina valage je ispod 5,0 % prema definisanim standardima (Codex Alimentarius Commission; CXS 331-2017). Prisustvo vlage u većem procentu od dozvoljenog može negativno da utiče na vijabilnost ćelija kao i na teksturalna svojstva proizvoda, odnosno lepljivost dobijenih prahova.

### 5.3.5. Priprema napitka na bazi surutke sa dodatkom nosača sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom

Nakon postupka sušenja smrzanjem dobijeni prahovi sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom su korišćeni za pripremu napitaka na bazi surutke. Fermentacija se odvijala na 42 °C u vremenskom periodu koji zavisi od polaznog sastava prahova. U nosačima sa manjom koncentracijom alginata fermentacija se odvijala kraći vremenski period ~ 5 h dok u nosačima sa većom koncentracijom alginata 5,5 h. Implementacijom nosača sa kulturom u fermentacioni medijuma koji je bogat jonima Ca<sup>2+</sup> dolazi do dodatnog umrežavanja i jonske izmene između nosača i medijuma i rehidratacije strukture nosača.

#### 5.3.5.1. Vijabilnost probiotske starter kulture pre i posle fermentacije

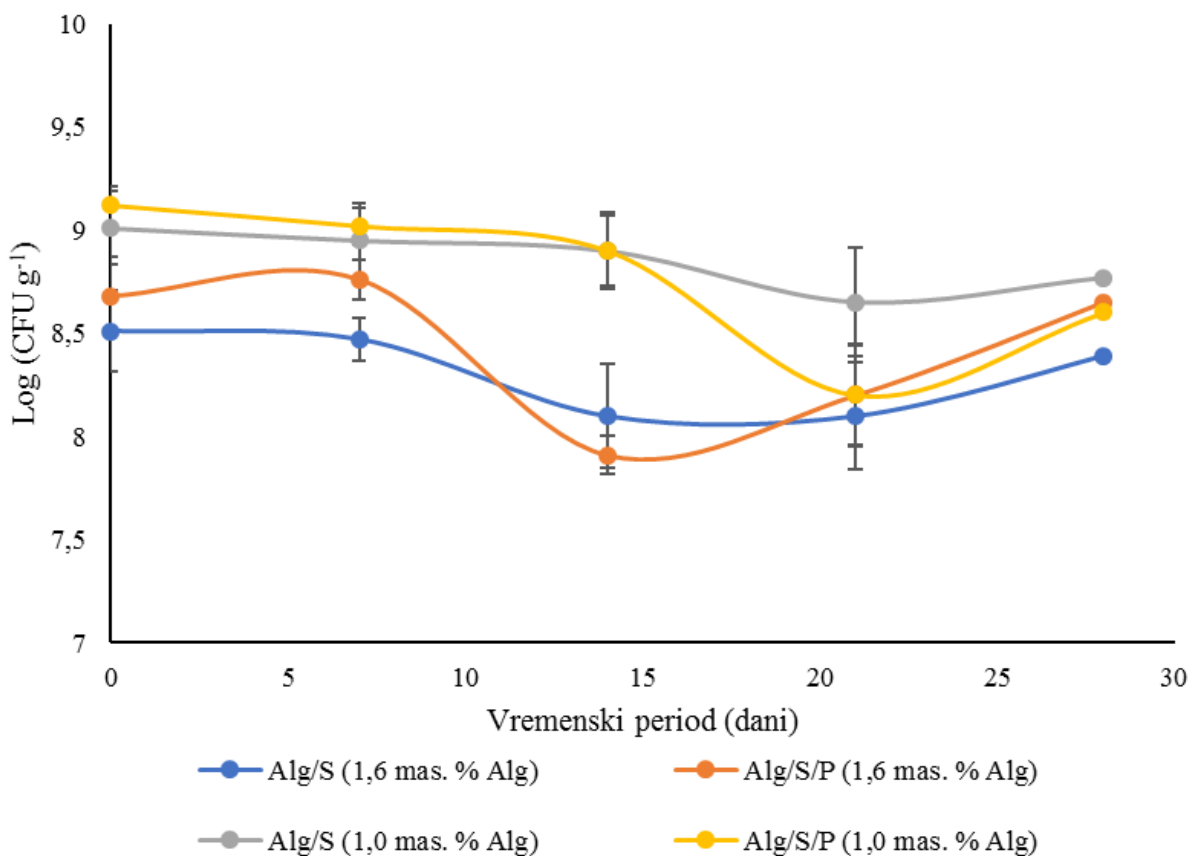
Vijabilnost kulture u prahu pre fermentacije kao i u medijumu nakon fermentacije je određivana prema metodama opisanim u odeljku 4.3.13. U tabeli 5.14. su date vrednosti za vijabilnost kulture pre i posle fermentacije. Poređenjem rezultata za dobijene prahove, primetno je da su uzorci sa manjom koncentracijom alginata (1,0 mas. %) sa i bez dodatka proteina dali najbolje rezultate za vijabilnost inkapsulirane kulture nakon sušenja. Posle procesa fermentacije najveći porast u broju je dostignut za nosače sa manjom koncentracijom alginata i sa dodatkom proteina. Bolja vijabilnost kulture u sistemima sa manjom koncentracijom alginata ukazuje na bolju difuziju u sistem i samim tim bolju vijabilnost kulture.

Tabela 5.14. Vijabilnost probiotske starter kulture pre i posle procesa fermentacije, (log (CFU/g), (log (CFU/mL))

Tip nosača	Broj ćelija (log (CFU/g)) pre fermentacije	Broj ćelija (log (CFU/mL)) posle fermentacije
Alg/S (1,0 mas. %, Alg)	7,55±0,02	9,01±0,08
Alg/S (1,6 mas. %, Alg)	7,40±0,06	8,51±0,11
Alg/S/P (1,0 mas. %, Alg)	7,71±0,10	9,12±0,15
Alg/S/P (1,6 mas. %, Alg)	7,65±0,09	8,68±0,12

### 5.3.5.2. Vijabilnost kulture u napitku i u nosaču tokom vremenskog perioda skladištenja

Vijabilnost probiotske kulture je praćena u vremenskom periodu od 28 dana u napitku kao i u praškastim uzorcima. Na slici 5.49 je data promena u vijabilnosti kulture u vremenskom periodu od 28 dana sa intervalima od 7 dana za napitak na bazi surutke. Probiotska starter kultura ima zadovoljavajuću vijabilnost nakon analiziranog perioda skladištenja. Broj probiotskih bakterija je  $\sim 4 \cdot 10^7$  za nosače bez proteina dok u slučaju sa proteinim kod prahova sa većom koncentracijom alginata iznosi  $\sim 2 \cdot 10^7$ . U fermentacionom medijumu sa prahom manje koncentracije alginata broj probiotskih ćelija iznosi  $\sim 4,6 \cdot 10^7$ . S obzirom da je broj probiotskih bakterija u napitku nakon 28 dana  $> 10^7$ , može se reći da primenom na ovaj način inkapsulirane kulture u pripremi fermentisanog napitka je dostignut željeni broj probiotika u ispitivanom vremenskom periodu skladištenja.

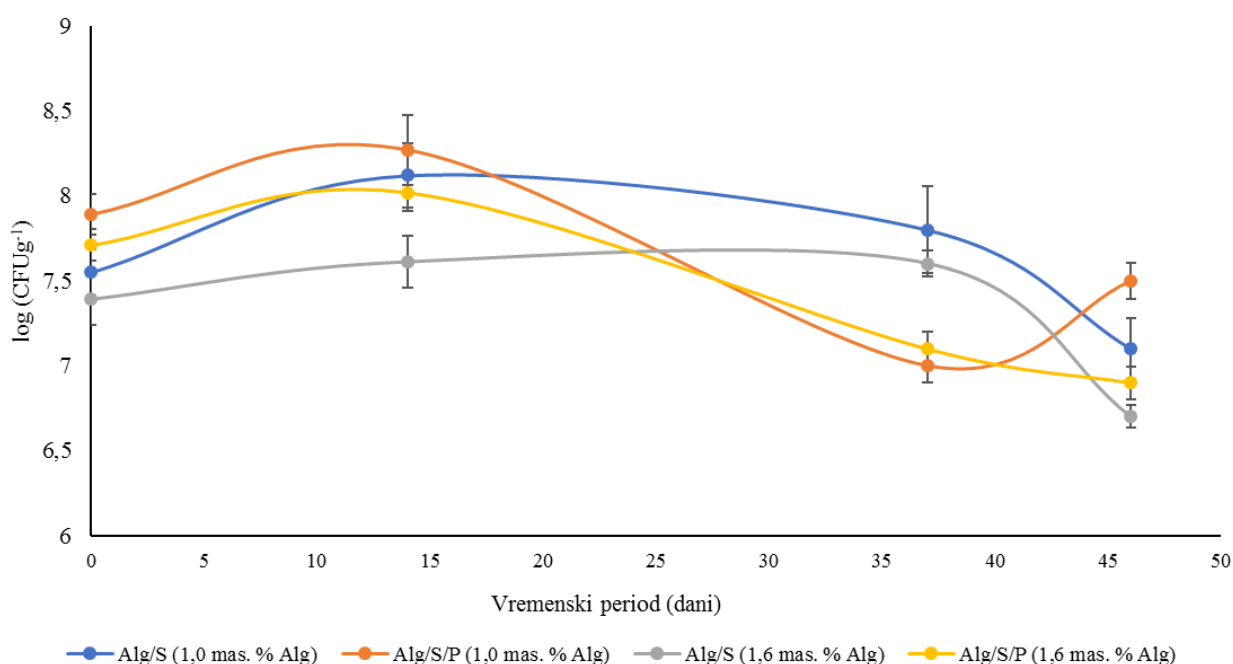


Slika 5.49. Promena u vijabilnosti probiotske starter kulture u napitku na bazi surutke u vremenskom intervalu od 28 dana.

Na slici 5.49 je vidljiv pad u broju ćelija u prve dve nedelje za sve vrste nosača, s tim da u sistemima sa manjom koncentracijom alginata je bolja vijabilnost kulture u tom periodu. Nakon 21 dana je primetan blagi porast u broju ćelija usled uticaja prisustvinih proteina.

U nosačima sa proteinima je zabeležen približan broj ćelija u periodu nakon 21 dan. Posle 28 dana najveća vijabilnost je u nasicima pripremanim sa prahom bez proteina i manjom koncentracijom alginata. Najmanja fluktuacija u broju ćelija je zabeležena za nosače bez dodatog koncentrata proteina.

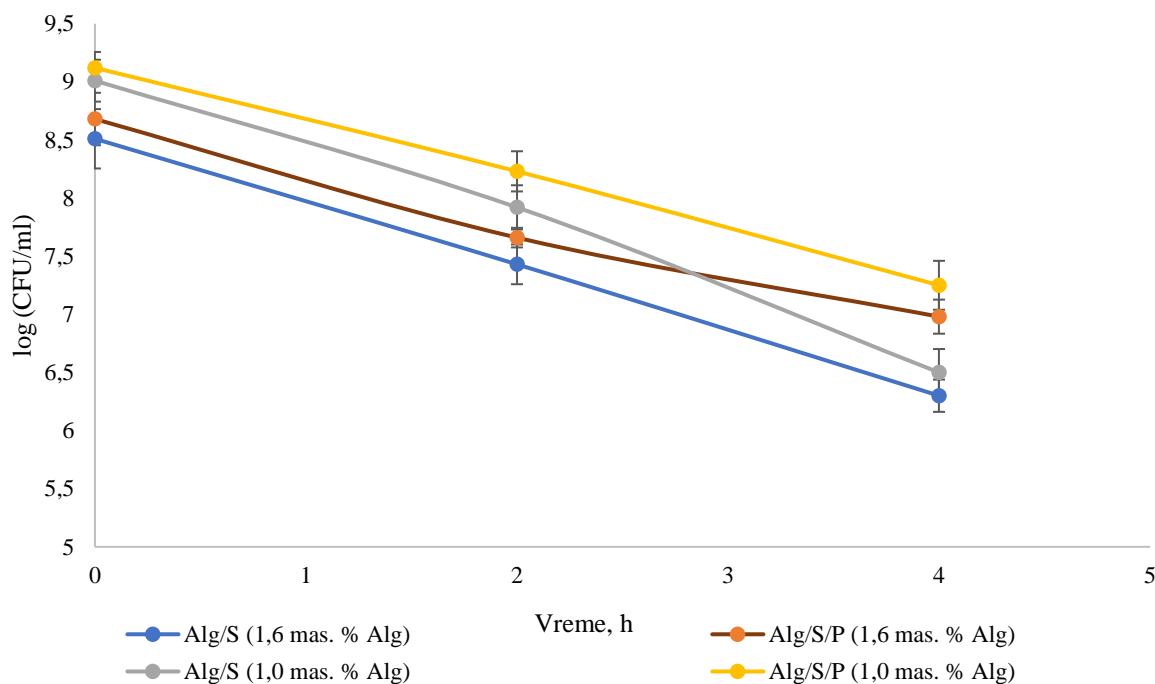
Vijabilnost kulture je razmatrana i u prahovima za period od 45 dana. Na slici 5.50 su date promene u broju ćelija ( $\log(\text{CFU/g})$ ) za pomenuti vremenski period. Intenzivniji pad u broju ćelija je primetan nakon dve nedelje i takav trend se nastavlja do kraja vremenskog perioda čuvanja prahova. Nakon mesec dana čuvanja prahova na sobnoj temperaturi može se uočiti blagi porast u broju ćelija za nosače koji su obogaćeni proteinima i to u oba slučaja sa manjom i većom koncentracijom alginata s tim da je malo veći rast u nosačima sa manjom koncentracijom alginata u uzorku. Broj ćelija se nakon perioda skladištenja za sve uzorke nalazi u opsegu  $10^6$ - $10^7$  što je zadovoljavajući broj ćelija nakon 45 dana, posebno za uzorke sa probiotskim kulturama.



Slika 5.50. Vijabilnost probiotske starter kulture ( $\log \text{CFU/g}$ ) za vremenski period skladištenja prahova.

### 5.3.5.3. Vijabilnost probiotske starter kulture i preživljavanje u simuliranim gastrointestinalnim uslovima

Vijabilnost inkapsulirane probiotske starter kulture u nosačima dobijenim liofilizacijom je određena prema metodi opisanoj u odeljku 4.3.14.5. Prilikom ispitivanja vijabilnosti kulture korišćeni su uzorci medijuma nakon procesa fermentacije. Nakon 2h provedenih u simuliranim uslovima želudačnog soka primetan je pad u broju ćelija za sva četiri uzorka za 1,0 logaritamsku jedinicu pri čemu je najveći pad zabeležen za nosače sa i bez dodatih proteina pri koncentraciji alginata od 1,6 mas. %. U periodu nakon 4h najbolje rezultate u pogledu preživljavanja su pokazali nosači sa dodatim koncentratom proteina. U odnosu na početni broj ćelija za nosače Alg/S pri manjoj i većoj koncentraciji alginata broj preživelih ćelija iznosi 74,01 % i 72,14 % dok u slučaju nosača sa dodatim proteinima pri manjoj i većoj koncentraciji alginata iznosi 80,41 % i 79,50 % (slika 5.51). Evidentno je da je dodatak proteina ima pozitivan uticaj na preživljavanje kulture nakon 4h u simuliranim GI uslovima. Probiotske kulture u sklopu ispitivane starter kulture su zabeležile broj veći od  $10^6$  nakon izlaganja 4h u pomentim uslovima što se može smatrati zadovoljavajućem broju u cilju dalje primene ove tehnike za inkapsulaciju kulture i zaštite kulture tokom pripreme i čuvanja fermentisanih napitaka.



Slika 5.51. Vijabilnost probiotske starter kulture (log CFU/mL) u periodu od 4h u simuliranim GI uslovima.



## 6. ZAKLJUČAK

U doktorskoj disertaciji je rađena karakterizacija prirodnih hidrogel sistema za inkapsulaciju probiotske starter kulture ABY 6. Korišćene tehnike inkapsulacije su ekstruzija, sprej-sušenje i sušenje smrzavanjem (liofilizacija). Inkapsulirana kultura je implementirana u napitke na bazi surutke i na taj način razmatrana primena ovakvog tipa sistema u proizvodnji fermentisanih napitaka na bazi surutke kao i funkcionalnog aditiva za potrebe prehrambene industrije. Karakterizacijom prirodnih hidrogel sistema sa inkapsuliranom kulturom dobijeni su sledeći rezultati:

- Optimizacijom tehnike ekstruzije ostvarena je uspešna inkapsulacija probiotske starter kulture u hitozanom obložene i neobložene hidrogel sisteme. Dobijeni su sferni nosači opsega veličina od 0,71-3,0 mm u zavisnosti od toga da li se inkapsulacija odvija u prisustvu elektrostatičkog potencijala.
- Eksperimentalno je potvrđeno da je optimalna koncentracija natrijum-alginata za pripremu nosača sa kulturom 1,6 mas. %.
- FTIR analizom spektara je potvrđena interakcija između inkapsulirane kulture i dobijenih nosača, s tim da je veći afinitet kulture prema hidrogel nosačima obogaćenim koncentratom proteina surutke. Interakcije između nosača i kulture su potvrđene prisustvom amidnih veza. Interakcije između kulture i hidrogel nosača kao i nosača i fermentacionog medijuma su praćene pomeranjima i intenzitetom pojedinih pikova, kao i nestajanja određenih pikova u spektrima inkapsulirane kulture i nosača. Rezultati su pokazali promene u pikovima amino i karboksilnih grupa pre i posle fermentacije, što ukazuje na jonske interakcije između karbonilne grupa alginata i amino grupa proteina. Difuzija  $\text{Ca}^{2+}$  iz fermentacionog medijuma u alginatnu mrežu je potvrđena pomeranjem vibracija  $-\text{C}-\text{O}$  i  $\text{C}-\text{O}-\text{H}$  na niže frekvencije kao i promenama spektra u regionima  $\text{COO}^-$  usled antisimetričnih i simetričnih vibracija.
- Primenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) analizirana je površinska morfologija uzoraka kao i uticaj fermentacionog medijuma na svojstva nosača. Površinska morfologija kao i način vezivanja inkapsulirane kulture za nosače su bitni za dalju primenu ovakvih sistema.

Uvid u mikrostrukturu i poroznost nosača je bitan zbog optimizacije sastava suspenzije za inkapsulaciju kulture. SEM mikrografije nosača su potvrdile efikasnost postupka inkapsulacije kulture primenom tehnike ekstruzije kao i prisustvo bakterijskih kolonija nakon inkapsulacije i u periodu čuvanja od 28 dana. Analizirani uzorci su prethodno liofilizovani zbog čega su i primetne neravnine na površini nosača. Rezultati su pokazali da dodatak samo kulture u nosaču nema značajniji uticaj na mikrostrukturu i poroznost nosača. Dodatkom surutke i proteina surutke vidljiva je glatkija površina nosača kao i veća poroznost nosača posebno u slučaju nosača sa dodatkom koncentrata proteina. Krioprotektantna svojstva proteina tokom liofilizacije su pozitivno uticala na vijabilnost kulture kao i da nosači zadrže sferni oblik nakon sušenja uzoraka za potrebe SEM analiza. Nosači koji su bili izloženi uslovima fermentacije imaju glatkiju površinsku morfologiju.

- Nakon inkapsulacije kulture u navedene nosače (hitozanom obložene i neobložene) određena je efikasnost postupka inkapsulacije. Rezultati ukazuju da su proteini imali najveći doprinos na efikasnost postupka inkapsulacije kulture ekstruzionom tehnikom. Pri čemu je kombinacija surutke i alginata pokazala najbolje rezultate dok oblaganjem hitozanom nakon inkapsulacije nije imalo statistički značajan doprinos u tom pogledu. Kalcijum-alginatni nosači bez dodatka surutke i proteina su imali i do 15,0 % manju efikasnost inkapsulacije kulture u poređenju sa nosačima obogaćenih surutkom. Rezultati za efikasnost inkapsulacije su pokazali da tehnikom ekstruzije je moguće ostvariti visoki stepen inkapsulacije probiotske starter kulture za nosače pripremane kombinacijom alginata i surutke (Alg/S) i proteinima surutke (Alg/S/P). Povećanje koncentracije proteina u polaznoj suspenziji kao i veličina nosača nemaju statistički značajan uticaj na efikasnost postupka inkapsulacije.
- Dobijeni nosači sa inkapsuliranom kulturom su implementirani u medijum na bazi surutke (70 mas. % surutka i 30 mas. % mleko). Nakon fermentacije se razmatrao uticaj uslova procesa na strukturu nosača kao i vijabilnost kulture. Najbolje rezultate su pokazali nosači Alg/S/P obloženi i neobloženi hitozanom. Kod pomenutih nosača se broj ćelija uvećao za  $1,22 \pm 0,02$ , što ukazuje i na afinitet inkapsulirane kulture prema nosačima. Vreme trajanja fermentacije inkapsuliranom kulturom je ~5,5 h dok za slobodnu kulturu iznosi 4 h. Usled prisustva zaštitne barijere produženo je vreme fermentacije dok je dostignuta vrednost pH=4,6.

- Bubrenje nosača tokom procesa fermentacije je bitno jer ima i uticaj na otpuštanje kulture u navedenim uslovima. Do promena u veličini nosača tokom fermentacije dolazi usled promena pH vrednosti fermentacionog medijuma u opsegu od 6,7 do 4,5. U ovom slučaju, za pH vrednosti medijuma iznad izoelektrične tačke alginata i proteina surutke (3,4-3,7 i 5,3) uočeno je bubrenje hidrogel nosača usled čega je došlo do većeg otpuštanja ćelija iz nosača. Dobijeni rezultati ukazuju da nosači sa koncentratom proteina kao i sa čistim alginatom najviše bubre u pomenutim uslovima. Na primerima nosača obloženih hitozanom, takođe je primetan porast veličine nosača ali manje nego u slučaju neobloženih kao i manji broj otpuštenih ćelija u fermentacionom medijumu. U nosačima sa čistim alginatom je najveći broj otpuštenih ćelija tokom fermentacije 34,5 %, što se može objasniti i izrazitom poroznošću ovakvog sistema zbog čega je i neophodno unaprediti ovakav nosač sa dodatkom surutke (5,2 % otpuštenih ćelija) i koncentratom proteina (21,3 %). Oblaganjem hitozanom nosača sa dodatkom surutke postignuto je otpuštanje ćelija manje od 5 %.
- Napici sa implemetiranom probiotskom kulturom su praćeni u vremenskom periodu od 28. dana, što je najčešće predviđen period čuvanja ovakvog tipa proizvoda na rafovima u hladnim uslovima. Oblaganjem nosača hitozanom je imalo pozitivan efekat na vijabilnost kulture u periodu skladištenja napitka. Nakon 21. dana, primetan je veći broj preživelih bakterija nego što je to slučaju nosačima koji nisu obloženi. Nosači sa dodatkom proteina imaju umerenu fluktuaciju u broju ćelija u ispitivanom vremenskom intervalu što je od velikog značaja za deklarisanje napitaka sa implementiranim probiotskim ćelijama.
- *In vitro* eksperimenti koji simuliraju uslove ljudskog gastro-intestinalnog trakta (GIT) su pokazali da hidrogel sistemi koji su proteinsko-polisharidne strukture imaju veliki potencijal za zaštitu probiotskih kultura od štetnih efekata gornjeg GIT-a, osiguravajući dostizanje zadovoljavajućeg broja bakterija u niži deo GIT-a. Broj vijabilnih ćelija (*Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus acidophilus*) se smanjivao tokom prva dva sata (simulirani želudačni sok sa dodatkom pepsina, pH 2,5) za oba uzorka i ostalo stabilan naredna dva sata (intestinalni sok sa pankreatinom i 0,3 % goveđe žuči, pH 7,0). Nosači obloženi hitozanom su pokazali preživljavanje 96,2 % dok nosači Alg/S/P i Alg/S 93,6 % i 85,9 % datim redosled nakon 4h simulacije GIT-u odnosu na početni broj ćelija dobijenih u nosačima nakon fermentacije. Poređenjem dobijenih rezultat za inkapsuliranu kulturu sa rezultatima za slobodnu kulturom, moguće je primetiti značajan doprinos postupka inkapsulacije u pogledu vijabilnosti kulture tokom simuliranih uslova GIT-a.

- Uzimajući u obzir da su nosači koji su obloženi hitozanom pokazali najbolja svojstva sa aspekta vijabilnosti i stabilnosti, analizirana su i reološka svojstva ovakvog tipa nosača u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima. Na osnovu dobijenih vrednosti dinamičkih modula je razmatran uticaj simuliranih sredina na reološko ponašanje nosača. Modul čuvanja (elastičnosti) beleži veći pad za nosače sa ćelijama u prvih 2h u poređenju sa nosačima bez ćelija dok u intestinalnom soku je primetan veći pada čvrstoće materijala za nosače bez ćelija. Smanjenje modula čuvanja, uzrokovano slabljenjem nosača, izraženo je u simuliranim intestinalnim uslovima u poređenju sa rezultatima dobijenim za gastrični sok.
- Na osnovu dobijenih vrednosti dinamičkih modula primenjena je modifikovana frakciona Kelvin-Voigtova jednačina koja zadovoljava uslove za modelovanja reološkog ponašanja nosača sa pomenutim svojstvima. Najstabilnija struktura odgovara nosačima bez ćelija pri  $t = 0$ . Rast ćelija tokom fermentacije indukuje slabljenje nosača što dovodi do smanjenja efektivnog modula za 2,28 puta. Enzimski indukovana parcijalna degradacija nosača dobijenih u gastričnim uslovima uzrokuje smanjenje efektivnog modula nosača sa i bez ćelija tokom prvih 60-90 min. Nakon toga se povećava efektivni modul usled inaktivacije pepsina izazvanog interakcijama sa alginatnim lancima. Efektivni modul za nosače sa i bez ćelija se smanjuje u simuliranim intestinalnim uslovima. Veći pad u modulu je zabeležen na primeru nosača bez ćelija. Ovaj fenomen je uzrokovan nemogućnošću ćelija da formiraju stabilne adhezivne kontakte sa proteinima surutke pod gastričnim uslovima. Efektivni modul nosača sa ćelijama je 1,88 puta veći nakon 2 h u intestinalnim uslovima. Vrednosti predviđene matematičkim modelom za nosače sa ćelijama i bez dobro koreliraju sa eksperimentalnim podacima, uz relativnu grešku od 10 %.
- Pripremani hidrogel sistemi sa inkapsuliranom kulturom su bili izlagani uslovima fermentacije i pratile su se promene u mehaničkim svojstvima nosača kao posledice promena u pH vrednosti medijuma i povećanjem broja ćelija u hidrogel sistemima u datim uslovima. Dobijeni rezultati ukazuju da sa povećanjem koncentracije alginata raste i modul elastičnosti. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da inkapsulacijom kulture u čiste kalcijum-alginatne nosače dolazi do pad u čvrstoći hidrogel nosača usled prisustva odbojnih interakcija između slobodnih delova alginatnih lanaca i negativno naelektrisane ćelijske membrane inkapsulirane kulture.

- Poređenjem rezultata čistih nosača i nosača sa dodatkom surutke i kulture može se zaključiti da dodatak surutke ima značajan doprinos u unapređenju mehaničkih svojstava nosača i samim tim na mehaničku stabilnost hidrogel sistema. Ovaj efekat se može objasniti sposobnošću proteina surutke da formiraju gel u prisustvu jona  $\text{Ca}^{2+}$  jona. Poređenjem rezultata dobijenih za silu pre i posle fermentacije, može se zaključiti da je proces fermentacije unapredio čvrstoću hidrogel nosača. Dodatak koncentrata proteina u nosače i oblaganje nosača hitozanom je takođe imalo pozitivan uticaj na mehanička svojstva nosača.

Karakterizacijom nosača sa inkapsuliranom kulturom pripremanih tehnikom sprej-sušenja dobijeni su sledeći rezultati:

- Nakon postupka sprej-sušenja određene su veličine dobijenih nosača koje iznose  $7,23 \pm 0,5 \mu\text{m}$  i  $5,06 \pm 0,2 \mu\text{m}$  za nosače tipa Alg/S/P i Alg/S datim redosled. Takođe je na osnovu dobijenih vrednosti za  $\zeta$ -potencijal zaključeno je da dodatak koncentrata proteina dovodi do stabilizacije sistema usled novih interakcija između nosača i proteina što je potvrđeno i FTIR analizom.
- Na osnovu dobijenih SEM mikrofotografija se može zaključiti da nosači dobijeni sprej-sušenjem zadržavaju sferni oblik s tim da na površini kao i kod nosača dobijenih ekstruzijom su uočljive neravnine i brazde. Do formiranja brazda dolazi usled dehidratacije nosača u procesu sprej-sušenja. Izražajnije su neravnine kod nosača tipa Alg/S/P.
- Rezultati za vijabilnost kulture nakon postupka sušenja ukazuju da dodatak proteina ima pozitivan efekat na broj ćelija i samim tim i na efikasnost procesa inkapsulacije. Takođe je pokazano da dodatkom surutke kao i kombinacije surutke i proteina može pružiti adekvatnu zaštitu starter kulture i omogućiti efikasna inkapsulacija probiotske starter kulture. Efikasnost inkapsulacije za nosače tipa Alg/S iznosi 76,8 % dok za nosače tipa Alg/S/P 79,6 %.
- Rastvorljivost prahova kao i sadržaj vlage u uzorcima su veoma bitni parametri u očuvanju vijabilnosti inkapsulirane kulture tokom proizvodnog procesa i skladištenja proizvoda. Pomenuti parametri imaju uticaj i na teksturalna svojstva proizvoda od čega može da zavisi primenljivost dobijenih prahova u prehrambenoj industriji. Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultat dobijeni prahovi bez dodatih proteina surutke su pokazali bolju rastvorljivost za 2,0 %.

Poređenjem eksperimentalnih rezultata za prahove bez dodatih proteina sadržaj vlage u uzorcima je iznosio  $4,7 \pm 0,31$  %, a za uzorke sa dodatkom proteina  $3,87 \pm 0,11$  %. Rezultati sadržaja vlage u uzorcima, ukazuju da dodati proteini smanjuju difuziju vlage u prahovima usled denaturacije proteina koji formiraju čvrst sloja poput "kore" usled čega se smanjuje prisustvo vlage u ovakvim uzorcima.

- Fermentacija sa nosačima obogaćenim proteinima je trajala ~ 6 h dok je fermentacija sa nosačima bez dodatih proteina trajala ~ 5 h. Aktivacijom kulture u mleku 1 h pre početka fermentacije može se skratiti fermentacija za nosače sa dodatkom koncentrata proteina surutke za 30 min što nije slučaj sa fermentacijom nosačima bez dodatih proteina. Denaturacija proteina nakon sprej-sušenja je uticala na poroznost nosača zbog čega je i fermentacija trajala duže u slučaju nosača sa dodatim koncentratom proteina. Razlika u broju ćelija ( $\Delta \log$  (CFU/g)) pre i posle fermentacije za Alg/S iznosi 2,13 dok u slučaju nosača sa dodatkom proteina iznosi 1,4. Nakon implementacije nosača dobijenih sprej sušenjem u fermentacioni medijum dolazi do rehidratacije sistema kao i dodatne jonske izmene između nosača i medijuma bogatog jonima  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Praškasti uzorci su čuvani u vremenskom periodu od 45 dana kao i dobijeni napici na bazi surutke. Analizirana je vijabilnost kulture u datom vremenskom periodu. Broj ćelija za oba tipa nosača se održava na istom broju u periodu od 14 dana, s tim da su manje fluktuacije u broju kod nosača sa dodatim koncentratom proteina. Nakon 14 dana je primetan pad u broju ćelija kod pomenutih nosača ali je veći pad zabeležen kod nosača sa dodatkom surutke.

U nosačima sa dodatim proteinima je primetan zadovoljavajući broj u periodu do 37 dana za razliku od nosača sa samo surutkom gde se optimalan broj ostvaruje do 21. dan. Na osnovu dobijenih rezultata za prisustvo vlage u uzorcima nakon sušenja ukazuje da usled denaturacije proteina se povećava njihova zaštitna uloga od vlage a samim tim i bolje preživljavanje bakterijskih ćelija u prahovima sa većim sadržajem proteina surutke.

- Analizirana je i vijabilnost kulture u napicima tokom vremenskog perioda od 28 dana. Pri čemu su dobijene fluktuacije u broju za dati period statistički zanemarljive ( $p < 0,05$ ). U oba slučaja je dostignut zadovoljavajući broj probiotskih bakterija nakon predviđenog perioda čuvanja napitka, za prah Alg/S 8,75 ( $\log$  (CFU/mL)) i za prah Alg/S/P 8,89 ( $\log$  (CFU/mL)).

- Promene u vijabilnosti probiotskih kultura u simuliranim GI uslovima su praćene u vremenskom intervalu od 4h. U prvih 2h je primetan pad u broju ćelija u odnosu na početni broj za 5,0 % za napitak pripreman sa nosačem tipa Alg/S dok je za napitke dobijene sa nosačem Alg/S/P primetan pad za 7,0 %. Nakon 4h izlaganja uzoraka u simuliranim uslovima u odnosu na početni broj ćelija, preživljavanje kulture u nasicima je 83,03 % i 89,04 % za nosače Alg/S i Alg/S/P datim redosledom.

Karakterizacijom nosača sa inkapsuliranom kulturom pripremanih tehnikom sušenja smrzavanjem dobijeni su sledeći rezultati:

- Nakon postupka sušenja je rađena analiza veličine nosača kao i naelektrisanje dobijenog uzorka. Sistemi sa dodatim proteinima imaju manje vrednosti  $\zeta$ -potencijala, što ukazuje i na njihov dopinos sa aspekta stabilnosti sistema kao posledice uspostavljanja novih veza u novonastalim sistemima. Takođe je primetno da sa dodatkom proteina kao i povećanjem koncentracije polisaharidne komponente (alginata) se povećava veličina dobijenih nosača. Veličine dobijenih nosača su u opsegu 2,98-5,22  $\mu\text{m}$ .
- Na osnovu SEM mikrografija za nosače dobijene tehnikom sušenja smrzavanjem, primetan je veći afinitet kulture prema nosačima koji su pripremani sa manjom koncentracijom alginata kao i veća poroznost u sistemima sa dodatom surutkom i proteinima surutke. Zaštitna svojstva proteina su imala pozitivan uticaj na vijabilnost kulture.
- Nakon sušenja smrzavanjem od polazne suspenzije su dobijeni prahovi nosača Alg/S i Alg/S/P za koncentracije alginata 1,0 mas. % i 1,6 mas. %. Za ispitivane suspenzije gubici su 12,0 % i 16,0 % za nosače bez proteina pri koncentracijama alginata 1,0 mas. % i 1,6 mas. % navedenim redosledom. Za slučaj nosača sa dodatim proteinima surutke gubici nakon postupka sušenja iznose 22,0 % i 19,0 % za nosače sa koncentracijom alginata 1,0 mas. % i 1,6 mas. % datim redosledom. Na osnovu eksperimentalnih rezultat primetno je da sa smanjenjem koncentracije proteina je bolje preživljavanje kulture kao i da poređenjem nosača sa i bez dodatka proteina vidljiva je veća efikasnost inkapsulacije u slučaju sistema sa dodatim proteinima. Tehnikom liofilizacije je dobijeno bolje preživljavanje kulture u poređenju sa tehnikom sprej-sušenja posebno u slučaju nosača bez dodatih proteina.

- Prahovi sa dodatim proteinima imaju manju rastvorljivosti u vodi u poređenju sa uzoracima bez proteina. Takođe, bolja je rastvorljivost za nosače pripremane sa manjom koncentracijom alginata. Vrednosti za prisustvo vlage u uzorcima su u opsegu 2,1-3,4 % što je u skladu sa standardima koji su potrebni za primenu ovakvo tipa praha u mlekerskoj industriji.
- Prahovi sa manjom koncentracijom alginata (1,0 mas. %) sa i bez dodatka proteina su dali najbolje rezultate za vijabilnost inkapsulirane kulture nakon sušenja smrzavanjem. Posle procesa fermentacije najveći porast u broju ćelija je dostignut za nosače sa manjom koncentracijom alginata ali bez dodatka proteina.
- Vijabilnost probiotske kulture je praćena u vremenskom periodu od 28 dana u pripremljenom napitku kao i 45 dana u praškastim uzorcima. Probiotska starter kultura ima zadovoljavajuću vijabilnost nakon analiziranog perioda skladištenja. Broj probiotskih bakterija u nosačima je  $> 10^7$  što ukazuje da dobijeni nosači tehnikom sušenja smrzavanjem mogu koristiti u pripremi fermentisanog napitka.
- Prilikom ispitivanja vijabilnosti kulture korišćeni su uzorci medijuma nakon procesa fermentacije. U odnosu na početni broj ćelija za nosače Alg/S pri manjoj i većoj koncentraciji alginata broj preživelih ćelija iznosi 74,01% i 72,14 % dok u slučaju nosača sa dodatim proteinima pri manjoj i većoj koncentracijom alginata iznosi 80,41 % i 79,50 %. Dodatak proteina ima pozitivan uticaj na preživljavanje kulture nakon 4h u simuliranim gastro-intestinalnim uslovima. Probiotske kulture u sastavu korišćene starter kulture su zabeležile broj veći od  $10^6$  nakon izlaganja 4h u pomentim uslovima što se može smatrati zadovoljavajućim broj u cilju dalje primene ove tehnike za inkapsulaciju kulture i zaštite kulture tokom pripreme i čuvanja fermentisanih napitaka.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji daju uvid u karakteristike i primenu dobijenih biopolimernih nosača za inkapsulaciju probiotske starter kulture, ilustrujući njihov potencijal za primenu kao funkcionalnih aditiva u prehrambenoj industriji. Primenom navedenih tehnika se može pružiti zaštita probiotskoj starter kulturi i omogućiti njihovo ciljano otpuštanje u tankom crevu gde se nastanjuju i ispoljavaju svoj pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje.



## 7. LITERATURA

1. Agrawal R. (2005) Probiotics: an emerging food supplement with health benefits, *Food Biotechnology* 19 (3), 227–246.
2. Amine K M, Champagne CP, Salmieri S, Britten M, St-Gelais D, Fustier P, Lacroix, M. (2014) Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying, *LWT – Food Science and Technology*, 56, 111–117.
3. Amund OD. (2016) Exploring the relationship between exposure to technological and gastrointestinal stress and probiotic functional properties of lactobacilli and bifidobacterial, *Canadian Journal of Microbiology*, 62, 715–725.
4. Anal AK, Singh H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for a industrial applications and targeted delivery, *Trends Food Science and Technology*, 18 (5), 240–251.
5. Ananta E, Volkert M, Knorr D. (2005) Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG, *International Dairy Journal*, 15, 399–409.
6. Assadi M M, Pourahmad R, Moazami N. (2000) Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(6), 541–543.
7. Avila-Reyesa S V, Garcia-Suarez F J, Jimenez M T, San Martín-Gonzalez M F, Bello-Perez L A. (2014) Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability, *Carbohydrate Polymers*, 102, 423–430.
8. Avila-Reyesa SV, Garcia-Suarez FJ, Jimenez MT, San Martín-Gonzalez M F, Bello-Perez LA. (2014) Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability, *Carbohydrate Polymers*, 102, 423–430.
9. Bajpai S, Sharma S. (2004) Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  ions. *Reactive and Functional Polymers*. 59(2), 129–40.
10. Basholli-Salihu M, Mueller M, Salar-Behzadi S, Unger FM, Viernstein H. (2014) Effect of lyoprotectants on  $\beta$ -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices, *LWT - Food Science and Technology*, 57, 276–282.
11. Behboudi-Jobbehdar S, Soukoulis C, Yonekura L, Fisk I. (2013) Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748, *Drying Technology*, 31, 1274–1283.

12. Belščak-Cvitanović A, Dorđević V, Karlović S, Pavlović V, Komes D, Ježek D, i ostali (2015) Protein-reinforced and chitosan-pectin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract, *Food Hydrocolloids*, 51, 361–374.
13. Bierbaum G, Sahl HG. (2009) Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 2–18.
14. Blana V A, Grounta A, Tassou C C, Nychas GJ E, Panagou EZ. (2014) Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives, *Food Microbiology*, 38, 208–218.
15. Borgogna M, Bellich B, Zorzin L, Lapasin R, Cesàro A. (2010) Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system, *Food Chemistry*, 122, 416–423.
16. Borgogna M, Bellich B, Zorzin L, Lapasin R, Cesàro A. (2010) Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system, *Food Chemistry*, 122 (2), 416–423.
17. Brown L, Pingitore E V, Mozzi F, Saavedra L, Villegas J M, Hebert EM. (2016) Lactic acid bacteria as cell factories for the generation of bioactive peptides, *Protein and Peptide Letters*, 24, 146–155.
18. Bulatović M, Rakin M, Mojović Lj, Nikolić S, Vukašinović-Sekulić M, Đukić Vuković A. (2012) Surutka kao sirovina za proizvodnju funkcionalnih napitaka, *Hemijska industrija*, 66 (4)4, 567–579.
19. Burgain C, Gaiani C, Linder M, Scher J. (2011) Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, *Journal of Food Engineering*, 104, No 4, 467–483.
20. Burgain J, Gaiani C, Francius G, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C, Lebeer S, i ostali (2013) In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 104, 153–62.
21. Çabuk B, Harsa ŞT. (2015) Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(6), 650–656.
22. Canani RB, Cirillo P, Terrin G, Cesarano L, Spagnuolo MI, De Vincenzo A, Albano F, Passariello A, De Marco G, Manguso F, Guarino A. (2007) Probiotics for treatment of

- acute diarrhea in children: a randomized clinical trial of five different preparations, *British Medical Journal*, 335 (7615), 340–342.
23. Canani RB, Cirillo P, Terrin G, Cesarano L, Spagnuolo MI, De Vincenzo A, Albano F, Passariello A, De Marco G, Manguso F, Guarino A, 2007. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations, *BMJ*, 335–340.
24. Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM, Cal-Vidal J. (2005) Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 420–428.
25. Casarotti S N, Monteiro D A, Moretti M M S, Penna A LB. (2014) Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk, *Food Research International*, 59, 67–75.
26. Champagne C, Fustier P. (2007a) Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2), 184–190.
27. Champagne CP, Gardner N, Brochu E, Beaulieu Y. (1991) The freeze drying of lactic acid bacteria: a review, *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24, 118–28.
28. Chan ES, Boon-Beng L, Ravindra P, Poncelet D. (2009) Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion–dripping method, *Journal of Colloid and Interface Science*, 338 (1), 63–72.
29. Chan ES, Lim T K, Voo WP, Pogaku R, Tey BT, Zhang Z. (2011) Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness, *Particuology*, 9, 228–234.
30. Chandramouli V, Kalasapathy K, Peiris P, Jones M (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric conditions, *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27–35.
31. Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán MDC. (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate–chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 142 (1–2), 185–189.
32. Chavez BE, Ledebor AM. (2007) Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival, *Drying Technology*, 25, 1193–201.
33. Chen LY, Subirade M. (2006) Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds, *Biomaterials*, 27(26), 4646–4654.

34. Chen HY, Li XY, Liu BJ, Meng XH.(2017) Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions, *Journal of Functional Foods*, 29, 248–255.
35. Chen LY, Subirade M. (2007) Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate–whey protein granular microspheres, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(3), 354–362, 2007.
36. Chen MJ, Chen KN, (2007) Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley-Blackwell, USA, pp. 83–107.
37. Chun J-Y, Kim J-M, Min S-G. (2012) Effect of Whey Protein Isolate on Ice Recrystallization Characteristics in Whey Protein Isolate/ $\kappa$ -Carrageenan Matrix, *Korean Journal of Food Science*, 32(5), 627–634.
38. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. (2007) Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus, *Letters in Applied Microbiology*, 45, 454–460.
39. Cook M T, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. (2011) Production and evaluation of dry alginate–chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria, *Biomacromolecules*, 12, 2834–2840.
40. Corcoran B M, Ross R P, Fitzgerald G F, Stanton C. (2004) Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances, *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1024–1039.
41. Cui JH, Goh JS, Kim PH, Choi SH, Lee BJ (2000). Survival and stability of bifidobacteria located in alginate poly-l-lysine microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 210, 51–59.
42. De Castro A, Montaña A, Casado F J, Sánchez A H, Rejano L (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish style green olive fermentation, *Food Microbiology*, 19(6), 637–644.
43. De Prisco A, Maresca D, Ongeng D, Mauriello G. (2015) Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment, *LWT - Food Science and Technology*, 61, 452–462.
44. Desai KG, Park HJ. (2006) Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate–chitosan microspheres prepared by spray drying, *Journal of Microencapsulation*, 23(1), 91–103.

45. De Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components, *International Dairy Journal*, 20 (4), 292–302.
46. Desai KGH, Park HJ. (2005) Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, *Journal of Microencapsulation*, 22, 179–192.
47. Dianawati D, Mishra V, Shah NP. (2012) Role of Calcium Alginate and Mannitol in Protecting Bifidobacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (19), 6914–6921.
48. Dimantov A, Greenberg M, Kesselman E, Shimoni (2003). Study of high amylase corn starch as food grade enteric coating in a microcapsule model systems, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 93–100.
49. Djordjevic VD, Jaric J, Fabry B, Fredberg JJ, Stamenovic D. (2003) Fractional Derivatives Embody Essential Features of Cell Rheological Behaviour, *Annals of Biomedical Engineering*, 31, 692–699.
50. Doherty S B, Gee V L, Ross R P, Stanton C, Fitzgerald G F, Brodkorb, A. (2011) Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection, *Food Hydrocolloids*, 25, 1604–1617.
51. Draget KI, Skjak-Braek G, Christensen BE, Gaserød O, Smidsrød O. (1996) Swelling and partial solubilization of alginic acid gel beads in acidic buffer, *Carbohydrate Polymers*, 29, 209–215.
52. Dunne C, Mahony L, Lisa M, Thornton G, Morrissey D, Halloran S, Feeney M, Flynn M, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Gerald C, Sullivan Shanahan F, Collins J.K. (2001) In vitro selection criteria for the probiotic bacteria of human origin: correlate with the vivo findings, *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386–392.
53. Eastman J E, Moore C O. (1984) Cold water soluble granular starch for gelled food composition. U.S. Patent 4465702.
54. Erukhimovitch V, Pavlov V, Talyshinsky M, Souprun Y, Huleihel M. (2005) FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 1105–1108.
55. FAO/WHO, Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. (2002) *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada.

56. Fioramonti SA, Perez AA, Aringoli EE, Rubiolo AC, Santiago L G. (2014) Design and characterization of soluble biopolymer complexes produced by electrostatic self-assembly of a whey protein isolate and sodium alginate, *Food Hydrocolloids*, 35, 129–136.
57. Fritzen-Freire CB, Prudencio ES, Amboni RDM C, Pinto SS, NegraoMurakami AN, Murakami FS. (2012) Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics, *Food Research International*, 45, 306–312.
58. Fuller R. (1989) Probiotics in man and animal, *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.
59. Gardiner GE, O’Sullivan E, Kelly J, Auty MAE, Fitzgerald GF, Collins JK, Ross RP, Stanton C. (2000) Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2605–12.
60. Gawkowsky D, Chikindas M L. (2013) Non-dairy probiotic beverages: the next step into human health, *Beneficial Microbes*, 4, 127–142.
61. Gbassi G K, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. (2009) Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins, *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 103–105.
62. Gbassi G K, Yolou F S, Sarr S O, Atheba P G, Amin C N, Ake M. (2012) Whey proteins analysis in aqueous medium and in artificial gastric and intestinal fluids, *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(4), 1828–1837.
63. Gebare C, Chaves KS, Ribeiro MCE, Souza F N, Grosso C R F, Gigante M L. (2013) Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions, *Food Research International*, 51, 872–878.
64. Gerez CL, Font de Valdez G, Gigante ML, Grosso CRF. (2012) Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH, *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 552–6.
65. Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, Aqil T, Zulifqar Z, Tariq A, MehmoodS. (2014) Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 222–229.
66. Gouin S.(2004) Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330–347.
67. Gunasekaran S, Ko S, Xiao L. (2007) Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications, *Journal of Food Engineering*, 83, 31–40.

68. Hadzieva J, Mladenovska K, Simonoska Crcarevska M, Glavaš Dodov M, Dimchevska S, Geškovski N, Grozdanov A, Popovski E, Petruševski G, Chachorovska M, Petreska Ivanovska T, Petruševska-Tozi L, Ugarkovic S, Goracinova K. (2017) Lactobacillus casei Encapsulated in Soy Protein Isolate and Alginate Microparticles Prepared by Spray Drying, *Food Technology and Biotechnology*, 55 (2), 173–186.
69. Haffner FB, Diab R, Pasc A. (2016) Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches, *AIMS Materials Science*, 3(1),114–136.
70. Hansen LT, Allan-Wojtas PM, Jin YL, Paulson AT. (2002) Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions, *Food Microbiology*, 19, 35–45.
71. Harnsilawata T, Pongsawatmanita R, McClements DJ. (2006) Characterization of b-lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study, *Food Hydrocolloids*, 20, 577–585.
72. Heidebach T, Först P, Kulozik U. (2009a) Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins, *Food Hydrocolloids*, 23 (7), 1670–1677.
73. Heidebach T, Först P, Kulozik U. (2009b) Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells, *International Dairy Journal*, 19 (2), 77–84.
74. Heidebach T, Först P, Kulozik U. (2012) Microencapsulation of probiotic cells for food applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 291–311.
75. Holkem A T, Raddatz GC, Barin JS, Flores ÉMM, Muller EI, Codevilla CF, de Menezes CR. (2017) Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB12 by emulsification/internal gelation, *LWT-Food Science and Technology*, 76, 216–221.
76. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (2), 365S–373S.
77. Holzapfel WH, Wood BJ (2014) Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy (Eds.) pp. 447–455. John Wiley Sons, Ltd.
78. Hoobin P, Burgar I, Zhu S, Ying D, Sanguansri L, Augustin MA. (2013) Water Sorption Properties, Molecular Mobility and Probiotic Survival in Freeze Dried Protein–Carbohydrate Matrices, *Food Function* 4, 1376–1386.
79. I. Podlubny, Fractional Differential Equations, Mathematics in Science and Engineering, first ed., Academic Press, San Diego, 1999.

80. Jankovic I, Sybesma W, Phothirath P, Ananta E, Mercenier A. (2010) Application of probiotics in food products – challenges and new approaches, *Current Opinion in Biotechnology*, 21 (2), 175–181.
81. Jiang Y, Li Y, Chai Z, Leng X. (2010) Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5100–5108.
82. Jinapong N, Supphantharika M, Jamnong P, Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration, *Journal of Food Engineering*, 84, 194–205.
83. Jofré A, Aymerich T, Garriga M. (2015) Impact of different cryoprotectants on the survival of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei/paracasei* during long-term storage, *Beneficial Microbes*, 6(3), 381–6.
84. Kailasapathy K. (2009) Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, *Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4 (6).
85. Kailasapathy K. (2009): Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development, CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, *Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4, 1–19.
86. Kailasapathy, K. (2002) Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications, *Current Issues in intestinal Microbiology*, 3 (2), 39–48.
87. Kalliola S, Repo E, Srivastava V, Heiskanen JP, Sirviö JA, Liimatainen H, Sillanpää M. (2017) The pH sensitive properties of carboxymethyl chitosan nanoparticles cross-linked with calcium ions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153, 229–236.
88. Kansiz M, Heraud P, Wood B, Burden F, Beardall J, McNoughton D.(1999) Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains, *Phytochemistry*, 52, 407–17.
89. Karimi R, Mortazavian AA, Da Cruz AG. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review, *Dairy Science and Technology*, 91, 283–308.
90. Kasmiasi TU, Harmayani E, Rahayu ES. (2016) Survival of *Lactobacillus plantarum* DAD 13 during Spray Drying and Its Application for Yoghurt Fermentation, *International Research Journal of Biological Science*, 5(2), 16–22.
91. Kebary KMK, Hussein SA, Badawi RM (1998). Improving viability of *Bifidobacterium* and their effect on frozen ice milk, *Journal of Dairy Science*, 26, 319–337.



92. Kekkonen RA, Vasankari TJ, Vuorimaa T, Haahtela T, Julkunen I, Korpela R. (2007) The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners, *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 17 (4), 352–363.
93. Kim JU, Kim B, Shahbaz HM, Lee SH, Park D, Park J. (2016) Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage, *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 519–530.
94. Kim SJ, Shin SR, Lee YM, Kim SI. (2003) Swelling characterizations of chitosan and polyacrylonitrile semi-interpenetrating polymer network hydrogels, *Journal of Applied Polymer Science*, 87, 2011–2015.
95. Kosin B., Rakshit SK. (2006) Criteria for production of probiotic: Review, *Journal of Food Technology & Biotechnology*, 44, 371–379.
96. Kostić IT, Isailović BD, Đorđević VB, Lević SM, Nedović VA, Bugarski BM. (2012) Elektrostatička ekstruzija kao disperziona tehnika za inkapsulaciju ćelija i biološki aktivnih supstanci, *Hemijska industrija*, 66 505–517.
97. Kostov G, Angelov M, Mihaylov I, Poncelet D, Mechanical properties of Ca-alginate beads for ethanol fermentation with immobilized yeast, *Revue de Génie Industriel*, 5, 25–35,
98. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, *International Dairy Journal*, 13, 3–13.
99. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth HC. (2006) Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage, *LWT - Food Science and Technology*, 39, 177–183.
100. Krunić TŽ, Obradović NS, Rakin MB. (2019) Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture, *Food Chemistry*, 293, 74–82.
101. Kurtmann L, Carlsen CU, Risbo J, Skibsted LH. (2009) Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate, *Cryobiology*, 58, 175–80.
102. Larena I, Melgarejo P, De Cal A. (2003) Drying of *Conidia* of *Penicillium oxalicum*, a biological agent against *Fusarium* wilt of tomato, *Journal of Phytopathology* 1, 51:600–6.

103. Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, Grøndahl L. (2007) Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS, *Biomacromolecules*, 8, 2533–2541.
104. Le Tien C, Kokoszka M, Ispas-Szabo P, Mateescu M, Delmas-Patterson G, Yu H-L, Lacroix M. (2000) Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5566–5575.
105. Lee KI, Heo TR (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 869–973.
106. Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3592–3597.
107. Li XY, Chen XG, Cha DS, Park HJ, Liu CS. (2009) Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate–gelatin and its properties, *Journal of Microencapsulation*, 26(4) 315–324.
108. Lian WC, Hsiao HC, Chou CC. (2002) Survival of bifidobacteria after spray-drying, *International Journal of Food Microbiology*, 74, 79–86.
109. Lin CK, Tsai HC, Lin PP, Tsen HY, Tsai CC. (2008) *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. *Anaerobe*, 14, 251–255.
110. Lin J Z, Yu WT, Liu X D, Xie H G, Wang W, Ma X J. (2008) In vitro and in vivo characterization of alginate–chitosan–alginate artificial microcapsules for therapeutic oral delivery of live bacterial cells, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 660–665.
111. Livney YD. (2010) Milk proteins as vehicles for bioactives, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15 (1–2), 73–83.
112. Lorieau L, Halabi A, Ligneul A, Hazart E, Dupont D, Flourey J. (2018) Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during in vitro digestion, *Food Hydrocolloids*, 82, 399–411.
113. Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou, E, Servin A, De Vuyst L. (2006) Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds, *Research in Microbiology*, 157, 241–247.

114. Manojlović V, Đonlagić J, Obradović B, Nedović V, Bugarski B. (2006) Investigations of Cell Immobilization in alginate: rheological and electrostatic extrusion studies, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 505–510.
115. Manojlović V, Nedović V, Kailasapathy K, Zuidam N. (2010) Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. In: Zuidam, N. J., Nedović, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer Science+Business Media, London, pp. 269–302.
116. Manojlović V, Nedović VA, Kailasapathy K, Zuidam JN. (2010): Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. In: Zuidam NJ, Nedović VA (Eds.), *Encapsulation Technologies for Food Active Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, pp. 269–301.
117. Martín M J, Lara-Villoslada F, Ruiz M A, Morales M E. (2015). Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15-25.
118. Messaoud GB, Sánchez-González L, Jacquot A, Probst L, Desobry S. (2015) Alginate/sodium caseinate aqueous-core capsules: a pH-responsive matrix, *Journal of Colloid and Interface Science*, 440, p.1–8, 2015
119. Michaylova M, Minkova S, Kimura K, Sasaki T, Isawa K. (2007) Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria, *FEMS Microbiology Letters*, 269(1), 160–169.
120. Millqvist-Fureby A, Elofsson U, Bergenstahl B. (2001) Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins, *Colloid Surface B*, 21, 47–58.
121. Minekus M, Alving M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carriere F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Egger L, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie A, Marze S, McClements D J, Menard O, Recio I, Santos C N, Singh R P, Vegarud G E, Wickham M S J, Weitschies W, Brodkorb A. (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus, *Food Function*, 5, 1113–1124.
122. Mirković M., (2016) Primena i vijabilnost autohtonih sprej-sušenih potencijalnih probiotskih bakterija mlečne kiseline u hrani i gastrointestinalnim uslovima, Doktorska disertacija.

123. Mishra V, Shah C, Mokashe N, Chavan R, Yadav H, Prajapati J. (2015) Probiotics as potential antioxidants: A systematic review, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63, 3615–3626.
124. Moayyedi M, Eskandari MH, Rad AHE, Ziaee E, Khodaparast MHH, Golmakani M-T. (2018) Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Journal of Functional Foods*, 40, 391–399.
125. Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. (2007) Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms, *Iranian journal of Biotechnology*, 5(1), 2007.
126. Mortazavian AM, Sohrabvandi S (2006c). Probiotics and food Probiotic products, Eta Publication, Iran, (In Farsi).
127. Mugula J K, Narvhus J A, Sørhaug T. (2003) Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food, *International Journal of Food Microbiology*, 83(3), 307–318
128. Muthukumarasamy P, Allan-Wojtas P, Holley RA. (2006) Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules, *Journal of Food Science*, 71, M20–M24.
129. Nag A, Das S. (2013) Effect of trehalose and lactose as cryoprotectant during freeze-drying, in vitro gastro-intestinal transit and survival of microencapsulated freeze-dried *Lactobacillus casei* 431 cells, *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 161–169.
130. Naidu A S, Bidlack W R, Clemens R A. (1999) Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39,13–126.
131. Navarra G, Giacomazza D, Leone M, Librizzi F, Militello V, San Biagio PL. (2009) Thermal aggregation and ion-induced cold-gelation of bovine serum albumin, *European Biophysics Journal*, 38(4), 437–446.
132. Nedović V, Bugarski B, Mantzouridou F, Paraskevopoulou A., Naziri E, Koupantsis T, Trifković K, Drvenica I, Balanč B, Đorđević V. (2016): Recent advances and applications of encapsulated microbial and non-microbial active agents in the manufacture of food and beverages, In: V. Ravishankar Rai (Ed.), *Advances in Food Biotechnology*. WILEY Blackwell, New Jersey, pp. 635–680.
133. Nguyen B T, Bujna E, Fekete N, Tran A T M, Rezessy-Szabo J M, Prasad R, Nguyen Q D. (2019) Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains, *Frontiers in Nutrition*, 6, 1–7.

134. Nualkaekul S, Cook M T, Khutoryanskiy VV, Charalampopoulos D. (2013) Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices, *Food Research International*, 53, 304–311.
135. Obradović N, Krunić T, Trifković K, Bulatović M, Rakin P M, Rakin BM, Bigarski B. (2015) Influence of Chitosan Coating on Mechanical Stability of Biopolymer Carriers with Probiotic Starter Culture in Fermented Whey Beverages, *International Journal of Polymer Science*, 1-8.
136. Obradović N, Pajić-Lijaković I, Krunić T, Belović M, Rakin M, Bugarski B. (2019). Effect of Encapsulated Probiotic Starter Culture on Rheological and Structural Properties of Natural Hydrogel Carriers Affected by Fermentation and Gastrointestinal Conditions, *Food Biophysics*, 1-14.
137. O’Riordan K, Andrews D, Buckle K, Conway P. (2001) Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1059–1066.
138. Ong L, Henriksson A, Shah NP. (2006) Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid, *International Dairy Journal*, 16(5), 446–456.
139. Ousta A, Mbretre T, Kirschner C, Narvhus JA, Kohler A. (2004) FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli, *Journal of Microbiological Methods*, 59, 149 – 162.
140. Ouwerx C, Velings N, Mestdagh MM, Axelos MAV. (1998) Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations, *Polymer Gels and Networks*, 6, 393–408.
141. Pajic-Lijakovic I, Levic S, Handađev M, Stevanovic-Dajic Z, Radosevic R, Nedovic V, Bugarski B. (2015) Structural changes of Ca-alginate beads caused by immobilized yeast cell growth, *Biochemical Engineering Journal*, 103, 32–38.
142. Paramithiotis S, Chouliaras Y, Tsakalidou E, Kalantzopoulos G. (2005) Applicationn of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure, *Process Biochemistry*, 40(8), 2813–2819.
143. Picinin De Castro-Cislaghi FP, Dos Reis E Silva C, Fritzen-Freire CB, Goulart Lorenz J, Sant’Anna ES. (2012) *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage, *Journal of Food Engineering*, 113, 186–193.

144. Picot A, Lacroix C. (2004) Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *International Dairy Journal*, 14 (6), 505–515.
145. Poncelet D, Dreffier C, Subra-Paternault P, Vandamme TF. (2007) Introduction aux techniques de microencapsulation. In: Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. (Eds.), M.
146. Pongjanyakul T, Puttipipatkachorn S. (2007) Xanthan-alginate composite gel beads: molecular interaction and in vitro characterization, *International Journal of Pharmaceutics*, 331,61–71.
147. Poreda A, Tuszynski T, Zdaniewicz M, Sroka P, Jakubowski M. (2013) Support materials for yeast immobilization affect the concentration of metal ions in the fermentation medium, *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 164–171.
148. Pravilović P. (2016) Difuzija polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
149. Prisco A D, Mauriello G.(2016) Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool, *Trends in Food Science & Technology*, 48, 27–39.
150. Quinto E J, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, Girbés T. (2014) Probiotic lactic acid bacteria: A review, *Food Nutrition and Science*, 5, 1765–1775.
151. Rabiey L, Britten M. (2009) Effect of protein composition on the rheological properties of acid-induced whey protein gels, *Food Hydrocolloids*, 23(3), 973–979.
152. Radulović Z, Mirković N, Bogović-Matijašič B, Petrušić M, Petrović T, Manojlović V, Nedović V. (2012): Quantification of viable spray-dried potential probiotic lactobacilli using real-time PCR. *Archives of Biological Sciences* 64: 1465–1472.
153. Rajam R, Karthik P, Parthasarathi S, Joseph GS, Anandharamakrishnan C. (2012) Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, *Journal of Functional Foods*, 4, 891-898.
154. Rakin M, Bulatović M, Zarić D, Stamenković-Đoković M, Krunic T, Borić M, Vukašinović-Sekulić M. (2016) Quality of fermented whey beverage with milk, *Hemijska industrija*, 70(1), 91–98.
155. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. (2010) Lactic acid bacteria: Their antimicrobial compounds and their uses in food production, *Annals of Biological Research*, 1(4), 218–228.

156. Ray M, Ghosh K, Singh S, Mondal KC. (2016) Folk to functional: An explorative overview of rice-based fermented foods and beverages in India, *Journal of Ethnic Foods*, 3, 5–18.
157. Roberts GAF. (1992) Chitin Chemistry, 1–110, The Mac Millan Press, London, pp. 274–315.
158. Rodriguez DV. (2015) FTIR Investigations of Whey Protein Interactions in Relation to Model Food Systems, Ph.D. thesis, McGill University, Montreal.
159. Rossier-Miranda FJ, Schroen K, Boom R. (2010) Mechanical characterization and pH response of fibril-reinforced microcapsules prepared by layer-by-layer adsorption, *Langmuir* 26(24), 19106–19113.
160. Saadatzadeh A, Fazeli MR, Jamalifar H, Dinarvand R. (2013) Probiotic Properties of Lyophilized Cell Free Extract of *Lactobacillus casei*, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 8(3), 131-7.
161. Sabikhi L, Babu R, Thompkinson D K, Kapila S. (2010) Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions, *Food and Bioprocess Technology*, 3, 586–593.
162. Sadeghi S, Madadlou A, Yarmand M. (2014) Microemulsification and cold gelation of whey proteins for nanoencapsulation of date palm pit extract, *Food Hydrocolloids*, 35, 590-596.
163. Sanchez B, Champomier-Verges M-C, del Carmen Collado M, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, de los Reyes-Gavilan C G, Margolles A, Zagorec M. (2007) Low-pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of *Bifidobacterium longum* Biotype longum, *Applied and Environmental Microbiology*, 6450–6459.
164. Sandoval-Castilla O, Lobato-Calleros C, García-Galindo HS, Alvarez-Ramírez J, Vernon-Carter EJ. (2010) Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *Food Research International*, 43, 111–117.
165. Saraei F, Dounighi N M, Zolfagharian H, Bidhendi S M, Khaki P, Inanlou F. (2013) Design and evaluate alginate nanoparticles as a protein delivery system, *Archives of Razi Institute*, 68(2), 139–146.
166. Sartor RB, (2006) Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis, *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*, 3, 390–407.
167. Sartor RB. (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology*, 134, 577–594.

168. Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N, Shimoni E. (2010) Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying, *Food Research International*, 43 (1), 193–202.
169. Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PS, Goulet J, Tompkins TA. (2005) Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements, *Infection and Immunity*, 73, 5183–5188.
170. Sheu TY, Marshall RT, Heymann H (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen dessert by microentrapment, *Journal of Dairy Science*, 76, 1902-1907.
171. Shori AB. (2017) Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit, *HAYATI Journal of Biosciences*, 24 (1), 2017, 1–5.
172. Šipailienė A, Petraitytė S. (2018) Encapsulation of Probiotics: Proper Selection of the Probiotic Strain and the Influence of Encapsulation Technology and Materials on the Viability of Encapsulated Microorganisms, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10:1–10.
173. Smilkov K, Petreska Ivanovska T, Petrushevska Tozi L, Petkovska R, Hadjieva J, Popovski E, Stafilov T, Grozdanov A, Mladenovska K. (2014) Optimization of the formulation for preparing *Lactobacillus casei* loaded whey protein-Ca-alginate microparticles using full-factorial design, *Journal of Microencapsulation*, 31(2), 166–175.
174. Sodini I, Lucas A, Oliveira MN, Remeuf F, Corrieu G. (2002) Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing, *Journal of Dairy Science*, 85(10), 2479–2488.
175. Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Macnaughtan W, Parmenter C, Fisk I D. (2017) Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate, *Food Hydrocolloids*, 70, 345–355
176. Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Yonekura L, Parmenter C, Fisk I. (2014b) Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying, *Food and Bioprocess Technology*, 7, 255e1268.
177. Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Yonekura L, Parmenter C, Fisk I. (2013) Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated



- Lactobacillus acidophilus NCIMB 701748 Using Spray Drying, *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1–14, 2013.
178. Standard for dairy permeate powders, CXS 331-2017, Food and Agriculture Organization of United Nations.
179. Steinkraus K H. (2002) Fermentations in world food processing, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 23–32.
180. Stojanović R, Belščak-Cvitanović A, Manojlović V, Komes D, Nedović V, Bugarski B. (2012) Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in Ca-alginate beads, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 685–696.
181. Stojkowska J, Kostić D, Jovanović Ž, Vukašinović-Sekulić M, Mišković-Stanković V, Obradović B. (2014) A comprehensive approach to in vitro functional evaluation of Ag/alginate nanocomposite hydrogels, *Carbohydrate Polymers*, 111, 305–314.
182. Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. (2000) Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *International Journal of Food Microbiology*, 62, 47–55.
183. Tamang J P, Thapa N, Tamang B, Rai A, Chettri R. (2015) Microorganisms in fermented foods and beverages. In J. P. Tamang (Ed.). Health benefits of fermented foods and beverages pp. 1–110. CRC Press.
184. Tee WF, Nazaruddin R, Tan YN, Ayob MK. (2013) Effects of encapsulation on the viability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* exposed to high acidity condition and presence of bile salts, *Food Science and Technology International*, 1–6.
185. Tomović N S., Trifković KT, Rakin MP, Rakin, MB, Bugarski BM. (2015) Influence of compression speed and deformation percentage on mechanical properties of calcium alginate particles, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 21(3), 411–417.
186. Trabelsi I, Ayadi D, Bejar W, Bejar S, Chouayekh H, Ben Salah R. (2014) Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 84–89,
187. Trifković K T, Milašinović N Z, Djordjević V B, Krusic M T, Knezevic-Jugovic Z T, Nedovic V A, Bugarski B M. (2014) Chitosan microbeads as carriers for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols, *Carbohydrate Polymers*, 111, 901–907.
188. Trifković K T. (2016) Hidrogelovi na bazi hitozana za kontrolisano otpuštanje polifenola, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.

189. Truelstrup-Hansen L, Allan-wojtas PM, Jin YL, Paulson AT (2002). Survival of free and calcium-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in simulated gastro-intestinal conditions, *Food Microbiology*, 19: 35-45.
190. Turgeon S L, Beaulieu M. (2001) Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides, *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 583-591.
191. Van der Ven C, Muresan S, Gruppen H, De Bont DBA, Merck KB, Voragen AGP. (2002) FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6943-6950.
192. Vivek K. (2013) Use of encapsulated probiotics in dairy based foods. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 3, 188-199.
193. Vrbaški Lj, Markov S, (1993) *Practicum of microbiology* (1st ed.). Prometej. Serbia.
194. Wang YC, Yu RC, Chou CC. (2004) Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage, *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 209-17.
195. Weinbreck F, Bodnar I, Marco M L. (2010) Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products, *International Journal of Food Microbiology*, 136, 364-367.
196. Wichchuki S, Oztop M H, McCarthy M J, McCarthy K L. (2013) Whey protein/alginate beads as carriers of a bioactive component, *Food Hydrocolloids*, 33(1), 66-73.
197. Williams DH, Fleming I. (1989) *Spectroscopic methods in organic chemistry*, 4th ed. McGraw-Hill Book Company, London, United Kingdom.
198. Wu H, Arosio P, Podolskaya O G, Wei D, Morbidelli M. (2012) Stability and gelation behavior of bovine serum albumin pre-aggregates in the presence of calcium chloride, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(14), 4906-4916.
199. Xu M, Gagné-Bourque F, Dumont M-J, Jabaji S. (2016) Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions, *Journal of Food Engineering*, 168, 52-59.
200. Yanez-Fernandez J, Ramos-Ramirez EG, Salazar-Montoy JA. (2008) Rheological characterization of dispersions used in the preparation of microcapsules obtained by interfacial polymerization containing *Lactobacillus* sp, *European Food Research and Technology*, 226 (5), 957-966
201. Yao KD, Peng T, Feng HB, He YY. (1994) Swelling kinetics and release characteristic of crosslinked chitosan-polyether polymer network (semiIPN) hydrogels, *Journal of Polymer Science, Part A, Polymer Chemistry*, 32, 1213-1223.

202. Ying DY, Phoon MC, Sanguansri L, Weerakkody R, Burgar I, Augustin MA. (2010) Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage, *Journal of Food Science*, 75, (9) 588-95.
203. Zhang Z, Zhang R, Zou L, McClements DJ. (2016) Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release, *Food Hydrocolloids*, 58, 308-315.
204. Zuidam N J, Shimoni E. (2010) Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. New York, U. S. A.: Springer.

## Spisak slika

Slika 3.1. Šematski prikaz tipova nosača (a) nosači tipa matrice; (b) nosači tipa “rezervoara” (c) multi-membrana. ....	15
Slika 3.2. Zavisnost veličine nosača od primenjenog postupka za inkapsulaciju probiotskih ćelija .....	16
Slika 3.3. Šematski prikaz ekstruzionih tehnika: a) tehnika presecanja mlaza; b) tehnika vibrirajućeg raspršivača; c) tehnika raspršivanja uz pomoć rotirajućeg diska; d) tehnika ukapavanja uz dejstvo koaksijalnog toka vazduha; e) tehnika elektrostatičke ekstruzije. ....	18
Slika 3.4. Šematski prikaz postupka emulzifikacije. ....	20
Slika 3.5. Šematski prikaz mikroinkapsulacije probiotskih ćelija u nosače dobijene geliranjem mlečnih proteina u prisustvu enzima. ....	21
Slika 3.6. Šematski prikaz inkapsulacije probiotskih ćelija tehnikom sprej-sušenja. ....	22
Slika 3.7. Uređaj za liofilizaciju (Christ Beta 2-8 LD Freeze Dryer, Nemačka).....	23
Slika 3.8. Različite konfiguracije sistema za oblaganje u fluidizovanom sloju: a) oblaganje sa vrha komore; b) oblaganje sa dna komore; c) tangencijalno oblaganje. ....	24
Slika 3.9. Izgled strukture natrijum alginata (G – guluronska kiselina; M – manuronska kiselina) .....	26
Slika 3.10. Izgled struktura između guluronskih grupa (crni krugovi predstavljaju $Ca^{2+}$ jone između susednih ostataka guluronske kiseline).....	27
Slika 3.11. Izgled alginatnih čestica sa probiotskom starter kulturom. ....	28
Slika 3.12. Hemijska struktura hitozana ( $\beta$ [1→4] glikozidna veza između ostataka 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoze (D-glukozamina) i 2-acetamido-2-deoksi-D-glukopiranoze (N-acetil-D-glukozamina) .....	31
Slika 3.13. Šematski prikaz faktora koji utiču na efikasnost postupka inkapsulacije bakterijskih kultura. ....	34
Slika 4.1. Šematski prikaz inkapsulacije probiotske starter kulture u hidrogel nosače primenom postupka elektrostatičke ekstruzije. ....	40

Slika 4.2. Postupak dobijanja mikronosača tehnikom sprej-sušenja .....	42
Slika 4.3. Optički mikroskop Motic BA210 Series. ....	43
Slika 4.4. Zetasizer Nano Series, Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.).....	46
Slika 4.5. Oprema za ispitivanje mehaničkih svojstava hidrogel sistema, AG-Xplus Universal Testing Machine (Shimadzu, Japan). ....	49
Slika 5.1. Izgled i veličina hidrogel nosača dobijenih ekstruzionom tehnikom (a) Alg/S nosač dobijen uz primenu elektrostatičkog napona (5,5 kV) (b) hidrogel nosači Alg/S dobijeni primenom napona 6,6 kV (c) Alg/S bez primene elektrostatičkog napona tokom inkapsulacije (d) Alg/S/P primenom elektrostatičkog napona 6,6 kV (e) hidrogel nosači Alg/S/P bez korišćenja elektrostatičkog napona (f) hitozanom obloženi Alg/S nosači dobijeni bez primene elektrostatičkog napona tokom inkapsulacije.....	57
Slika 5.2. Izgled hidrogel nosača dobijenih primenom natrijum alginata koncentracije a) 1,0 mas. % i b) 2,0 mas. % .....	58
Slika 5.3. FTIR analiza spektra probiotske starter kulture (ABY 6). ....	60
Slika 5.4. FTIR spektar kalcijum-alginatnog nosača.....	61
Slika 5.5. Uporedni FTIR spektri čiste probiotske kulture i kalcijum-alginatnog nosača sa inkapsuliranom kulturom.....	62
Slika 5.6. Uporedni FTIR spektri surutke i Alg/S nosača bez kulture. ....	63
Slika 5.7. FTIR spektar Alg/S nosača sa inkapsuliranom kulturom.....	64
Slika 5.8. FTIR analiza spektra Alg/S nosača pre i posle fermentacije.....	65
Slika 5.9. Uporedni prikaz FTIR spektara nosača Alg/S i Alg/P sa inkapsuliranom kulturom pre procesa fermentacije. ....	66
Slika 5.10. Uporedni prikaz FTIR spektara za Alg/S/P nosače sa inkapsuliranom kulturom pre i posle fermentacije.....	67
Slika 5.11. Uporedni prikaz FTIR spektara posle fermentacije za nosače tipa Alg/S i Alg/S/P sa inkapsuliranom kulturom.....	68
Slika 5.12. SEM mikrografija preseka hidrogel nosača Alg/S i Alg/S/P a) raspored kulture u nosaču Alg/S (×20000); b) raspored ćelija u Alg/S/P nosaču (×20000). ....	69
Slika 5.13. SEM mikrografija preseka hidrogel nosača a) presek Alg/S nosača sa starter kulturom u periodu čuvanja od 4 nedelje (×20000) (b) izdvojene štapičaste bakterije u Alg/S	

nosaču nakon postupka inkapsulacije ( $\times 20000$ ) c) presek Alg/S/P nosača sa bakterijskim ćelijama starter kulture ( $\times 20000$ ) d) prekrivne štapičaste bakterije slojem nosača tipa Alg/S.70	
Slika 5.14. Izgled površinske morfologije Alg/S nosača ( $\times 20000$ ).....	71
Slika 5.15. SEM mikrografija čistog i liofilizovanog kalcijum-alginatnog nosača bez starter kulture a) izgled liofilizovanog nosača ( $\times 10000$ ) b) izgled strukture nosača na preseku ( $\times 10000$ ) c) mikrostruktura nosača na preseku, ( $\times 10000$ ); SEM mikrografija Alg nosača sa ABY 6 kulturom d) pre fermentacije ( $\times 10000$ ), e) izgled preseka nosača pre fermentacije ( $\times 10000$ ) f) raspored inkapsulirane kulture u delovima nosaču ( $\times 10000$ ) g) izgled nosača nakon fermentacije ( $\times 10000$ ) h) površinska morfologija nosača nakon fermentacije ( $\times 10000$ ) i) raspored inkapsulirane kulture u površinskim delovima nosača posle fermentacije ( $\times 10000$ ). .....	72
Slika 5.16. SEM mikrografija liofilizovanih Alg/S nosača sa i bez inkapsulirane kulture a) Alg/S nosači bez inkapsulirane kulture ( $\times 10000$ ) b) površinska morfologija Alg/S nosača bez kulture ( $\times 10000$ ) c) poprečni presek Alg/S nosača bez kulture ( $\times 10000$ ) d) Alg/S nosači sa inkapsuliranom kulturom pre fermentacije ( $\times 10000$ ) e) izgled preseka Alg/S nosača sa inkapsuliranom kulturom pre fermentacije f) izgled inkapsuliranih kolonija na preseku nosača ( $\times 10000$ ) g) površinska morfologija nosača nakon fermentacije ( $\times 10000$ ) g) prikaz poprečnog preseka nosača nakon fermentacije i) glatka površina nosača nakon fermentacije sa ćelijama na površini ( $\times 10000$ ). ....	73
Slika 5.17. SEM mikrografija liofilizovanih Alg/S/P nosača sa inkapsuliranom kulturom, ( $\times 20000$ ) a) izgled nosača pre fermentacije ( $\times 20000$ ) b) mikrostruktura na preseku nosača ( $\times 20000$ ) c) izgled bakterijskih kolonija na segmentima preseka nosača ( $\times 20000$ ) d) izgled nosača nakon fermentacije ( $\times 20000$ ) e) prikaz delova površinske morfologije nosača nakon fermentacije ( $\times 20000$ ) f) raspored kulture na poprečnom preseku nosača nakon fermentacije ( $\times 20000$ ). ....	74
Slika 5.18. SEM mikrografija liofilizovanih Alg/S/P nosača obloženih hitozanom ( $\times 20000$ ) a) izgled nosača nakon liofilizacije pre procesa fermentacije ( $\times 20000$ ) b) izgled površinske morfologije nosača pre fermentacije sa nasumično raspoređenom kulturom ( $\times 20000$ ) c) izgled površinske morfologije nosača nakon procesa fermentacije ( $\times 20000$ ). ....	75
Slika 5.19. Efikasnost postupka inkapsulacije probiotske starter kulture za nosače veličine $\sim 800 \mu\text{m}$ .....	78
Slika 5.20. Izgled kalcijum-alginatnog nosača obloženog hitozanom. ....	81

Slika 5.21. Izgled kalcijum-alginatnog nosača (Alg) a) pre fermentacije i b) posle fermentacije .....	81
Slika 5.22. Izgled kalcijum-alginatnih nosača sa surutkom (Alg/S) sa inkapsuliranom probiotskom starter kulturom a) pre fermentacije b) posle fermentacije. ....	82
Slika 5.23. Procenat otpuštenih ćelija tokom procesa fermentacije u zavisnosti od vrste nosača .....	82
Slika 5.24. Uticaj vremenskog perioda skladištenja proizvoda na vijabilnost inkapsulirane probiotske starter kulture u hidrogelovima implementiranim u napitak na bazi surutke. ....	83
Slika 5.25. Uticaj simuliranih GI uslova na vijabilnost probiotskih bakterija u hidrogel nosačima u vremenskom intervalu od 4h. ....	85
Slika 5.26. Uticaj gastro-intestinalnih uslova na promenu prečnika nosača u vremenskom intervalu od 4h. ....	87
Slika 5.27. Uticaj gastro-intestinalnih uslova na vrednosti dinamičkog modula ( $G'$ ) za hidrogel nosače u vremenskom intervalu od 4h. ....	89
Slika 5.28. Zavisnost dinamičkih modula od ugaone brzine za nosače obložene hitozanom bez inkapsulirane kulture u vremenskom intervalu od 120 min u simuliranim intestinalnim uslovima.....	91
Slika 5.29. Uporedni prikaz eksperimentalnih rezultata i vrednosti dobijenih primenom modela za hitozanom obložene nosače sa inkapsuliranom kulturom u simuliranim uslovima želudačnog soka u vremenskom intervalu od 30 min.....	92
Slika 5.30. Kompresija hidrogel nosača potapanjem pojedinačnih hidrogel uzoraka u destilovanu vodu u Petri šolji. ....	95
Slika 5.31. Dijagrami zavisnosti a) sile od pomeranja hoda klipa b) napona od deformacije za kalcijum-alginatne nosače pri brzini kompresije od 1 mm/min i deformaciji uzorka od 50 %. ....	96
Slika 5.32. Zavisnost maksimalne sile od brzine kompresije za kalcijum-alginatne nosače pri deformaciji uzorka od 30%.....	97
Slika 5.33. Uticaj koncentracije alginata, dodatka surutke i oblaganja hitozanom na vrednost napona za hidrogel nosače pri deformaciji uzorka od 30 %.....	98
Slika 5.34. Uticaj inkapsulirane kulture na mehanička svojstva nosača (pripremani sa natrijum-alginatom koncentracije 1,6 mas %), metoda kompresije pri brzini 1,0 mm/min.....	99

Slika 5.35. Zavisnost napona od deformacije za hidrogel nosače pre i posle fermentacije na bazi surutke. ....	100
Slika 5.36. Modul elastičnosti hidrogel nosača (Alg/S) i (Alg/S/Ch) pre i posle fermentacije. ....	101
Slika 5.37. Uticaj procesa fermentacije na mehanička svojstva nosača sa i bez dodatka koncentrata proteina (inženjerske krive zavisnosti napona od deformacije).....	102
Slika 5.38. SEM mikrografija nosača Alg/S dobijenih tehnikom sprej-sušenje, ( $\times 20000$ ); ( $\times 10000$ ). ....	106
Slika 5.39. SEM mikrografija nosača Alg/S/P dobijenih tehnikom sprej-sušenja, ( $\times 20000$ ); ( $\times 10000$ ). ....	106
Slika 5.40. Uticaj vremenskog perioda skladištenja (45 dana) na vijabilnost probiotske starter kulture.....	111
Slika 5.41. Uticaj vremenskog perioda skladištenja (28 dana) na vijabilnost probiotske kulture u napitku na bazi surutke sa inkapsuliranom kulturom tehnikom sprej-sušenja. ....	112
Slika 5.42. Promene u vijabilnosti probiotskih kultura ( $\log$ (CFU/mL)) u uslovima simuliranih GI uslova.....	113
Slika 5.43. Izgled praškastih uzoraka dobijenih sa različitim koncentracijama alginata ..... (1,6 mas. % i 1,0 mas. %). ....	115
Slika 5.44. SEM mikrografija uzoraka Alg/S (koncentracije 1,6 mas. %, Alg); a) izgled uzorka nakon sprej-sušenja $\times 5000$ b) inkapsulirana kultura u nosaču $\times 10000$ c) poprečni presek nosača sa inkapsuliranom kulturom $\times 30000$ . ....	116
Slika 5.45. SEM mikrografija nosača Alg/S/P (koncentracija alginata 1,6 mas. %) a) izgled nosača $\times 10000$ b) inkapsulirana kultura $\times 10000$ c) poprečni presek nosača $\times 10000$ .....	117
Slika 5.46. SEM mikrografija nosača Alg/S (koncentracija alginata 1,0 mas. %) a) površinska morfologija nosača b) inkapsulirana kultura u nosaču $\times 10000$ c) poprečni presek nosača $\times 2000$ .....	118
Slika 5.47. SEM mikrografija nosača Alg/S/P (koncentracija alginata 1,0 mas. %) a) površinska morfologija nosača $\times 5000$ b) inkapsulirana kultura u nosaču $\times 10000$ c) poprečni presek nosača sa inkapsuliranom kulturom $\times 10000$ . ....	118
Slika 5.48. Rastvorljivost (%) i prisustvo vlage (%) u prahovima nakon postupka sušenja smrzavanjem. ....	120
Slika 5.49. Promena u vijabilnosti probiotske starter kulture u napitku na bazi surutke u vremenskom intervalu od 28 dana. ....	122



Slika 5.50. Vijabilnost probiotske starter kulture (log CFU/g) za vremenski period skladištenja prahova. .... 123

Slika 5.51. Vijabilnost probiotske starter kulture (log CFU/mL) u periodu od 4h u simuliranim GI uslovima. .... 124

## Spisak tabela

Tabela 3.1. Tehnike inkapsulacije probiotskih kultura: prednosti i nedostaci .....	25
Tabela 3.2. BMK kao starter kultura u fermentisanim proizvodima.....	33
Tabela 4.1. Koncentracije i zapremine elektrolita korišćenih u pripremi SGF i SIF tečnosti. .	54
.....	54
Tabela 5.1. Srednji prečnik (D), faktor sferičnosti (SF) i faktor skupljanja ( $k_{SF}$ ) za Alg/S i Alg/S/P nosače sa i bez inkapsulirane kulture.....	59
Tabela 5.2. Broj ćelija u nosačima nakon inkapsulacije log (CFU/g) i efikasnost postupka inkapsulacije starter kulture, % .....	76
Tabela 5.3. Uticaj povećanja sadržaja koncentrata proteina u nosaču na efiksanost postupka inkapsulacije (EE, %) .....	77
Tabela 5.4. Uticaj procesa fermentacije na rast inkapsulirane kulture u nosaču.....	79
Tabela 5.5. Bubrenje nosača sa i bez inkapsulirane kulture tokom procesa fermentacije .....	80
Tabela 5.6. Parametri modela koji opisuju viskoelastična svojstva nosača .....	93
Tabela 5.7. Vrednosti modula elastičnosti za kalcijum-alginatne nosače prečnika ~ 2,60 mm pri deformaciji od 30 % pripremljenih sa različitim koncentracijama rastvora natrijum-alginata.	98
Tabela 5.8. Vrednosti za modul elastičnosti hidrogel nosača (Alg, Alg/S i Alg/S/P) pre i nakon fermentacije. ....	103
Tabela 5.9. Veličina i naelektrisanje nosača ( $\zeta$ -potencijal) dobijenih tehnikom sprej-sušenja .....	105
Tabela 5.10. Efikasnost inkapsulacije probiotske starter kulture u nosače nakon postupka sprej-sušenja .....	108
Tabela 5.11. Vijabilnost probiotske starter kulture pre i posle procesa fermentacije, (log (CFU/g)) .....	110
Tabela 5.12. Veličina i naelektrisanje ( $\zeta$ -potencijal) dobijenih nosača nakon postupka sušenja smrzavanjem.....	115
Tabela 5.13. Efikasnost inkapsulacije i vijabilnost probiotske starter kulture nakon postupka sušenja smrzavanjem .....	119

Tabela 5.14. Vijabilnost probiotske starter kulture pre i posle procesa fermentacije, (log (CFU/g), (log (CFU/mL))..... 121

## **Prilozi**

### **Изјава о ауторству**

**Име и презиме аутора:** Наташа Обрадовић

**Број индекса:** 4035/2010

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

#### **КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПРИМЕНА ПРИРОДНИХ ХИДРОГЕЛОВА ЗА ИНКАПСУЛАЦИЈУ ПРОБИОТСКЕ СТАРТЕР КУЛТУРЕ**

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

**Име и презиме аутора:** Наташа Обрадовић

**Број индекса:** 4035/2010

Студијски програм: Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада: Карактеризација и примена природних хидрогелова за инкапсулацију пробиотске стартер културе

Ментор: др Бранко Бугарски

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним станицама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

## **Изјава о коришћењу**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку “Светозар Марковић” да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

### **КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПРИМЕНА ПРИРОДНИХ ХИДРОГЕЛОВА ЗА ИНКАПСУЛАЦИЈУ ПРОБИОТСКЕ СТАРТЕР КУЛТУРЕ**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

## Biografija

Nataša Obradović (devojačko Tomović), dipl. inž. tehnologije, je rođena 14.06.1984. godine u Beogradu. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2003/04. godine na studijskom programu Hemijska tehnologija; studijsko područje Farmaceutsko inženjerstvo i diplomirala 2008. godine. Diplomski rad na temu “Proračun i dimenzionisanje duplikatorske posude za pripremu infuzionih rastvora “pod rukovodstvom mentora prof. dr Marka Rakina odbranila je sa ocenom 10.

Doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2010/11. godine na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Položila je sve programom predviđene ispite i odbranila završni rad na temu “Tehnike imobilizacija probiotika i modelovanje difuzije nutrijenata kroz čestice sa imobilisanim ćelijama metodom konačnih elemenata” pod rukovodstvom mentora prof. dr Branka Bugarskog.

Od februara 2011. zaposlena je u Inovacionom centru Tehnološko–metalurškog fakulteta, u okviru projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja iz oblasti poljoprivrede i hrane: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju poboljšanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj projekta III46010). U zvanje istraživač-saradnik reizabrana je 29. avgusta 2019. godine. Učestvovala je u realizaciji Inovacionog projekta „Kapsule zdravlja u ledenom čaju“ (Ev. br. 451-03-2802/2013-16/1) (2014-2015). U periodu 2012-2015. godine bila je angažovana i u realizaciji Eureka projekta E!8029 „Optimizacija energetskog bilansa složenih sistema“.

Od 2010. godine do danas, Nataša Obradović je aktivno učestvovala u promociji i popularizaciji nauke (Sajmu nauke *EduFair*, Sajam tehnike, Sajam knjiga itd.). U letnjem semestru 2015/16 godine učestvovala je u izvođenju vežbi iz predmeta Oprema u biotehnologiji, dok je u zimskom semestru iste godine učestvovala u realizaciji vežbi iz predmeta Projektovanje uređaja i aparata u farmaceutskoj industriji. Takođe, bila je član stručne komisije za odabir naučno-istraživačkih radova studenata Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu koji predstavljaju matični fakultet na naučno-sportskoj manifestaciji Tehnologijada.



U toku svog dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada je kao autor ili koautor objavila 2 rada u međunarodnim časopisima izuzetne vrednosti, 1 rad u vrhunskom međunaradnom časopisu, 7 radova u časopisima međunarodnog značaja i časopisima međunarodnog značaja verifikovanih posebnom odlukom, 14 radova saopštenih na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja štampanih u celini ili u izvodu i 1 rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja. Takođe, bila je i koautor pomoćnog udžbenika koji se koristi u nastavi na Tehnološko-metalurškom fakultetu.