

Inkapsulacija bakterijskih kultura *Lactiplantibacillus plantarum* u formulacije alginatnih mikročestica

Zelić, Hana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:119726>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



Inkapsulacija bakterijskih kultura *Lactiplantibacillus plantarum* u formulacije alginatnih mikročestica

Zelić, Hana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:506242>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-10-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**INKAPSULACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA
LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM U FORMULACIJE
ALGINATNIH MIKROČESTICA
DIPLOMSKI RAD**

Hana Zelić

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**INKAPSULACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA
LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM U FORMULACIJE
ALGINATNIH MIKROČESTICA
DIPLOMSKI RAD**

Hana Zelić

Mentor:

prof. dr. sc. Marko Vinceković

Zagreb, rujan, 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Hana Zelić**, JMBAG 0178113736, rođen/a 24.07.1998. u Zadru, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**INKAPSULACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* U
FORMULACIJE ALGINATNIH MIKROČESTICA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Hane Zelić**, JMBAG 0178113736, naslova

**INKAPSULACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* U
FORMULACIJE ALGINATNIH MIKROČESTICA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Marko Vinceković mentor

2. Izv. prof. dr. sc. Nataša Mikuec član

3. Izv. prof. dr. sc. Luna Maslov Bandić član

Zahvala

Ovime zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Marku Vincekoviću, prije svega, na ponuđenoj zanimljivoj temi te na stručnom vodstvu, pravilnom usmjeravanju i strpljenju. Također zahvaljujem na mogućnosti uključivanja na istraživanjima u sklopu projekta KK.01.1.1.04.0058 „Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva“ financiranog od strane Ministarstvo znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske. Zahvaljujem se i na mogućnosti rada u laboratoriju Laboratorij Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u čijem sam laboratoriju radila na izolaciji bakterijskih kultura *Lactiplantibacillus plantarum* voditeljstvom izv.prof.dr.sc. Nevija Zdolec i dr.sc. Marte Kiš.

Zahvaljujem i djelatnicima Zavoda za kemiju na stručnom vodstvu tijekom rada u laboratoriju.

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada.....	2
2	Pregled literature	3
2.1	Bakterije mliječne kiseline (BMK)	3
2.2	Rod <i>Lactiplantibacillus</i>	3
2.3	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	4
2.4	Mikroinkapsulacija BMK.....	4
2.4.1	Mikročestice (mikrosfere)	7
3	Materijali i metode	8
3.1	Hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	8
3.1.1	BHI tekuća hranjiva podloga (engl. Brain Heart Infusion broth)	8
3.1.2	BHI kruta hranjiva podloga (engl. Brain Heart Infusion agar)	8
3.1.3	MRS tekuća hranjiva podloga	8
3.2	Otopine i puferi	8
3.2.1	Citratni pufer (0,2 M NaHCO ₃ , 0,06 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ x 2 H ₂ O)	8
3.2.2	Etanol (70 %)	8
3.2.3	Fiziološka otopina (0,85 %).....	8
3.2.4	Kalcijev klorid (CaCl ₂ , 1 M)	9
3.2.5	Natrijev alginat (1,8 %)	9
3.2.6	Mucosol® (2 %).....	9
3.3	Metode	9
3.3.1	Inkapsulacija metodom ionskog geliranja	9
3.3.2	Formiranje mikrosfera procesom ionskog geliranja	10
3.3.3	Mikroskopska promatranja.....	12
3.3.4	Električni naboj i veličina stanica <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> suspendiranih u vodi	12
3.3.5	Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije.....	12

3.4	Metode fizikalno-kemijske karakterizacije mikrosfera	13
3.4.1	Prinos inkapsulacije stanica <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (%E _{yLbP}) i stupanj bubrenja S _w	13
3.4.2	Morfologija i veličina mikrosfera	13
3.4.3	Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama	14
3.5	Mjerenje dinamike otpuštanja stanica <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> iz mikrosfera.....	14
4	Rezultati i rasprava.....	15
4.1	Međudjelovanja bakterijskih stanica vrste <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> i kalcijevih iona	15
4.1.1	Električni naboj i veličina bakterijskih stanica vrste <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> suspendiranih u vodi.....	15
4.2	Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera.....	18
4.2.1	Prinos inkapsulacije EY% i stupanj bubrenja S _w	18
4.2.2	Morfologija i veličina mikrosfera	19
4.2.3	Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama	21
4.3	Dinamika otpuštanja stanica <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> iz mikrosfera.....	22
5	Zaključak	25
6	Popis literature	25
7	Prilog.....	30
7.1	Popis kratica	30
	Životopis.....	32

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Hane Zelić**, naslova

INKAPSULACIJA BAKTERIJSKIH KULTURA *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* U FORMULACIJE ALGINATNIH MIKROČESTICA

Bakterijska vrsta *Lactiplantibacillus plantarum*, koja pripada skupini bakterija mliječne kiseline (BMK), nalazi široku primjenu u različitim industrijama, a posebice je zanimljiva njena primjena u proizvodnji fermentiranih proizvoda poput sira, jogurta, pekarskih proizvoda. Ova bakterijska vrsta često se koristi u procesu zakiseljavanja sira te ima pozitivan utjecaj na organoleptička svojstva sira. Procesom inkapsulacije ove bakterijske vrste u alginatne mikročestice metodom ionskog geliranja osigurava se stabilnost i preživljavanje bakterijskih stanica. Mikročestice omogućavaju zaštitu bakterijskih stanica te njihovo otpuštanje u određenim vremenskim intervalima i uvjetima. Nakon procesa inkapsulacije provest će se detaljna fizikalno-kemijska karakterizacija mikročestica. Pratit će se otpuštanje bakterijskih kultura (UV/VIS) iz formulacija mikročestica, te će se odrediti prinos inkapsulacije (EY%), zeta potencijal (ξ) i stupanj bubrenja (S_w).

Ključne riječi: BMK, *Lactiplantibacillus plantarum*, inkapsulacija, metoda ionskog geliranja, mikročestice

Summary

Of the master's thesis – student **Hana Zelić**, entitled

ENCAPSULATION OF *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* IN NATRIUM ALGINATE MICROSPHERES

Lactiplantibacillus plantarum, that belongs to lactic acid bacteria (LAB), has wide use in many industries, especially in the production of fermented products such as cheese, yogurt and bakery products. This bacteria culture is often used in cheese acidification and has positive effect on the organoleptic properties of cheese. Encapsulation of this bacteria culture by ionic gelation method provides stability and survival of these bacteria. Microspheres formulations protect bacteria and provide their release in certain time intervals and conditions. By the end of encapsulation, a detailed physical and chemical characterization of the microspheres will be made. The release of bacteria cultures and calcium ions (UV/VIS) from microspheres formulations will be monitored, also encapsulation yield (EY%), zeta potential (ξ) and swelling degree (S_w) will be determined.

Keywords: LAB, *Lactiplantibacillus plantarum*, encapsulation, ionic gelation method, microspheres

1 Uvod

Bakterije mliječne kiseline (BMK) skupina su mikroorganizama koji u procesu fermentacije, iz različitih ugljikohidrata, proizvode mliječnu kiselinu. BMK najširu primjenu nalaze u prehrambenoj industriji, primjerice u proizvodnji sireva, jogurta, kefira, pekarskih proizvoda, piva, vina i slično. Nastanjuju širok niz staništa poput probavnog trakta životinja i ljudi, biljnog materijala, voda, mesa i mnogih drugih. Zbog svojih svojstava BMK često se koriste kao probiotici. Unutar ove skupine bakterija nalaze se rodovi *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum* i *Globicatella* (Šušković i sur., 1997.).

U ovom radu opisan je proces inkapsulacije bakterijske vrste *Lactiplantibacillus plantarum*, koja pripada skupini BMK, u formulacije alginatnih mikročestica za daljnju upotrebu u proizvodnji sira. Uređaj za kontroliranu inkapsulaciju aktivnih sastojaka i materijala za laboratorijska i razvojna istraživanja naziva se inkapsulator. Proces inkapsulacije predstavlja pakiranje čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala unutar drugog materijala pri čemu nastaju kapsule veličine od nekoliko nanometara (nm) do nekoliko milimetara (mm). Tvar koja se inkapsulira naziva se jezgra, dok se tvar u koju se inkapsulira naziva membrana. Mikročestice (mikrokapsule) koriste se kako bi se u određenim uvjetima ispustile komponente unutar njih. Tehnika inkapsulacije štiti aktivnost enzima i omogućava njegovo otpuštanje u kontroliranim vremenskim intervalima prema zahtjevima tehnoloških postupaka proizvodnje sira. Proces inkapsulacije za cilj ima postizanje financijske i vremenske uštede u procesu proizvodnje sira kao i dobivanje gotovog proizvoda (sira) s dodatnom vrijednošću.

Proces inkapsulacije, u ovom diplomskom radu, proveden je metodom ionskog geliranja. U središtu istraživanja su mikrosfere nastale metodom ionskog geliranja. Za pripremu mikrokapsula mogu se upotrebljavati mnogi polimeri no najčešće se koriste biopolimeri (polimeri prirodnog podrijetla). U ovom radu korišten je natrijev alginat koji predstavlja vrlo zahvalan biopolimer za pripremu mikrokapsula jer zahtjeva izuzetno blage uvjete provođenja procesa inkapsulacije.

Nakon procesa inkapsulacije praćeno je otpuštanje bakterijskih kultura i kalcijevih iona (UV/VIS) iz formulacija mikrokapsula, te je određen prinos inkapsulacije (EY%), zeta potencijal (ξ) i stupanj bubrenja (S_w). Fizikalno-kemijska karakterizacija formulacija mikrokapsula određena je optičko-fluorescencijskim mikroskopom u Zavodu za kemiju Agronomskog fakulteta te elektronskim pretražnim mikroskopom u Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

1.1 Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada

U proizvodnji sira u svrhu zakiseljavanja mlijeka te stvaranja poželjnih senzorskih svojstava koriste se starterske (bakterijske) kulture. Jedna od najčešće korištenih bakterijskih vrsta u proizvodnji sira je *Lactiplantibacillus plantarum*. Kako bi se povećala stabilnost i preživljavanje bakterijskih kultura provodi se postupak njihove inkapsulacije u formulacije alginatnih mikročestica. Time se postiže njihova zaštita te otpuštanje u određenim vremenskim intervalima i uvjetima.

Pretpostavka je da će proces inkapsulacije ove bakterijske vrste u alginatne mikročestice osigurati odgovarajuću brojnost i aktivnost bakterijskih stanica u mikročesticama te tako omogućiti kontrolirano otpuštanje komponenti unutar mikročestica tijekom proizvodnje sira.

Cilj ovog diplomskog rada detaljna je fizikalno-kemijska karakterizacija alginatnih mikročestica ispunjenih bakterijskim kulturama vrste *Lactiplantibacillus plantarum*.

Specifični ciljevi ovog diplomskog rada su:

- 1) inkapsulirati bakterijske kulture vrste *Lactiplantibacillus plantarum* u formulacije alginatnih mikročestica metodom ionskog geliranja,
- 2) utvrditi otpuštanje bakterijskih kultura vrste *Lactiplantibacillus plantarum* iz formulacije alginatnih mikročestica,
- 3) odrediti preživljavanje bakterijskih kultura vrste *Lactiplantibacillus plantarum* u formulacijama alginatnih mikročestica.

2 Pregled literature

2.1 Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Bakterije mliječne kiseline (BMK) naziv je za skupinu bakterija koje u procesu fermentacije proizvode mliječnu kiselinu iz različitih ugljikohidrata te tako dobivaju potrebnu energiju. BMK nesporogeni su, katalaza-negativni mikroorganizmi. Bakterije unutar ove skupine su gram-pozitivne te imaju nizak sadržaj gvanina i citozina u DNA molekuli. BMK, prema načinu disanja, pripadaju fakultativnim anaerobima. BMK široka su skupina bakterija koje naseljavaju različita staništa u okolišu kao što su razgradni biljni materijal, probavni sustav ljudi i životinja te mliječni proizvodi i meso. BMK ponajviše se vežu uz proizvodnju fermentiranih i pekarskih proizvoda kao što su jogurt, kefir, vino, kruh, sir i slično. Bakterije koje pripadaju ovoj skupini vežu se i uz industrijsku proizvodnju mliječne kiseline. Mliječna kiselina kao produkt ove skupine bakterija našla je široku upotrebu u kemijskoj i prehrambenoj industriji. BMK sve se češće koriste kao probiotici zbog pozitivnog utjecaja na zdravlje koji se očituje u poboljšanju metabolizma laktoze, stimulaciji imunološkog sustava, suzbijanju urogenitalnih i crijevnih infekcija, regulaciji koncentracije kolesterola, antitumornom djelovanju, suzbijanju alergijskih reakcija, modifikaciji crijevne mikroflore (Pandžić, 2017.). Probiotici su jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušćković i sur. 1997). BMK proizvode niz produkata koji inhibitorno djeluju na određene skupine organizama. Neki od njih su vodikov peroksid (H_2O_2), diacetil i bakteriocini. BMK tijekom procesa fermentacije proizvode različite organske kiseline koje inhibitorno djeluju na rast i razmnožavanje određenih vrsta mikroorganizama (Blažeka i sur., 1991.; Brkić i sur., 1995.). Najbrojniji rod BMK je rod *Lactiplantibacillus*.

2.2 Rod *Lactiplantibacillus*

Rod *Lactiplantibacillus* najbrojniji je rod BMK te obuhvaća 152 vrste, a spada u porodicu *Lactobacillaceae*. Bakterije roda *Lactiplantibacillus*, prema načinu disanja, pripadaju aerotolerantnim ili anaerobnim organizmima. Vrste ovog roda štapićastog su oblika. Prema fermentacijskim svojstvima mogu se podijeliti u tri skupine: obligatno homofermentativne (proizvode više od 85% mliječne kiseline iz glukoze), fakultativno heterofermentativne i obligatno heterofermentativne (uz mliječnu kiselinu proizvode CO_2 , etanol i/ili octenu kiselinu iz glukoze) (Šušćković, 1996.). Bakterijske vrste roda *Lactiplantibacillus* često se pojavljuju formirajući parove ili lance različitih duljina. Optimalna temperatura za rast bakterija ovog roda je 30-40 °C, a mogu rasti 5-53 °C. U mlijeko dospijevaju iz vanjske sredine. Zbog složenih prehrambenih zahtjeva nalazimo ih u bogatim staništima, primjerice u mesu, vinu, pivi, probavnom traktu životinja i ljudi, mliječnim proizvodima i slično.

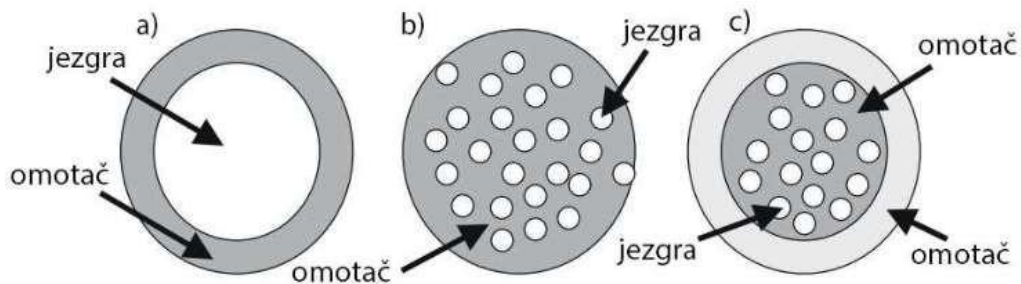
2.3 *Lactiplantibacillus plantarum*

Lactiplantibacillus plantarum (rod *Lactiplantibacillus*) široko je rasprostranjena bakterijska vrsta koja pripada skupini BMK. Gram-pozitivna je vrsta štapićastog oblika. Prosječna duljina ove bakterijske vrste je 3-8 μm (Landete i sur., 2010.). Ova bakterijska vrsta može rasti pri pH 3.4-8.8 (Giraud i sur. 2009.), te pri temperaturi 12-40 °C (Matejčeková i sur., 2016.). Bakterije ove vrste pojavljuju se pojedinačno, u paru ili u kratkim lancima. Ova bakterijska vrsta ima jedan od najvećih genoma iz skupine BMK. Pronalazimo je u mnogim prehrambenim proizvodima kao što su pekarski proizvodi, mlijeko, meso, fermentirano povrće te u ljudskom i životinjskom probavnom traktu. Desetljećima se koristi u proizvodnji sireva i maslina, kao i mnogih drugih fermentiranih proizvoda zbog pozitivnog utjecaja na organoleptička svojstva, teksturu i okus (Behera i sur., 2018.). Vrsta *Lactiplantibacillus plantarum*, bilo da se radi o sojevima iz okoliša ili o onima koji se koriste kao starter kulture u mnogim biotehnološkim procesima, posjeduje mnoga poželjna svojstva za primjenu u procesu fermentacije (fermentiranoj hrani) te se zato često koristi za poboljšanje kvalitete određenih prehrambenih namirnica. Njezino probiotičko djelovanje očituje se u stimulaciji probavnog sustava, borbi protiv nepoželjnih bakterijskih vrsta i poticanju proizvodnje vitamina u tijelu. Posljedično, ova bakterijska vrsta održava ravnotežu probavnog sustava te sudjeluje u jačanju imuniteta.

2.4 Mikroinkapsulacija BMK

Inkapsulacija je proces pakiranja čvrstog, tekućeg ili plinovitog materijala unutar drugog materijala tijekom kojeg nastaju kapsule. Veličina kapsula varira od nekoliko nm do nekoliko mm. S obzirom na veličinu razlikuju se nanočestice (10-1000 nm), mikročestice (2-2000 μm) i makročestice (> 2000 μm) (Singh i sur. 2010). Tehnikom inkapsulacije postiže se bolja stabilnost komponenti, maskiranje okusa i mirisa, raznolikost aroma te povećanje biodostupnosti. Metode inkapsulacije se dijele na: fizikalne (sušenje raspršivanjem, centrifugalna ekstruzija, sferizacija ekstruzijom, procesi koji koriste superkritične fluide), fizikalno-kemijske (ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, ekstrakcija otapala isparavanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija) i kemijske (granična polimerizacija, umrežavanje, in situ polimerizacija itd.) (Gallo i Carbo, 2010.; Teixeira da Silva i sur., 2014.). Tvar koja se inkapsulira naziva se jezgra, aktivno sredstvo, punjenje ili unutarnja faza, a tvar u koju se inkapsulira naziva se membrana, ljuska, nosač, vanjska faza ili matriks. Tvar u koju se inkapsulira najčešće predstavlja neki prehrambeni materijal. Razlikuju se dva osnovna tipa kapsula. Prvi tip kapsula naziva se pojedinačne čestice (eng. reservoir type), a drugi tip kapsula matriks tip (eng. matrix type). Pojedinačne čestice imaju ljusku oko aktivnog sredstva te se još nazivaju monojezgrene ili mononuklearne. Pojedinačne čestice nestabilnije su od matriks tipa kapsula, zbog čega se matriks tip kapsula češće upotrebljava. Matriks tip kapsula još se naziva i polijejgrene ili polinuklearne kapsule te je za taj tip kapsula karakteristično da se aktivno sredstvo nalazi dispergirano unutar nosača. Često se, u procesu inkapsulacije, primjenjuju i dodatni omotači. Kapsule su uglavnom sferičnog oblika no mogu biti i ovalne, cilindrične i

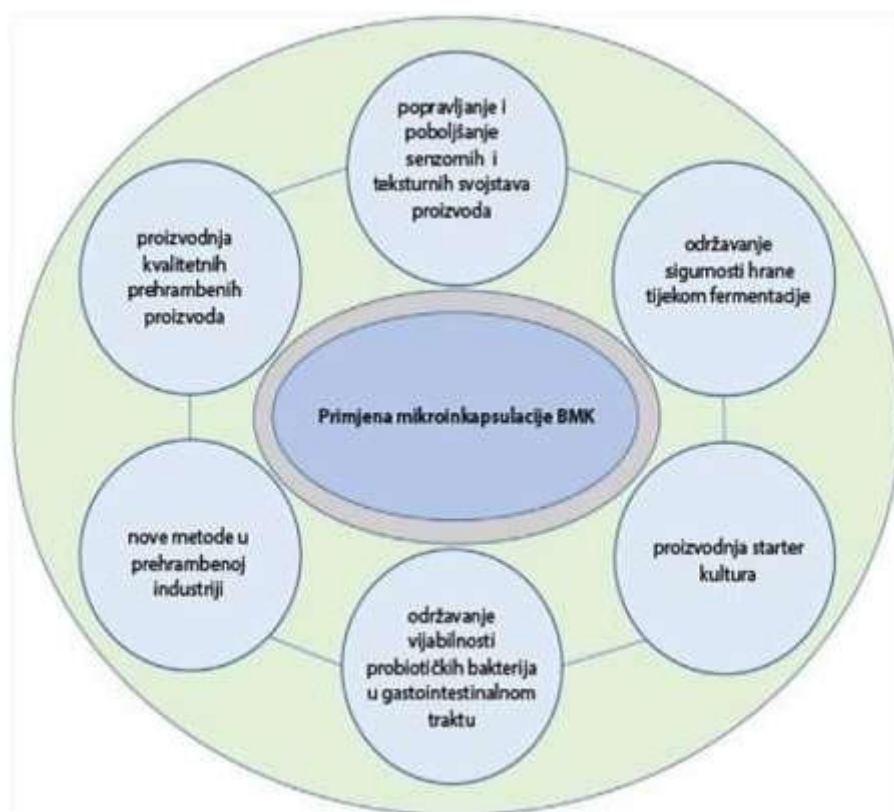
nepravilnih oblika. Glavna zadaća kapsula je da pod određenim uvjetima ispuštaju komponente koje se nalaze unutar njih (Zuidam i Nedović, 2010.; Fang i Bhandari, 2010.). Na slici 2.4.1. prikazani su tipovi kapsula.



Slika 2.4.1. Tipovi kapsula: a) pojedinačni tip, b) matriks tip i c) matriks tip s dodatnim omotačem

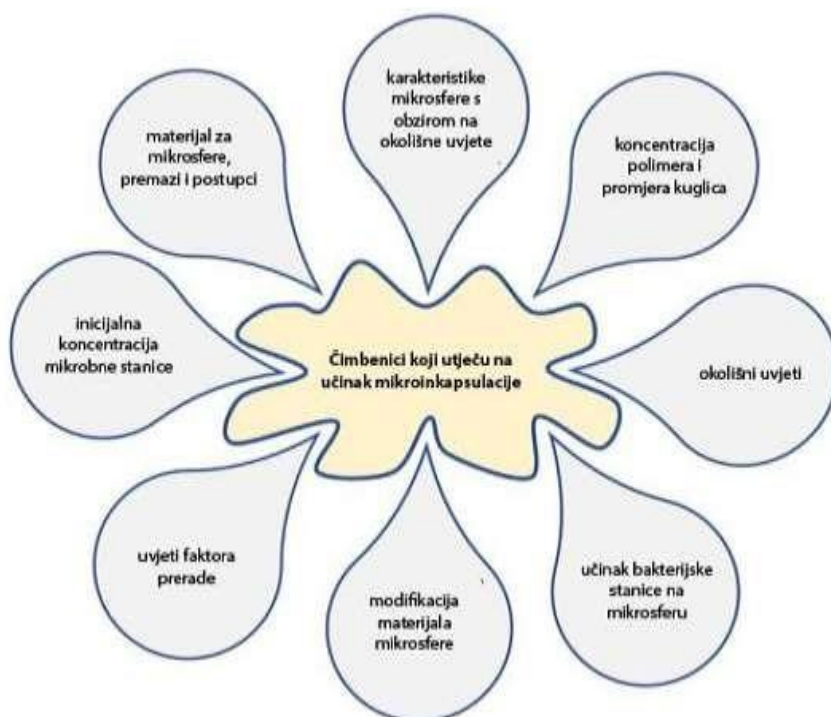
Izvor: (Zuidam i Nedović, 2010.)

Proces inkapsulacije omogućuje prekrivanje neželjenih okusa i mirisa, kontrolu svojstava aktivnih komponenti, mogućnost kontroliranog otpuštanja, povećanu stabilnost u konačnom proizvodu i tijekom proizvodnje (gdje ne dolazi do degradacije ili reakcije s drugim komponentama, kisikom ili vodom), reduciranu zapaljivost hlapivih komponenti, nepomičnost aktivnog sredstva unutar kapsule te dulji rok trajanja (Zuidam i Nedović, 2010.). Proces inkapsulacije nudi niz prednosti u odnosu na primjenu starter kultura što se posebice iskorištava na području prehrambene biotehnologije. Korištenjem kapsula poboljšava se aktivnost mikrobnih stanica tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja. Na slici 2.4.2. prikazano je u kojim područjima se primjenjuje inkapsulacija BMK, a na slici 2.4.3. prikazani su čimbenici koji utječu na proces inkapsulacije BMK.



Slika 2.4.2. Primjena inkapsulacije BMK

Izvor: <https://repozitorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A1375/datastream/PDF/view>



Slika 2.4.3. Čimbenici koji utječu na učinak inkapsulacije

Izvor: <https://repozitorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A1375/datastream/PDF/view>

2.4.1 Mikročestice (mikrosfere)

Mikrosfere su sferne čestice promjera 1–2000 μm . Mikrosfere imaju ulogu očuvanja stabilnosti i biološke aktivnosti inkapsuliranog sastojka. Mogu se pripremiti fizikalnim, kemijskim i fizikalno-kemijskim metodama. Kako bi inkapsulacija živih stanica bila učinkovita, nužno je odabrati odgovarajuća sredstva. Odabir materijala stijenke bira se ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima tvari za inkapsuliranje (poroznost, topljivost) i sredstva za inkapsuliranje (viskoznost, mehanička svojstva), kao i kompatibilnosti između tih dviju tvari (stijenka materijala treba biti netopljiva i ne smije reagirati sa sastojkom koji se inkapsulira). Osim toga, bitna je i zamišljena veličina mikrosfere (Boras, 2019.). Nosač materijala najčešće je prehrambenog podrijetla te mora imati sposobnost stvaranja zaštitne film ovojnice između aktivnog sastojka i njegove okoline.

U ovom radu korišten je natrijev alginat, anionski polisaharid koji lako stvara sfere u kojima se može ugraditi aktivni sastojak upotrebom vodenog sustava pri sobnoj temperaturi. Alginat se dobiva iz poljoprivrednih sirovina ili ljuska rakova. Sastavljen je od dvije ponavljajuće karboksilne jedinice (α -L-guluronska i β -D-manuronska kiselina povezane α -glikozidnom vezom) koje dovode do stvaranja različitih polielektrolitnih kompleksa struktura (Racovitá i sur., 2009.).

3 Materijali i metode

3.1 Hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture *Lactiplantibacillus plantarum*

3.1.1 BHI tekuća hranjiva podloga (engl. Brain Heart Infusion broth)

BHI tekuća hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripremljena je otapanjem 37 g BHI podloge u 1000 mL destilirane vode. Podloga je sterilizirana autoklaviranjem pri 121 °C kroz 15 minuta.

3.1.2 BHI kruta hranjiva podloga (engl. Brain Heart Infusion agar)

BHI kruta hranjiva podloga (Biolife, Italija) pripremljena je otapanjem 37 g tekuće BHI podloge i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1000 mL destilirane vode. Podloga je sterilizirana nakon što je dodan agar u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta.

3.1.3 MRS tekuća hranjiva podloga

MRS tekuća hranjiva podloga pripremljena je otapanjem 55,2 g MRS podloge (Biolife, Italija) u 1000 mL destilirane vode. Podloga je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C kroz 15 min.

3.2 Otopine i puferi

3.2.1 Citratni pufer (0,2 M NaHCO₃, 0,06 M Na₃C₆H₅O₇ x 2 H₂O)

Citratni pufer pripremljen je kao smjesa 16,8 g (0,2 mol dm⁻³) NaHCO₃ i 17,65 g (0,06 mol dm⁻³) Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O čiji je pH 8.

3.2.2 Etanol (70 %)

Etanol (70%) je pripremljen miješanjem 733,3 mL 96% etanola sa 266,7 mL destilirane vode.

3.2.3 Fiziološka otopina (0,85 %)

Fiziološka otopina pripremljena je otapanjem 9 g natrijeva klorida u 1 L destilirane vode.

3.2.4 Kalcijev klorid (CaCl₂, 1 M)

Otopina kalcijevog klorida pripravljena je otapanjem 2 g kalcijeva klorida u 50 mL destilirane vode.

3.2.5 Natrijev alginat (1,8 %)

Otopina natrijevog alginata (1,8%) pripravljena je otapanjem 2 g Na – alginata u 100 mL destilirane vode. Otopina je sterilizirana u autoklavu na temperaturi od 121 °C tijekom 15 minuta.

3.2.6 Mucosol® (2 %)

Mucosol® (2%) je pripremljen miješanjem 20 mL Mucosol® otopine sa 980 mL destilirane vode.

3.3 Metode

3.3.1 Inkapsulacija metodom ionskog geliranja

Ionsko geliranje je metoda koja se temelji na svojstvu polisaharida da geliraju u vodenim otopinama u prisutnosti dvovalentnih i trovalentnih iona. Ova metoda koristi vrlo blage uvjete i zadržava aktivnosti molekula tijekom procesa inkapsulacije koristeći reverzibilno fizičko poprečno povezivanje polisaharidnih lanaca elektrostatskom interakcijom. Glavna prednost u odnosu na kemijsko umrežavanje je izbjegavanje korištenja toksičnih reagensa te, posljedično, izostanak drugih neželjenih učinaka (Usmiati i sur., 2014.). U procesu ionskog geliranja polisaharidi (alginat, gelan guma, pektin i dr.) otapaju se u vodi ili u slabo kiselom mediju (kitozan). Otopina polisaharida istiskuje se iglom ili mlaznicom, uz konstantno miješanje, u otopinu koja najčešće sadrži katione suprotnog naboja. Ioni suprotnog naboja koji se koriste za ionsko geliranje mogu se podijeliti u dvije glavne skupine:

1. Ioni niske molekulske mase (nastali disocijacijom soli: MgCl₂, BaCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, CuCl₂ te pirofosfat, tripolifosfat, tetrapolifosfat, oktapolifosfat, heksametafosfat i [Fe(CN)₆]⁻⁴ / [Fe(CN)₆]⁻³
2. Ioni visoke molekulske mase (npr. lauril sulfat, oktil sulfat, cetilstearyl sulfat, heksadecil sulfat).

U ovom radu istraživane su sfere mikroveličina, tj. mikrosfere pripravljene metodom ionskog geliranja. Otopina polisaharida se dodaje u otopinu gelirajućeg kationa koji se veže na lance

polisaharida suprotnog naboja. Nadalje, dolazi do umrežavanja i taloženja okruglih čestica tijekom miješanja natrijevog alginata s kalcijevim kloridom, odnosno kalcijevim ionima. Nakon cijelog postupka mikrosfere se odstrane filtriranjem, potom se isperu destiliranom vodom i osuše (Racovitā i sur. 2009.). Na slici 3.3.1.1. prikazano je odstranjivanje mikrosfera filtriranjem.



Slika 3.3.1.1. Odstranjivanje mikrosfera filtriranjem

3.3.2 Formiranje mikrosfera procesom ionskog geliranja

Soj *Lactiplantibacillus plantarum* inkapsuliran je upotrebom uređaja Encapsulator Buchi – B390, na Zavodu za kemiju, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prije početka procesa inkapsulacije uređaj je steriliziran ispiranjem s otopinom Mucasola 2%, destiliranom vodom, 80% otopinom etanola, ponovo destiliranom vodom te na kraju fiziološkom otopinom.

Alginate mikrosfere sa sojem *Lactiplantibacillus plantarum* dobivene su procesom ionskog geliranja u uvjetima sobne temperature, tlaka od 0,4 Bar, frekvencije 1800 Hz te veličine dizne promjera 150 μm . Otopina natrijevog alginata sa bakterijama vrste *Lactiplantibacillus plantarum* se ukapavao u otopinu kalcijeva klorida uz kontinuirano miješanje na magnetnoj miješalici. Na kraju procesa kapsule su isprane fiziološkom otopinom, profiltrirane kroz komad

muslina i nanese na Petrijevu zdjelicu. Na slici 3.3.2.1. prikazane su mikrosfere nanese na Petrijevu zdjelicu. Na isti naćin i pod istim uvjetima dobile su se i prazne, tj. kontrolne mikrosfere bez bakterija. Na slici 3.3.2.2. prikazan je uređaj za inkapsulaciju Encapsulator Buchi – B390.



Slika 3.3.2.1. Mikrosfere nanese na Petrijevu zdjelicu nakon filtriranja i ispiranja



Slika 3.3.2.2. Uređaj za mikroinkapsulaciju, Encapsulator Büchi-B390, BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska

3.3.3 Mikroskopska promatranja mikrosfera

Prosječan promjer i oblici mikrosfera promatrani su stereomikroskopom Leica MZ16a (Leica Microsystems Ltd., Švicarska) pomoću Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, verzija E_LCmicro_09Okt2009. Promjeri su mjereni na oko 100 mikrosfera.

3.3.4 Električni naboj i veličina stanica *Lactiplantibacillus plantarum* suspendiranih u vodi

Električni naboj i zeta potencijal (ζ /mV) stanica soja *Lactiplantibacillus plantarum* suspendiranih u vodi i otopini kalcijevog klorida (variraju od 0,005 do 2,0 mol dm⁻³) izmjerene su pomoću Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Zetasizer Nano ZS pomoću Henryove jednadžbe ($u = (2\xi\varepsilon f(Ka))/3\eta$) sa $f(Ka) = 1,5$ (Smoluchowski aproksimacija) mjeri elektroforetsku pokretljivost (u) i izračunava zeta potencijal (ξ) agregata. Zeta potencijal je uzet kao srednja vrijednost od tri do šest mjerenja.

DLS mjerenja provedena su pod kutem raspršivanja od 173°. Funkcija korelacije intenziteta analizirana je korištenjem softvera CONTIN za kvantificiranje raspodjele agregata (Provencher, 1982). Einstein-Stokesovom jednadžbom procijenjen je hidrodinamički promjer (d) uz pretpostavku da je sferičan agregat ($d = kBT/6\pi\eta D$, gdje kB je Boltzmannova konstanta, T je temperatura, η je viskoznost otapala i D je vidljivi difuzijski koeficijent translacije). Distribucije veličine su prikazane kao raspodjela volumena budući da u polidisperznoj suspenziji distribucija veličine intenziteta koju daje DLS precjenjuju udio većih čestica. U vrlo polidisperznom uzorku i/ili kod jakih međudjelovanja čestica, značenje prosječne veličine čestica nije izravno (Viseau i sur. 2001.). Zbog toga smo primijenili podatke volumne raspodjele samo kao sredstvo potvrđivanja prisutnosti agregata, kako bismo odredili relativne distribucije veličine čestica u otopinama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje tri do šest mjerenja.

3.3.5 Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije

Fourierovom transformacijom infracrvene spektroskopije (FTIR) zabilježeni su spektri FTIR instrumentom - Cary 660 FTIR (MIR sustav) (Agilent Technologies, USA). Uzorci su pomiješani s kalijevim bromidom da se dobiju gel pelete. Spektralno skeniranje provedeno je u rasponu od 500-4000 cm⁻¹.

3.4 Metode fizikalno-kemijske karakterizacije mikrosfera

3.4.1 Prinos inkapsulacije stanica *Lactiplantibacillus plantarum* (%E_{Y_{LBP}}) i stupanj bubrenja S_w

Prinos inkapsulacije (EY%) izražen je kao postotak održivosti stanica koje se koriste za kapsulaciju i izračunavaju se kako slijedi:

$$E_{Y_{LBP}} (\%) = (N_{\text{mikrosferes}}/N_{\text{suspenzija}}) \times 100$$

gdje N_{mikrosfera} (izraženo kao CFU po gramu mikrosfere) i N_{suspenzije} (izražene kao CFU po gramu otopine) predstavljaju održive brojeve u alginatnim mikrosferama i staničnoj suspenziji koja se koristi za inkapsuliranje. Izvorna stanična suspenzija korištena za inkapsuliranje bila je serijski razrijeđena (1:10) u sterilnoj fiziološkoj otopini (0,85 % NaCl, Merck, Njemačka), potom nanesa na MRS agar (Biolife, Italija) ploče u duplikatima te inkubirana na 30 °C tijekom 48 h u anaerobnim uvjetima. Kao kontrola koristile su se formirane mikrosfere bez stanica *Lactiplantibacillus plantarum* (ALG/Ca) pri istim uvjetima.

Bubrenje mikrosfera ovisi, između ostalog, o svojstvu sredstva za otapanje. Stoga, kako bi se izbjegao utjecaj elektrolita iz puferkih otopina, stupanj bubrenja (S_w) određen je za mikrosfere dispergirane u deioniziranoj vodi. Izvagano je 10 mg mikrosfera u epruvete i potom je dodano 10 mL destilirane vode. Mikrosfere su zatim ostavljene da bubre na sobnoj temperaturi tijekom tri sata kako bi se postigla ravnoteža. Težina vlažnih nabubrenih mikrosfera određena je vaganjem nakon upijanja vlage s površine mikrosfera pomoću filter papira. S_w je izračunat pomoću jednadžbe:

$$S_w\% = (w_t - w_0) / w_0$$

gdje je w_t težina nabubrenih mikrosfera, a w₀ je težina suhih mikrosfera. Sva su mjerenja ponavljana tri puta, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost s odgovarajućom standardnom devijacijom.

3.4.2 Morfologija i veličina mikrosfera

Prije početka procesa inkapsulacije nekoliko nasumično odabranih kolonija soja *Lactiplantibacillus plantarum* obojane su po gramu i vizualizirane svjetlosnim mikroskopom kojim su se promatrale morfološke karakteristike bakterijskih stanica. Nakon završetka procesa inkapsulacije stanica *Lactiplantibacillus plantarum* u alginatne mikrosfere, nastale mikrosfere su promatrane uz pomoć optičkog mikroskopa. Promatrane su boja, struktura, veličina i oblik pripremljenih mikrosfera.

3.4.3 Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama

Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama provedena je Fourierovom transformacijom infracrvene spektroskopije (FTIR).

3.5 Mjerenje dinamike otpuštanja stanica *Lactiplantibacillus plantarum* iz mikrosfera

Dinamika otpuštanja soja *Lactiplantibacillus plantarum* iz alginatih mikrosfera i njegovo preživljavanje u mikrosferama praćeni su tijekom 40 dana.

Po 1 g mikrosfera sa sojem *Lactiplantibacillus plantarum* sterilno je odvagano u Falcon tube i dodano im je 10 mL tekuće BHI podloge. Uzorkovanje je provedeno u duplikatima nakon 0, 5, 7, 10, 20, 30 i 40 dana nakon mikroinkapsulacije (n = 14). Za svako uzorkovanje pripremljena je i kontrola gdje je u Falcon tube odvagano 4 g praznih mikrosfera uz dodatak 10 mL tekuće BHI podloge (n = 7).

Na dan uzorkovanja (nulti, 5., 7., 10., 20., 30. i 40. dan), za sve uzorke uključujući i kontrole, supernatant je sterilno odvojen od kapsula. Po 1 ml supernatanta dodan je u 9 mL sterilne fiziološke otopine te je napravljena serija razrjeđenja (10⁻² do 10⁻⁸). 100 µL odgovarajućih razrjeđenja precijepljeno je na krute BHI hranjive podloge u duplikatima. 1 g mikrosfera koje sadrže soj *Lactiplantibacillus plantarum* otopljen je u 9 mL citratnog pufera (0,2 M NaHCO₃, 0,06 M Na₃C₆H₅O₇ x 2 H₂O). Zatim je napravljena serija razrjeđenja (10⁻² do 10⁻⁸). Po 100 µL odgovarajućih razrjeđenja precijepljeno je na krute BHI hranjive podloge u 2 ponavljanja. Podloge su inkubirane u anaerobnim uvjetima pri 30 °C kroz 48 sati. Nakon inkubacije, izbrojane su pojedinačne kolonije na razrjeđenjima na kojem se njihov broj kretao između 30-300. Broj mikroorganizama koji formiraju kolonije (engl. *colony forming units*) izračunat je prema formuli:

$$\text{CFU} = (\text{broj poraslih kolonija} / \text{upotrebljeni volumen uzorka}) \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja}$$

Dobiveni CFU je izražen kao logaritamska vrijednost CFU/mL supernatanta ili CFU/g mikrosfera.

4 Rezultati i rasprava

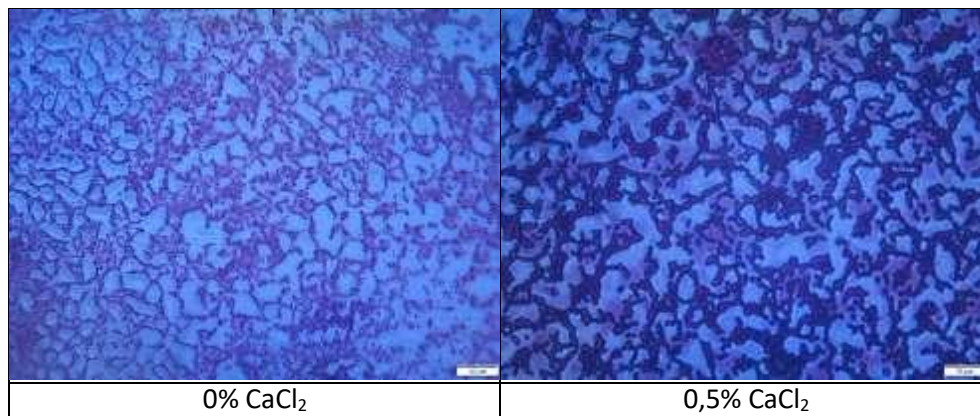
Upotrebom metode ionskog geliranja uspješno je provedena inkapsulacija bakterijske kulture *Lactobacillus plantarum* u alginatne mikrosfere.

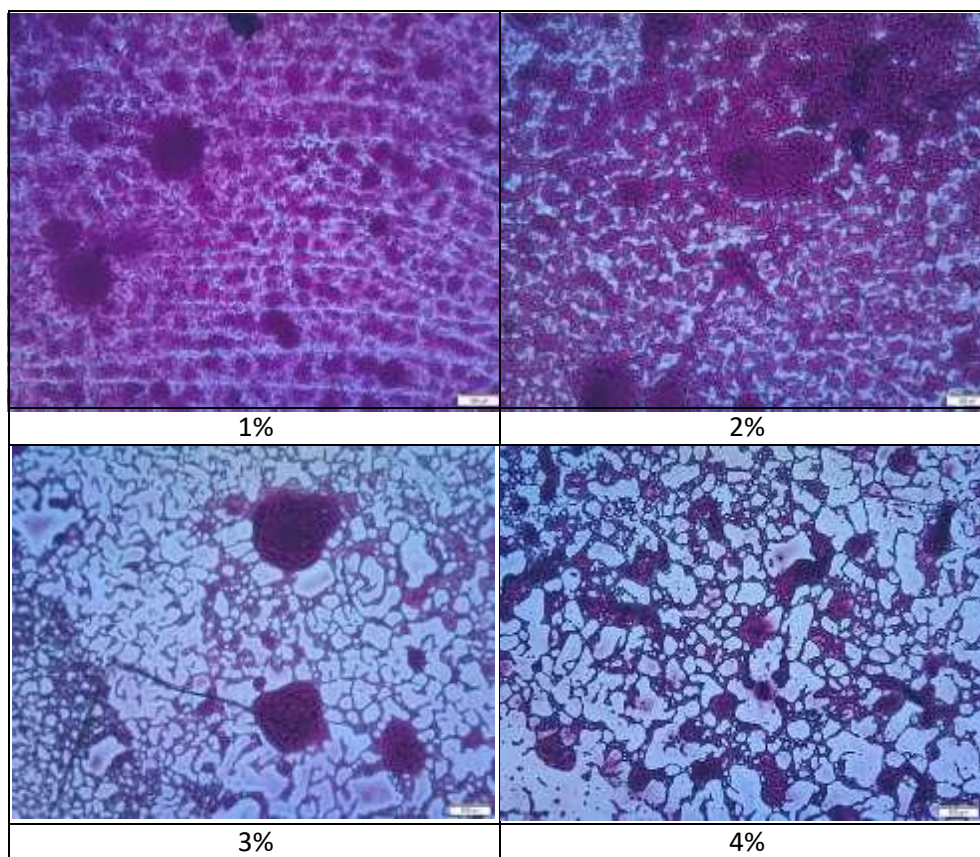
4.1 Međudjelovanja bakterijskih stanica vrste *Lactiplantibacillus plantarum* i kalcijevih iona

Istražen je utjecaj različitih koncentracija kationa kalcija na stanice *Lactiplantibacillus plantarum* u suspenziji. Do sada nije objašnjeno djelovanje kalcija na rast vrsta roda *Lactobacillus*. Proučavani su neki membranski transporteri kalcija i predložene hipoteze o njihovoj prirodi i načinu djelovanja. Kalcij posreduje u liziranju stanica izazvanom djelovanjem faga, ali ne na razini njihove adsorpcije. Kalcij utječe na vezanje nekih enzima sa stijenkom stanice (Boy a val 1989.).

4.1.1 Električni naboj i veličina bakterijskih stanica vrste *Lactiplantibacillus plantarum* suspendiranih u vodi

Na slici 4.1.1.1. prikazane su mikrofotografije stanica *Lactiplantibacillus plantarum* suspendiranih u otopini kalcijevog klorida (CaCl_2) koncentracijskog intervala (0,5-4%).





Slika 4.1.1.1. Mikrofotografije stanica *Lactiplantibacillus plantarum* suspendiranih u otopini kalcijevog klorida (CaCl₂) koncentracijskog intervala (0,5-4%) nakon bojanja po gramu

Iz prikazanih mikrofotografija mogu se uočiti promjene u ponašanju stanica *Lactiplantibacillus plantarum* koje su suspendirane u otopinama kalcijevog klorida (CaCl₂) u koncentracijskom intervalu (0,5-4%). Već s dodatkom niske koncentracije kalcijevog klorida (CaCl₂) dolazi do postupka grupiranja stanica *Lactiplantibacillus plantarum* u veće agregate, a kako koncentracija kalcijevog klorida (CaCl₂) raste agregati postaju učestaliji i veći. Opažene promjene mogu se objasniti svojstvom velikog broja mikroorganizama, uključujući i bakterije mliječne kiseline vrste *Lactiplantibacillus plantarum*, da imaju sposobnost adsorpcije, transporta i pohrane metalnih iona u unutrašnjost stanice (Mrvčić, 2012.). S porastom koncentracije kalcijevih iona koji se vežu na stanicu *Lactiplantibacillus plantarum* dolazi do snižavanja elektrostatskih odbojnih sila između stanica što u konačnici dovodi do stvaranja agregata stanica *Lactiplantibacillus plantarum* koji rastu s porastom koncentracije kalcijevih iona.

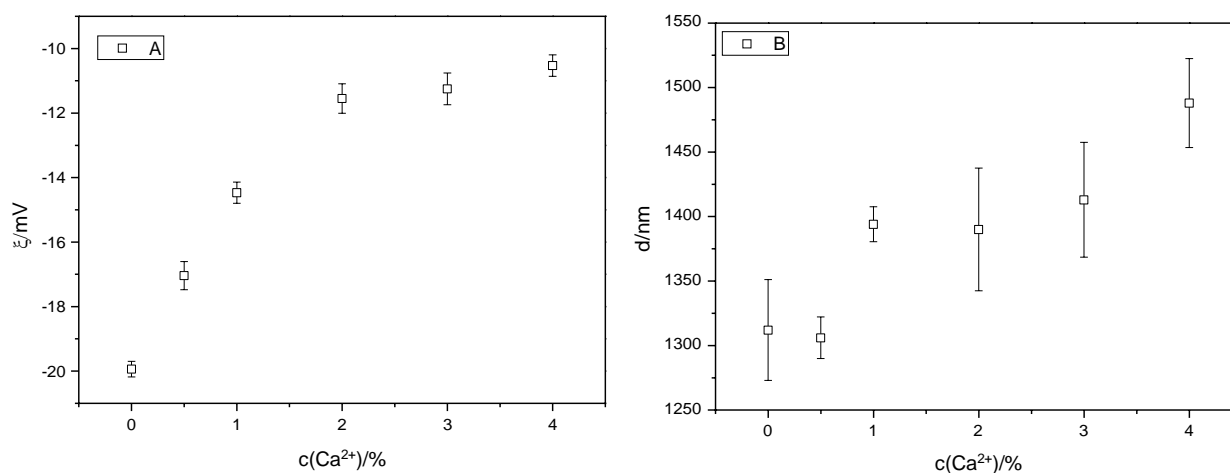
Vežanje metalnih iona na stanice *Lactiplantibacillus plantarum*, kao i na stanice drugih mikroorganizama, složen je proces koji ovisi o karakteristikama metalnih iona, fiziološkim svojstvima mikroorganizama i ostalim fizikalno-kemijskim karakteristikama (pH, temperatura, koncentracija metalnih iona). Stanične stijenke soja *Lactiplantibacillus plantarum* imaju složen sastav glikopolimera i proteina. Sastoji se od debelog peptidoglikanskog sakulusa (mureina)

koji okružuje citoplazmatsku membranu i teinskih kiselina, polisaharida, i bjelančevina. Ioni metala vežu se na staničnu stijenku i izvanstanično na polisaharide u živim ili neaktivnim stanicama. Ovaj proces ovisi o dostupnim funkcionalnim skupinama na površini stanice, prirodi i koncentraciji metalnih iona kao i o površinskom naboju (Jurić i sur., 2020.).

Utjecaj različitih koncentracija kalcijevih kationa na stanice *Lactiplantibacillus plantarum* suspendiranih u vodi ispitana je i pomoću mjerenja veličine i zeta potencijala čestica.

Stanice *Lactiplantibacillus plantarum* se vrlo lako suspendiraju u vodi što ukazuje na njihovu hidrofилnost. Stanice *Lactiplantibacillus plantarum* suspendirane u vodi pokazuju negativan naboj ($-19,94 \pm 0,2421$). Negativan zeta potencijal čistih stanica *Lactiplantibacillus plantarum* suspendiranih u vodi je u skladu s analizom odnosa između relativne površinske hidrofobnosti i površinskog električnog naboja (Lee i sur., 2016.). Površinski naboj bakterija roda *Lactiplantibacillus* ovisi o količini masnih kiselina, amida, peptida i fosfata (teihoična kiselina) na staničnoj membrani (Polak-Berecka i sur., 2017.).

Uz povećanje koncentracije kalcijevog klorida stanice *Lactiplantibacillus plantarum* postaju manje negativno nabijene zbog elektrostatskog vezanja kationa kalcija te njegove adsorpcije na površini stanice (Slika 4.1.1.2. a). Isto tako, pri višoj koncentraciji kalcijevih iona, suspendirane stanice *Lactiplantibacillus plantarum* pokazuju značajna nakupljanja u agregate što je posljedica sniženja elektrostatskih odbijanja između stanica što je u skladu i s mikroskopskim opažanjima. Zeta potencijal je jedan od važnih parametara jer odražava interakciju stanica i povezan je s biološkom aktivnošću stanica, aglutinacijom stanica, svojstvom stanične adhezije, itd. (García-Cayuela i sur., 2014.).



Slika 4.1.1.2. Varijacija (a) prosječnog zeta potencijala, ζ , i (b) prosječni hidrodinamički promjer, d , čestica s koncentracijom kalcijevog klorida kod suspendiranih stanica *Lactiplantibacillus plantarum*

Čak i kod najviše koncentracije kalcijevog klorida (CaCl_2) u iznosu od 4% nije došlo do potpune neutralizacije naboja suspendiranih stanica *Lactiplantibacillus plantarum* što je u skladu s prethodnim istraživanjima (Jurić i sur., 2020.).

4.2 Fizikalno-kemijska karakterizacija mikrosfera

4.2.1 Prinos inkapsulacije EY% i stupanj bubrenja S_w

Za procjenu prinosa inkapsulacije određena je brojnost korištenih bakterija za inkapsulaciju i brojnost bakterije koje su preživjele u mikrosferi. Početna bakterijska populacija korištena za inkapsulaciju bila je $9,84 \pm 0,1 \log \text{CFU/mL}$, a nakon procesa inkapsuliranja vitalna frakcija bila je $9,0 \pm 0,1 \log \text{CFU/g}$. Unatoč nižoj vrijednosti prinosa inkapsulacije od približno 60%, vijabilna frakcija je veća od zahtjeva međunarodnih standarda za fermentirane proizvode koji bi trebao sadržavati najmanje 10^7 živih bakterija po gramu proizvoda (Corbo i sur., 2016.).

Prinos inkapsulacije je složen proces koji ovisi o brojnim parametrima kao što su sposobnost mikrosfera da zarobe stanice, preživljavanje stanica tijekom skladištenja mikrosfera i oslobađanje stanica nakon imobilizacije.

Kada se rasprše u otopini, mikrosfere bubre, mijenjajući mnoga svojstva, kao što su mehanička čvrstoća, propusnost, otpuštanje aktivnih tvari, stabilnost i brzina razgradnje (Siepmann i sur. 2012.). Stupanj bubrenja mikrosfera s inkapsuliranim stanicama *Lactiplantibacillus plantarum* ($155,4 \pm 10,8 \%$) je značajno viši od stupnja bubrenja ALG/Ca mikrosfera ($48,7 \pm 12,21 \%$) pripremljenih pri istim koncentracijama alginata i kalcijevog kationa. Tijekom geliranja, kationi kalcija kooperativno reagiraju sa skupinama L-guluronske kiseline stvarajući ionske poprečne veze između različitih polimernih lanaca. Stupanj bubrenja hidrogela ograničen je umreženjem te se može koristiti kao mjera opsega umreženja (Jurić i sur., 2020.).

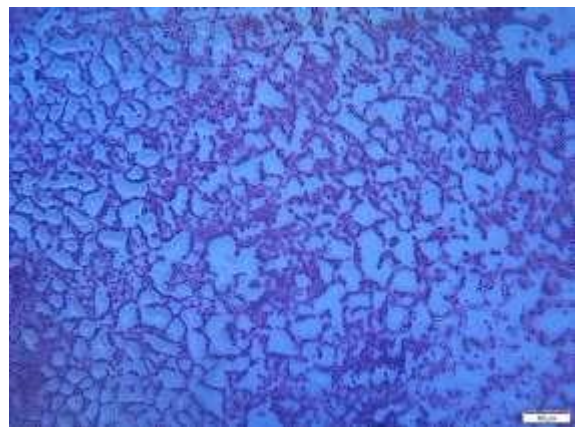
Dodatkom stanica *Lactiplantibacillus plantarum* uzrokuje se sniženje stupnja umreženja u mikrosferama kalcijevog alginata jer dolazi do promjene u strukturi mreže gela što je posljedica elektrostatskih interakcija ali i negativnog naboja stanica *Lactiplantibacillus plantarum*.

4.2.2 Morfologija i veličina mikrosfera

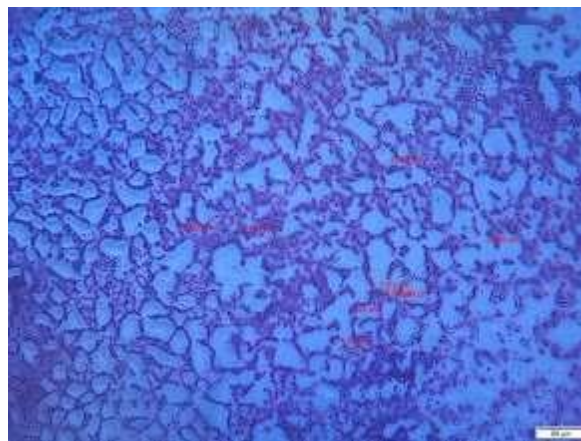
Pregledom svjetlosnim mikroskopom potvrđena je prisutnost kratkih, gram pozitivnih štapića. Mikrofotografije stanica *Lactiplantibacillus plantarum* su prikazane na slici 4.2.2.1. *Lactiplantibacillus plantarum* je široko rasprostranjen član roda *Lactiplantibacillus* i obično se nalazi u mnogim fermentiranim prehrambenim proizvodima, kao i u anaerobnim biljnim tvarima (Zheng i sur., 2020.).



a)



b)

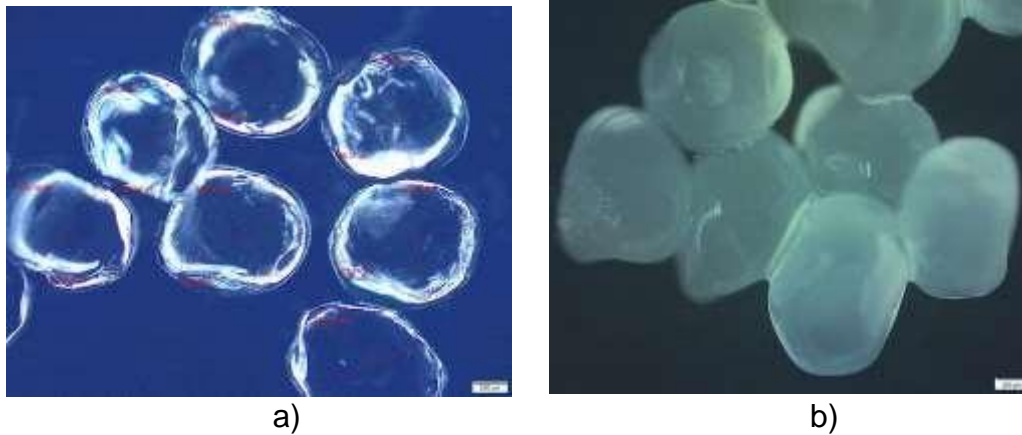


c)

Slika 4.2.2.1. Izgled stanica *Lactiplantibacillus plantarum* pod svjetlosnim mikroskopom: a) bez bojanja, b) nakon bojanja po gramu i c) prosječna veličina stanica (povećano 1000x)

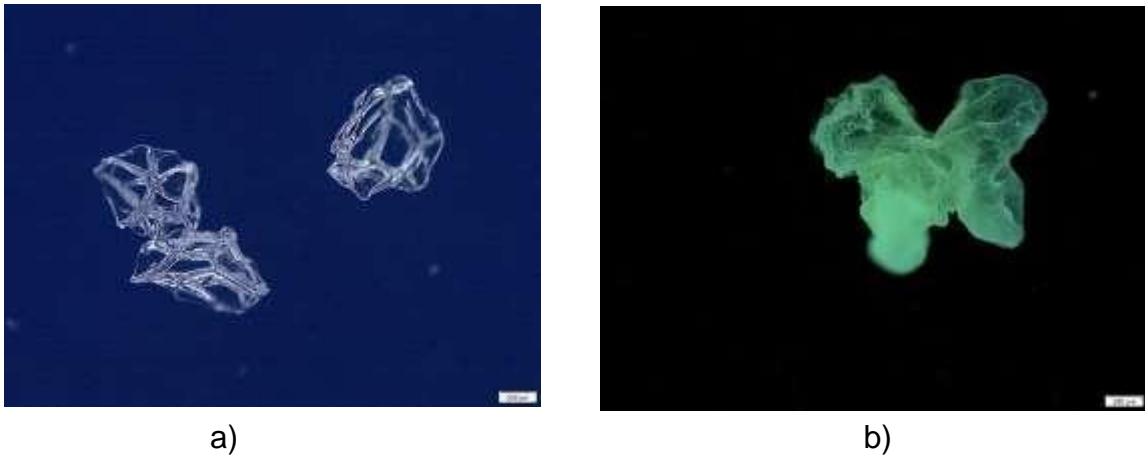
Kao što je vidljivo iz mikrofotografija prikazanih na slici 4.2.2.1. radi se o štapićastom mikroorganizmu sa zaobljenim krajevima. Imaju širinu od oko $0,9 \pm 0,082$ do $1,2 \pm 0,051$ μm , duljinu od $1,0 \pm 0,015$ do $8,0 \pm 0,036$ μm . Uočene su samostalne stanice, ali i određena udruženja u lančaste strukture što je u skladu s morfološkim ispitivanjima stanica *Lactiplantibacillus plantarum* (Corsetti, 2011.). Odmah nakon procesa inkapsulacije, promatrajući na optičkom

mikroskopu, uočena je promjena u boji pripremljenih mikrosfera koje sadrže stanice *Lactiplantibacillus plantarum* koje su bijele boje i mikrosfera koje ne sadrže stanice *Lactiplantibacillus plantarum* koje su prozirne. Mikrofotografije mikrosfera ispunjenih sa stanicama *Lactiplantibacillus plantarum* i prazne mikrosfere kalcijevog alginata prikazane su na Slici 4.2.2.2.



Slika 4.2.2.2. Mikrofotografije: a) mikrosfera praznih mikrosfera kalcijevog alginata (ALG/Ca) ii b) mikrosfera spunjenih s stanicama *Lactiplantibacillus plantarum* (ALG/Ca+LP)

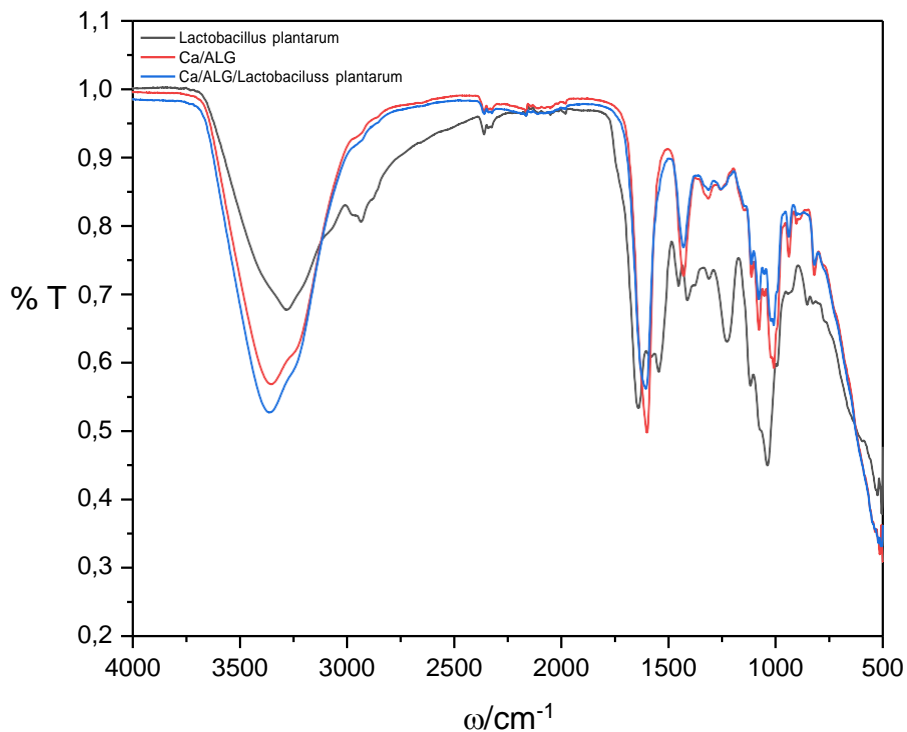
Mikroskopskim opažanjem uočeno je da nastale mikrosfere kalcijevog alginata i mikrosfere ispunjene sa stanicama *Lactiplantibacillus plantarum* imaju sličnu nepravilnu sferičnu strukturu. Veličina i oblik pripremljenih mikrosfera (ALG/Ca) i (ALG/Ca+LP) uglavnom određuju veličina mlaznice koja se koristi tijekom procesa inkapsulacije i na njega utječe koncentracija natrijevog alginata i kalcijevih iona. Pripremljene mikrosfere su veličine mikroskopskog raspona koji pokazuje glatku teksturu površine što je u skladu sa sličnim istraživanjima (Jurić i sur. 2021.). Veličina nastalih mikrosfera bez stanica *Lactiplantibacillus plantarum* približno iznosi $685 \pm 73,21 \mu\text{m}$, dok veličina mikrosfere ispunjene s stanicama *Lactiplantibacillus plantarum* približno iznosi $641 \pm 26,89 \mu\text{m}$. Oba tipa mikrosfera imaju sferično-jajolik oblik, a zbog svoje veličine i prisutnosti vlage su međusobno spojene. To bi mogla biti posljedica visoke površinske napetosti korištene otopine za umrežavanje (CaCl_2), što rezultira stvaranjem nesavršene sferično-jajolike strukture mikrosfere (Maresca i sur. 2016.). Sušenjem formulacija mikrosfera do konstantne mase procesom liofilizacije dolazi do značajnih i vidljivih promjena u veličini, obliku i površini oba tipa formulacija mikrosfera. Gubitkom vlage i vode veličina oba tipa formulacija se smanjuje za približno 55 %. Također dolazi i do promjene u obliku površine mikrosfera. Površina postaje gruba, naborana i s nizom udubina. Navedene promjene površine su posljedica naglog gubitka vode kroz pore mikrosfera. Nastala udubljenja predstavljaju smjer gubitka vode iz formulacija mikrosfera. Zbog toga struktura postaje rahla i krhka. Na slici 4.2.2.3. prikazane su prazne osušene mikrosfere i osušene mikrosfere ispunjene sa stanicama *Lactiplantibacillus plantarum*. Također gubitkom vlage i sušenjem dolazi do međusobnog povezivanja mikrosfera u veće nakupine.



Slika 4.2.2.3. Mikrofotografije a) praznih suhih formulacija mikrosfera Ca/ALG i b) suhih formulacija mikrosfera ispunjenih s stanicama *Lactiplantibacillus plantarum*

4.2.3 Identifikacija molekulskih međudjelovanja u mikrosferama

FTIR spektri liofiliziranih stanica *Lactiplantibacillus plantarum*, Ca/ALG mikrosfera i Ca/ALG/*Lactiplantibacillus plantarum* mikrosfera su prikazane na slici 4.2.3.1.



Slika 4.2.3.1. FTIR spektri liofiliziranih stanica *Lactiplantibacillus plantarum* (crna linija), mikrosfera Ca/ALG (crvena linija) i mikrosfera Ca/ALG/*Lactiplantibacillus plantarum* (plava linija)

FTIR spektar stanica *Lactiplantibacillus plantarum* pokazuje nekoliko karakterističnih vrhova (pikova) u određenim područjima valnih brojeva. Ova područja sadrže informacije iz različitih staničnih komponenti: (1) 3000–2800 cm^{-1} : masne kiseline u bakterijskoj stanici membrana; (2) 1800–1500 cm^{-1} : amidne trake proteina i peptida; (3) 1500–1200 cm^{-1} : mješovita regija: proteini i masne kiseline; (4) 1200–900 cm^{-1} : polisaharidi unutar stanične stijenke; (5) 900–500 cm^{-1} : područje otiska prsta koje sadrži trake koje se ne mogu dodijeliti specifične funkcionalne skupine (Oust i sur. 2004.).

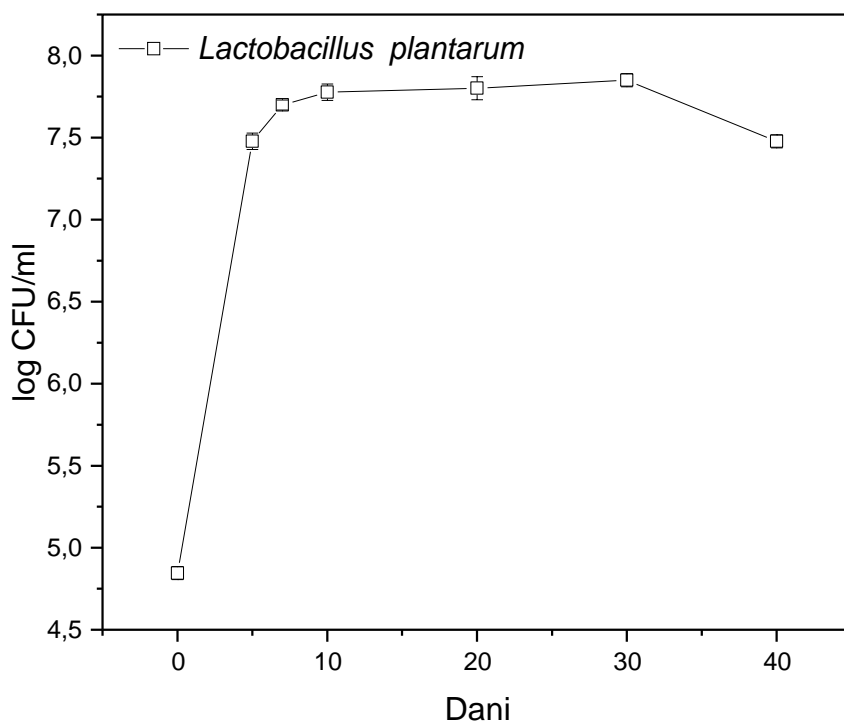
FTIR spektar mikrosfere Ca/ALG i mikrosfera Ca/ALG/*Lactiplantibacillus plantarum* su vrlo slični. Karakterizira ih karakterističan intenzivan pik u intervalu of 3300 – 3500 cm^{-1} što odgovara istezanju -OH. Također vrpce na (1081-1021) cm^{-1} području dodijeljene su C-O-C antisimetričnom istezanju.

Ostale vibracije bile su prisutne zbog istezanja C-N, N-H i O-H koja su se dogodila u području 1190.-920. cm^{-1} i 3200–3600 cm^{-1} . Učinak unakrsnog povezivanja Ca^{2+} iona s natrijevim alginatom mogu se promatrati iz jačih apsorpcijskih vrpce na 1596 cm^{-1} i (3000–3500) cm^{-1} i smanjenom području rastezanja C-O-C. (Vaziri i sur. 2018.).

Promjene u položaju i intenzitetu vrpce mikrosfera Ca/ALG ispunjenih s *Lactiplantibacillus plantarum* može se objasniti elektrostatskim interakcijama između biopolimernog matriksa i negativno nabijenih stanica *Lactiplantibacillus plantarum* te pojavom dodatnog umrežavanja.

4.3 Dinamika otpuštanja stanica *Lactiplantibacillus plantarum* iz mikrosfera

Otpuštanje stanica *Lactiplantibacillus plantarum* iz alginatnih mikrosfera praćeni su tijekom 40 dana. Log CFU/mL za otpuštanje iz mikrosferama određeni su na dan inkapsulacije i 5, 7, 10, 20, 30 i 40 dana nakon inkapsulacije u duplikatima. Dinamika otpuštanja soja *Lactiplantibacillus plantarum* iz alginatnih mikrosfera prikazana je na Slici 4.3.1.



Slika 4.3.1. Otpuštanje stanica *Lactiplantibacillus plantarum* iz alginatnih mikrosfera. Brojnost soja stanica *Lactiplantibacillus plantarum* prikazana je kao srednja vrijednost log CFU/mL s pripadajućom standardnom devijacijom

Bakterijske stanice *Lactiplantibacillus plantarum* otpuštaju se odmah nakon inkapsulacije ($4,82 \pm 0,07$ log CFU/mL), a najviše do 5. dana ($7,65 \pm 0,05$ log CFU/mL). Od 5. do 20. dana nema većih promjena u otpuštanju, a vrijednosti se kreću između $7,33 \pm 0,24$ log CFU/mL i $7,68 \pm 0,16$ log CFU/mL. Nakon toga, otpuštanje soja *Lactiplantibacillus plantarum* postupno se smanjuje do 40. dana ($7,47 \pm 0,17$ log CFU/mL). Sličnu dinamiku otpuštanja iz alginatnih mikrosfera pokazala su i druga istraživanja. Međutim, maksimalno otpuštanje detektirano je u različito vrijeme. Corbo i sur. (2016) pokazali su da se odmah nakon inkapsulacije bakterije *Lactiplantibacillus plantarum*, iz alginatnih mikrosfera otpustilo oko 3,5 log CFU/mL, te da je maksimalno otpuštanje, oko 6 log CFU/mL, detektirano nakon 150 sati. Barbosa i sur. (2015), s druge strane, pokazali su da se bakterijske stanice *Lactiplantibacillus curvatus* maksimalno otpuštaju iz alginatnih mikrosfera 7. dan. Na inicijalno otpuštanje, kao i kasnije otpuštanje iz alginatnih mikrosfera, mogu utjecati različiti faktori, kao što su veličina mikrosfera i temperatura.

Stanice *Lactiplantibacillus plantarum* su uspješno inkapsulirane u Ca/ALG mikrosfere čime se omogućuje njihova zaštita od vanjskog utjecaja ali i omogućuje otpuštanja u određenim vremenskim intervalima. Ca/ALG mikrosfere pružaju povoljne uvjete za preživljavanje stanica *Lactiplantibacillus plantarum*, a time i njihovo otpuštanje.

Mehanizmi kojim se aktivna tvar otpušta iz mikročestica su kompleksni te mogu uključivati različite procese: prodiranje okolne otopine u mikrosferu, bubrenje mikrosfera, difuziju aktivnog sastojka kroz mrežu gela, otapanje aktivnog sastojka u okolnom mediju i eroziju nabubrene mikrosfere (Maderuelo i sur., 2011.).

Pokazano je da su difuzija, bubrenje i erozija najvažniji mehanizmi koji kontroliraju brzinu otpuštanja aktivnih sastojaka iz hidrofilnih mikrosfera (Sankalia i sur., 2007.). Korsmeyer i sur. (1983) primijenili su empirijski model za analizu otpuštanja aktivnih sastojaka iz hidrofilnih mikrosfera:

$$f=kt^n$$

gdje je f frakcija otpuštena u vremenu t, k je kinetička konstanta karakteristična za određeni sustav i n je eksponent karakterističan za kontrolni mehanizam otpuštanja.

U ovom slučaju vrijednost eksponenta n iz Korsmeyer-Peppas modela je manji od 0,43 (n=0,056) što ukazuje da se stanice *Lactiplantibacillus plantarum* otpuštaju iz mikrosfera procesom difuzije. Poznavanje kinetike i mehanizama koji kontroliraju otpuštanje aktivnih sastojaka je važno za pripremu optimalnih formulacija baziranih na biopolimernim materijalima.

5 Zaključak

Proces inkapsulacije, proveden metodom ionskog geliranja, soja *Lactiplantibacillus plantarum* u alginatne mikročestice pokazao se učinkovitim. Nakon procesa inkapsulacije postignuta je zadovoljavajuća brojnost i aktivnost bakterijskih stanica vrste *Lactiplantibacillus plantarum* u formulacijama alginatnih mikročestica, stoga se dobivene mikročestice mogu koristiti za kontrolirano otpuštanje komponenti unutar njih tijekom proizvodnje sira.

Uspješno je provedena fizikalno-kemijska karakterizacija alginatnih mikročestica ispunjenih sojem *Lactiplantibacillus plantarum*. Nakon procesa inkapsulacije vitalna frakcija iznosila je $9,0 \pm 0,1$ log CFU/g, a takav rezultat odgovara zahtjevima međunarodnih standarda za fermentirane proizvode. Stupanj bubrenja mikrosfera s inkapsuliranim stanicama *Lactiplantibacillus plantarum* iznosio je $155,4 \pm 10,8$ %, a stupanj bubrenja ALG/Ca mikrosfera $48,7 \pm 12,21$, čime je potvrđena očekivana pretpostavka da je stupanj bubrenja mikrosfera ispunjenih bakterijskim stanicama viši od stupnja bubrenja praznih mikrosfera.

Mikroskopskim pregledom potvrđena je prisutnost kratkih, gram pozitivnih štapića vrste *Lactiplantibacillus plantarum* unutar alginatnih mikročestica. Veličina bakterijskih stanica i veličina pripravljenih mikrosfera određene su optičkim mikroskopom.

Uspješno je izmjerena dinamika otpuštanja bakterijskih stanica vrste *Lactiplantibacillus plantarum* iz mikrosfera. Soj *Lactobacillus plantarum* otpušta se odmah nakon inkapsulacije ($4,82 \pm 0,07$ log CFU/mL). Najviše se otpušta do 5. dana ($7,65 \pm 0,05$ log CFU/mL). Nakon 20. dana otpuštanje soja *Lactobacillus plantarum* postupno se smanjuje do 40. dana.

6 Popis literature

1. Barbosa M.S., Todorov S.D., Jurkiewicz C.H., Franco B.D. (2015). Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes*. *Food control*. 47: 147-153
2. Behera S.S., Ray R.C., Zdolec N.(2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *Biomed. Res. Int.* 2018, 9361614.
3. Blažeka B., Šušković J., Matošić S. (1991). Antimicrobial activity of lactobacilli and streptococci. *World J. Microbiol. Biotechnol.* (7)533-536
4. Boras A. (2019). Mikroinkapsulacija soja *Lactobacillus sakei* MRS_296 s potencijalom primjene kao starter kultura. Diplomski rad. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:835936> – pristup 22.7.2022.
5. Boy a val P. (1989). Lactic acid bacteria and metals ions, *Le Lait* 69(2): 87—113
6. Brkić B. (1995). Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline. Magistarski rad, *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev* 33(4): 145-150
7. Corbo M.R., Bevilacqua A., Speranza B., Di Maggio B., Gallo M., Sinigaglia M. (2016). Use of alginate beads as carriers for lactic acid bacteria in a structured system and preliminary validation in a meat product. *Meat science*. 111: 198-203
8. Corsetti A., Valmorri S. (2011). Lactic Acid Bacteria. *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus plantarum*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 111–118. doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00263-6
9. Fang Z., Bhandari B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21(10): 510–523
10. Gallo M., Corbo M.R. (2010). Microencapsulation as a new approach to protect active compounds in food. U: *Application of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability*. Bentham Science Publisher. 188-195
11. García-Cayueta T., Korany A.M., Bustos I.P., Gómez de Cadiñanos L., Requena T., Peláez C., Martínez-Cuesta M.C. (2014). Adhesionabilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res Int.* 57(1): 44–50
12. Giraud E., Lelong B., Raimbault M. (1991). Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36(1): 96–99

13. Jurić S., Tanuwidjaja I., Fuka M.M., Kahlina K. V., Marijan M., Boras A., Vinceković M. (2020). ENCAPSULATION OF TWO FERMENTATION AGENTS, LACTOBACILLUS SAKEI AND CALCIUM IONS IN MICROSPHERES. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111387. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.11138
14. Jurić S., Tanuwidjaja I., Fuka M.M., Kahlina-Vlahoviček K., Marijan M., Boras A., Kolić Udiković N., Vinceković M. (2021). Encapsulation of two fermentation agents, *Lactobacillus sakei* and calcium ions in microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197(), 111387. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.111387
15. Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N.A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 15: 25-35
16. Landete J.M., Rodríguez H., Curiel J.A., De Las Rivas B., De Felipe F.L., Muñoz R. (2010). "Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains". *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. str. 387–396. doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00043-7. ISBN 9780123744203. S2CID 89393063
17. Lee I.C., Caggianiello G., van Swam I.I., Taverne N., Meijerink M., Bron P.A., Kleerebezem M. (2016). Strain-Specific Features of Extracellular Polysaccharides and Their Impact on *Lactobacillus plantarum*-Host Interactions. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(13): 3959–3970. doi:10.1128/aem.00306-16
18. Maderuelo C., Zarzuelo A., Lanao J.M. (2011). Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *Journal of Controlled Release*. 154: 2-19
19. Maresca D., Prisco A. De, Storia A., La Cirillo T., Esposito F., Mauriello G. (2016). Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: preliminary investigation. *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)*. 66: 436–443
20. Matejčeková Z., Liptáková D., Spodniaková S., Valík L.(2016). Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. *Acta Chimica Slovaca*. 9(2): 104–108
21. Mrvčić J., Stanzer D., Šolić E., Stehlik-Tomas V. (2012). Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28(9): 2771–2782. doi:10.1007/s11274-012-1094-2
22. Oust A., Møretrø T., Kirschner C., Narvhus J. A., Kohler A. (2004). FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *Journal of Microbiological Methods*. 59(2): 149–162. doi:10.1016/j.mimet.2004.06.011

23. Pandžić I. (2017). Korištenje bakterija mliječne kiseline u poljoprivrednoj proizvodnji. Diplomski rad. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:668216> – pristup 19.7.2022.
24. Polak-Berecka M., Boguta P., Ciesla J., Bieganski A., Skrzypek T., Czernecki T., Wasko A. (2017). Studies on the removal of Cd ions by gastrointestinal lactobacilli. *Appl Microbiol Biot.* 101(8): 3415–3425
25. Racovită Ș., Vasiliu S., Popa M., Luca C. (2009). Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. *Revue Roumaine de Chimie.* 54(9): 709–718
26. Sankalia M.G., Mashru R.C., Sankalia J.M., Sutariya V.B. (2007). Reversed chitosan-alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: optimization and physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 65: 215-232
27. Siepmann J., Siepmann F. (2012). Modeling of diffusion controlled drug delivery, *J. Control. Release* 161(2012): 351–362
28. Singh M.N., Hemant K.S.Y., Ram M., Shivakumar H.G. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. *Journal of Research in Pharmaceutical Sciences.* 5(2): 65–77
29. Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.
30. Šušković J., Brkić B., Matošić S. (1997). Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb 1997. *Mljekarstvo* 47. (1) 57-73
31. Teixeira da Silva P., Martins Fries L.L., Ragagnin de Menezes C., Tasch Holkem A., Schwan C.L., Wigmann É.F., De Oliveira Bastos J., De Bona da Silva C. (2014). Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural.* doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971 [online] <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971> . Pristup 25.7.2022.
32. Usmiati S., Richana N., Mangunwidjaja D., Noor E., Prangdimurti E. (2014). The Using of Ionic Gelation Method Based on Polysaccharides for Encapsulating the Macromolecules– A Review. *International Conference on Food Security and Nutrition.* 67: 79-84

33. Vaziri A.S., Alemzadeh I., Vossoughi M. (2018). Improving survivability of *Lactobacillus plantarum* in alginate-chitosan beads reinforced by Na-tripolyphosphate dual cross-linking. *LWT*, 97: 440–447. doi:10.1016/j.lwt.2018.07.037
34. Viseau M.I., Edwards K., Campos C., Costa S.M.B. (2001). Spontaneous Vesicles Formed in Aqueous Mixtures of Two Cationic Amphiphiles. *Langmuir*. 16: 2105-2114
35. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M., Harris H.M., Mattarelli P., et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70(4): 2782–2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107. PMID 32293557
36. Zuidam N. J., Nedović V. (2010). *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, Springer. str. 3-29

7 Prilog

7.1 Popis kratica

Kratica	Značenje
BMK	bakterije mliječne kiseline
ALG/Ca	mikrosfera kalcijevog alginata
ALG/Ca/ <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	mikrosfera kalcijevog alginata sa stanicama <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
CaCl ₂	kalcijev klorid
FTIR	engl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije)
CFU	colony-forming unit
nm	nanometar
μm	mikrometar
cm	centimetar
g	gram
mL	mililitar
L	litra
°C	Celzijev stpanj
Hz	Herc
kB	Boltzmannova konstanta
T	temperatura
η	viskoznost otapala
D	vidljivi difuzijski koeficijent translacije
N _{microsheres} , N _{suspenzija}	održivi brojevi u alginatnim mikrosferama i staničnoj suspenziji
BHI	Brain Heart Infusion
MRS	MRS De Man, Rogosa, Sharpe
ξ	zeta potencijal

S_w	stupanj bubrenja
EY%	prinos inkapsulacije
UV/VIS	ultraviolet-visible spectroscopy

Životopis

Hana Zelić rođena je u Zadru 24. srpnja 1998. godine. Završila je Osnovnu školu Šime Budinića u Zadru, a potom je školske godine 2013./2014. upisala opće usmjerenje Gimnazije Jurja Barakovića u Zadru. Srednjoškolsko obrazovanje završila je školske godine 2016./2017., a potom je akademske godine 2017./2018. upisala Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Završila je prediplomski studij Agroekologije, a potom je, akademske godine 2020./2021., upisala i diplomski studij. Trenutno je studentica druge godine diplomskog studija Agroekologije, usmjerenja Mikrobne biotehnologije u poljoprivredi. Tijekom trajanja prediplomskog studija stručnu praksu obavila je na Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a stručnu praksu za vrijeme trajanja diplomskog studija obavila je u poduzeću VITA d.o.o. Zna osnove njemačkog jezika, a engleskim jezikom služi se bez poteškoća.