



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



MIKROINKAPSULACIJA SOJA *LACTOBACILLUS SAKEI* MRS_296 S POTENCIJALOM PRIMJENE KAO STARTER KULTURA

DIPLOMSKI RAD

Anita Boras

Zagreb, rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij

Agroekologija - Mikrobnna biotehnologija u poljoprivredi

**MIKROINKAPSULACIJA SOJA *LACTOBACILLUS SAKEI* MRS_296 S
POTENCIJALOM PRIMJENE KAO STARTER KULTURA**

DIPLOMSKI RAD

Anita Boras

Mentor:

Izv. prof. dr.sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Zagreb, rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Anita Boras**, JMBAG 0178097997, rođena 07. 11. 1994. godine u Ljubuškom (BiH), izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

MIKROINKAPSULACIJA SOJA *LACTOBACILLUS SAKEI* MRS_296 S POTENCIJALOM PRIMJENE KAO STARTER KULTURA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica 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 s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Anita Boras**, JMBAG 0178097997, naslova:

**MIKROINKAPSULACIJA SOJA *LACTOBACILLUS SAKEI* MRS_296 S
POTENCIJALOM PRIMJENE KAO STARTER KULTURA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Mentor: Izv. prof. dr. sc.

Mirna Mrkonjić Fuka

2. Član: Prof. dr. sc.

Marko Vinceković

3. Član: Doc. dr.sc. Ivica Kos

Zahvala

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc Mirni Mrkonjić Fuka na predloženoj temi diplomskog rada, divnoj suradnji, ukazanom povjerenju i strpljivosti tijekom realizacije ovog rada.

Posebno hvala mag. ing. agr. Irina Tanuwidjaja na nesebičnoj pomoći te mnogobrojnim savjetima koji su mi uvelike pomogli, kako kroz praktični dio u laboratoriju, tako i prilikom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem i ostalim djelatnicama Zavoda za mikrobiologiju na pomoći i susretljivosti, kao i djelatnicima Zavoda za kemiju.

Zahvaljujem se i Hrvatskoj zakladi za znanost koja je omogućila sredstva za ovo istraživanje u sklopu projekta "Očuvanje mikrobne raznolikosti povezane s proizvodnjom tradicionalnih hrvatskih kobasica od mesa divljači: biotehnološka i sigurnosna karakterizacija" (miCROgame UIP-11-2013-6640).

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada	3
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK)	4
2.2. Rod <i>Lactobacillus</i>	5
2.3. <i>Lactobacillus sakei</i>	6
2.4. BMK kao funkcionalni starteri u proizvodnji trajnih fermentiranih kobasica	7
2.5. Mikroinkapsulacija BMK.....	8
2.5.1. Mikrosfere	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture.....	11
3.1.1. BHI tekuća hranjiva podloga (engl. <i>Brain Heart Infusion broth</i>).....	11
3.1.2. BHI kruta hranjiva podloga (engl. <i>Brain Heart Infusion agar</i>)	11
3.1.3. MRS tekuća hranjiva podloga	11
3.2. Otopine i puferi	11
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)	11
3.2.2. Etanol (80 %)	11
3.2.3. Fiziološka otopina (0,85 %)	12
3.2.4. Glicerol (50 %).....	12
3.2.5. Kalcijev klorid (CaCl ₂ , 1 M).....	12
3.2.6. Natrijev alginat (1,8 %).....	12
3.2.7. Mucosol [®] (2 %)	12
3.3. Odabir izolata i priprema biomase za mikroinkapsulaciju	12
3.4. Formiranje mikrosfera.....	13
3.5. Morfološka karakterizacija mikrosfera	15

3.6. Određivanje dinamike otpuštanja i preživljavanja soja MRS_296	15
3.7. Mjerenje pH vrijednosti.....	16
3.8. Određivanje vijabilnosti inkapsuliranog soja MRS_296 čuvanih pri 25 °C	16
3.9. Statistička analiza.....	17
3.10. Izolacija i prikupljanje soja MRS_296.....	17
3.11. Izolacija DNA iz prikupljenih izolata	17
3.12. Kontrola mikroinkapsulacije pomoću rep-PCR	18
4. REZULTATI.....	20
4.1. Morfološke karakteristike soja <i>Lb. sakei</i> MRS_296 i mikrosfera.....	20
4.2. Dinamika otpuštanja i preživljavanja <i>Lb. sakei</i> MRS_296 u mikrosferama.....	21
4.3. Sposobnost acidifikacije inkapsuliranog soja <i>Lb. sakei</i> MRS_296	24
4.4. Utjecaj pohrane na sobnoj temperaturi na vijabilnost soja <i>Lb. sakei</i> MRS_296.....	25
4.5. Praćenje soja <i>Lb. sakei</i> MRS_296 tijekom otpuštanja iz mikrosfera i čuvanja pri 25 °C	26
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČCI.....	32
7. POPIS LITERATURE	33
8.1. Popis kratica	40
8.2. Tablice.....	41
ŽIVOTOPIS	45

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Anite Boras**, naslova

MIKROINKAPSULACIJA SOJA *LACTOBACILLUS SAKEI* MRS_296 S POTENCIJALOM PRIMJENE KAO STARTER KULTURA

Za spriječavanje proliferacije potencijalnih patogena, ubrzavanje fermentacijskog postupka, poboljšanje organoleptičkih svojstava te postizanje visoke razine sigurnosti hrane i njene kvalitete u tradicionalnim fermentiranim kobasicama, primjena starter kultura je nužnost. Soj *Lactobacillus sakei* MRS_296 je selekcioniran i detaljno molekularno-biološki i tehnološki karakteriziran u Laboratoriju za mikrobiologiju namirnica Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta. Bakterijski soj zadovoljio je vrlo stroge kriterije selekcije i može biti primijenjen kao dio starter kultura za standardizaciju proizvodnje kobasica od divljači. Kako bi se broj mikrobnih kultura koje se apliciraju kao starter kulture održao visokim kroz čitav proces proizvodnje kobasica, stanice se mogu inkapsulirati. Mikroinkapsuliranjem se mikrobnostanice mogu učinkovito zaštititi od biotičkih i abiotičkih stresova te se može povećati njihova biomasa i vijabilnost. U ovom radu ispitan je potencijal mikroinkapsuliranja u sustavu nosača na bazi natrijevog alginata tehnikom ionskog geliranja, s ciljem povećanja brojnosti i vijabilnosti inkapsuliranog soja. Cilj rada je pripremiti mikrosfere natrijevog alginata ispunjene sojem *Lb. sakei* MRS_296, koje će nakon procesa biti čuvane u tekućem BHI mediju kroz 40 dana i ispitati dinamiku njihovog otpuštanja i preživljavanja u alginatnim mikrosferama. Pokazano je da se soj *Lb. sakei* MRS_296 počinje otpuštati odmah nakon inkapsulacije ($4,82 \pm 0,07$ log CFU/ml) i najviše se otpušta do 5. dana ($7,65 \pm 0,05$ log CFU/ml). Sličan trend dokazan je i za preživljavanje ispitivanog soja u mikrosferama gdje je najveća brojnost u mikrosferama detektirana 5. dan ($9,32 \pm 0,05$ log CFU/g). Između brojnosti soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama i njegovog otpuštanja iz mikrosfera postoji jaka značajna pozitivna korelacija ($r = 0,98$; $p < 0,01$). Istovremeno, dokazana je i jaka značajna negativna korelacija između otpuštanja soja *Lb. sakei* MRS_296 iz mikrosfera i promjene pH vrijednosti medija ($r = -0,81$; $p = 0,03$). Kod čuvanja mikrosfera pri 25 °C soj *Lb. sakei* MRS_296 ostaje vijabilan i nakon 40 dana, međutim postotak njegovog preživljavanja je iznimno nizak (0,0002 – 0,0008 %).

Ključne riječi: BMK, *Lactobacillus sakei*, tradicionalne fermentirane kobasice, starter kulture, mikroinkapsulacija

Summary

Of the master's thesis – student **Anita Boras**, entitled

MICROENCAPSULATION OF A STRAIN *LACTOBACILLUS SAKEI* MRS_296 WITH POTENTIAL APPLICATION AS A STARTER CULTURE

To prevent proliferation of potential pathogens, accelerate the fermentation process, improve organoleptic properties and achieve high levels of food safety and its quality in traditional fermented sausages, the application of meat starter cultures is a necessity. Strain *Lactobacillus sakei* MRS_296 was selected and molecular-biologically and technologically characterized in the Laboratory of Food Microbiology at the University of Zagreb Faculty of Agriculture. This bacterial strain satisfied very strict selection criteria and it may be used as a part of starter cultures for the standardization of game meat sausages production. In order to maintain high microbial culture counts throughout the whole sausage production, cells can be encapsulated. Microencapsulation can efficiently protect microbial cells from biotic and abiotic stress which can result in the increase of their biomass and viability. In this study, the potential of carrier system based on sodium alginate formed by ionizing gelation technique for increasing the number and viability of encapsulated strain was investigated. The aim of this master's thesis is to prepare sodium alginates microspheres by ionizing gelation, filled with strain *Lb. sakei* MRS_296, which will then be stored in the BHI broth for 40 days and to follow their release and survival dynamics in alginate microspheres. It has been shown that strain *Lb. sakei* MRS_296 begins to release immediately after encapsulation (4.82 ± 0.07 log CFU/ml) and the majority is released by day 5 (7.65 ± 0.05 log CFU/ml). A similar trend was detected for the survival of the tested strain in the microspheres where the highest abundance was detected on day 5 (9.32 ± 0.05 log CFU/g). A strong significant positive correlation ($r = 0.98$; $p < 0.01$) between the abundance of strain *Lb. sakei* MRS_296 in the microspheres and its release from the microspheres was detected. At the same time, a strong significant negative correlation between the release of strain *Lb. sakei* MRS_296 from the microspheres and pH changes of the medium ($r = -0.81$; $p = 0.03$) was detected. When storing the microspheres at 25 °C, strain *Lb. sakei* MRS_296 remains viable after 40 days, however, its survival rate is extremely low (0.0002 - 0.0008%).

Key words: LAB, *Lactobacillus sakei* MRS_296, traditional fermented sausages, starter cultures, microencapsulation

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) imaju dugu povijest primjene u proizvodnji fermentiranih mesnih proizvoda. Spontano fermentirane kobasice od mesa divljači predstavljaju jedan od najatraktivnijih tradicionalnih proizvoda zahvaljujući specifičnim organoleptičkim svojstvima i visokom sadržaju vrijednih hranjivih tvari. U Hrvatskoj spontano fermentirane kobasice od divljači najčešće se proizvode na obiteljsko-poljoprivrednim gospodarstvima od smjese mesa divlje i domaće svinje, uz dodatak različitih začina i bez dodatka starter kultura, prateći tradicionalne recepture i postupke. Fermentacija tradicionalnih kobasica u Hrvatskoj nije kontrolirana i temelji se na metaboličkoj aktivnosti autohtone mikrobiote ili inokulaciji proizvodima dobre kvalitete iz prethodne proizvodnje (Petričević i sur., 2010).

Fermentacija i zrenje su ključne faze u proizvodnji trajnih fermentiranih kobasica i koristi se kako bi im se produžio vijek trajanja (Lücke, 1994). Tijekom fermentacije početna mesna smjesa izložena je djelovanju brojnih složenih mikrobioloških, biokemijskih i fizikalno-kemijskih procesa, što doprinosi razvoju specifičnih kvalitativnih i organoleptičkih svojstava (tekstura, okus, miris). U svrhu dobivanja sigurnih proizvoda standardne kvalitete bez senzornih grešaka, često se primjenjuju starter ili bioprotektivne kulture. Primjena starter kultura predstavlja oblik biološke zaštite mesa, postiže se dominacija tehnološki i higijenski poželjne mikrobiote koja doprinosi unaprijeđenju kvalitete proizvoda, sigurnosti u proizvodnji i boljoj senzornoj ocjeni proizvoda (Lizaso i sur., 1999; Villani i sur., 2007). Istovremeno, primjenom industrijskih starter kultura mogu se izgubiti specifična organoleptička svojstva.

Bakterije mliječne kiseline (BMK), koagulaza negativni stafiloki i mikrokoki, te kvasci i plijesni su najznačajnije grupe mikroorganizama izolirane iz tradicionalnih mesnih proizvoda. Shodno tome, iste se mogu koristiti i u obliku starter kultura, budući da su dobro prilagođene uvjetima tijekom sazrijevanja kobasica i kompetitivnije su nego bakterije izolirane iz drugih izvora (Ammor i sur., 2005). Među BMK, vrsta *Lactobacillus sakei* predstavlja jednu od najkompetitivnijih BMK s prirodnom mikrobiotom mesa te je dominantna vrsta izolirana iz spontano fermentiranih kobasica (Aymerich i sur., 2003; Papamanoli i sur., 2003) i kao takva često je sastavni dio starter kultura.

Unatoč svim dosadašnjim naprecima u proizvodnji fermentiranih proizvoda održavanje starter kultura u fermentiranoj hrani tijekom cijelog proizvodnog procesa i dalje predstavlja veliki izazov. Mikroinkapsulacijom se bakterijske kulture mogu zaštititi od biotičkih i abiotičkih

stresova i time povećati njihova vijabilnost tijekom cijelog proizvodnog procesa (Blandino i sur., 1999; Vinceković i sur., 2016). Fermentacija pomoću inkapsuliranog startera nudi brojne prednosti u usporedbi s tradicionalnom inokulacijom, npr. brža fermentacija, veća gustoća stanica, povećana tolerancija stanica prema visokim temperaturama i toksičnim produktima, selektivno uklanjanje toksičnih hidrofobnih tvari i dr. (Kavitake i sur., 2018).

Tijekom ovog istraživanja, soj *Lb. sakei* MRS_296 koji je izoliran iz tradicionalnih fermentiranih kobasica, mikroinkapsuliran je pomoću natrijevog alginata tehnikom ionskog geliranja. U svrhu detaljne karakterizacije *Lb. sakei* MRS_296, određena je sposobnost otpuštanja i preživljavanja soja *Lb. sakei* MRS_296 tijekom 40 dana, njihov utjecaj na promjenu pH vrijednosti BHI medija, kao i njihovo preživljavanje tijekom čuvanja na sobnoj temperaturi.

1.1. Hipoteza, opći i specifični ciljevi rada

Autohtoni soj *Lb. sakei* MRS_296 izoliran u prethodnim istraživanjima, detaljno je molekularno-biološki i tehnološki okarakteriziran i kao takav pokazuje potencijal za primjenu u obliku starter kulture. Kako bi se osigurala dovoljna brojnost i vijabilnost tijekom cijelog procesa proizvodnje soj *Lb. sakei* MRS_296 je mikroinkapsuliran. Mikroinkapsulacija pomaže zaštititi kulturu od stresnih okolišnih uvjeta, omogućuje njezino kontrolirano otpuštanje i u konačnici može utjecati na organoleptička svojstva krajnjeg proizvoda.

Stoga je pretpostavka ovog istraživanja da će mikroinkapsulacija osigurati odgovarajuću brojnost i aktivnost bakterijskog soja *Lb. sakei* MRS_296 te postupno otpuštanje tijekom cijelog proizvodnog procesa.

Specifični ciljevi ovog rada su:

1. Mikroinkapsulacija bakterijskog soja *Lb. sakei* MRS_296 s natrijevim alginatom tehnikom ionskog geliranja
2. Morfološka karakterizacija alginatnih mikrosfera
3. Određivanje dinamike otpuštanja soja *Lb. sakei* MRS_296 iz alginatnih mikrosfera
4. Određivanje sposobnosti preživljavanja soja *Lb. sakei* MRS_296 u alginatnim mikrosferama
5. Određivanje vijabilnosti soja *Lb. sakei* MRS_296 pri čuvanju na sobnoj temperaturi

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su gram pozitivne bakterije koje čine heterogenu skupinu nesporogenih, katalaza-negativnih, mezofilnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili samo u anaerobnim uvjetima. Obitavaju u vrlo različitim staništima bogatim hranjivim tvarima poput mlijeka, mesa, te su dio populacije mikroorganizama probavnog trakta zdravih ljudi i životinja.

Obuhvaćaju velik broj vrsta koje pripadaju rodovima: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum* i *Globicatella* (Šušković i sur., 1997).

BMK predstavljaju glavnu skupinu mikroorganizama koja vodi fermentaciju tradicionalnih kobasica (De Las Rivas i sur., 2008; Curiel i sur., 2011). Uz njih, mikroorganizmi koji su primarno uključeni u fermentaciju kobasica su koagulaza negativni stafilokoki (*Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, *S. lentus*), enterokoki, plijesni (*Penicillium nalgiovense*, *P. gladioli*, *P. camemberti* i dr.) i kvasci (*Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*) te zajedno utječu na senzorna i organoleptička svojstva proizvoda (Hammes i Hertel, 1998; Lücke, 2000).

Broj BMK na početku fermentacije kobasica obično iznosi 3,2 do 5,3 log CFU/g, a u prvim danima fermentacije raste na 7 do 9 log CFU/g i ostaje konstantan tijekom zrenja (Žgomba Maksimović i sur., 2015). Njihova glavna uloga u proizvodnji kobasica je acidifikacija smjese kroz proizvodnju organskih kiselina, uglavnom mliječne kiseline, čime se inhibira rast nepoželjnih mikroorganizama (Žgomba Maksimović i sur., 2015). Istovremeno poboljšavaju razvoj boje, konzistencije, mirisa te općenito utječu na nastanak karakterističnih svojstava proizvoda (Incze, 2002).

Ujedno, neki sojevi BMK pokazuju bioprotektivna svojstva jer sintetiziraju tvari s antimikrobnim djelovanjem, kao što su različite organske kiseline, bakteriocini i peptidi s antimikrobnom aktivnošću (Cleveland i sur., 2001) doprinoseći tako mikrobiološkoj

sigurnosti i kvaliteti mesnih proizvoda. Za uporabu u hrani, moraju se zadovoljiti stroge selekcijske kriterije (Tablica 1).

Tablica 1. Seleksijski kriteriji za bakterije mliječne kiseline koje se koriste u proizvodnji fermentiranih kobasica (Šušković i Kos, 2001).

• Brza proizvodnja mliječne kiseline
• Brzi rast pri različitim temperaturama
• Homofermentativne vrste
• Postojanost kulture kroz cijelu fermentaciju i proces zrenja
• Redukcija nitrata
• Katalaza pozitivni
• Laktoza negativni
• Nastajanje arome
• Nema nastajanja peroksida
• Nema nastajanja biogenih amina
• Nema nastajanja sluzi,
• Tolerancija ili sinergizam prema drugim mikrobnim komponentama starter kulture
• Antagonizam prema patogenim mikroorganizmima
• Antagonizam prema tehnološki nepoželjnim mikroorganizmima
• Faktori koji poboljšavaju nutritivnu vrijednost kobasica
• Ekonomski faktori

2.2. Rod *Lactobacillus*

S taksonomskog stajališta, laktobacili čine najznačajniji i najbrojniji rod BMK te danas obuhvaća 152 vrste, a spada u obitelj *Lactobacillaceae*. Laktobacili su gram-pozitivne, nesporulirajuće, katalaza negativne, aerotolerantne ili anaerobne i većinom nepokretne bakterije koje se pojavljuju u obliku bacila ili kokobacila. Mogu se podijeliti u tri skupine prema fermentacijskim svojstvima: (i) obligatni homofermentativni (proizvode više od 85 % mliječne kiseline iz glukoze), (ii) fakultativno heterofermentativni i (iii) obligatno heterofermentativni (uz mliječnu kiselinu proizvode CO₂, etanol i/ili octenu kiselinu iz glukoze).

Imaju složene prehrambene zahtjeve u smislu aminokiselina, peptida, vitamina, soli, masnih kiselina ili estera masnih kiselina. Stoga ih obično nalazimo u bogatim staništima, kao što su hrana (mliječni proizvodi, proizvodi od žitarica, meso i proizvodi od ribe, pivo, vino, voće i voćni sokovi, ukiseljeno povrće, kaša, kiseli kupus, silaža i kiselo tijesto), voda, tlo i kanalizacija, dio su normalne mikroflore u ustima, gastrointestinalnom i genitalnom traktu ljudi i mnogih životinja (Pot i sur., 1994; Hammes i Vogel, 1995; Hammes i Hertel, 2006).

2.3. *Lactobacillus sakei*

Jedna od najčešće korištenih vrsta kao starter kultura u industrijskoj proizvodnji različitih fermentiranih proizvoda je vrsta *Lb. sakei*. Vrsta pokazuje široku genomsku raznolikost koja se može uočiti pri uočavanju različitih sojeva i na koju se vjerojatno oslanjaju njezini višestruki aspekti u mesnim proizvodima: starter, zaštitna ili bioprotektivna kultura (Zagorec i Champomier-Vergès, 2017).

Iako je u početku izoliran od rižinog vina (Kandler i Weiss, 1986), *Lb. sakei* je dominantna vrsta laktobacila u fermentiranim mesnim i ribljim proizvodima (Montel, 1999). Pripada skupini fakultativno heterofermentativnih laktobacila i predstavlja jednu od najkompetitivnijih BMK s prirodnom mikrobiotom mesa te često dominira u fermentiranim kobasicama, dok su ostali laktobacili poput *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. paracasei* zastupljeni u manjoj mjeri (Hugas i sur., 1993; Rebecchi i sur., 1998; Aymerich i sur., 2003; Papamanoli i sur., 2003).

U fermentiranim kobasicama, *Lb. sakei* je konkurentniji od drugih laktobacila zbog svojih metaboličkih aktivnosti i fenotipskih osobina koje su posebno dobro prilagođene okolišu mesa. Pokazuje kraću log fazu i bržu dinamiku rasta (Dossmann i sur., 1996). Optimalna temperatura rasta je obično 30-40 °C i mogu rasti u rasponu pH između 5.5–6.2. *Lb. sakei* je psihrotrofan i može tolerirati visoke koncentracije soli, različite količine kisika, hladnoću i različite nepovoljne uvjete na koje nailazi tijekom skladištenja i prerade mesa (Duhutrel i sur., 2010; Guilbaud i sur., 2012; Belfiore i sur., 2013; Chaillou i sur., 2005; Champomier-Vergès i sur., 2002).

Šećeri su im glavni izvori energije. Fermentacija heksoze je homofermentativna, dok pentoze (kao što je riboza) fermentiraju heterofermentativno (McLeod i sur., 2008; Rimaux i sur., 2011). Ipak, sposobnost vrste da dominira mikrobiotom fermentiranih kobasica, pripisuje se njezinoj sposobnosti korištenja drugih supstrata za dobivanje energije za rast i opstanak nakon iscrpljenja heksoza (Cocconcelli i Fontana, 2010). Pokazalo se da *Lb. sakei*, zbog brzog rasta i proizvodnje kiseline, uvelike smanjuje nakupljanje biogenih amina u fermentiranim kobasicama sprečavanjem razvoja bakterija koje proizvode amine (Bover-Cid i sur., 2001).

2.4. BMK kao funkcionalni starteri u proizvodnji trajnih fermentiranih kobasica

Proces proizvodnje fermentiranih kobasica je dugotrajan i skup. Budući da se proizvode na malim obiteljskim gospodarstvima uvjeti proizvodnje često su varijabilni ili postupci tijekom obrade mogu biti nehigijenski, što rezultira senzorno (organoleptički) i mikrobiološki upitnim proizvodima neujednačenog sastava i kvalitete (Kovačević i sur., 2009; Kos i sur., 2015). Zadovoljenje potrošačke potražnje za sigurnom hranom visoke kvalitete dovelo je do poboljšanja kontrole procesa proizvodnje, kroz razvoj i primjenu definiranih starter i/ili bioprotektivnih kultura.

Prema Šušković i sur. (2001) starter kulture sadrže visoke koncentracije živih mikroorganizama, a koriste se za iniciranje i ubrzavanje fermentacijskih procesa u kontrolirani proces fermentacije, s ciljem oplemenjivanja namirnica različitim proizvodima metabolizma upotrijebljenih starter kultura. U procesima fermentacije koriste se starter kulture mikroorganizma za poboljšanje svojstava kao što su okus, aroma, rok trajanja, tekstura i nutritivna vrijednost namirnica.

Danas se u industrijskoj proizvodnji primjenjuju mješovite starter kulture BMK, gdje pripadaju rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus*, bakterijske vrste iz porodice *Micrococcaceae* te vrste iz roda *Streptomyces*, gdje tijekom procesa zrenja poželjna mikroflora doprinosi unapređenju kvalitete proizvoda, sigurnosti u proizvodnji i boljoj senzorskoj ocjeni zdravstveno besprijekornih fermentiranih kobasica.

Leroy i sur. (2006) u svojem preglednom radu predlažu nove kriterije za izbor funkcionalnih starter kultura u proizvodnji fermentiranih kobasica, u smislu očuvanja aroma i mikrobiološke stabilnosti krajnjeg proizvoda. Glavni kriterij za odabir starter kultura za proizvodnju fermentiranih mesnih proizvoda je da ne proizvode biogene amine (Frece i sur., 2014). Nužne karakteristike uključuju brzu produkciju mliječne kiseline da se pH spusti na $< 5,1$, kompetitivnost soja s kontaminiranom inicijalnom mikroflorom karakterističnom za svježe meso, dobre metaboličke aktivnosti u anaerobnoj atmosferi, visokoj koncentraciji soli (2-10 %), niskoj temperaturi (2 – 24 °C) i niskoj pH vrijednosti (4,2-6) i dr.

Istraživanje koje su proveli Frece i sur. (2014), pokazuje kako autohtoni sojevi imaju sposobnost preživljavanja tijekom industrijske proizvodnje, također su pokazali bolje rezultate u razvoju senzornih karakteristika, stabilnosti i mikrobiološke sigurnosti kobasica u odnosu na komercijalne startere. Stoga je tendencija na primjeni autohtonih sojeva izoliranih

iz tradicionalnih fermentiranih kobasica koji nakon detaljne karakterizacije i selekcije mogu biti aplicirani kao starter kulture (Ammor i sur., 2005).

U istraživanju koje je provela Senko (2017), ispitan je utjecaj autohtonih sojeva *Lb. sakei* MRS_296 na mikrobiotu kobasica od mesa divlje svinje, gdje je izoliran kao dominantan soj u svim vremenskim intervalima uzorkovanja, uključujući i gotove proizvode (kraj zrenja), te je potvrđeno da pokazuje dobru kompetitivnost s prirodnom mikrobiotom.

2.5. Mikroinkapsulacija BMK

Nove tehnologije mikroinkapsulacije bakterija predstavljaju područje koje se intenzivno proučava u području prehrambene biotehnologije zbog niza prednosti koje pružaju moguće unaprjeđenje dosadašnje, tradicionalne uporabe starter kultura. Razvojem novih metoda inkapsulacije i temeljem prijašnjih istraživanja s ciljem povećanja vijabilnosti, omogućuje se povećanje efikasnosti procesa proizvodnje.

Mikroinkapsulacija aktivnih agensa u biopolimerne matrice je proces kojim se aktivni sastojci mogu zaštititi unutar matriksa sfere (King, 1995). Aktivni sastojak može biti u čvrstom, tekućem ili plinovitom stanju. Mikroinkapsulirani materijal se naziva jezgrom, ispunom, aktivnom tvari, unutarnjom fazom, dok se materijal koji se koristi za mikroinkapsuliranje naziva membrana za oblaganje, ljuska, kapsula, stijenka materijala, vanjska faza ili matriks (Augustin i sur., 2001; Burgain i sur., 2011; Fang i Bhandari, 2010). Do sada su se mikroorganizmi imobilizirali s ciljem dobivanja različitih biotehnoških proizvoda u raznim industrijama poput farmaceutske (lijekovi, enzimi, peptidi, DNA), prehrambene (antioksidansi, vitamini, minerali, arome, probiotici), agroindustrijske (insekticidi, herbicidi, fungicidi), kozmetičke (eterična ulja, vitamini, UV adsorberi, pigmenti), tekstilna (antimikrobni agensi, mirisi) i dr. (Gouin, 2004).

Mikroinkapsulacija aktivnih agensa se tek u posljednjih nekoliko desetljeća primjenjuje na mikrobne stanice, kao učinkovita metoda za kontrolirano otpuštanje istog, koje se upotrebljava za zaštitu osjetljivih materijala, smanjenje njene reaktivnosti s vanjskim faktorima (voda, temperatura, pH), fizikalnu ili kemijsku stabilnost, čime se povećava stabilnost hranjivih sastojaka u konačnom proizvodu, tj. poboljšava se aktivnost tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja, kao i bioraspoloživost. Stoga se, u prehrambenoj industriji mikroinkapsulacija najčešće odnosi na implementaciju bioaktivnih molekula

(antioksidansa, mineralnih tvari, vitamina, fitosterola, masnih kiselina) i živih stanica (probiotika) u različite prehrambene proizvode (Nedovic i sur., 2011).

2.5.1. Mikrosfere

Mikrosfere su sferne čestice, mikrometarskog promjera, tipično veličine 1–2000 µm. Dobre mikrosfere bi trebale biti sposobne za očuvanje stabilnosti i biološke aktivnosti inkapsuliranog sastojka.

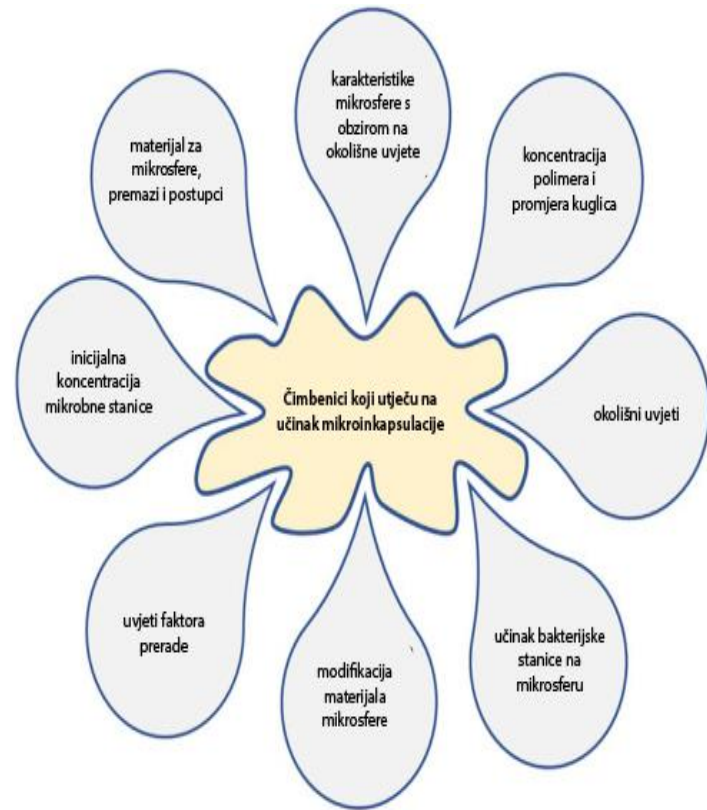
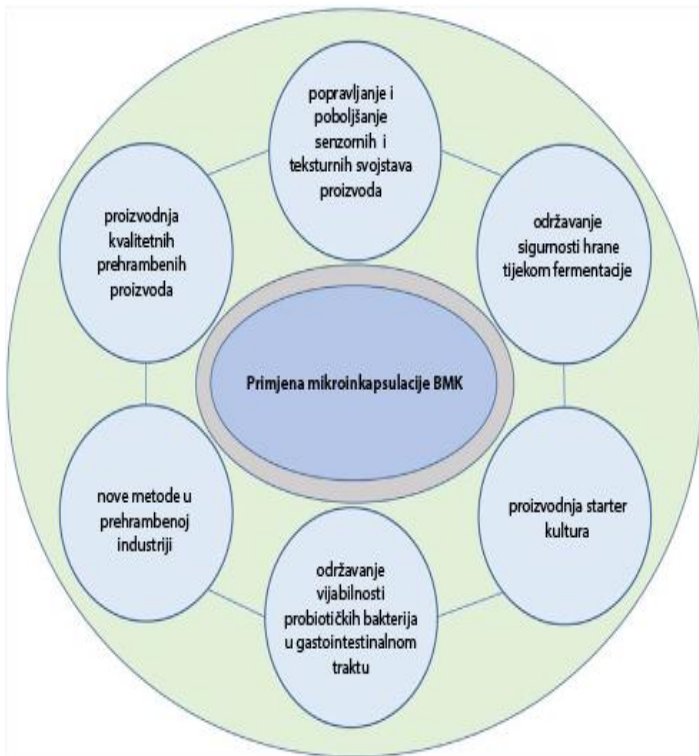
Mikrosfere se mogu napraviti na različite načine, uključujući fizikalne metode u koje spadaju sušenje raspršivanjem i centrifugalna ekstruzija, zatim fizikalno-kemijske u koje spadaju ionsko geliranje, hlađenje raspršivanjem, jednostavna i kompleksna koacervacija te kemijske kao *in situ* polimerizacija i dr. (Blanco i sur., 2005; Bao i sur., 2006; Rizkalla i sur., 2006).

Za učinkovito mikroinkapsuliranje živih stanica, potrebno je odabrati odgovarajuća sredstva. Kriterij za odabir materijala stijenke temelji se na fizikalno-kemijskim svojstvima tvari za mikroinkapsuliranje (poroznost, topljivost) i sredstva za mikroinkapsuliranje (viskoznost, mehanička svojstva), kao i kompatibilnosti između tih dviju tvari (stijenka materijala treba bit netopljiva i ne smije reagirati sa sastojkom koji se inkapsulira). Drugi kriterij koji se uzima u obzir jest zamišljena veličina mikrosfere.

Nosač materijala koji se koristi u prehrambenim proizvodima mora biti „*food grade*“ i imati sposobnost stvaranja zaštitne film ovojnice između aktivnog sastojka i njegove okoline. Polisaharidi poput alginata su biopolimeri koji lako stvaraju sfere u kojima se može ugraditi aktivni sastojak upotrebom vodenog sustava na sobnoj temperaturi. Alginat je anionski polisaharid sastavljen od dvije ponavljajuće karboksilne jedinice, koje dovode do stvaranja različitih polielektrolitnih kompleksa struktura.

Budući da je danas i dalje veliki izazov održivost starter kultura u fermentiranoj hrani, bitna tehnika za razvoj vijabilnosti i održivosti mikrobnih stanica je mikroinkapsuliranje. Postoji mnogo mogućnosti primjene kompleksa kalcijevog alginata u obliku mikrosfera/mikrokapsula za imobilizaciju i kontrolirano otpuštanje različitih kemijskih ili biološki aktivnih tvari. Korištenje inkapsuliranih stanica ima nekoliko prednosti u odnosu na formulacije slobodnih stanica, a to su zaštita od biotičkih stresova i abiotičkih stresova kao što je inhibicijski učinak toksičnih stresova, povećano preživljavanje probiotika i poboljšana fiziološka aktivnost te povećana gustoća stanica (Haffner i sur., 2016). Proces mikroinkapsulacije je obećavajuća

tehnika za zaštitu starter i probiotičkih kultura od nepovoljnih uvjeta kojima mogu biti izloženi.



Slika 1. Primjena mikroinkapsulacije BMK i čimbenici koji utječu na učinak mikroinkapsulacije (Kavitake i sur., 2018).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Hranjive podloge za uzgoj bakterijske kulture

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 dodavanja agara u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta.

3.1.3. MRS tekuća hranjiva podloga

Podloga je pripremljena otapanjem 55,2 g MRS podloge (Biolife, Italija) u 1000 ml destilirane vode i 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 (0,2 M NaHCO₃, 0,06 M Na₃C₆H₅O₇ x 2 H₂O) je pripremljen otapanjem 16,80 g NaHCO₃ i 17,65 g Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O u 1000 ml destilirane vode i nakon čega je steriliziran u autoklavu pri 121 °C kroz 15 min.

3.2.2. Etanol (80 %)

Etanol (80 %) je dobiven miješanjem 833,33 ml etanola (96 %) i 166,67 ml sterilne destilirane vode.

3.2.3. Fiziološka otopina (0,85 %)

Fiziološka otopina (0,85 %) pripravljena je otapanjem 8,5 g NaCl (Merck, Njemačka) u 1000 ml destilirane vode, nakon čega je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C kroz 15 minuta.

3.2.4. Glicerol (50 %)

Glicerol (50 %, Kemika, Zagreb) je pripremljen miješanjem 50 ml glicerola i 50 ml destilirane vode i steriliziran autoklavanjem pri 121 °C kroz 15 min.

3.2.5. Kalcijev klorid (CaCl₂, 1 M)

Kalcijev klorid (1 M) (Fluka™, Njemačka) pripremljen je otapanjem 110,98 g CaCl₂ u 1000 ml destilirane vode te je steriliziran autoklavanjem pri 121 °C kroz 15 min.

3.2.6. Natrijev alginat (1,8 %)

Natrijev alginat je pripremljen otapanjem 18 g natrijevog alginata u 1000 ml destilirane vode. Otopina je sterilizirana u autoklavu pri 121 °C kroz 15 min.

3.2.7. Mucosol® (2 %)

Radna otopina Mucosol® (2 %, Sigma-Aldrich, Njemačka) pripravljena je miješanjem 20 ml Mucosol otopine i 980 ml sterilne destilirane vode.

3.3. Odabir izolata i priprema biomase za mikroinkapsulaciju

U radu je korišten bakterijski soj *Lb. sakei* MRS_296, izoliran iz tradicionalnih, spontano fermentiranih kobasica od mesa divljači. Korišteni izolat je identificiran i detaljno sigurnosno i tehnološki okarakteriziran molekularno-biološkim metodama u okviru prijašnjih istraživanja (Žgomba Maksimović i sur., 2018).

Do pripreme biomase za mikroinkapsulaciju bakterijski soj *Lb. sakei* MRS_296 čuvan je u 80 % glicerolu pri temperaturi od -20 °C u Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Kako bi se uzgojila dovoljna biomasa soj MRS_296 nacijepljen je u 3 ml tekuće

BHI hranjive podloge i inkubiran pri 30 °C kroz 24 h uz stalno miješanje (250 rpm/min, Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan)). Tako uzgojeni soj MRS_296 precjepljen je na krutu BHI podlogu i pročišćen do monokulture metodom iscrpljenja. Podloge su inkubirane u anaerobnim uvjetima pri 30 °C kroz 24 h. Nasumično odabrane kolonije obojane su po gramu i mikroskopskim pregledom svjetlosnim mikroskopom potvrđena je prisutnost kratkih, gram pozitivnih štapića, što je morfološki karakteristično za laktobacile. Sterilnom mikrobiološkom ezom jedna kolonija soja *Lb. sakei* MRS_296 je precjepljena u 300 ml sterilne tekuće BHI hranjive podloge, nakon čega je inkubirana anaerobno pri 30 °C kroz 24 h uz stalno miješanje (250 rpm/min, Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan)). Stanice su odvojene od podloge centrifugiranjem (Nüve-NF 800R, Turska) pri 3600 rpm na 4 °C kroz 10 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo dekantiran te su peleti resuspendirani u 16 ml tekuće BHI podloge. Za određivanje ukupnog broja bakterija za mikroinkapsulaciju odvojen je 1 ml ovako pripremljene suspenzije i pripremljena je serija razrijeđenja (10^{-2} do 10^{-8}) kao što je opisano kasnije u Poglavlju 3.9.. Preostala suspenzija pomiješana je s 285 ml 1,8 % otopine natrijevog alginata, nakon čega je smjesa homogenizirana miješanjem pri 240 rpm/min kroz 10 min (Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan)). Ovako pripremljena suspenzija korištena je za formiranje mikrosfera.

3.4. Formiranje mikrosfera

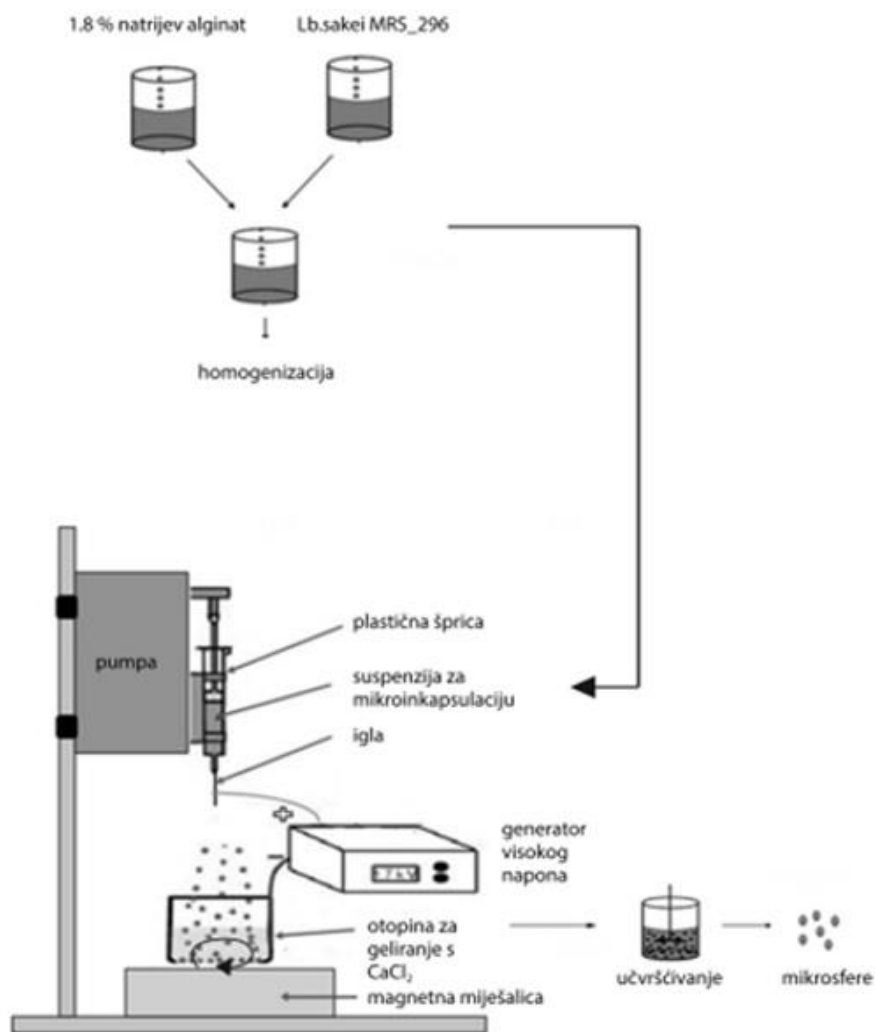
Soj *Lb. sakei* MRS_296 mikroinkapsuliran je na Zavodu za kemiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu, pomoću uređaja Encapsulator Büchi-B390 (Slika 2, Büchi Labortechnik AG, Švicarska). Prije inkapsulacije uređaj je steriliziran na sljedeći način. Uređaj je ispran 2 % otopinom Mucosol[®], nakon čega je višestruko ispiran sterilnom destiliranom vodom. Potom je ispiran 80 % etanolom, više puta sterilnom destiliranom vodom i konačno s 0,85 % sterilnom fiziološkom otopinom.



Izvor: © Anita Boras

Slika 2. Uređaj za mikroinkapsulaciju, Encapsulator Büchi-B390, BÜCHI Labortechnik AG, Švicarska.

Alginatne mikrosfere sa sojem *Lb. sakei* MRS_296 dobivene su tehnikom ionskog geliranja. Mikrosfere su formirane pomoću uređaja Encapsulator Büchi-B390 (promjer dizne = 300 μm , 600 Hz, 121 mbar) pri sobnoj temperaturi, ukapavanjem 300 ml suspenzije 1,8 % natrijevog alginata i soja *Lb. sakei* MRS_296 u 50 ml 1 M otopine kalcijevog klorida, uz stalno miješanje na magnetnoj miješalici (Slika 3). Ovako dobivene mikrosfere isprane su sterilnom destiliranom vodom tri puta kako bi se uklonio suvišak CaCl_2 . Pod istim uvjetima formirane su i kontrolne odnosno prazne mikrosfere bez soja *Lb. sakei* MRS_296.



Slika 3. Shematski prikaz procesa mikroinkapsulacije (Kavitake i sur., 2018, uz vlastite preinake).

3.5. Morfološka karakterizacija mikrosfera

Morfologija i veličina mikrosfera određene su skenirajućim elektronskim mikroskopom (FE-SEM, engl. *field emission scanning electron microscope*) JSM-7000F (Jeol, Tokio, Japan) pri ubrzavajućem naponu od 5,0 kV na Institutu Ruđer Bošković.

3.6. Određivanje dinamike otpuštanja i preživljavanja soja MRS_296

Dinamika otpuštanja soja MRS_296 iz alginatih mikrosfera i njegovo preživljavanje u mikrosferama praćeni su tijekom 40 dana.

Po g mikrosfera sa sojem MRS_296 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 (0, 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 μ l odgovarajućih razrjeđenja precjepljeno je na krute BHI hranjive podloge u duplikatima. 1 g mikrosfera koje sadrže soj MRS_296 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 μ l odgovarajućih razrjeđenja precjepljeno 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:

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

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

3.7. Mjerenje pH vrijednosti

Promjene pH vrijednost u supernatantu svih uzoraka mjerene su nakon 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 30 i 40 dana nakon mikroinkapsulacije pomoću pH metra BT-600 (Boeco, Germany).

3.8. Određivanje vijabilnosti inkapsuliranog soja MRS_296 čuvanih pri 25 °C

Vijabilnost inkapsuliranog soja MRS_296 tijekom čuvanja pri 25 °C praćena je tijekom 40 dana. Po 2 g mikrosfera sa sojem MRS_296 sterilno je odvagano u Falcon tube. Uzorci su inkubirani pri 25 °C (n = 5). Uzorkovanje je provedeno nakon 7, 10, 20, 30 i 40 dana. Brojnost preživjelih bakterija u mikrosferama određena je otapanjem 1 g mikrosfera sa sojem

MRS_296 u 9 ml citratnog pufera (0,2 M NaHCO₃, 0,06 M Na₃C₆H₅O₇ x 2 H₂O) kao što je opisano u Poglavlju 3.9..

3.9. Statistička analiza

Za testiranje značajnih razlika u otpuštanju i preživljavanju soja MRS_296 u mikrosferama i pH promjenama korištena je dvofaktorska analiza varijance ANOVA (engl. *Two-way ANOVA*), a Tukey HSD test je korišten *post-hoc* za višestruko uspoređivanje srednjih vrijednosti. Rezultati se smatraju značajno različitim ako je $p < 0,05$. Također, kako bi se utvrdilo postoji li povezanost između otpuštanja soja MRS_296 i njegovog preživljavanja u mikrosferama odnosno između otpuštanja soja MRS_296 i promjena pH medija izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije. Sve statističke analize napravljene su u računalnom programu Microsoft Excel 2016 pomoću dodatka Analysis ToolPak.

3.10. Izolacija i prikupljanje soja MRS_296

Sojevi MRS_296 su je izolirani i prikupljeni s krutih BHI hranjivih podloga. Prikupljeno je po 10 izolata nakon 0, 5, 7, 10, 20, 30 i 40 dana. Izabrane kolonije sterilno su precijepljene u 1,5 ml tekuće MRS podloge i inkubirane na temperaturi od 30 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, 750 µl podloge s naraslom biomasom odvojeno je i pomiješano s 750 µl sterilnog 50 % glicerola i pohranjeno pri -20 °C u Zavodu za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Preostalih 750 µl podloge s naraslom biomasom centrifugirano je (13200 rpm/min) kako bi se stanice odvojile od podloge. Supernatant je pažljivo uklonjen. Iz tako dobivenog staničnog peleta izolirana je DNA.

3.11. Izolacija DNA iz prikupljenih izolata

DNA je izolirana iz peleta dobivenih kako je opisano u Poglavlju 3.13. pomoću komercijalnog kita Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, SAD), kako je opisano u uputama proizvođača. Ukratko, stanični peleti su resuspendirani u 480 µl 50 mM EDTA pufera te je dodano 120 µl lizozima (10 mg/ml). Uzorci su inkubirani pri 37 °C tijekom 30 minuta i centrifugirani na 13 000 x g kako bi se uklonio supenatant. Zatim je uzorcima dodano 600 µl Nuclei Lysis Solution, nakon čega je uslijedila inkubacija na 80 °C tijekom 5 min. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu uzorcima je dodano 3 µl otopine RNaze praćeno

inkubacijom pri 37 °C tijekom 60 min. Kako bi se istaložili proteini uzorcima je dodano 200 µl Protein Precipitation Solution. Smjesa je kratko vorteksirana, inkubirana na ledu 5 min i centrifugirana na 13 000 x g kroz 3 min. Supernatant je prebačen u novu čistu tubicu s 600 µl izopropanola i lagano promiješan preokretanjem tubica do stvaranja vidljivih niti DNA. Uzorci su centrifugirani (16 000 x g/1 min) kako bi se uklonio izopropanol. Preostalom peletu dodano je 600 µl 70 % etanola. Etanol je uklonjen centrifugiranjem (16 000 x g/1 min). Nakon uklanjanja etanola istaložena DNA se osušila na zraku nakon čega joj je dodano 50 µl DNA Rehydration Solution. Dobivena DNA je pohranjena pri -20 °C do korištenja u daljnjim molekularno-biološkim analizama.

3.12. Kontrola mikroinkapsulacije pomoću rep-PCR

Provjera mikroinkapsulacije soja MRS_296 i odsutnost kontaminacije određena je rep-PCR (engl. *Repetitive Element Sequence-based PCR*). DNA izolirana iz 4 nasumično prikupljena izolata soja MRS_296 prikupljenih s krutih BHI hranjivih podloga, amplificirana je oligonukleotidnom početnicom GTG₍₅₎ (3' GTG GTG GTG GTG GTG 5'). Pripremljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µl, a korišteni reagensi, njihovi volumeni i koncentracije navedeni su u Tablici 2. Reakcija je provedena u uvjetima navedenima u Tablici 3. DNA je amplificirana u PCR uređaju ProFlex PCR System (Applied biosystems, SAD).

Tablica 2. Reagensi korišteni za pripremanje reakcijske smjese za rep-PCR-(GTG)₅.

Reagens	Početni volumen (μl)	Početna koncentracija	Završna koncentracija
10x PCR pufer	2,5	10x	1x
dNTP	1,25	2 mM	0,1 mM
GTG ₅	1	50 pmol	2 pmol
DyNAzyme polimeraza	1	2 U/μl	0,08 U/μl
dH ₂ O	18,25		
DNA	1		

Tablica 3. Temperaturni profil rep-PCR reakcije.

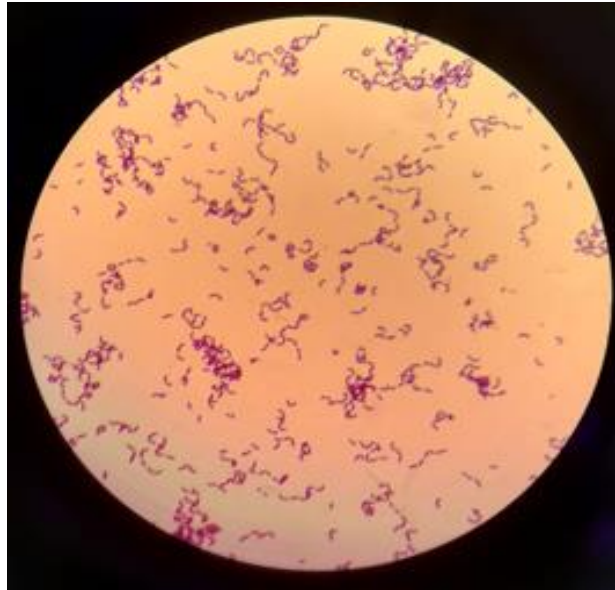
Faza	Temperatura (°C/ min ili s)	Br.ciklusa
Početna denaturacija	95 °C/7 min	1x
<ul style="list-style-type: none"> • Denaturacija • Sparivanje početnica • Elongacija 	90 °C/30 s 40 °C/1 min 65 °C/8 min	30x
Završna elongacija	65 °C/16 min	1x

PCR produkti su razdvojeni horizontalnom gel elektroforezom na 2 % agaroznom gelu tijekom 1 h i 50 min na 80 V. 4 μl PCR produkta pomiješano je s 1 μl 6x Loading Dye (Invitrogen, Waltham, USA). Po završetku elektroforeze gel je bojan 20 min u EtBr, odbojavan 10 min u 1 x TAE puferu te vizualiziran i snimljen digitalnom kamerom na UV-transluminatoru.

4. REZULTATI

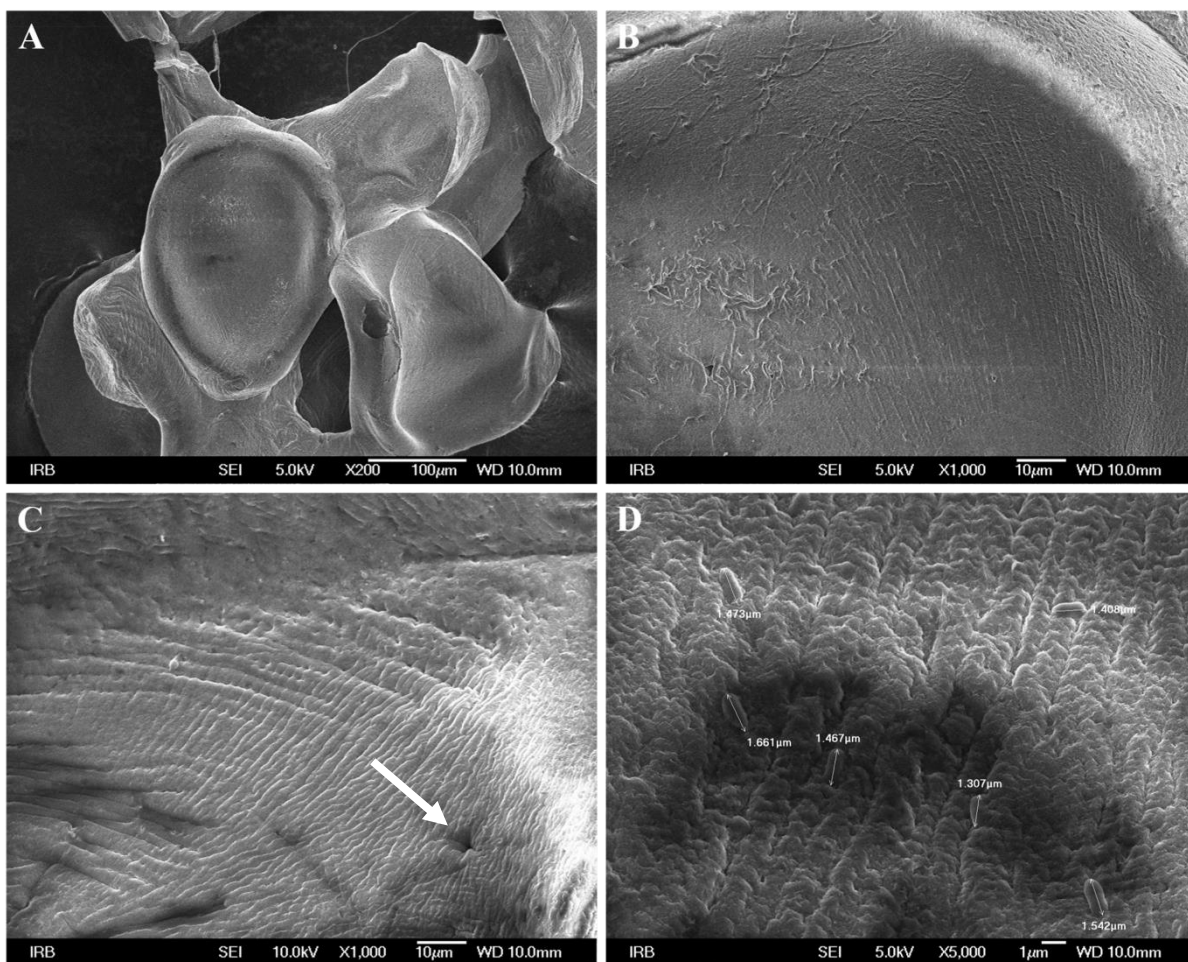
4.1. Morfološke karakteristike soja *Lb. sakei* MRS_296 i mikrosfera

Prije mikroinkapsulacije nekoliko nasumično odabranih kolonija soja *Lb. sakei* MRS_296 obojane su po gramu i vizualizirane svjetlosnim mikroskopom. Mikroskopskim pregledom potvrđena je prisutnost kratkih, gram pozitivnih štapića (Slika 4).



Slika 4. Izgled stanica *Lb. sakei* MRS_296 pod svjetlosnim mikroskopom nakon bojanja po gramu (povećano 1000x).

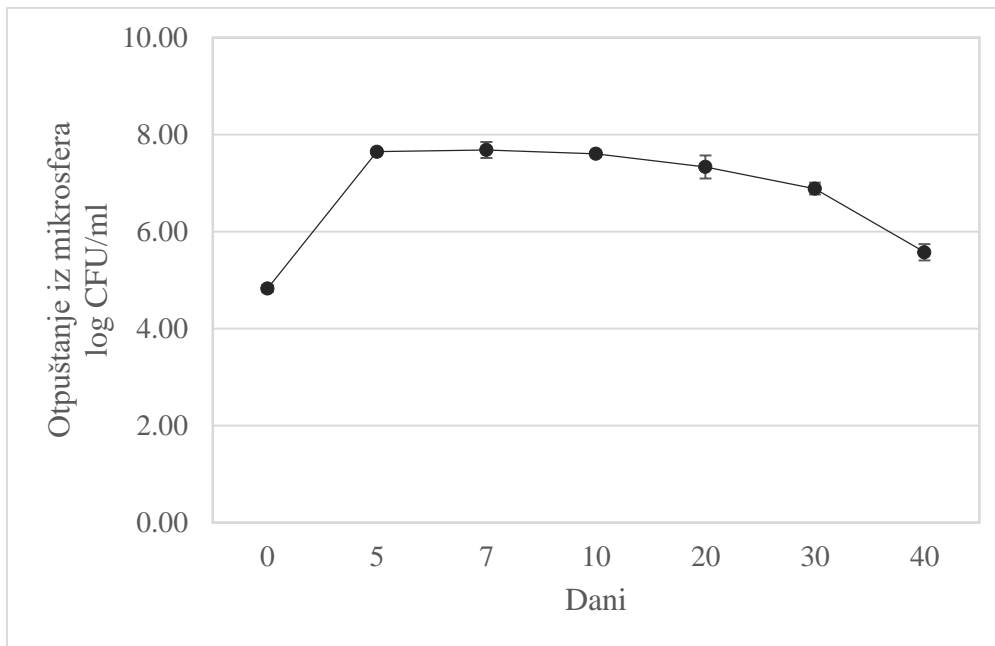
Nakon mikroinkapsulacije, mikrosfere sa sojem *Lb. sakei* vizualizirane su skenirajućim elektronskim mikroskopom. Veličina mikrosfera regulirana je promjerom dizni koja se koristi za inkapsulaciju. Formirane mikrosfere su nepravilnog oblika i promjer im nije prelazio 300 μm . (Slika 5A). Površina mikrosfera je gruba i naborana (Slika 5B) uz mjestimično stvaranje pora (Slika 5C). Vidljivo je otpuštanje bacila, čija dužina varira između 1,307 i 1,661 μm , iz mikrosfera (Slika 5D).



Slika 5. SEM slike mikrosfera i mikroinkapsuliranog soja *Lb. sakei* MRS_296. Na slikama su prikazani alginatna mikrosfera povećana 200x (A), površina alginatne mikrosfere (B) i pora (bijela strelica) na površini mikrosfere (C) povećani 1000x i otpuštanje soja *Lb. sakei* MRS_296 iz mikrosfera povećano 5000x (D).

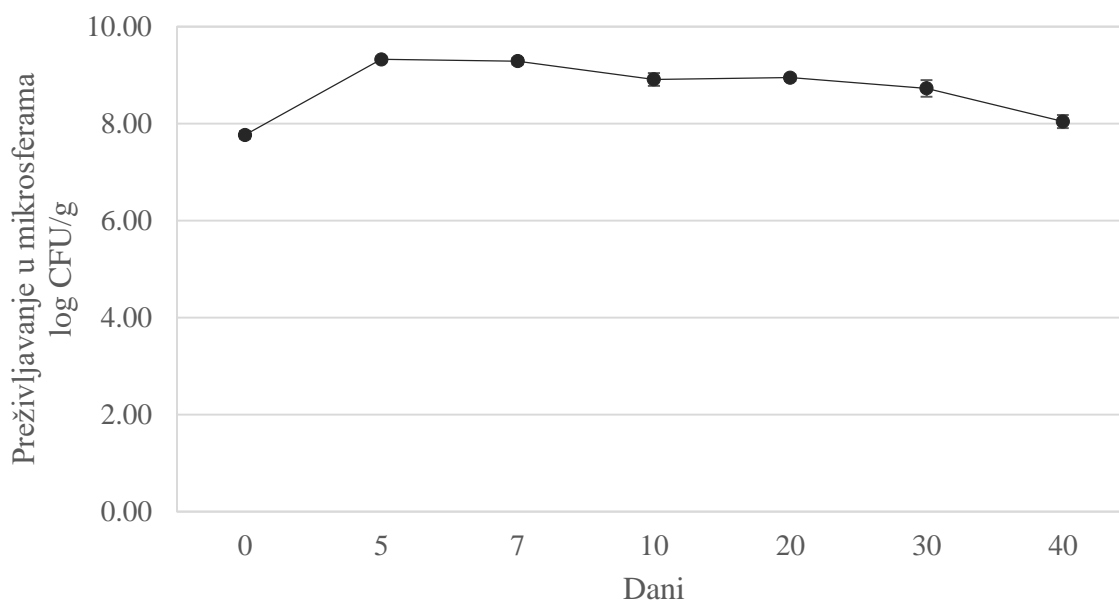
4.2. Dinamika otpuštanja i preživljavanja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama

Prije mikroinkapsulacije određen je početni broj *Lb. sakei* MRS_296 i iznosio je $9,79 \pm 0,08$ log CFU/ml. Otpuštanje iz i preživljavanje *Lb. sakei* MRS_296 u alginatnim mikrosferama praćeni su tijekom 40 dana. Log CFU/ml za otpuštanje odnosno log CFU/g za preživljavanje u mikrosferama određeni su na dan mikroinkapsulacije i 5, 7, 10, 20, 30 i 40 dana nakon mikroinkapsulacije u duplikatima. Dinamika otpuštanja soja *Lb. sakei* MRS_296 iz alginatnih mikrosfera prikazana je na Slici 6., a preživljavanja u alginatnim mikrosferama na Slici 7.



Slika 6. Otpuštanje soja *Lb. sakei* MRS_296 iz alginatnih mikrosfera. Brojnost soja *Lb. sakei* MRS_296 prikazana je kao srednja vrijednost log CFU/ml s pripadajućom standardnom devijacijom.

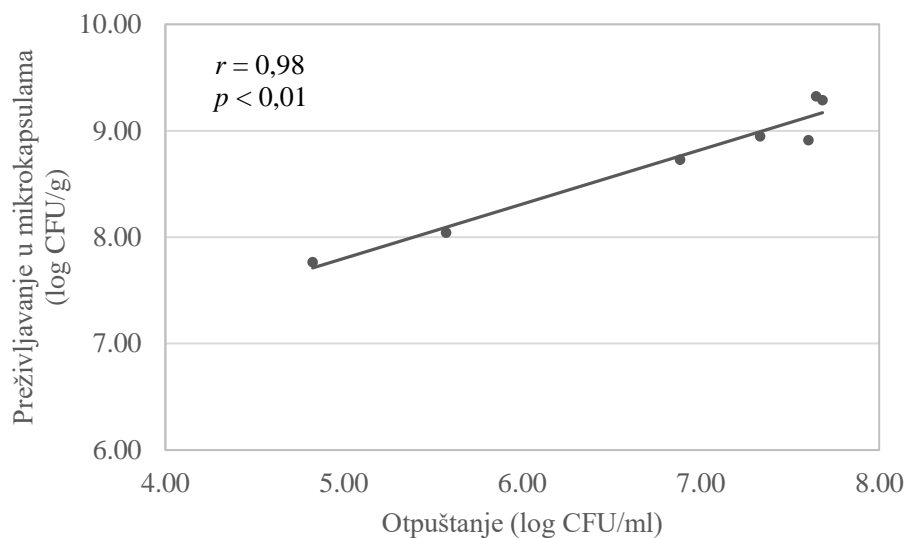
Soj *Lb. sakei* MRS_296 otpušta se odmah nakon inkapsulacije ($4,82 \pm 0,07$ log CFU/ml), a najviše do 5. dana ($7,65 \pm 0,05$ log CFU/ml). Od 5. do 20. dana nema većih promjena u otpuštanju i vrijednosti se kreću između $7,33 \pm 0,24$ log CFU/ml i $7,68 \pm 0,16$ log CFU/ml. Nakon toga, otpuštanje soja *Lb. sakei* MRS_296 postupno se smanjuje do 40. dana ($5,57 \pm 0,17$ log CFU/ml). Dvofaktorijalna analiza varijance ANOVA pokazala je da postoji značajna razlika u otpuštanju soja *Lb. sakei* MRS_296 s obzirom na vrijeme proteklo od mikroinkapsulacije ($p < 0,01$). *Post-hoc* Tukey HSD test pokazao je da se otpuštanje iz mikrosfera tijekom vremena gotovo uvijek značajno razlikuje. Značajne razlike u otpuštanju jedino nisu primjećene 5. u odnosu na 7. i 10. dan i 7. u odnosu na 20. dan mikroinkapsulacije (Tablica P1).



Slika 7. Preživljavanje soja *Lb. sakei* MRS_296 u alginatnim mikrosferama. Prikazane su srednje vrijednosti log CFU soja *Lb. sakei* MRS_296 u g mikrosfera i pripadajuće standardne devijacije.

Na dan mikroinkapsulacije u mikrosferama detektirana je najmanja brojnost soja *Lb. sakei* MRS_296 ($7,77 \pm 0,08$ log CFU/g), a najveća 5. dana ($9,32 \pm 0,05$ log CFU/g). Od 10. do 40. dana brojnost *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama postupno se smanjuje ($8,91 \pm 0,13$ log CFU/g do $8,04 \pm 0,13$ log CFU/g). Dvofaktorijalna analiza varijance ANOVA pokazala je da postoji značajna razlika u preživljavanju soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama s obzirom na vrijeme proteklo od inkapsulacije ($p < 0,01$). *Pos-hoc* Tukey HSD test pokazao je da se preživljavanje u mikrosferama značajno razlikuje u većini slučajeva uz nekoliko iznimaka. Naime, preživljavanje se ne razlikuje značajnije 5. u odnosu na 7. dan, 10. u odnosu na 20. i 30. dan, i 20. u odnosu na 30. dan mikroinkapsulacije (Tablica P2).

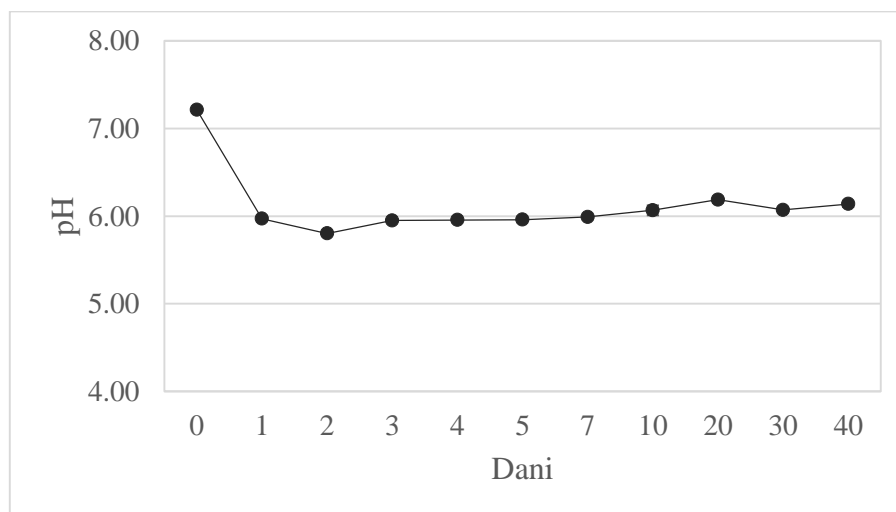
Iz Slike 8. vidljivo je da postoji značajna jaka pozitivna korelacija između brojnosti soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama i njegovog otpuštanja iz mikrosfera ($r = 0,98$; $p < 0,01$).



Slika 8. Korelacija između brojnosti soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama i njegovog otpuštanja iz mikrosfera.

4.3. Sposobnost acidifikacije inkapsuliranog soja *Lb. sakei* MRS_296

Zajedno s otpuštanjem soja *Lb. sakei* MRS_296 iz mikrosfera mjerene su i promjene pH vrijednosti u supernatantu tijekom 40 dana. Promjene pH vrijednosti prikazane su na Slici 9.

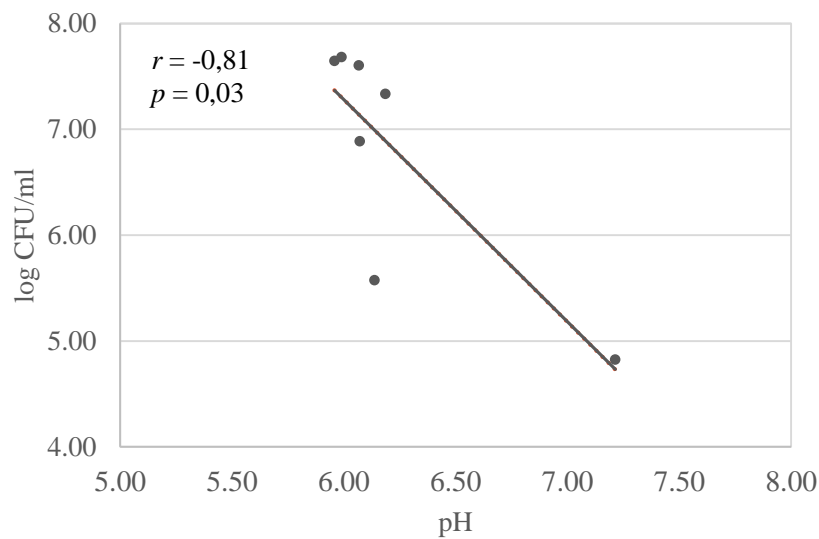


Slika 9. Promjene pH vrijednosti medija s mikrosferama. Prikazane su srednje pH vrijednosti s pripadajućim standardnim devijacijama.

Početna pH vrijednost tekuće BHI podloge u kojoj su čuvane mikrosfere iznosila je $7,21 \pm 0,01$. pH Od početka eksperimenta do 2. dana pH vrijednost pada na najnižu izmjerenu

vrijednost ($5,80 \pm 0,02$). Nakon toga, pH vrijednost postupno raste do 20. dana ($6,19 \pm 0,03$) i ostaje približno konstantna do 40. dana. Dvofaktorijska analiza varijance ANOVA pokazala je da se pH vrijednosti značajno mijenjaju s vremenom ($p < 0,01$), a *post-hoc* Tukey HSD test je potvrdio da pH vrijednosti medija s mikrosferama, u većinom slučajeva, značajno rastu s vremenom (Tablica P3).

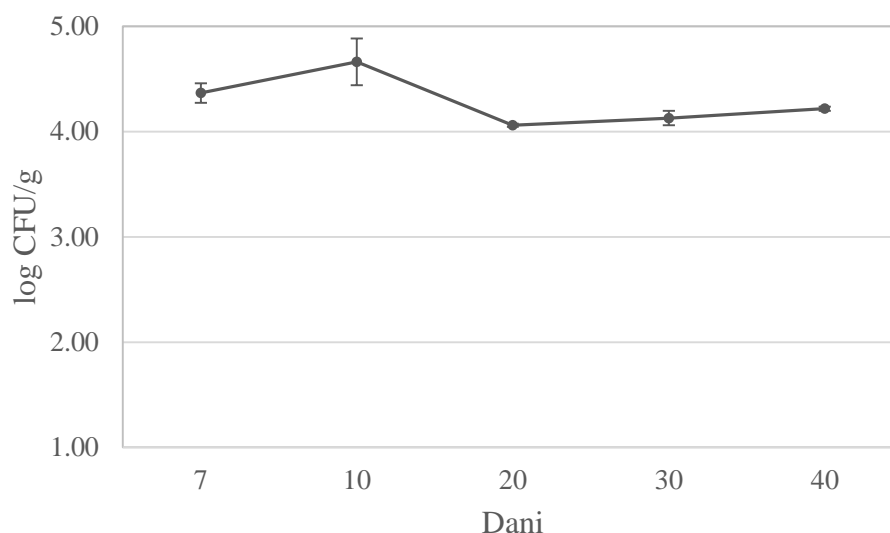
Dodatno je utvrđeno da postoji značajna jaka negativna korelacija između otpuštanja soja *Lb. sakei* MRS_296 iz mikrosferama i promjene pH vrijednosti medija u kojem su čuvane mikrosfere ($r = -0,81$; $p = 0,03$; Slika 10).



Slika 10. Korelacija između otpuštanja soja *Lb. sakei* MRS_296 iz mikrosfera i promjene pH vrijednosti medija u kojem su mikrosfere čuvane .

4.4. Utjecaj pohrane na sobnoj temperaturi na vijabilnost soja *Lb. sakei* MRS_296

U ovom radu ispitana je vijabilnost inkapsuliranog soja *Lb. sakei* MRS_296 čuvanog pri 25 °C bez dodatka tekućeg medija. Iz rezultata je vidljivo da *Lb. sakei* MRS_296 ostaje vijabilan tijekom svih 40 dana pokusa (Slika 11).

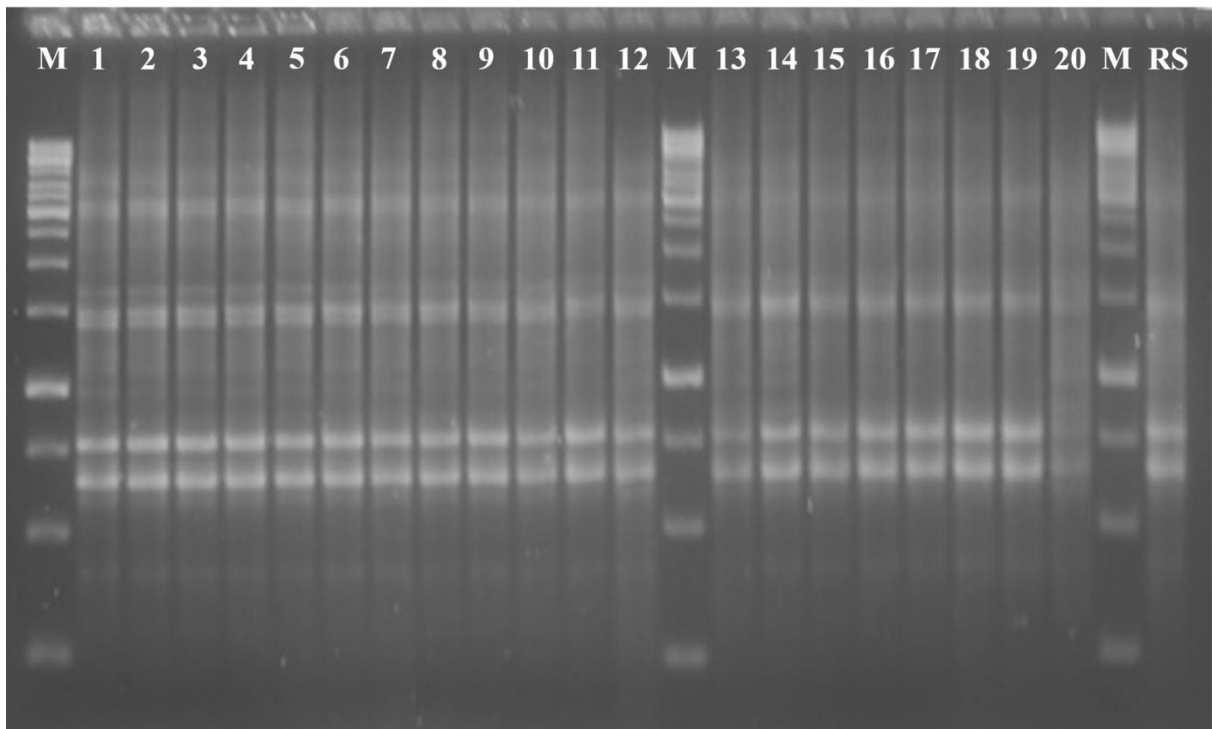


Slika 11. Vijabilnost inkapsuliranog soja *Lb. sakei* MRS_296 čuvanog pri 25 °C tijekom 40 dana. Prikazane su srednje vrijednosti log CFU soja *Lb. sakei* MRS_296 u g mikrosfera s pripadajućim standardnim devijacijama.

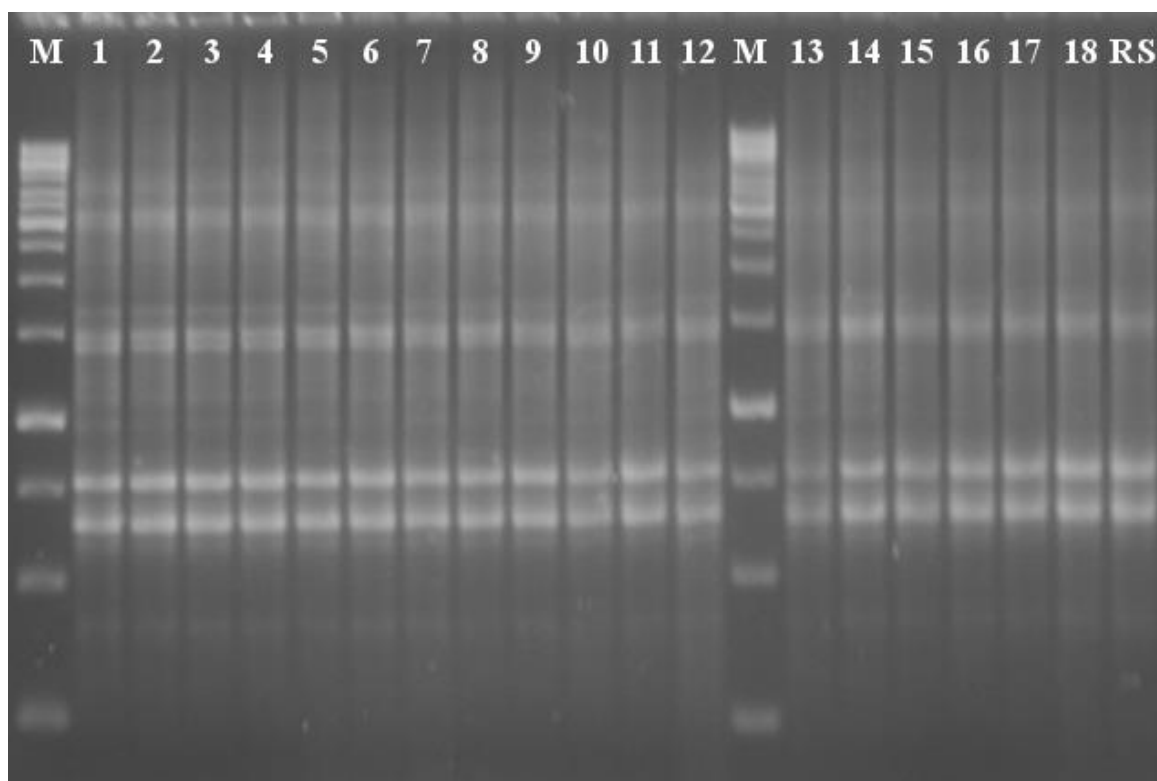
Istraživani soj pokazao je maksimalnu vijabilnost 10. dan čuvanja pri 25 °C ($4,66 \pm 0,22$ log CFU/g). Već 20. dan čuvanja njegova vijabilnost pada na minimalnu detektiranu vrijednost ($4,06 \pm 0,02$ log CFU/g) i ostaje približno konstantna do kraja eksperimenta. U odnosu na početni inkapsulirani broj *Lb. sakei* MRS_296 postotak preživljavanja ovako čuvanih mikrosfera varira između 0,0002 i 0,0008 %.

4.5. Praćenje soja *Lb. sakei* MRS_296 tijekom otpuštanja iz mikrosfera i čuvanja pri 25 °C

Otpuštanje soja *Lb. sakei* MRS_296 iz mikrosfera i njegovo čuvanje pri 25 °C praćeni su pomoću metode rep-PCR. rep-PCR obrasci dobiveni amplifikacijom DNA izolirane iz izolata prikupljenih tijekom 0, 5, 7, 10, 20, 30 i 40 dana nakon mikroinkapsulacije i soja *Lb. sakei* MRS_296 korištenog za mikroinkapsulaciju pomoću GTG₍₅₎ početnice prikazani su na Slikama 12 i 13.



Slika 12. rep-PCR obrasci dobiveni amplifikacijom DNA izolirane iz izolata prikupljenih 0, 5, 7, 10 i 20 dana nakon mikroinkapsulacije i soja *Lb. sakei* MRS_296 pomoću GTG5 početnice. (M) marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas); (1-4) izolati prikupljeni neposredno nakon inkapsulacije; (5-8) izolati prikupljeni 5 dana nakon inkapsulacije; (9-12) izolati prikupljeni 7 dana nakon inkapsulacije; (13-16) izolati prikupljeni 10 dana nakon inkapsulacije; (17-20) izolati prikupljeni 20 dana nakon inkapsulacije; (RS) soj *Lb. sakei* MRS_296 korišten u inkapsulaciji.



Slika 13. rep-PCR obrasci dobiveni amplifikacijom DNA izolirane iz izolata prikupljenih 30 i 40 dana nakon mikroinkapsulacije, izolata prikupljenih nakon 7, 10, 20, 30 i 40 dana čuvanja mikrosfera pri 25 °C i soja *Lb. sakei* MRS_296 pomoću GTG5 početnice. (M) marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas); (1-4) izolati prikupljeni 30 dana nakon mikroinkapsulacije; (5-8) izolati prikupljeni 40 dana nakon mikroinkapsulacije; (9-10) izolati prikupljeni 7. dan čuvanja pri 25 °C; (11-12) izolati prikupljeni 10. dan čuvanja pri 25 °C; (13-14) izolati prikupljeni 20. dan čuvanja pri 25 °C; (15-16) izolati prikupljeni 30. dan čuvanja pri 25 °C; (17-18) izolati prikupljeni 40. dan čuvanja pri 25 °C; (RS) soj *Lb. sakei* MRS_296 korišten u mikroinkapsulaciji.

Temeljem dobivenih rep-PCR obrazaca izolata prikupljenih 0, 5, 7, 10, 20, 30 i 40 dana nakon inkapsulacije i izolata prikupljenih 7., 10., 20., 30. i 40. dan čuvanja pri 25 °C i usporedbom s rep-PCR obrascem mikroinkapsuliranog soja *Lb. sakei* MRS_296 svi prikupljeni izolati identificirani su kao soj *Lb. sakei* MRS_296 na temelju čega se može zaključiti da je mikroinkapsulacija bila uspješna. Ujedno, pregledom dobivenih obrazaca potvrđena je i odsutnost bilo kakve kontaminacije.

5. RASPRAVA

U Hrvatskoj postoji duga tradicija proizvodnje fermentiranih kobasica od mesa domaćih ili divljih životinja koje se pripremaju po tradicionalnim recepturama, čineći neizostavni dio gastronomske tradicije. Problem je što su uvjeti proizvodnje u domaćinstvu često varijabilni ili postupci tijekom obrade nehigijenski što može rezultirati organoleptički i mikrobiološki upitnim proizvodima neujednačenog sastava i kvalitete (Kovačević i sur., 2009; Kos i sur., 2015).

Jedan od načina dobivanja mikrobiološki ispravnih proizvoda vrhunske kvalitete je primjena starter i/ili bioprotektivnih kultura. Iako održavanje brojnosti i vijabilnosti starter kultura tijekom proizvodnje fermentirane hrane još uvijek predstavlja veliki izazov, brojna istraživanja su pokazala da bi primjena mikroinkapsuliranih starter, bioprotektivnih i probiotičkih kultura mogla donijeti velike koristiti prehrambenoj industriji (Mortazvian i sur., 2007; Darukaradhya i sur., 2013; Barbosa i sur., 2015; Corbo i sur., 2011).

U ovom radu istražen je potencijal sustava nosača na bazi natrijevog alginata za mikroinkapsulaciju autohtonog soja *Lb. sakei* MRS_296 tehnikom ionskog geliranja. Zbog svoje netoksičnosti, biokompatibilnosti te jednostavne i jeftine proizvodnje, natrijev alginat spada u najčešće korištene i istraživane sustave za imobilizaciju mikrobnih stanica (Kailasapathy i sur., 2002; Burgin i sur., 2011). Kako bi se osigurala učinkovitost starter kultura tijekom proizvodnje fermentiranih kobasica, nužno je uzgojiti i aplicirati odgovarajuću biomasu. Smjesi mesa obično se dodaje velik broj vijabilnih stanica koji varira između 5 i 9 log CFU/g (Oliveira i sur., 2018). Početna biomasa soja *Lb. sakei* MRS_296 prije mikroinkapsulacije iznosila je $9,79 \pm 0,08$ log CFU/ml, a neposredno nakon mikroinkapsulacije u mikrosferama $7,77 \pm 0,08$ log CFU/g. Iako se iz mikrosfera odmah nakon mikroinkapsulacije otpustilo tek $4,82 \pm 0,07$ log CFU/ml *Lb. sakei* MRS_296, do 5. dana njegovo otpuštanje je doseglo $7,65 \pm 0,05$ log CFU/ml. Između 5. i 40. dana minimalno otpuštanje je iznosilo $5,57 \pm 0,17$ log CFU/ml što pokazuje da se mikroinkapsulacijom pomoću natrijevog alginata može osigurati dovoljan broj vijabilnih stanica tijekom cijelog proizvodnog procesa.

Sličnu dinamiku otpuštanja iz alginatnih mikrosfera pokazala su i druga istraživanja. Međutim, maksimalno otpuštanje detektirano je u različito vrijeme. Corbo i sur. (2013) pokazali su da se odmah nakon inkapsulacije bakterije *Lb. 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, su pokazali da se *Lb. curvatus* maksimalno otpušta 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. Primjerice, mikrobnе stanice imobilizirane na površini ili blizu površine mikrosfera mogu se odmah otpustiti, dok se stanice iz dubljih slojeva otpuštaju kasnije (Graff i sur., 2008; Westman i sur., 2012). Iako je pokazano da temperatura ne utječe na vijabilnost mikrobnih stanica, pad temperature dovodi do kasnijeg otpuštanja iz mikrosfera (Corbo i sur., 2013).

Ovo istraživanje pokazalo je da promjene u brojnosti *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama pokazuju isti trend kao i otpuštanje i da postoji značajna, pozitivna korelacija između preživljavanja soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama i njegovog otpuštanja. Međutim, kako prema našem saznanju o ovome ne postoje literaturni podaci, možemo samo pretpostaviti da mikrosfere osiguravaju povoljne uvjete za umnažanje soja *Lb. sakei* MRS_296 te da se s povećanjem njegove brojnosti pojačano otpuštaju iz mikrosfera.

Također, u ovom radu je pokazano da otpuštanje soja *Lb. sakei* MRS_296 je praćeno padom pH vrijednosti medija. Najmanja pH vrijednost ($5,80 \pm 0,02$) izmjerena je 2. dan. Sposobnost acidifikacije za neinkapsulirani soj *Lb. sakei* MRS_296 ispitana je u prethodnim istraživanjima (Žgomba Maksimović, 2018) koje je pokazalo da neinkapsulirani spoj brže i jače zakiseljava inokulirani medij ($\text{pH} = 3,88 \pm 0,03$ nakon 24 h). Navedeno je u suprotnosti s istraživanjima koja su pokazala su da bi se mikroinkapsulirani spojevi mogli koristiti kao biokatalizatori fermentacije. Tako su npr. Krasaekoopt i sur. (2003) pokazali da mikroinkapsulirani *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* jače zakiseljava mlijeko, dok Picot i Lacroix (2004) nisu detektirali značajne razlike u acidifikacijskoj sposobnosti mikroinkapsuliranih i neinkapsuliranih bifidobakterija.

Čuvanjem mikrosfera na sobnoj temperature očuvana je vijabilnost soja *Lb. sakei* MRS_296 tijekom 40 dana, međutim, postotak preživljavanja je iznimno nizak (0,0002 – 0,0008 %). Suprotno tome, Lee i sur. (2004) pokazali su da mikroinkapsulirani *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ostaje stabilan i zadržava vijabilnost kroz 4 tjedna pri čuvanju na 22 °C, ali uz znatno bolji postotak preživljavanja (0,7 %). Na postotak preživljavanja moglo bi se utjecati promjenom uvjeta čuvanja, npr. čuvanjem inkapsuliranih sojeva u nekom mediju (Corbo i sur., 2011), nižim temperaturama (Corbo i sur., 2013) ili izborom drugih tvari za mikroinkapsulaciju (Lee i sur., 2004).

Iako je ovo istraživanje dalo uvid u dinamiku otpuštanja i preživljavanja soja *Lb. sakei* MRS_296 tijekom 40 dana, njegov utjecaj na promjenu pH vrijednosti i njihovo preživljavanje tijekom čuvanja na sobnoj temperaturi, nužno je provesti daljnje analize kako bi se optimizirala formulacija koja bi se potencijalno mogla koristiti u proizvodnji i domaćih i industrijskih fermentiranih kobasica.

6. ZAKLJUČCI

- Mikroskopskim pregledom potvrđena je prisutnost kratkih, gram pozitivnih štapića.
- Metoda ionskog geliranja pokazala se učinkovitom tehnikom mikroinkapsulacije soja *Lb. sakei* MRS_296.
- Skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) je potvrđeno formiranje alginatnih mikrosfera promjera do 300 μm i prisutnost soja *Lb. sakei* MRS_296 dužina 1,307 do 1,661 μm .
- Uzgojena je dostatna biomasa za mikroinkapsulaciju gdje je početna brojnost soja *Lb. sakei* MRS_296 iznosila je $9,79 \pm 0,08$ log CFU/ml.
- Soj *Lb. sakei* MRS_296 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 *Lb. sakei* MRS_296 postupno se smanjuje do 40. dana.
- Najmanja brojnost soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama izmjerena je na dan inkapsulacije ($7,77 \pm 0,08$ log CFU/g), a najveća 5. dan ($9,32 \pm 0,05$ log CFU/g). Do 40. dana brojnost *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama postupno se smanjuje.
- Dokazana je jaka značajna pozitivna korelacija između brojnosti soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama i njegovog otpuštanja iz mikrosfera ($r = 0,98$; $p < 0,01$).
- Najniža pH vrijednost izmjerena je 2. dan ($5,80 \pm 0,02$). Potom, pH vrijednost postupno raste do 20. dana ($6,19 \pm 0,03$) i ostaje konstantna do 40. dana.
- Dokazana je jaka značajna negativna korelacija između otpuštanja soja *Lb. sakei* MRS_296 iz mikrosferama i promjene pH vrijednosti medija ($r = -0,81$; $p = 0,03$).
- Kod čuvanja mikrosfera pri 25 °C maksimalna vijabilnost soja *Lb. sakei* MRS_296 detektirana je 10. dan čuvanja ($4,66 \pm 0,22$ log CFU/g).
- Postotak preživljavanja soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama pri 25 °C je iznimno nizak (0,0002 – 0,0008 %).
- rep-PCR-om svi prikupljeni izolati identificirani su kao soj *Lb. sakei* MRS_296 i dokazna je odsutnost kontaminacija.

7. POPIS LITERATURE

1. Ammor, S., Dufour E., Zagorec M., Chaillou S., Chevallier I. (2005). Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology*. 22(6): 529-538.
2. Augustin, M.A., Sanguansri, L., Margetts, C. and Young, B. (2001). Microencapsulating food ingredients. *Food Australia*, 53(6): 220-223.
3. Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8): 4583–4594.
4. Bao, W., Zhou, J., Luo, J., Wu, D. (2006). PLGA microspheres with high drug loading and high encapsulation efficiency prepared by a novel solvent evaporation technique. *Journal of microencapsulation*. 23(5): 471-479.
5. 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.
6. Belfiore, C., Raya, R. R., Vignolo, G. M. (2013). Identification, technological and safety characterization of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* isolated from Argentinean anchovies (*Engraulis anchoita*). *SpringerPlus* 2(1): 257.
7. Blanco, M.D., Sastre, R.L., Teijon, C., Olmo, R. and Teijon, J.M. (2005). 5-Fluorouracil-loaded microspheres prepared by spray-drying poly (D, L-lactide) and poly (lactide-co-glycolide) polymers: characterization and drug release. *Journal of microencapsulation*. 22(6): 671-682.
8. Blandino, A., Macias, M., Cantero, D. (1999). Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88(6): 686-689.
9. Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M. C. (2001). Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Protection*. 64(3): 367-373.
10. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. and Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*, 104(4): 467-483.

11. Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.M., Dudez, A.M., Martin, V., Beaufiles, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V. and Zagorec, M. (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature biotechnology*. 23(12): 1527.
12. Champomier-Vergès, M.C., Chaillou, S., Cornet, M. and Zagorec, M. (2001). *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Research in Microbiology*. 152(10): 839-848.
13. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*. 71(1), 1-20.
14. Cocconcelli, P.S., Fontana, C. (2010). Starter cultures for meat fermentation. U: *Handbook of meat processing* (Ur. Todorá F.). Blackwell Publishing. Ames, Iowa, USA. 199-218.
15. Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Gallo, M., Speranza, B., Sinigaglia, M. (2013). Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and in vivo applications. *Innovative food science & emerging technologies*. 18: 196-201.
16. 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.
17. Corbo, M.R., Bevilacqua, A. and Sinigaglia, M. (2011). Shelf life of alginate beads containing lactobacilli and bifidobacteria: characterisation of microspheres containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *International journal of food science & technology*. 46(10): 2212-2217.
18. Curiel, J.A., Ruiz-Capillas, C., De las Rivas, B., Carrascosa, A.V., Jiménez-Colmenero, F., Muñoz, R. (2011). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. *Meat Science*. 88(3): 368-373.
19. Darukaradhy, J., Phillips, M. and Kailasapathy, K. (2013). Effect of encapsulation on the survival of probiotic bacteria in the presence of starter and non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese over a 6-month ripening period. *International Journal of Fermented Foods*. 2(1): 63.
20. De las Rivas, B., Ruiz-Capillas, C., Carrascosa, A. V., Curiel, J. A., Jiménez-Colmenero, F., Muñoz, R. (2008). Biogenic amine production by Gram-positive

- bacteria isolated from Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high pressure and kept in chilled storage. *Meat science*, 80(2), 272-277.
21. Dossmann, M.U., Vogel, R.F. and Hammes, W.P., 1996. Mathematical description of the growth of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus pentosus* under conditions prevailing in fermented sausages. *Applied microbiology and biotechnology*. 46(4): 334-339.
 22. Duhutrel, P., Bordat, C., Wu, T. D., Zagorec, M., Guerquin-Kern, J. L., Champomier-Vergès, M. C. (2010). Iron sources used by the nonpathogenic lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* as revealed by electron energy loss spectroscopy and secondary-ion mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(2): 560-565.
 23. Fang, Z., Bhandari, B., (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21(10): 510-523.
 24. Frece, J., Kovačević, D., Kazazić, S., Mrvčić, J., Vahčić, N., Ježek, D., Hruškar, M., Babić, I., Markov, K. (2014). Comparison of sensory properties, shelf-life and microbiological safety of industrial sausages produced with autochthonous and commercial starter cultures. *Food technology and biotechnology*. 52(3): 307-316.
 25. Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in food science & technology*. 15(7-8): 330-347.
 26. Graff, S., Hussain, S., Chaumeil, J.C. and Charrueau, C. (2008). Increased intestinal delivery of viable *Saccharomyces boulardii* by encapsulation in microspheres. *Pharmaceutical research* 25(6): 1290-1296.
 27. Guilbaud, M., Zagorec, M., Chaillou, S. and Champomier-Vergès, M.C. (2012). Intraspecies diversity of *Lactobacillus sakei* response to oxidative stress and variability of strain performance in mixed strains challenges. *Food microbiology*. 29(2): 197-204.
 28. Haffner, F.B., Diab, R. and Pasc, A. (2016). Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *AIMS Materials Science*. 3(1): 114-136.
 29. Hammes W. P., Hertel C. (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. U: *Prokaryotes Volume 4* (Ur. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E.). Springer. New York, NY, USA. 320-403.
 30. Hammes W. P., Vogel R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. U: *Genera of lactic acid bacteria. Volume 2* (Ur. Wood B. J. B., Holzapfel W. H.). Blackie Academic & Professional. London, UK. 19- 54.

31. Hammes W.P., Bantleon A., Min S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*. 7(1-2): 165-173.
32. Hammes W.P., Hertel C., (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Science*. 49: S125–S138.
33. Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T., Monfort, J.M. (1993). Biochemical characterization of lactobacilli isolated from dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 18(2): 107–113.
34. Incze K. (2002). Fermentirani mesni proizvodi. *Mesna industrija* 4: 112-117.
35. Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current issues in intestinal microbiology*. 3(2): 39-48.
36. Kandler, O., Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing gram- positive rods. U: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2* (Ur. Holt J. G., Sneath P. H. A.). Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA. 1209-1229.
37. Kavitate, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., Shetty, P. H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods– A review. *Food Bioscience*. 21: 34-44.
38. King A. H. (1995). Encapsulation of food ingredients: A review of available technology, focusing on hydrocolloids. U: *Encapsulation and controlled release of food ingredients* (Ur. Risch S. J., Reineccius G. A.). ACS symposium series (Vol. 590). American Chemical Society. Washington DC. 26–39.
39. Kos, I., M. Gredičak, B. Sinčić Pulić, I. Širić, M. Mrkonjić Fuka. (2015). Senzorna svojstva trajnih kobasica od mesa domaće i divlje svinje. Pedeseti hrvatski i deseti međunarodni simpozij agronoma. Opatija, 16. – 20. veljače. Zbornik radova, Opatija, 438 – 442.
40. Kovačević, D., Suman, K., Šubarić, D., Mastanjević, K., Vidaček, S. (2009). Investigation of homogeneity and physicochemical characterisation of the Homemade Slavonian Sausage. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*. 11(6): 338-344.
41. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. and Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International dairy journal*. 13(1): 3-13.
42. Lee, J.S., Cha, D.S. and Park, H.J. (2004). Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52(24): 7300-7305.
43. Léonard, L., Beji, O., Arnould, C., Noirot, E., Bonnotte, A., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Lherminier, J., Saurel, R. and Oulahal, N. (2015). Preservation of

- viability and anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei*, entrapped in gelling matrices of alginate or alginate/caseinate. *Food control*. 47: 7-19.
44. Leroy F., Verluyten J., De Vuyst L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 106:270-285.
 45. Lizaso, G., Chasco, J., Beriain, M. J. (1999). Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiology*. 16(3): 219–228.
 46. Lücke, F. K. (1994). Fermented meat products. *Food Research International*. 27(3): 299–307.
 47. Lücke F. K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*. 56(2): 105–115.
 48. McLeod, A., Nyquist, O.L., Snipen, L., Naterstad, K. and Axelsson, L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and applied microbiology*. 31(5): 393-403.
 49. Montel M.C. (1999). Fermented meat products. U: *Fermented foods Encyclopedia of food microbiology* (Ur. Batt C.A., Patel P.D.). Academic Press, London, UK. 744-753.
 50. Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R. and Sohrabvandi, S. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(1): 1-18.
 51. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 1: 1806-1815.
 52. Oliveira M., Ferreira V., Magalhães R., Teixeira T. (2018). Biocontrol strategies for Mediterranean style fermented sausages. *Food reserch international*. 103: 438-449.
 53. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science*, 65(2), 859-867
 54. Petrović, M., Radović, Č., Parunović, N., Mijatović, M., Radojković, D., Aleksić, S., Stanišić, N., Popovac, M. (2010). Quality traits of carcass sides and meat of Moravka and Mangalitsa pig breeds. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 26(1-2): 21-27.

55. Picot A., Lacroix C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International dairy journal*. 14(6): 505-515.
56. Pot B., Ludwig W., Kersters K., Schleifer K.H. (1994). Taxonomy of lactic acid bacteria. U: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications* (Ur. De Vuyst L., Vandamme E.J.). Springer. Boston, MA, USA. 13–90.
57. Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G., Cocconcelli, P.S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 84(6): 1043–1049.
58. Rimaux, T., Vrancken, G., Vuylsteke, B., De Vuyst, L. and Leroy, F. (2011). The pentose moiety of adenosine and inosine is an important energy source for the fermented-meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(18): 6539-6550.
59. Rizkalla, N., Range, C., Lacasse, F.X. and Hildgen, P. (2006). Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method. *Journal of microencapsulation*. 23(1): 39-57.
60. Senko H. (2017). Utjecaj autohtonih sojeva *Lactobacillus sakei* na mikrobiotu kobasica od mesa divlje svinje. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet Zavod za mikrobiologiju. Zagreb.
61. Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* 47 (1): 57-73.
62. Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology* 39: 227-235.
63. Villani, F., Casaburi, A., Pennacchia, C., Filos, L., Russo, F., Ercolini, D. (2007). Microbial ecology of the Soppressata of Vallo di Diano, a traditional dry fermented from Southern Italy, and in vitro and in situ selection of autochthonous starter cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(17): 5453–5463.
64. Vinceković, M., Jalšenjak, N., Topolovec-Pintarić, S., Đermić, E., Bujan, M., Jurić, S. (2016). Encapsulation of biological and chemical agents for plant nutrition and protection: chitosan/alginate microcapsules loaded with copper cations and *Trichoderma viride*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 64(43): 8073-8083.
65. Westman, J. O., Ylittervo, P., Franzén, C. J., Taherzadeh, M. J. (2012). Effects of encapsulation of microorganisms on product formation during microbial fermentations. *Applied microbiology and biotechnology*. 96(6): 1441-1454.

66. Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C. (2017). *Lactobacillus sakei*: a starter for sausage fermentation, a protective culture for meat products. *Microorganisms*. 5(3): 56.
67. Žgomba Maksimović A. (2018). Microbiota of spontaneously fermented game meat sausages. Doctoral dissertation. University of Zagreb Faculty of agriculture Department of microbiology. Zagreb.
68. Žgomba Maksimović, A., Hulak, N., Vuko, M., Kovačević, V., Kos, I., Mrkonjić Fuka, M. (2015). Bakterije mliječne kiseline u proizvodnji tradicionalnih trajnih kobasica. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*. 17(6): 545-551.

8.1. Popis kratica

BHI	moždano-srčani infuzijski medij (engl. <i>brain heart infusion agar</i>)
BMK	bakterije mliječne kiseline
°C	stupanj celzijusa
CFU	broj formiranih kolonija (eng. <i>colony forming units</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
MRS	De Man-Rogosa-Sharpe medij
g	gram
g	sila gravitacije, broj okretaja rotora centrifuge u minuti
h	sat
l	litra
μl	mikrolitar
cm	centimetar
M	mol, množina tvari
min	minuta
rpm	broj okretaja u minuti (engl. <i>revolution per minute</i>)
rep-PCR	lančana reakcija polimerazom repetitivnih ekstrageničkih palindromskih elemenata (engl. <i>repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction</i>)
SEM	skenirajući elektronski mikroskop (engl. <i>Scanning Electron Microscope</i>)
UV	ultraljubičasti dio spektra elektromagnetskog zračenja (engl. <i>ultraviolet</i>)
V	volt

8.2. Tablice

Tablica P1. Otpuštanje soja *Lb. sakei* MRS_296 iz mikrosfera.

Usporedba	Apsolutna razlika	Grupa 1 (n)	Grupa 2 (n)	Standardna pogreška	q vrijednost	Značajna razlika
0 dan - 5 dan	2,82	4	4	0,06	45,08	da
0 dan - 7 dan	2,86	4	4	0,06	45,65	da
0 dan - 10 dan	2,78	4	4	0,06	44,40	da
0 dan - 20 dan	2,51	4	4	0,06	40,06	da
0 dan - 30 dan	2,06	4	4	0,06	32,91	da
0 dan - 40 dan	0,75	4	4	0,06	11,96	da
dan 5 - dan 7	0,04	4	4	0,06	0,57	ne
dan 5 - dan 10	0,04	4	4	0,06	0,68	ne
dan 5 - dan 20	0,31	4	4	0,06	5,01	da
dan 5 - dan 30	0,76	4	4	0,06	12,17	da
dan 5 - dan 40	2,07	4	4	0,06	33,12	da
dan 7 - dan 10	0,08	4	4	0,06	1,25	ne
dan 7 - dan 20	0,35	4	4	0,06	5,59	da
dan 7 - dan 30	0,80	4	4	0,06	12,74	da
dan 7 - dan 40	2,11	4	4	0,06	33,69	da
dan 10 - dan 20	0,27	4	4	0,06	4,34	ne
dan 10 - dan 30	0,72	4	4	0,06	11,49	da
dan 10 - dan 40	2,03	4	4	0,06	32,44	da
dan 20 - dan 30	0,45	4	4	0,06	7,15	da
dan 20 - dan 40	1,76	4	4	0,06	28,11	da
dan 30 - dan 40	1,31	4	4	0,06	20,95	da

Kod razine značajnosti $p < 0,05$ i 42 stupnja slobode kritična vrijednost iznosi 4,39. Ako je izračunata q vrijednost veća ili jednaka kritičnoj vrijednosti razlike u srednjim vrijednostima smatraju se značajnim.

Tablica P2. Preživljavanje soja *Lb. sakei* MRS_296 u mikrosferama.

Usporedba	Apsolutna razlika	Grupa 1 (n)	Grupa 2 (n)	Standardna pogreška	q vrijednost	Značajna razlika
0 dan - 5 dan	1,56	4	4	0,06	24,89	da
0 dan - 7 dan	1,52	4	4	0,06	24,30	da
0 dan - 10 dan	1,14	4	4	0,06	18,28	da
0 dan - 20 dan	1,18	4	4	0,06	18,89	da
0 dan - 30 dan	0,96	4	4	0,06	15,35	da
0 dan - 40 dan	0,28	4	4	0,06	4,43	da
dan 5 - dan 7	0,04	4	4	0,06	0,59	ne
dan 5 - dan 10	0,41	4	4	0,06	6,61	da
dan 5 - dan 20	0,38	4	4	0,06	6,00	da
dan 5 - dan 30	0,60	4	4	0,06	9,54	da
dan 5 - dan 40	1,28	4	4	0,06	20,47	da
dan 7 - dan 10	0,38	4	4	0,06	6,02	da
dan 7 - dan 20	0,34	4	4	0,06	5,41	da
dan 7 - dan 30	0,56	4	4	0,06	8,94	da
dan 7 - dan 40	1,24	4	4	0,06	19,87	da
dan 10 - dan 20	0,04	4	4	0,06	0,61	ne
dan 10 - dan 30	0,18	4	4	0,06	2,93	ne
dan 10 - dan 40	0,87	4	4	0,06	13,86	da
dan 20 - dan 30	0,22	4	4	0,06	3,54	ne
dan 20 - dan 40	0,91	4	4	0,06	14,47	da
dan 30 - dan 40	0,68	4	4	0,06	10,93	da

Kod razine značajnosti $p < 0,05$ i 42 stupnja slobode kritična vrijednost iznosi 4,39. Ako je izračunata q vrijednost veća ili jednaka kritičnoj vrijednosti razlike u srednjim vrijednostima smatraju se značajnim.

Tablica P3. pH promjene medija za čuvanje mikrosfera.

Usporedba	Apsolutna razlika	Grupa 1 (n)	Grupa 2 (n)	Standardna pogreška	q vrijednost	Značajna razlika
0 dan - 1 dan	1,24	3	3	0,01	86,66	da
0 dan - 2 dan	1,41	3	3	0,01	98,37	da
0 dan - 3 dan	1,26	3	3	0,01	88,03	da
0 dan - 4 dan	1,26	3	3	0,01	87,66	da
0 dan - 5 dan	1,26	3	3	0,01	87,50	da
0 dan - 7 dan	1,22	3	3	0,01	85,27	da
0 dan - 10 dan	1,15	3	3	0,01	79,90	da
0 dan - 20 dan	1,03	3	3	0,01	71,58	da
0 dan - 30 dan	1,14	3	3	0,01	79,64	da
0 dan - 40 dan	1,08	3	3	0,01	75,02	da
1 dan - 2 dan	0,17	3	3	0,01	11,71	da
1 dan - 3 dan	0,02	3	3	0,01	1,37	ne
1 dan - 4 dan	0,01	3	3	0,01	1,00	ne
1 dan - 5 dan	0,01	3	3	0,01	0,84	ne
1 dan - 7 dan	0,02	3	3	0,01	1,39	ne
1 dan - 10 dan	0,10	3	3	0,01	6,76	da
1 dan - 20 dan	0,22	3	3	0,01	15,08	da
1 dan - 30 dan	0,10	3	3	0,01	7,02	da
1 dan - 40 dan	0,17	3	3	0,01	11,64	da
2 dan - 3 dan	0,15	3	3	0,01	10,34	da
2 dan - 4 dan	0,15	3	3	0,01	10,71	da
2 dan - 5 dan	0,16	3	3	0,01	10,88	da
2 dan - 7 dan	0,19	3	3	0,01	13,11	da
2 dan - 10 dan	0,27	3	3	0,01	18,48	da
2 dan - 20 dan	0,38	3	3	0,01	26,80	da
2 dan - 30 dan	0,27	3	3	0,01	18,73	da
2 dan - 40 dan	0,34	3	3	0,01	23,36	da
3 dan - 4 dan	0,01	3	3	0,01	0,37	ne
3 dan - 5 dan	0,01	3	3	0,01	0,53	ne
3 dan - 7 dan	0,04	3	3	0,01	2,77	ne
3 dan - 10 dan	0,12	3	3	0,01	8,13	da
3 dan - 20 dan	0,24	3	3	0,01	16,45	da
3 dan - 30 dan	0,12	3	3	0,01	8,39	da
3 dan - 40 dan	0,19	3	3	0,01	13,01	da
4 dan - 5 dan	0,00	3	3	0,01	0,16	ne
4 dan - 7 dan	0,03	3	3	0,01	2,39	ne
4 dan - 10 dan	0,11	3	3	0,01	7,76	da
4 dan - 20 dan	0,23	3	3	0,01	16,08	da
4 dan - 30 dan	0,11	3	3	0,01	8,02	da
4 dan - 40 dan	0,18	3	3	0,01	12,64	da

5 dan - 7 dan	0,03	3	3	0,01	2,23	ne
5 dan - 10 dan	0,11	3	3	0,01	7,60	da
5 dan - 20 dan	0,23	3	3	0,01	15,92	da
5 dan - 30 dan	0,11	3	3	0,01	7,86	da
5 dan - 40 dan	0,18	3	3	0,01	12,48	da
7 dan - 10 dan	0,08	3	3	0,01	5,37	da
7 dan - 20 dan	0,20	3	3	0,01	13,69	da
7 dan - 30 dan	0,08	3	3	0,01	5,62	da
7 dan - 40 dan	0,15	3	3	0,01	10,25	da
10 dan - 20 dan	0,12	3	3	0,01	8,32	da
10 dan - 30 dan	0,00	3	3	0,01	0,26	ne
10 dan - 40 dan	0,07	3	3	0,01	4,88	ne
20 dan - 30 dan	0,12	3	3	0,01	8,06	da
20 dan - 40 dan	0,05	3	3	0,01	3,44	ne
30 dan - 40 dan	0,07	3	3	0,01	4,62	ne

Kod razine značajnosti $p < 0,05$ i 22 stupnja slobode kritična vrijednost iznosi 5,01. Ako je izračunata q vrijednost veća ili jednaka kritičnoj vrijednosti razlike u srednjim vrijednostima smatraju se značajnim.

ŽIVOTOPIS

Anita Boras, rođena je 07.11.1994. godine u Ljubuškom (BiH). Školovanje je započela 2001. godine u Osnovnoj školi Vitina, a daljnje školovanje je nastavila u Srednjoj školi Sestara milosrdnica u Ljubuškom, smjer opća gimnazija. Zatim je 2013. godine upisala Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2016. završava preddiplomski studij i nastavlja obrazovanje upisom diplomskog studija Agroekologija, usmjerenje Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi. Za vrijeme preddiplomskoga studija, obavila stručnu praksu u Hrvatskom centru za poljoprivredu, hranu i selo na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo. Pod vodstvom prof. dr. sc. Nevena Antunca u suradnji s laboratorijem piše stručni rad pod nazivom „Osiguranje kvalitete rezultata ispitivanja vina u analitičkom laboratoriju“ koji biva objavljen na Portalu znanstvenih časopisa Republike Hrvatske u Hrvatskom časopisu za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam (Vol.12 No.3-4 Prosinac 2017), Hrčak (<https://hrcak.srce.hr/197875>). Obavila stručnu praksu za vrijeme diplomskog studija na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za molekularnu mikrobiologiju. Tijekom studiranja je bila aktivna u raznim udrugama i pomagala na manifestacijama (Dani otvorenih vrata, Sveučilišna smotra) kao članica Kluba studenata agronomije, student tutor mlađim studentima te članica klape Agronomskog fakulteta „Falkuša“.