

Mikroinkapsulacija bakterija mliječne kiseline producenata S-proteina

Dučkić, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:554527>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial 4.0 International / Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Kristina Dučkić
58215628**

**MIKROINKAPSULACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE
KISELINE PRODUCENATA S-PROTEINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

MIKROINKAPSULACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE PRODUCENATA S- PROTEINA

Kristina Dučkić, 58215628

Sažetak: Bakterije mliječne kiseline imaju značajnu ulogu u humanom gastrointestinalnom traktu (GIT), posebno one s izraženom probiotičkom aktivnosti. Tema ovog rada je mikroinkapsulacija bakterijskih stanica soja *Levilactobacillus brevis* MB2 i *Levilactobacillus brevis* MB20 u natrijevom alginatu uz dodatak prebiotika (fruktooligosaharida - FOS i galaktooligosaharida - GOS), te liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora. Sojevi *Levilactobacillus brevis* MB2 i MB20 na površini sadrže S-proteine koji imaju ulogu u otpornosti bakterijske stanice na uvjete GIT-a. Cilj ovog rada bio je ispitati postotak preživljavanja bakterijskih sojeva u procesu mikroinkapsulacije i liofilizacije, te prema dobivenim rezultatima utvrđeno je da dodatak prebiotika tijekom mikroinkapsulacije i obranog mlijeka kao lioprotektora povećava postotak preživljavanja u oba procesa. Nadalje ispitan je i postotak preživljavanja mikroinkapsuliranih i liofiliziranih stanica u simuliranim uvjetima GIT-a. Rezultati su pokazali da dodatak prebiotika u procesu mikroinkapsulacije i dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora pozitivno utječu na postotak preživljavanja stanica u nepovoljnim uvjetima GIT-a.

Ključne riječi: mikroinkapsulacija, bakterije mliječne kiseline, prebiotici, S-proteini

Rad sadrži: 25 stranica, 10 slika, 2 tablica, 24 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Pomoć pri izradi: Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: rujan, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

MICROENCAPSULATION OF LACTIC ACID BACTERIA PRODUCERS OF S-PROTEINS

Kristina Dučkić, 58215628

Abstract: Lactic acid bacteria have a significant role in the human gastrointestinal tract (GIT), especially those with probiotic activity. The topic of this thesis is microencapsulation of bacterial cells of *Levilactobacillus brevis* MB2 and *Levilactobacillus brevis* MB20 strains in sodium alginate with the addition of prebiotics (fructooligosaccharides and galactooligosaccharides), and the lyophilization of microencapsulated cells while using skimmed milk as a lyoprotector. *Levilactobacillus brevis* MB2 and MB20 strains contain S-proteins on their surfaces that play a role in bacterial resistance to the conditions of the GIT. The goal of this thesis was to examine the rate of survival of bacterial strains in the process of microencapsulation and lyophilization and it was determined, according to the results, that the addition of prebiotics during microencapsulation and skimmed milk as a lyoprotector increases the cells survival rate in both processes. Furthermore, the survival rate of microencapsulated and lyophilized cells in the simulated conditions of the GIT was examined. Results have shown that the addition of prebiotics in the process of microencapsulation and skimmed milk as lyoprotector have a positive impact on the survival rate of cells in unfavourable conditions of the GIT.

Keywords: microencapsulation, lactic acid bacteria, prebiotics, S-proteins

Thesis contains: 25 pages, 10 figures, 2 tables, 24 references

Original in: Croatian

This thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb.

Mentor: Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate Professor

Technical support and assistance: Nina Čuljak, MSc

Thesis defended: September, 2023.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, a uz pomoć Nine Čuljak, mag. ing. biotechn. Rad je izrađen u okviru projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1. Metabolizam bakterija mliječne kiseline	3
2.2. PROBIOTICI I PREBIOTICI.....	3
2.2.1. Kriteriji za selekciju probiotika.....	5
2.3. S-PROTEINI.....	5
2.3.1. Građa i funkcija S-sloja kod bakterija.....	5
2.3.2. S-proteini kod bakterijske vrste <i>Levilactobacillus brevis</i>	6
2.4. MIKROINKAPSULACIJA	7
2.4.1. Mikroinkapsulacija probiotika	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. Radni mikroorganizmi	9
3.1.2. Hranjive podloge.....	9
3.1.3. Kemikalije.....	9
3.1.4. Aparatura i pribor.....	10
3.2. METODE	11
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	11
3.2.2. Mikroinkapsulacija sojeva <i>L. brevis</i> u natrijevom alginatu	12
3.2.3. Mikroinkapsulacija sojeva <i>L. brevis</i> u natrijevom alginatu uz dodatak prebiotika (FOS i GOS).....	13
3.2.4. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica sojeva <i>L. brevis</i> uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora.....	13
3.2.5. Preživljavanje mikroinkapsuliranih bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.....	13
3.2.5.1. Priprema simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva	13
3.2.5.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje mikroinkapsuliranih stanica sojeva <i>L. brevis</i>	14
3.2.6. Ispitivanje stabilnosti S-proteina tijekom prolaska liofiliziranih mikrokapsula kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta primjenom SDS-PAGE	14
3.2.7. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom	15
3.2.8. Obrada rezultata	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Mikroinkapsulacija <i>L. brevis</i> sojeva u natrijevom alginatu i u alginatu uz dodatak prebiotika (FOS i GOS)	16
4.2. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica <i>L. brevis</i> sojeva uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora.....	17
4.3. Preživljavanje mikroinkapsuliranih bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.....	19
5. ZAKLJUČCI	22
6. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Humani mikrobiom sastoji se od velikog broja simbiotičkih mikrobnih stanica, pretežito od bakterija koje se nalaze u gastrointestinalnom traktu. Mikrobiom ima značajnu ulogu u ljudskom zdravlju. Značajan broj kliničkih poremećaja povezani su s ulogom mikrobioma kao što su pretilost, pothranjenost, te različite upalne bolesti (Costello i sur., 2012). Kao jedna od značajnih vrsta bakterija u humanom mikrobiomu spadaju bakterije mliječne kiseline (BMK). Bakterije mliječne kiseline su Gram-pozitivne, nesporogene bakterije koje imaju visoku toleranciju na niske pH vrijednosti. Neke bakterije ove skupine karakteristične su po tome što imaju probiotička svojstva. Probiotici su mikroorganizmi koji pozitivno utječu na ljudsko zdravlje (Mokoena, 2017). Povećani interes za ljudsko zdravlje uključujući i crijevnu mikrofloru u posljednje vrijeme dovelo je do razvitka metoda kao što je mikroinkapsulaciju u cilju zaštite i ciljanog djelovanja probiotika. Mikroinkapsulacija je proces u kojem su sitne čestice ili kapljice obložene ovojnicom od različitih polimernih materijala što u konačnici rezultira stvaranjem malih kapsula u cilju izolacije i zaštite od vanjskog okruženja. Mikroinkapsulacija probiotika povećava njihovu efikasnost što u konačnici pozitivno utječe na ljudsko zdravlje te naravno i na mikrobiom (Yao i sur., 2019).

Cilj ovog rada bio je mikroinkapsulacija sinbiotičkih pripravka sojeva MB2 i MB20 bakterijske vrste *Levilactobacillus brevis*, producenta S-proteina, u kombinaciji s prebiotičkim supstratima, fruktooligosaharidima (FOS) i galaktooligosaharidima (GOS) te utjecaj mikroinkapsulacije na preživljavanje sinbiotičkih pripravaka tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta (GIT). Sojevi *Levilactobacillus brevis* MB2 i MB20 djeluju kao probiotici i na površini stanica sadrže S-proteine.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline predstavljaju grupu bakterija koje imaju morfološke, metaboličke i fiziološke sličnosti, te su također i blisko povezane filogenetski (Khalid, 2011). Bakterije koje pripadaju skupini bakterija mliječne kiseline su Gram-pozitivne, anaerobne, nesporogene, a morfološki u obliku štapića i koka. Optimalni uvjeti za rast bakterija mliječne kiseline su pH vrijednost u rasponu od 5,5 do 5,8, te zahtijevaju prisutnost aminokiselina, vitamina, minerala, peptida, baza nukleinskih kiselina, masnih kiselina i ugljikohidrata (Mokoena, 2017).

Korištenje bakterija mliječne kiseline u fermentaciji hrane jedna je od drevnih tehnika konzerviranja hrane (Hayek i Ibrahim, 2013). Kao glavni produkt fermentacije koju provode bakterije iz ove skupine je mliječna kiselina, ali i njihova proizvodnja octene kiseline, egzopolisaharida, etanola i pojedinih enzima također je od velike značajnosti. Na temelju različitih produkata fermentacije i različitih temperatura rasta, bakterije mliječne kiseline klasificiraju se u različite skupine. Osim toga, BMK klasificiraju se i na temelju njihove sposobnosti fermentacije ugljikohidrata, te se dijele na homofermentativne i heterofermentativne bakterije (Ayivi i sur., 2020).

Karakteristična staništa za BMK su ona koja su nutritivno bogata kao što su prehrambeni proizvodi poput mlijeka, mesa i povrća, također se nalaze i u usnoj šupljini i gastrointestinalnom traktu sisavaca. Osim prethodno navedenih staništa, BMK su prisutne i u majčinom mlijeku. Majčino mlijeko sadrži bogatu mikrobiotu, koja se endogeno prenosi dojenjem u organizam djeteta, te ima značajnu ulogu u razvitku imunološkog sustava i zdravlja djeteta. Da majčino mlijeko ima pozitivan utjecaj na zdravlje dojenčadi dokazala je činjenica da djeca koja su se hranila dojenjem imaju bogatiju crijevnu mikrobiotu u usporedbi s djecom koja su se hranila umjetnom formulom. BMK se mogu koristiti i prilikom pojave mastitisa (upala dojke) tijekom laktacije koju uzrokuje bakterija *Staphylococcus aureus*. One zapravo inhibiraju prijanjanje patogena uz stijenku epitelnih stanica što u konačnici uzrokuje redukciju pojave mastitisa (Łubiech i Twaruzek, 2020).

2.1.1. Metabolizam bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline koriste ugljikohidrate kao glavni izvor energije, te ovisno o načinu kako asimiliraju ugljikohidrate postoje homofermentativne i heterofermentativne bakterije. Kao glavni produkt fermentacije kod homofermentativnih bakterija je mliječna kiselina, a kod heterofermentativnih bakterija osim što nastaje mliječna kiselina nastaju i drugi produkti kao što su ugljikov dioksid, etanol i octena kiselina. Bakterije mliječne kiseline imaju ulogu i u metabolizmu škroba jer tijekom fermentacije djelovanjem amilolitičkih bakterija mliječne kiseline može doći do razgradnje škroba na jednostavnije šećere. Glavnu ulogu u razgradnji škroba imaju enzimi, a jedan od enzima izoliran je iz bakterije *Lactiplantibacillus plantarum* koji osim hidrolize škroba ima i sposobnost hidrolize amilopektina i glikogena. Središnja metabolička aktivnost bakterija ove skupine je hidroliza peptida do slobodnih aminokiselina koje su esencijalne za rast bakterija. Važno je naglasiti da bakterije mliječne kiseline ne mogu samostalno sintetizirati aminokiseline, vitamine i baze nukleinskih kiselina te iz tog razloga metabolizam proteina igra važnu ulogu (Bintsis, 2018).

2.2. PROBIOTICI I PREBIOTICI

Probiotici su mikroorganizmi koji imaju pozitivne učinke na zdravlje domaćina kada se unose u odgovarajućim koncentracijama. Mikroorganizmi koji se smatraju probioticima prikazani su u tablici 1. Oni utječu na imunološki sustav, intestinalne epitelne stanice te mikrofloru u gastrointestinalnom traktu. Njihov utjecaj na intestinalne epitelne stanice uzrokuje povećano lučenje mucina što u konačnici uzrokuje blokiranje patogenih mikroorganizama, osim toga smanjuje mogućnost apoptoze, tj. programirane smrti epitelnih stanica. Pozitivan utjecaj na imunološki sustav najbolje pokazuje bakterija *Lacticaseibacillus casei* koja povećava ukupan broj imunoglobulina A (IgA) prilikom infekcije, što postiže stimulacijom B-stanica čija je glavna uloga proizvodnja imunoglobulina. Imunološki sustav nije proizveo antitijela za bakteriju *Lacticaseibacillus casei* što dodatno dokazuje pozitivan učinak ove probiotičke bakterije (Gogineni i sur., 2013).

Tablica 1. Mikroorganizmi koji se smatraju probioticima (Holzapfel i sur., 2001)

Vrste <i>Lactobacillus</i>	Vrste <i>Bifidobacterium</i>	Ostale bakterije mliječne kiseline	Ostali mikroorganizmi
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. Toyo
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc</i> <i>mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus</i> <i>inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Gastrointestinalni trak čovjeka sadrži više od 1000 vrsta bakterija i drugih mikroorganizama te kao što je prethodno spomenuto probiotici imaju značajan utjecaj na mikrobiotu u gastrointestinalnom traktu. Prebiotike ne mogu razgraditi endogeni enzimi iz gastrointestinalnog trakta te je to razlog zašto se nalaze u debelom crijevu gdje dolazi do njihove fermentacije. U procesu fermentacije prebiotika, formiraju se kratkolančane masne kiseline koje su od značajne važnosti za normalno funkcioniranje gastrointestinalnog trakta. Najčešći prebiotici su galaktooligosaharidi, fruktooligosaharidi, inulin, laktuloza te

derivati β -glukana i galaktoze (Martyniak i sur., 2021).

Probiotici su korišteni i u kliničkim istraživanjima kod pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva (Crohnova bolest i Ulcerozni kolitis), konkretnije kod prevencije crijevne disbioze tijekom dugotrajne terapije antibioticima. Istraživanja ovog tipa su limitirana brojem istraživačkih grupa te iz tog razloga rezultate istraživanja iznimno je teško analizirati i uspoređivati. Zbog prethodno navedenih razloga nemoguće je doći do zaključka trebaju li se probiotici koristiti pri liječenju upalnih bolesti crijeva (Akutko i Stawarski, 2021).

2.2.1. Kriteriji za selekciju probiotika

U svrhu kategorizacije određene supstance u skupinu probiotika važno je da sadrži određene kriterije kao što su GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) status, ne smije sadržavati nečistoće, potrebno je odrediti odgovarajuću dozu i potencijalne nuspojave prilikom konzumiranja probiotika, te ne smije poremetiti crijevnu mikrobiotu i negativno utjecati na domaćina. Održivost probiotika ima ključnu ulogu u njihovoj funkcionalnosti jer nakon konzumacije, probiotik treba preživjeti lizozim koji je sastavi dio sline u usnoj šupljini, kiselu sredinu u želucu i žučne kiseline u dvanaesniku. Prema tome, probiotike je potrebno testirati i provjeriti preživljavaju li niske pH vrijednosti (Corcionivoschi i sur., 2010).

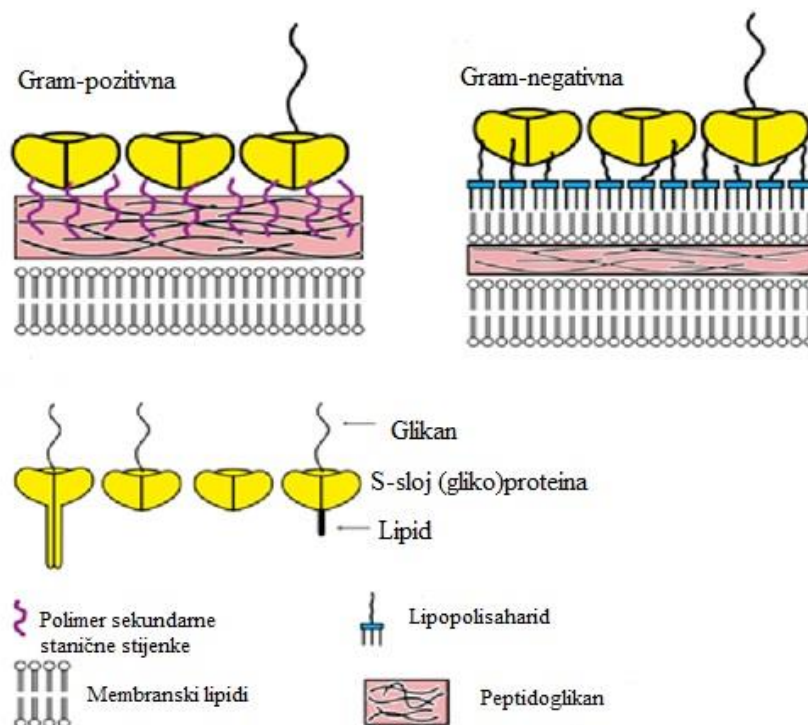
Kada se probiotici koriste u tehnološkoj proizvodnji važno je da imaju genetičku stabilnost, jednostavnu moć proizvodnje visoke koncentracije biomase, stabilnost i održivost tijekom različitih procesa proizvodnje i distribucije te stabilnost prilikom skladištenja. Stabilnost se često narušava prilikom proizvodnje prehrambenih proizvoda, transporta i skladištenja što ne doprinosi pozitivnom učinku probiotika jer je dokazano da samo prisutnost živih mikroorganizama u visokom broju ima pozitivan utjecaj na zdravlje. Iz prethodno navedenih razloga predloženo je koncentracija od 10^6 CFU/g probiotičkih stanica prilikom konzumacije (Mitropoulou i sur., 2013).

2.3. S-PROTEINI

2.3.1. Građa i funkcija S-sloja kod bakterija

S-sloj kod bakterija predstavlja dvodimenzionalnu površinsku strukturu koja se sastoji od proteinskih podjedinica. S-sloj je najčešće analizirana površinska struktura jer je gotovo univerzalna jedinica kod bakterijskih vrsta. Sastoji se od proteina koji se nazivaju S-proteini

te čine otprilike 10 % od ukupnih proteina bakterijske stanice. Evolucijski gledajući S-sloj predstavlja jednu od najjednostavnijih struktura, a shematski prikaz S-sloja prikazan je na slici 1. S-sloj ima važnu ulogu u preživljavanju stanica zahvaljujući brojnim funkcijama kao što su održavanje integriteta stanica, interakcija s enzimima i patogenima što u konačnici omogućuje interakciju patogena sa stanicom domaćina te posljedično i do pojave imunološke reakcije (Fagan i Fairweather, 2014).



Slika 1. Shematski prikaz supramolekulske strukture prokariotske stanice koja sadrži S-sloj (Sleytr i sur., 2014)

Kod Gram-pozitivnih bakterija S-sloj (gliko)proteina povezan je sa slojem peptidoglikana pomoću polimera sekundarne stanične stijenke. Kod Gram-negativnih bakterija S-sloj povezan je s lipopolisaharidima vanjske membrane.

2.3.2. S-proteini kod bakterijske vrste *Levilactobacillus brevis*

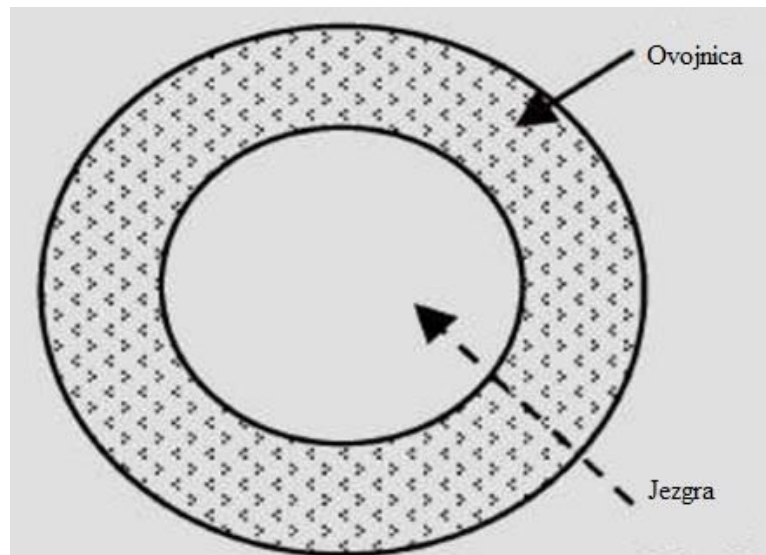
Levilactobacillus brevis je Gram-pozitivna, štapićasta, heterofermentativna bakterija mliječne kiseline. Najčešće se koristi u proizvodnji fermentirane hrane, ali određeni sojevi ove vrste pokazuju i probiotička svojstva te samim time i pozitivno utječu na crijevnu mikrobiotu i zdravlje domaćina.

Levilactobacillus brevis sadrži S-sloj te samim time i S-proteine koji su sastavni dio S-

sloja. Određena istraživanja ukazuju na potencijalne probiotičke i biotehnološke karakteristike S-proteina. Ekspresija S-proteina kod bakterija ove vrste može biti modulirana rastom ili stresnim uvjetima. S-proteini koje sintetiziraju bakterije *L. brevis* vrste pokazuju posebne funkcionalne i strukturne karakteristike. Uspoređivanjem nekoliko S-proteina utvrđeno je da imaju jako slične N-terminalne regije, dok se C-terminalne regije znatno razlikuju. C-terminalni dio proteina sudjeluje u procesu samoformiranja proteinskih podjedinica u S-sloj, a N-terminalni dio sadrži domenu koja služi za povezivanje sa staničnom stijenkom. U usporedbi s ostalim *Lactobacillus* S-proteinima, domene N-terminalne regije S-proteina iz bakterija vrste *Levilactobacillus brevis* nalaze se u obrnutom redoslijedu. S-proteini iz ove skupne također imaju interakciju i s neutralnim polisaharidima. C-terminalni dio S-proteina koji formira S-sloj dokazano je otporan na enzimsku razgradnju i na uvjete gastrointestinalnog trakta. Određena istraživanja pokazala su da kod specifični S-proteini *L. brevis* sojeva imaju ulogu u inhibiciji bakterijskih infekcija i u modulaciji proizvodnje citokina kod dendritičkih stanica. Činjenica da S-proteini čine visoki udio ukupnih proteina bakterijske stanice te njihova jednostavna mogućnost izolacije omogućuje njihovu potencijalnu upotrebu u dizajniranju novih lijekova (Mazzeo i sur., 2022).

2.4. MIKROINKAPSULACIJA

Mikroinkapsulacija je proces u kojem su sitne čestice ili kapljice obložene ovojnicom od različitih polimernih materijala što u konačnici rezultira stvaranjem malih kapsula u cilju izolacije i zaštite od vanjskog okruženja. Sitne čestice ili kapljice čine jezgru mikrokapsule, a vanjski dio mikrokapsula naziva se ovojnica (slika 2). Osim što pruža zaštitu također služi za maskiranje organoleptičkih svojstava kao što su miris, okus i boja, omogućuje kontrolirano otpuštanje supstancija iz lijekova kako bi lijek djelovao na ciljano područje, omogućuje i sigurno rukovanje toksičnim materijalima te smanjuje efekt iritacije želučane sluznice prilikom konzumacije određenih lijekova. Pod metode mikroinkapsuliranja spadaju polimerizacija na granici faza, *in situ* polimerizacija, fazna separacija, kompleksna koacervacija, sušenje raspršivanjem, zamrzavanje raspršivanjem i naslojavanjem u komorama (Jyothi i sur., 2010).



Slika 2. Shematski prikaz mikro kapsule (Jyothi i sur., 2012)

Mikroinkapsulacija mikroorganizama ključna je u biotehnologiji, a posebno kod bakterija mliječne kiseline jer omogućuje preživljavanje ovih bakterija u gastrointestinalnom traktu. Preživljavanje mikroinkapsuliranih bakterija ovisi o bakterijskom soju, karakteristikama kapsule kao što su vrsta i koncentracija sloja koji prekriva čestice te veličini čestica (Nazzaro i sur., 2012).

2.4.1. Mikroinkapsulacija probiotika

Održivost probiotika može se poboljšati mikroinkapsulacijom. Zapravo glavna svrha mikroinkapsulacije probiotika je zaštita od kiselina, tj. teških uvjeta u gastrointestinalnom traktu. Mikročestice koje se nalaze u jezgri mikro kapsule ne smiju biti topljive u vodi kako bi zadržale svoju strukturu u početnom dijelu probavnog sustava. Mikročestice se postupno otpuštaju tijekom digestije. Najčešće korišteni polimeri koji su sastavni dio ovojnice su alginat, hitozan, karagenan, pektin, proteini sirutke, polilizin i škrob. Polimeri koji se koriste moraju biti prirodni, biokompatibilni, ekonomični i moraju imati GRAS status (Nazzaro i sur., 2012).

Uloga mikroinkapsuliranih probiotika i njihovo kontrolirano otpuštanje tijekom njihove konzumacije obećavajuća je alternativa za rješavanje problema u industrijama kao što je prehrambena. Glavni problem je preživljavanje probiotika, a kod rješavanja ovih problema najvažnije je pravilno odabrati materijale i tehnike mikroinkapsulacije (Anal i Singh, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Tijekom izrade ovog rada korišteni su sojevi bakterija mliječne kiseline koje pripadaju vrsti *Levilactobacillus brevis*, a izolirani su iz majčinog mlijeka. Korišteni bakterijski sojevi, *L. brevis* MB2 i MB20, dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK) te su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Prikaz bakterijskih sojeva korištenih u radu, uzetih iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB2	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB20	MRS, 37 °C, anaerobno

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće podloge za održavanje i uzgoj BMK:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biovit“, Italija), sastava (g L⁻¹ destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- MRS bujon („Biovit“, Italija) istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

3.1.3. Kemikalije

- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma“, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- bromfenol plavo, „Sigma“, SAD

- Coomassie Brilliant Blue, „Termo Fisher Scientific“, SAD
- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol 70 %, „Kemika“, Hrvatska
- etanol 96 %, „Kemika“, Hrvatska
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), „Sigma-Aldrich“, SAD
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- fruktooligosaharid (FOS), „Sigma Aldrich“, SAD
- galaktooligosaharid (GOS), „Biosynth“, Švicarska
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- kalcijev klorid, „Fluka“, Švicarska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev alginat, „Fluka“, Švicarska
- natrijev citrat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat (SDS), „Sigma“, SAD
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- obrano mlijeko u prahu, „Sigma Aldrich“, Švicarska
- pankreatin, „Fluka“, Švicarska
- pepsin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametilen), „Sigma“, SAD
- Tris-HCl, „Invitrogen“, SAD
- žučne soli, „Difco“, SAD
- β -merkaptotanol, „Sigma“, SAD

3.1.4. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- celulozna vata, „Lola Ribar“, Hrvatska

- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- igle, „B. Braun“, Njemačka
- kadica za elektroforezu, „Bio-Rad“, SAD
- kivete za centrifugiranje (15 mL, 50 mL), „Falcon“, Engleska
- lijevak, „Normax“, Portugal
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, Engleska
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio- Rad“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pincete, „Isolab“, Njemačka
- plastične tubice od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- stalci za ependorfice, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- sterilna gaza, „Konstill“, Slovenija
- šprice, „Chirana“, Slovačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2. METODE

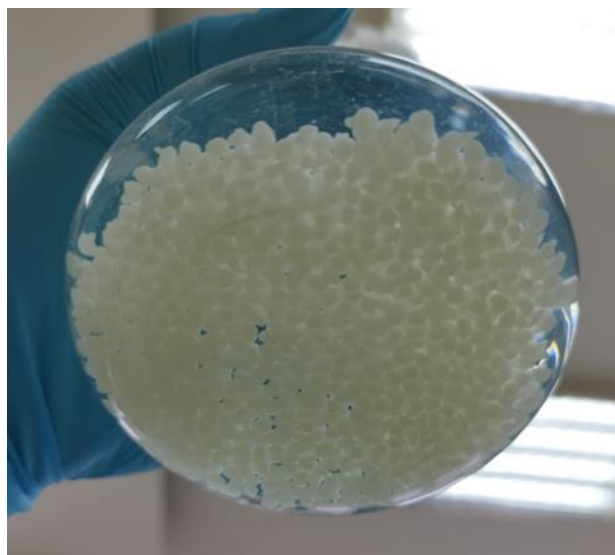
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj

podlozi uz dodatak 15 % (v v⁻¹) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi BMK su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 2.

3.2.2. Mikroinkapsulacija sojeva *L. brevis* u natrijevom alginatu

Prekonočno uzgojene kulture sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 uzgojene su propagacijom u MRS bujonu do volumena od 300 mL pri 37 °C u anaerobnim uvjetima. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o min⁻¹, a zatim isprane dva puta s 15 mL fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.7., resuspendiran u 15 mL 2 %-tne (w v⁻¹) otopine natrijeva alginata. Suspenzija bakterijskih stanica i alginata je, uz pomoć šprice i igle, ispuštena u 200 mL 1 %-tne otopine kalcijeva klorida uz miješanje na magnetnoj miješalici kako bi se formirale mikrokapsule (slika 3). Kuglice su ostavljene 1 sat na magnetskoj miješalici da očvrstnu, nakon čega je slijedilo ispiranje, pomoću lijevka i sterilne gaze, dva puta s fiziološkom otopinom i određivanje broja mikroinkapsuliranih stanica, nakon oslobađanja iz mikrokapsula pomoću 2 %-tnog (w v⁻¹) natrijevog citrata i vorteksiranja, indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.



Slika 3. Prikaz bakterijskih stanica mikroinkapsuliranih u alginatu

Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (engl. *encapsulation yield, EY*), odnosno broj živih stanica prije i poslije mikroinkapsulacije izračunat je prema dolje navedenoj

formuli, gdje je N broj živih mikroinkapsuliranih stanica, a N₀ broj slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks (alginat):

$$EY = \frac{N}{N_0} \cdot 100$$

3.2.3. Mikroinkapsulacija sojeva *L. brevis* u natrijevom alginatu uz dodatak prebiotika (FOS i GOS)

Kako bi se potencijalno povećala sposobnost preživljavanja mikroinkapsuliranih stanica sojeva *L. brevis* MB2 i MB20, provedena je mikroinkapsulacija na način kako je opisano u poglavlju 3.2.2., ali uz dodatak prebiotika fruktooligosaharida i galaktooligosaharida u konačnoj koncentraciji od 5 % (w v⁻¹). Kao kontrola su korišteni mikroinkapsulirani sojevi MB2 i MB20 bez dodatka navedenih prebiotika.

Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (EY) uz dodatak prebiotika izračunat je prema formuli navedenoj u poglavlju 3.2.2.

3.2.4. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica sojeva *L. brevis* uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora

1 gram mikroinkapsuliranih stanica sojeva MB2 i MB20 je odvagano u penicilinke te je dodano obrano mlijeko koji služi kao lioprotektor. Nakon smrzavanja na -80 °C, uzorci su liofilizirani. Takve liofilizirane mikrokapsule su tretirane s 2 %-tnim (w v⁻¹) natrijevim citratom kako bi se oslobodile stanice, a broj živih stanica nakon liofilizacije je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.7.

Broj živih stanica nakon liofilizacije te nakon 2 mjeseca skladištenja određen je indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.7., s prethodnim otpuštanjem stanica iz mikrokapsula dodatkom 2 %-tnog (w v⁻¹) natrijevog citrata.

3.2.5. Preživljavanje mikroinkapsuliranih bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

3.2.5.1. Priprema simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g L⁻¹) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,5 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom.

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g L⁻¹) i žučnih soli (3,0 mg mL⁻¹ goveđe žuči) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijeva klorida, kojoj

je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

3.2.5.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje mikroinkapsuliranih stanica sojeva *L. brevis*

Uzorci sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 mikroinkapsulirani te liofilizirani prema postupcima opisanim u poglavljima 3.2.2., 3.2.3. i 3.2.4., tretirani su s 3 mL simuliranog želučanog soka kroz 2 h na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 5 min pri 4200 o min⁻¹, a talog je resuspendiran u 3 mL fiziološke otopine. Nakon toga, dio suspenzije je uzet za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u želučanom soku, dok je ostatak suspenzije centrifugiran 5 min pri 4200 o min⁻¹. Talog je resuspendiran u 3 mL simuliranog soka tankog crijeva te inkubiran pri 37 °C tijekom 4 sata, nakon čega je dio suspenzije korišten za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u tankom crijevu. Broj stanica je određen indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7., s tretmanom mikrokapsula s 2 %-tnim (w v⁻¹) natrijevim citratom kako bi se oslobodile stanice.

3.2.6. Ispitivanje stabilnosti S-proteina tijekom prolaska liofiliziranih mikrokapsula kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta primjenom SDS-PAGE

Mikrokapsule dobivene prema postupcima opisanim u poglavljima 3.2.2. i 3.2.3. su, nakon liofilizacije (opisano u poglavlju 3.2.4.) i prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a (opisano u poglavlju 3.2.8.), razbijene tretmanom s 2 %-tnim (w v⁻¹) natrijevim citratom kako bi se oslobodile stanice te kako bi se s oslobođenih stanica ekstrahirali površinski proteini i analizirali primjenom natrij dodecil sulfat-poliakrilamidnog gel elektroforezom (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*). Nakon tretmana s 2 %-tnim (w v⁻¹) natrijevim citratom, uzorci su centrifugirani (5 min pri 4200 o min⁻¹), a dobiveni talozi stanica su isprani dva puta s destiliranom vodom i resuspendirani u 50 µL 2 %-tne otopine SDS-a. Tako priređeni uzorci su prokuhani 10 min te centrifugirani (5 min pri 4200 o min⁻¹). 20 µL supernatanata, u kojima su prisutni proteini, naneseo je u jažice unaprijed pripremljenog poliakrilamidnog (10 % (v v⁻¹)) gela. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 150 V tijekom 1,5 h. Kao standard je korišten ProSieve QuadColor Protein Marker koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu 4,6-315 kDa. Nakon završene elektroforeze, gel je

inkubiran u otopini za bojanje (0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) 2 h, a zatim u otopini octene kiseline (10 % (v v⁻¹)) do obezbojenja pozadine.

Priprava donjeg gela (dovoljno za 4 gela):

Tris-HCl	5 mL
Akrialmid	6 mL
dH ₂ O	5 mL
TEMED	10 µL
APS	76 µL

Priprava gornjeg gela (dovoljno za 4 gela):

Tris-HCl	6,39 mL
Akrialmid	0,9 mL
dH ₂ O	-
TEMED	15 µL
APS	67,5 µL

Priprema 10x konc. pufera za elektroforezu (1000 mL):

30 g Tris
144 g glicin
10 g SDS

3.2.7. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Broj živih bakterija određen je indirektnom metodom tako da su priređena decimalna razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u sterilnoj fiziološkoj otopini naciyepljena na MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37 °C, izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica (engl. *Colony Forming units, CFU*) po mililitru uzorka.

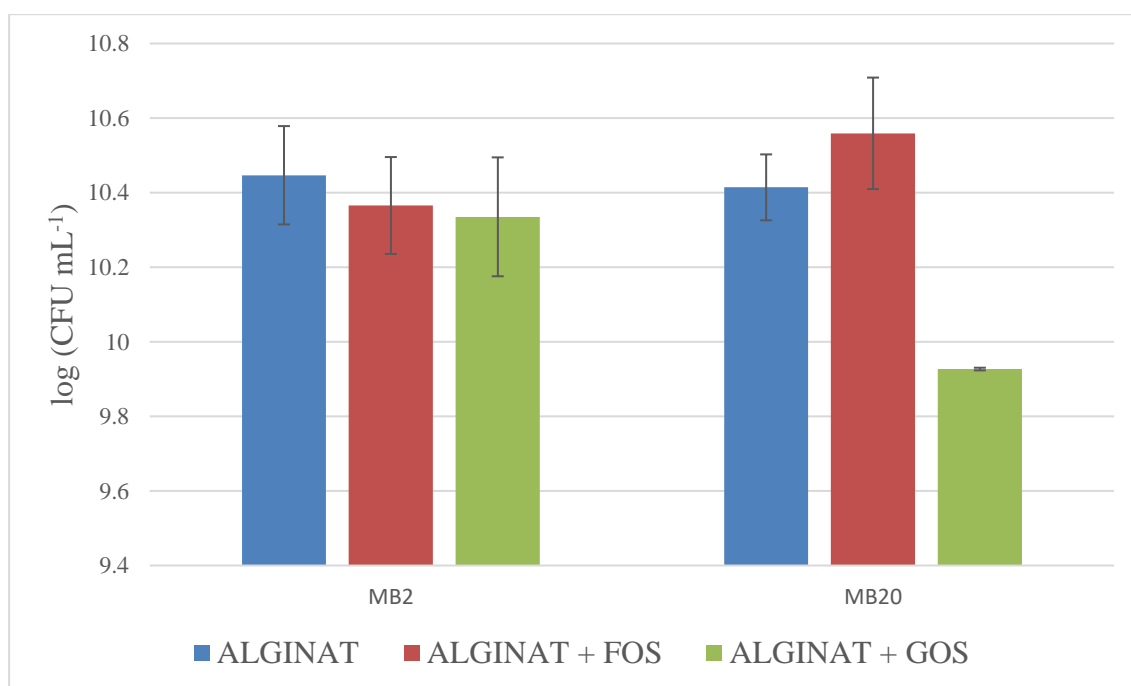
3.2.8. Obrada rezultata

Svi pokusi provedeni su u 3 paralele nakon čega je u programu Microsoft Excel napravljena statistička analiza čime je određena srednja vrijednost te standardna devijacija koja je prikazana na grafovima. Izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija prikazane su na grafovima.

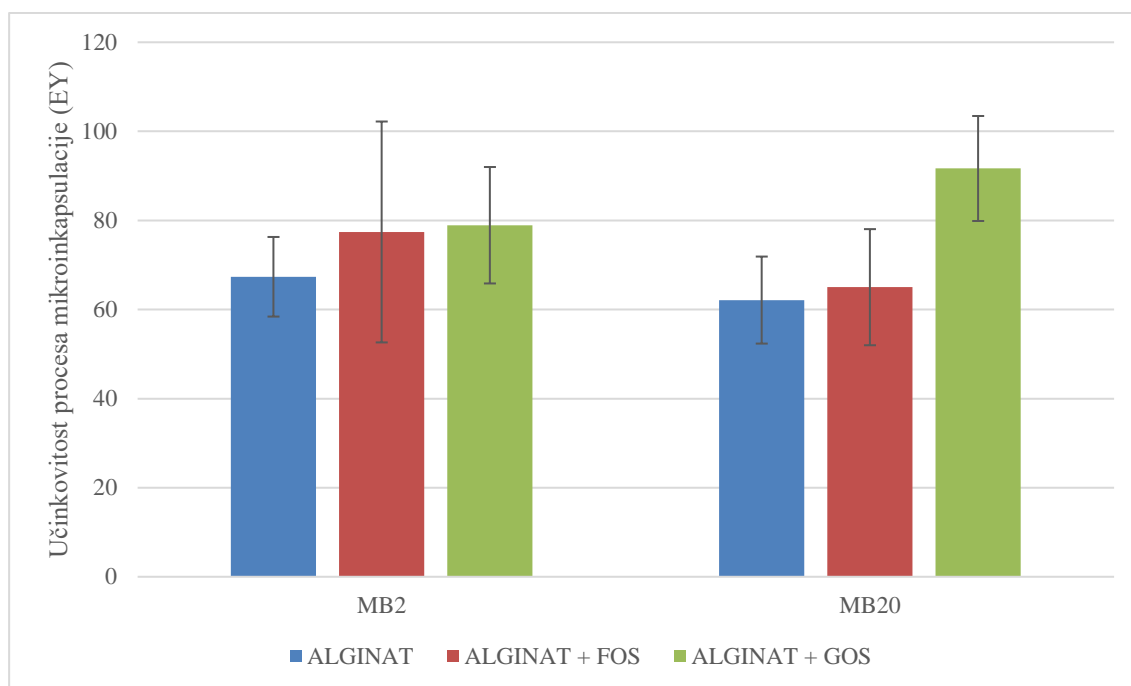
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Mikroinkapsulacija *L. brevis* sojeva u natrijevom alginatu i u alginatu uz dodatak prebiotika (FOS i GOS)

Bakterijske stanice sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 mikroinkapsulirane su u alginatu i u alginatu uz dodatak prebiotika (FOS i GOS). Alginat je jedan od najčešćih biomaterijala koji se koristi u mikroinkapsulaciji. Najčešće se koristi samostalno, ali i u kombinaciji s drugim komponentama kao što su prebiotici (Colom i sur., 2017). Broj poraslih kolonija prije mikroinkapsulacije prikazan je na slici 4 kao log (CFU mL⁻¹). Nakon provedene mikroinkapsulacije izračunata je učinkovitost procesa mikroinkapsulacije prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Na slici 5 prikazani su rezultati učinkovitosti procesa mikroinkapsulacije za alginat, što je ujedno i kontrola, alginat i FOS te alginat i GOS. Analizirajući rezultate može se uočiti da je učinkovitost procesa najveća kod mikroinkapsulacije u alginatu uz dodatak GOS-a.



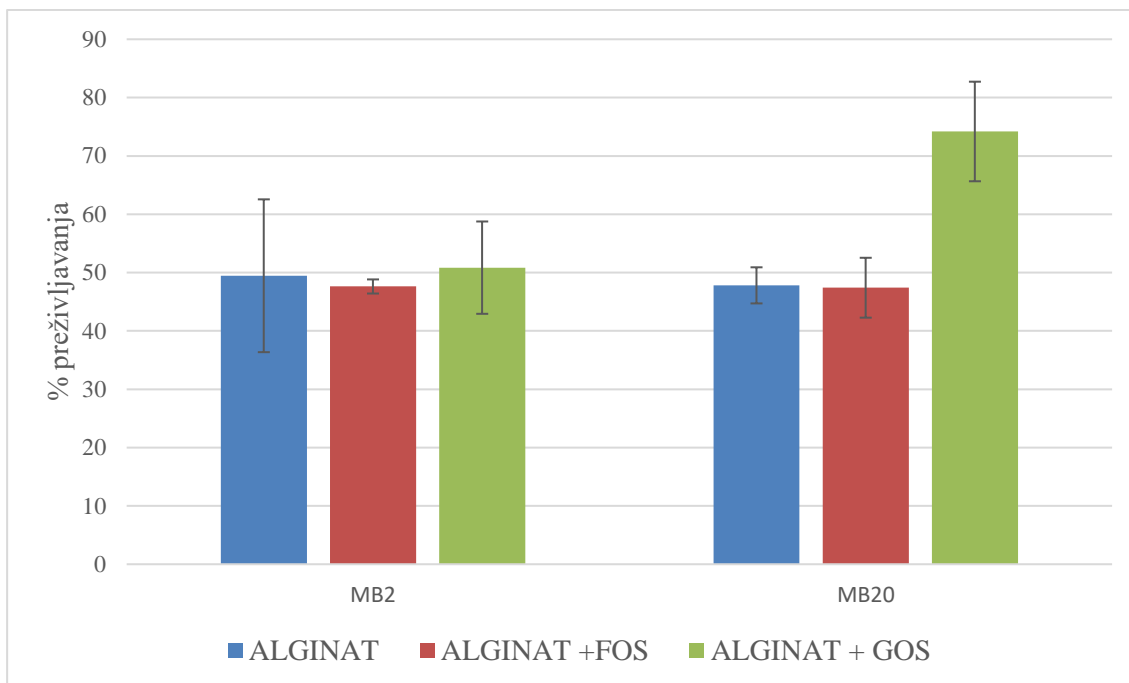
Slika 4. Početan broj kolonija bakterijskih sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 (prije mikroinkapsulacije), izražen kao logaritamska vrijednost CFU mL⁻¹



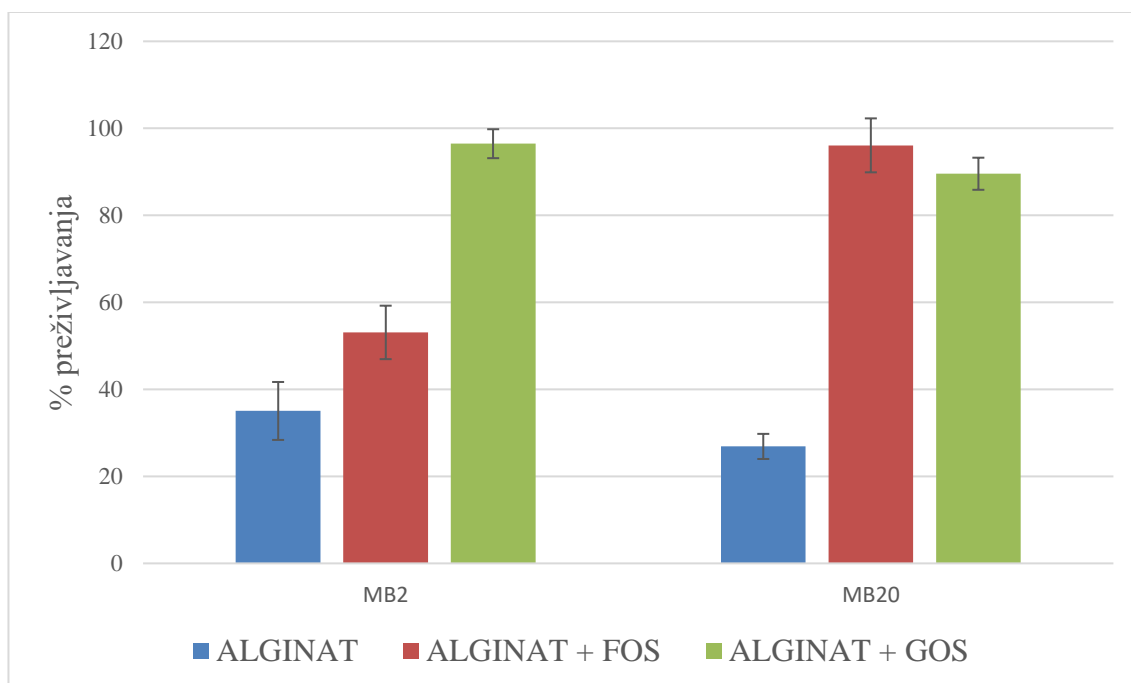
Slika 5. Usporedba učinkovitosti procesa mikroinkapsulacije (EY) sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 u alginatu (kontrola), alginatu uz dodatak FOS-a i alginatu uz dodatak GOS-a

4.2. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica *L. brevis* sojeva uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora

Liofilizacija je metoda uklanjanja vode iz uzorka pri niskoj temperaturi i vakuumu. Koristi se kako bi se povećala stabilnost uzorka i reducirao volumen što u konačnici omogućuje lakše skladištenje uzoraka. Također olakšava transport jer ne dolazi do gubitka aktivnosti (Kawasaki i sur., 2019). Bakterijski sojevi *L. brevis* MB2 i MB20 nakon procesa mikroinkapsulacije podvrgnuti su procesu liofilizacije uz dodatak mlijeka kao lioprotektora. Na slici 6 prikazani su rezultati kao postotak preživljavanja mikroinkapsuliranih stanica, nakon procesa liofilizacije. Na temelju prikazanih rezultata može se zaključiti da je postotak preživljavanja najveći kod mikroinkapsuliranih stanica u alginatu uz dodatak GOS-a. Uspoređujući s kontrolom, koja predstavlja mikroinkapsulirane stanice u alginatu bez dodatka prebiotika i uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora u procesu liofilizacije, može se zaključiti da dodatak adekvatnog prebiotika, u ovom slučaju GOS-a, može povećati postotak preživljavanja mikroinkapsuliranih stanica prilikom procesa liofilizacije. Postotak preživljavanja dva mjeseca nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije prikazan je na slici 7.



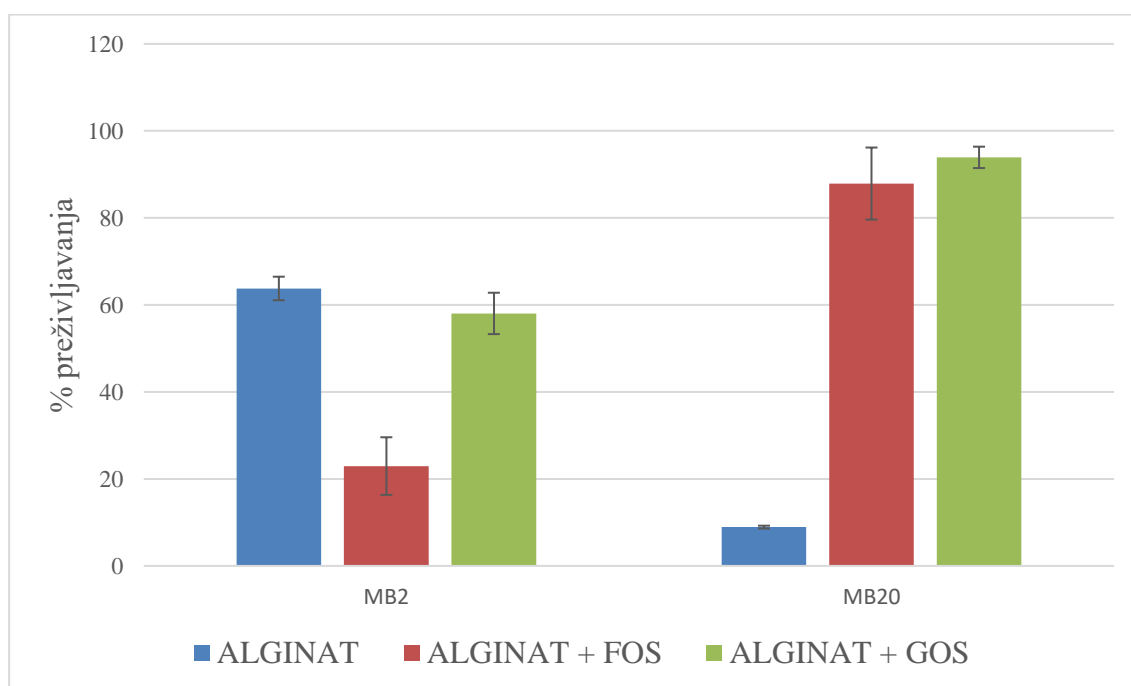
Slika 6. Usporedba preživljavanja mikroinkapsuliranih probiotičkih sojeva *L. brevis* MB2 i MB20, nakon procesa liofilizacije uz dodatak mlijeka kao lioprotektora



Slika 7. Usporedba preživljavanja mikroinkapsuliranih probiotičkih sojeva *L. brevis* MB2 i MB20, dva mjeseca nakon procesa liofilizacije uz dodatak mlijeka kao lioprotektora

4.3. Preživljavanje mikroinkapsuliranih bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

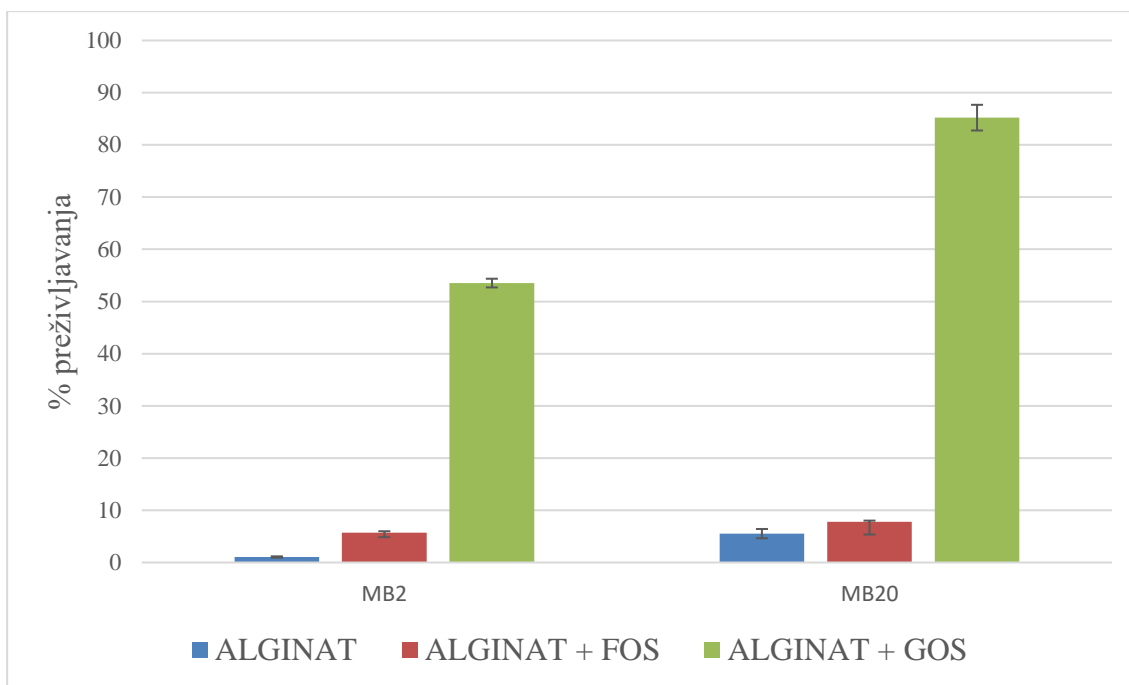
Nakon provedene mikroinkapsulacije i liofilizacije bakterijskih sojeva *L. brevis* MB2 i MB20, mikroinkapsulirani uzorci tretirani su simuliranim uvjetima želučanog soka i simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva, tj. cijelim gastrointestinalnim traktom. Cilj mikroinkapsulacije je stvaranje dodatne zaštite te postizanje većeg stupanja preživljavanja mikrokapsula nakon konzumacije s obzirom na uvjete gastrointestinalnog trakta. Na slici 8 prikazani su rezultati preživljavanja bakterijskih sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije te nakon inkubacije u simuliranim uvjetima želučanog soka. Dobiveni rezultati pokazuju da prisutnost prebiotika (FOS i GOS) povećava postotak preživljavanja tako da pružaju dodatnu zaštitu prilikom izlaganja simuliranim uvjetima želučanog soka.



Slika 8. Usporedba preživljavanja bakterijskih sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije te nakon inkubacije u simuliranim uvjetima želučanog soka

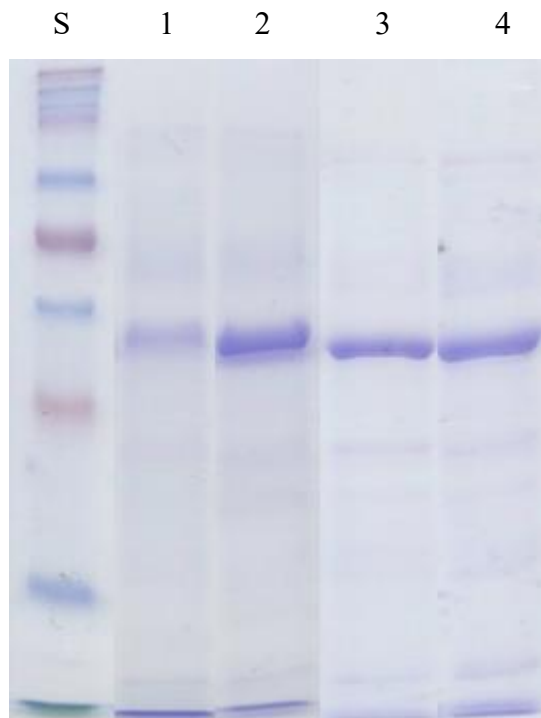
Rezultati liofiliziranih mikroinkapsuliranih uzoraka koji su tretirani simuliranim uvjetima cijelog gastrointestinalnog trakta (želučani sok i sok tankog crijeva) prikazani su na slici 9. Rezultati pokazuju manji postotak preživljavanja, posebnog kod kontrole (uzorci

mikroinkapsulirani u alginatu bez dodatka prebiotika), u usporedbi s postotkom preživljavanja kod simuliranih uvjeta želučanog soka. Uspoređujući rezultate preživljavanja u simuliranim uvjetima želučanog soka i simuliranim uvjetima GIT-a može se zaključiti da prebiotici (FOS i GOS) imaju značajnu ulogu u preživljavanju mikroinkapsuliranih stanica.



Slika 9. Usporedba preživljavanja bakterijskih sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije te nakon inkubacije u simuliranim uvjetima cijelog gastrointestinalnog trakta (želučani sok i sok tankog crijeva)

Za ispitivanje stabilnosti S-proteina tijekom prolaska liofiliziranih mikrokapsula kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta korištena je SDS-PAGE. Rezultati na primjeru soja *L. brevis* MB20 su prikazani na slici 10. Na slici su vidljive vrpce koje ukazuju na prisutnost S-proteina u uzorcima.



Slika 10. SDS-PAGE na primjeru soja *L. brevis* MB20, S - standard, 1- *L. brevis* MB20 (P), 2- *L. brevis* MB20 (\emptyset , 3), 3- *L. brevis* MB20 (FOS, 3), 4- *L. brevis* MB20 (GOS, 3), P - početno (soj prije inkapsulacije), \emptyset - alginat, 3 sojevi nakon mikroinkapsulacije, liofilizacije i GIT-a

5. ZAKLJUČCI

1. Uspješnost procesa mikroinkapsulacije sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 u natrijevom alginatu uz dodatak prebiotika (FOS i GOS) veća je u usporedbi s procesom mikroinkapsulacije u alginatu bez dodatka prebiotika.
2. Dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora povećava postotak preživljavanja mikroinkapsuliranih sojeva u procesu liofilizacije.
3. Stanice sojeva *L. brevis* MB2 i MB20 koje su mikroinkapsulirane u alginatu uz dodatak prebiotika, te liofilizirane uz dodatak lioprotektora pokazale su veći postotak preživljavanja u simuliranim uvjetima želučanog soka i simuliranim uvjetima cijelog GIT-a u usporedbi sa stanicama mikroinkapsuliranim samo u alginatu.
4. SDS-PAGE metodom je utvrđena prisutnost S-proteina u mikrokapsulama.

6. POPIS LITERATURE

Akutko K, Stawarski A (2021) Probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel diseases. *J Clin Med* **10**, 2466. <https://doi.org/10.3390/jcm10112466>

Anal AK, Singh H (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Technol* **18**, 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>

Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R, i sur. (2020) Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy* **1**, 202–232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>

Bintsis T (2018) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol* **4**, 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>

Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Arriñez-Soriano J, Cortés P, MasPOCH D, i sur. (2017) Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Sci Rep* **7**, 41441. <https://doi.org/10.1038/srep41441>

Corcionivoschi N, Drinceanu D, Stef L, Luca I, Julean C (2010) Probiotics-identification and ways of action. *Innov Rom Food Biotechnol* **6**, 1. <https://www.researchgate.net/publication/242581351>

Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJM, Relman DA (2012) The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science (1979)* **336**, 1255–1262. <https://doi.org/10.1126/science.1224203>

Fagan RP, Fairweather NF (2014) Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol* **12**, 211–222. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3213>

Hayek SA, Ibrahim SA (2013) Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr Sci* **04**, 73–87. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.411a010>

Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* **73**, 365-373. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.365s>

Jyothi NVN, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabha KS, Ramaiah PS, Srawan GY (2010) Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul* **27**, 187–197. <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>

Jyothi SS, Seethadevi A, Prabha KS, Muthuprasanna P, Pavitra P (2012) Microencapsulation: a review. *Int J Pharm Biol Sci* **3**, 509-531. www.ijpbs.net

K Gogineni V, Morrow LE (2013) Probiotics: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *J Probiotics Health* **1**, 1-11. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000101>

Kawasaki H, Shimanouchi T, Kimura Y (2019) Recent Development of Optimization of Lyophilization Process. *J Chem*, **2019**, 9502856. <https://doi.org/10.1155/2019/9502856>

Khalid K (2011) An overview of lactic acid bacteria *Int J Biosci* **1**, 1–13.

Łubiech K, Twarużek M (2020) Lactobacillus bacteria in breast milk. *Nutrients* **12**, 1–13. <https://doi.org/10.3390/nu12123783>

Martyniak A, Medyńska-Przęczek A, Wędrychowicz A, Skoczeń S, Tomasiak PJ (2021) Prebiotics, probiotics, synbiotics, paraprobiotics and postbiotic compounds in IBD. *Biomolecules* **11**, 1903. <https://doi.org/10.3390/biom11121903>

Mazzeo MF, Reale A, Di Renzo T, Siciliano RA (2022) Surface Layer Protein Pattern of *Levilactobacillus brevis* Strains Investigated by Proteomics. *Nutrients* **14**, 3679. <https://doi.org/10.3390/nu14183679>

Mitropoulou G, Nedovic V, Goyal A, Kourkoutas Y (2013) Immobilization technologies in probiotic food production. *J Nutr Metab* **2013**, 716861. <https://doi.org/10.1155/2013/716861>

Mokoena MP (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules* **22**, 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

Nazzaro F, Orlando P, Fratianni F, Coppola R (2012) Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **23**, 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001>

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D (2014) S-layers: Principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 823–864. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12063>

Yao M, Xie J, Du H, McClements DJ, Xiao H, Li L (2020) Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **19**, 857–874. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12532>

Izjava o izvornosti

Ja Kristina Dučkić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis