

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Katarina Prskalo

6932/BT

Analiza preživljavanja probiotičkih sojeva u guar gelu

Završni rad

Znanstveno-istraživački projekt: Personalizirani probiotički pripravci

Mentor: doc.dr.sc. Jurica Žučko

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo

Kabinet za bioinformatiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Analiza preživljavanja probiotičkog soja u guar gelu

Katarina Prskalo, 0058205469

Sažetak:

Konsumacijom probiotičkih sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Bifidobacterium animalis* subs. *lactis* Bb12 promovira se ljudsko zdravlje i oplemenjuje se crijevna mikroflora. Probiotici se uobičajeno konzumiraju kao dodaci prehrani, ali u ovom istraživanju će se ispitivati preživljavanje probiotičkih sojeva u guar gelu za rektalnu primjenu. Guar gel služi kao nosač bakterijskih stanica te je provedena analiza gelova različitih koncentracija guara kako bi se odredila optimalna koncentracija. Probiotički sojevi čuvaju se na 4 °C te nakon 10 i 30 dana mjeri se broj vijabilnih stanica.

Ključne riječi: guar gel, mikrobiota, polimeri, preživljavanje bakterija, probiotik

Rad sadrži: 22 stranica, 9 slika, 1 tablicu, 21 literaturnih navoda, 0 priloga

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: doc.dr.sc. Jurica Žučko

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Ksenija Uroić, dr. sc. Damir Oros

Datum obrane: 18. rujna, 2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical engineering

Section for Bioinformatics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Biotechnology

Survival analysis of a probiotic strains in guar gel

Katarina Prskalo, 0058205469

Abstract:

Lactobacillus plantarum D13 and *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 are probiotic bacteria that promote health and enrich the colonic microbiome. Probiotics are usually consumed through food supplements but this analysis will test survivability of probiotic strains in guar gum for rectal application. Guar gum is used as a matrix for probiotics and to determine the optimal concentration of guar this analysis will include testing gels with different concentrations of guar gum. Probiotic strains are kept on 4 °C and after 10 and 30 days number of viable cells is measured using plate counting method.

Keywords: guar gel, microbiota, polymer, bacteria survival, probiotic

Thesis contains: 22 pages, 9 figures, 1 table, 21 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Jurica Žučko

Technical support and assistance: doc. dr. sc. Ksenija Uroić, dr. sc. Damir Oros

Defence date: 18th of September, 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJA	2
2.1. Probiotici	2
2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	3
2.3. <i>Bifidobacterium animalis</i> subs. <i>lactis</i>	4
2.4. Prebiotici	4
2.5. Nutriose ® FB06	5
2.6. Gelovi	6
2.7. Guar gel	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Kemikalije korištene za pripremu gela	8
3.2. Mikroorganizmi	8
3.3. Sastav podloga za uzgoj mikroorganizma	8
3.4. Pribor	10
3.5. Određivanje optimalne koncentracije guar brašna u gelu	11
3.6. Analiza preživljavanja probiotičkih bakterija	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Određivanje koncentracije guar brašna	14
4.2. Analiza preživljavanja probiotičkih bakterija u guar gelu	16
5. ZAKLJUČAK	19
6. LITERATURA	20

1. UVOD

Mikrobiom definiramo kao skup različitih mikroorganizama koji se nalaze u nekom okolišu. Ljudsko tijelo je ekosustav koji se sastoji od različitih mikrobioma kao što je npr. crijevni mikrobiom ili kožni mikrobiom (Marchesi i sur., 2015). Disbioza je zdravstveno stanje koje je karakterizirano mikrobiološkim disbalansom u odnosu na zdrave individualce te je povezana sa zdravstvenim problemima kao što su alergije, upalne bolesti crijeva i rak (Karkman i sur., 2017). Nije još potpuno jasno da li je disbioza uzrok ili posljedica raznih bolesti te je zahtjevno istraživati tu vezu kod ljudi, ali laboratorijski eksperimenti na modelnim životinjama pokazuju upravo to da je disbioza uzrok mnogim bolestima (Karkman i sur., 2017). Transplantacijom fekalnog materijala zdravih pojedinaca se znatno povisila inzulinska osjetljivost što upućuje da je mikrobiološki sastav povezan i s pretilošću odnosno metaboličkim sindromom (Marchesi i sur., 2015). Sastav, dinamika rasta, funkcija i metaboliti mikrobioma utječu na imunološki sustav i metabolizam koja posljedično upravljaju manifestaciju metaboličkog sindroma. Konzumacija probiotičkih sojeva i prebiotika se smatra da ima pozitivan efekt na crijevni mikrobiom. Iako studije pokazuju razne djelotvorne efekte probiotika ta istraživanja nisu uniformno reproducibilna. S obzirom na to da svaki čovjeka ima jedinstven mikrobiom moguće je da svaki čovjek može drugačije reagirati na probiotik (Shapiro, Suez i Elinav, 2016). U istraživanju mikrobioma pacijenata s metaboličkim sindromom nakon konzumacije probiotika ustvrđeno je da su se dogodile modulacije u mikrobiomu te je sastav mikrobioma sličniji zdravim individualcima. Ovakvi rezultati upućuju na moguću upotrebu probiotika u terapijske svrhe u liječenju disbioze odnosno metaboličkog sindroma (Butel i Waligora-Dupriet, 2016).

Jedna od karakteristika probiotičkih sojeva je da su sposobni preživjeti uvjete u gastrointestinalnom sustavu kao što su prisutnost želučane kiseline i žučne kiseline dok ne dođu do mjesta djelovanja, što je najčešće debelo crijevo (Butel i Waligora-Dupriet, 2016). Kako bi se izbjegla problematika preživljavanja probiotičkog soja kroz probavni sustav, istražuje se metoda direktnog unosa probiotičkog soja u debelo crijevo s time da je u ovom istraživanju probiotički soj imobiliziran u guar gelu.

Gelovi su polučvrsti sustavi koji se sastoje od organskih makromolekula otopljene u vodi (Crebelli, Oskarsson i sur., 2017). Guar gel se sastoji od polisaharida čiju okosnicu čini monosaharid manoz, a na svaku drugu molekulu manoze vezan je monosaharid galaktoza koja čini kratke bočne ogranke. Gelovi poput guara imaju sve veću primjenu u medicini i dijagnostici te se koristi u istraživanju novih metoda za isporuku lijekova (Kadajji i Betageri, 2011).

Comment [jz1]: zahtjevno?

Comment [K2]: Problematicno jer se u ljudima ne izaziva namjerno disbioza.

Comment [jz3]: ok

Comment [K4]: Nove recenzije

Comment [jz5]: malo vise o gelu...

Comment [K6]: Dodano -o gelu

2. TEORIJA

2.1. Probiotici

“Probiotik je jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina” (Šušković, 1996). Kako bi se neki bakterijski soj koristio kao probiotik mora zadovoljiti neke uvjete kao što je, već navedena, sposobnost preživljavanja u gastrointestinalnom sustavu. Osim toga probiotički soj mora imati dokazani pozitivan efekt na zdravlje i ne smije predstavljati nikakav rizik domaćinu (Butel i Waligora-Dupriet, 2016). Probiotici su uglavnom bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, ali i druge bakterije kao na primjer *Escherichia coli*, *Propionibacterium* i *Enterococcus*. Osim bakterija u skupinu probiotika spada i kvasac *Saccharomyces boulardi* (Butel i Waligora-Dupriet, 2016). Mehanizmi djelovanja probiotika nisu uvijek u potpunosti razjašnjeni te Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, European Food Safety Authority) odbija zdravstvene tvrdnje o djelovanju probiotika, a razlog tome je nedostatak dokaza (Butel i Waligora-Dupriet, 2016). Ima mnogo primjera kako razni probiotički sojevi djeluju protiv velikog opsega bolesti u životinjskim modelima dok su rezultati takvih istraživanja kod ljudi dvosmislena. Prilagođavanjem eksperimenata se dobivaju jasniji rezultati, a jedan od mogućih pristupa je da se istražuje specifičnost probiotičkog soja i njegov učinak na ljudsko zdravlje. Primjer eksperimenta s takvim pristupom u kojem se koristi soj *Lactobacillus reuteri*, koji hidrolizira žučne kiseline, pokazao je da dolazi do smanjenja razine kolesterola kod ljudi koji boluju od hiperkolesterolemije (Marchesi i sur., 2015). Druga istraživanja su dokazala da postoje značajne razlike između mikrobioma ljudi koji su iz različitih dijelova svijeta (Escobar i sur., 2014.) te se može zaključiti da će probiotički sojevi djelovati drukčije na pojedince sukladno s tim.

Comment [K7]: Smijem li citirati?

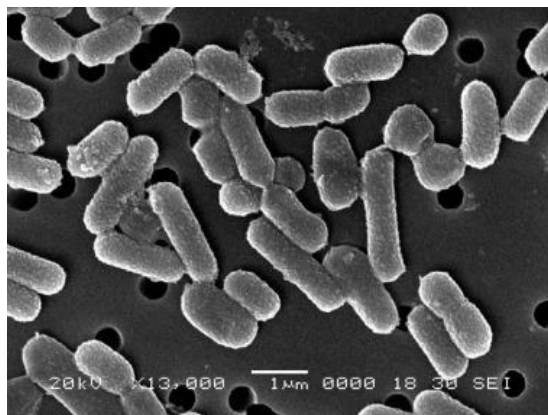
Mehanizmi djelovanja probiotika

1. Sprječavanje rasta egzogenih bakterija odnosno patogenih bakterija. Mehanizam uključuje inhibiciju rasta bakterija uslijed nastajanja metabolita probiotičkih bakterija. To mogu biti bakteriocini ili metaboliti koji snižuju pH.
2. Poboljšanje mukozne pregrade u crijevima koja sprječava direktan kontakt bakterija s epitelnim stanicama. Probiotici potiču signalizaciju za povećavanje mukoznog sloja i proizvodnju defensina.

3. Modulacije u imunološkom odgovoru. Prisutnost probiotika djeluje protuupalno.
4. Sinteza ekstracelularnih enzima kao što je beta-galaktozidaza. Time se ublažavaju simptomi pacijenata koji su intolerantni na laktozu (Butel i Waligora-Dupriet, 2016).

2.2. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum je gram pozitivna bakterija mliječne kiseline. Nalazi se u fermentiranim prehrambenim proizvodima i gastrointestinalnom traktu viših organizama (Valan Arsu, Al-Dhabi i sur., 2015). *Lactobacillus plantarum* ima sposobnost stvaranja kolonija u gastrointestinalnom traktu te je povezan s mnogim pozitivnim zdravstvenim efektima (de Vries, Vaughan i sur., 2006).

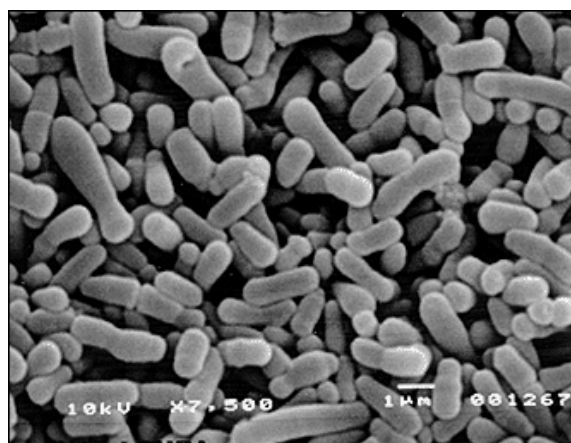


Slika 1. *Lactobacillus plantarum* (Valan Arsu, Al-Dhabi i sur., 2015)

Istraživanje je pokazalo da *Lactobacillus plantarum* u kombinaciji s borovnicama značajno smanjuje hipertenziju i krvni tlak. To ukazuje da se *Lactobacillus plantarum* može koristiti u svrhu smanjenja rizika od razvijanja kardiovaskularnih bolesti (Ahren i sur., 2014). Sasikumar i sur. (2014) navode da *Lactobacillus plantarum* ekspresijom gena oksalat dekarboksilaze značajno smanjuje koncentraciju kalcijevog oksalata u bubrezima time se smanjuje šansa razvijanja bubrežnog kamenca. Druga istraživanja pokazuju da primjenom živih ili termički umrtvljenih stanica *Lactobacillus plantarum* se atenuiraju simptomi Chronove bolesti i ulcerativnog kolitisa (Chiu i sur., 2013).

2.3. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Bifidobakterije su anaerobni, gram pozitivni i nesporogeni bacili. Često se nalaze u gastrointestinalnom traktu životinja i ljudi. Smatra se da bifidobakterije imaju pozitivan efekt na ljudsko zdravlje kada se konzumiraju kroz fermentiranu hranu, ali mehanizmi djelovanja bifidobakterija nije u potpunosti poznat (Solano-Aguilar, Dawson i sur., 2008).



Slika 2. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Istraživanje o pozitivnim efektima *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 pokazalo je da povećanjem populacije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 u debelom crijevu smanjuje broj patogenih bakterija poput enterokoka (Savard, Lamarche i sur., 2010).

2.4. Prebiotici

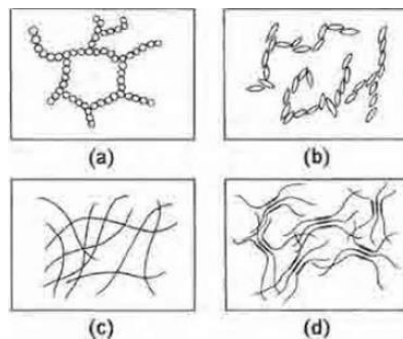
Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda definirala je prebiotik kao ne vijabilnu hranjivu komponentu koja promovira zdravlje tako da djeluje na mikrobiotu. Slično kao probiotik, prebiotik mora imati sposobnost prolaska kroz gastrointestinalni trakt, a da ne bude razgrađen te se ne smije apsorbirati u tankom crijevu. Ciljni organ je debelo crijevo, a ciljni mikroorganizmi su uglavnom vrste iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Prebiotici koji spadaju u skupinu dekstrina i potječu iz pšenice zajedno s drugim suplementima mogu utjecati na druge bakterijske vrste koje se povezuju s Chronovom bolešću (Butel i sur., 2016). U ovoj analizi preživljavanja probiotičkih sojeva u guar gelu za rektalnu primjenu koristi Nutriose® FB06 kao prebiotik.

2.5. Nutriose ® FB06

Prebiotik koji je derivat škroba, a po kemijskom sastavu je dekstrin. Topiv je u vodi i ne razgrađuje se u gastrointestinalnom sustavu. Potiče rast i efikasnost bakterija u debelom crijevu koja povoljno utječu na mikrobiotu, a time i na zdravlje (Guerin-Deremaux i sur., 2010).

2.6. Gelovi

Gelovi se definiraju kao polučvrsti sustav koji se sastoji od sitnih anorganskih čestica suspendiranih u vodi ili od organskih molekula velikih molekulskih masa otopljenih u vodi. Gelovi koji su sačinjeni od anorganskih čestica imaju dvije faze, a gelovi od organskih makromolekula imaju jednu fazu. Gelovi mogu biti potpuno prozirni ili mogu biti mutni. Koncentracija tvari koja tvori gel je obično manje od 10%, a najčešće su koncentracije u su od 0,5% do 2,0%. Rigidnost (krutost) gela ovisi o samoj prirodi tvari koja čini gel te vezama i interakcijama između čestica gela (Rathod i Mehta, 2015).



Slika 3. Struktura gela a) Struktura dvofaznog gela s flokuliranim česticama b) Struktura gela s izduljenim česticama c) Gusta vlaknasta struktura koja se koristi u gelastim sapunima d) Kristalne i amorfne regije u gelu od karboksimetilceluloze (Rathod i Mehta, 2015)

Tipovi interakcija među česticama koje čine gel mogu biti od vrlo čvrstih kovalentnih do slabijih Van der Waalsovih interakcija. Ako u gelu prevladavaju slabije interakcije, povećanje temperature uzrokuje likvefakciju gela (Rathod i Mehta, 2015).

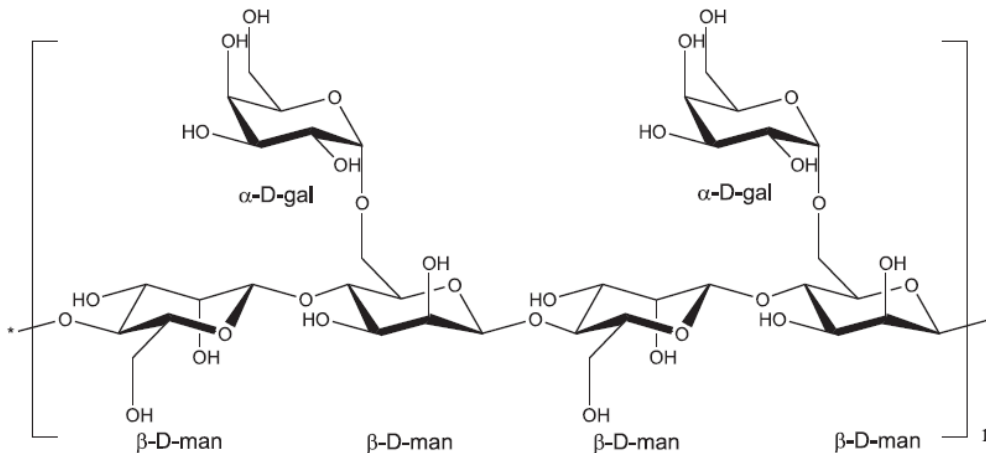
Organske molekule koje čine gelove su polimeri te mogu biti prirodni ili sintetski. Organski polimeri čine nitaste strukture koje se isprepliću te između njih prevladavaju Van der Waalsove interakcije (Rathod i Mehta, 2015).

Hidrogelovi su gelovi u kojima je otapalo voda te su načinjeni od hidrofilnih polimera. Takvi gelovi su fleksibilni zbog visokog udjela vode. Oni se mogu koristiti kao sustavi za isporuku lijekova s produženim otpuštanjem, za rektalnu isporuku lijekova i dijagnostiku, za proizvodnju leća (Rathod i Mehta, 2015), imobilizaciju i separaciju stanica (Hoare i Kohane, 2008). Hidrogelovi su biokompatibilni zbog visokog udjela vode i fizikalno-kemijske sličnosti ekstracelularnom matriksu (ako se radi o ugljikohidratnom gelu). Zbog toga ih se često koristi na živim organizmima jer se mogu razgraditi enzimski, hidrolitički ili uslijed povišene temperature (Hoare i Kohane, 2008).

2.7. Guar gel

Brašno guara dobiva se mljevenjem endosperma sjemenke guar biljke *Cyamopsis tetragonoloba*. Brašno guara sastoji se od ugljikohidrata, proteina, vode, vlakana i pepela. U guar brašnu je glavna komponenta galaktomanan koji je viskozozan polisaharid te je topiv u vodi (Crebelli, Oskarsson i sur., 2017). Okosnicu polisaharida čine jedinice manoze povezane β -1,4 glikozidnom vezom i na svakoj drugoj manози je α -1,4 glikozidnom vezom povezana D-galaktoza koja čini kratke bočne ogranke (Kadajji i Betageri, 2011).

Comment [jz8]: Nisam nasao specifično da se tako zove Galaktomanani su klasa polisaharida u koje spada i guar.. Guar se još zove i guaran.. Ovaj termin se zna koristiti samo u njemačkom koliko uspio iskopati...



Slika 4. Strukturna formula guar gume (Crebelli, Oskarsson i sur., 2017)

Guar guma se koristi kao stabilizator, emulgator i kao tvar za zgušnjavanje. Često se koristi za rektalnu isporuku lijekova te je glavna prednost što bakterije iz debelog crijeva imaju sposobnost razgraditi guar gumu (Kadajji i Betageri, 2011).

3. MATERIJALI I METODE

Materijali

3.1. Kemikalije korištene za pripremu gela

- Guar (Roth)
 - Viskozitet – 5000 cP
 - pH – 5,4-7,0
 - Udio vode (vlaga) ≤12%
 - Udio ugljikohidrata ≥80%
 - Udio proteina ≤5%
 - Udio pepela ≤0,8%
- Nutriose ® FB06 (Roquette)
- TOS agar (Sigma)
- MRS agar (Biolife)
- MRS bujon (Liofilchem)
- Rhinger tablete (Merck)
- mupirocin (Sigma-Aldrich)
- fiziološka otopina - sami pripremili

3.2. Mikroorganizmi

Lactobacillus plantarum D13 i *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 dobiveni iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

3.3. Sastav podloga za uzgoj mikroorganizma

- MRS agar
 - agar 20 g/L
 - natrijev acetat 5 g/L
 - magnezijev sulfat heptahidrat 0,1 g/L
 - manganov sulfat heptahidrat 0,05 g/L
 - pepton 10 g/L

- mesni ekstrakt 10 g/L
 - kvaščev ekstrakt 5 g/L
 - glukoza 20 g/L
 - Tween 80 1 g/L
- MRS bujon
 - agar 20 g/L
 - natrijev acetat 5 g/L
 - magnezijev sulfat heptahidrat 0,1 g/L
 - manganov sulfat heptahidrat 0,05 g/L
 - pepton 10 g/L
 - mesni ekstrakt 10 g/L
 - kvaščev ekstrakt 5 g/L
 - glukoza 20 g/L
 - Tween 80 1 g/L
- TOS agar
 - agar 15 g/L
 - amonijev sulfat 3 g/L
 - dikalijev hidrogenfosfat 48 g/L
 - enzimski hidrolizat kazeina 10 g/L
 - galaktooligosaharid 10 g/L
 - kalijev dihidrogenfosfat 3 g/L
 - kvaščev ekstrakt 1 g/L
 - L-cistein hidroklorid monohidrat 0,5 g/L
 - magnezijev sulfat heptahidrat 0,2 g/L
 - natrijev propionat 15 g/L

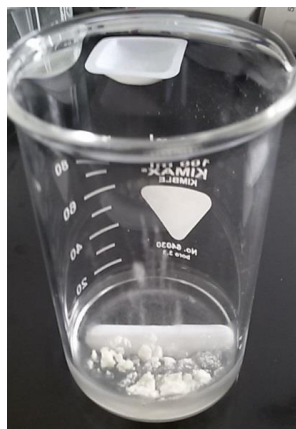
3.4. Pribor

- analitička vaga (Adam Eclipse)
- miješalica (Ika eurostar 20 digital)
- magnetska miješalica s grijanjem (Sigma-Aldrich IKA RCT basic)
- pipeta 5 mL (Eppendorf Research Plus)
- centrifuga (Eppendorf 5804R)
- termostat (Biosan ES-20/60)
- Hladnjak (Gorenje)
- pipete 0,5-5 mL (Eppendorf Research Plus) sa sterilnim nastavcima
- pipete 1-10 mL (Eppendorf Research Plus) sa sterilnim nastavcima
- laboratorijske čaše od 100, 150 i 250 mL
- Erlenmeyer tikvice od 100 i 250 mL
- plastične kivete s čepom od 10 i 50 mL
- Petrijeve zdjelice
- štapić po Drigalskom
- laboratorijska čaša 250 mL
- laboratorijska čaša 100 mL
- menzura 100 mL
- stakleni štapić
- metalna spatula
- križni i ravni magnet za miješanje

Metode

3.5. Određivanje optimalne koncentracije guar brašna u gelu

Kako bi odredili optimalnu gustoću gela na bazi guaru, koji će služiti kao nosač probiotičkih bakterija, provedeno je testiranje gelova s različitim koncentracijama guar brašna. Guar gel podložan je kontaminacijama tako da je rad provodjen u aseptičnim uvjetima. Vodena otopina koja se koristila za miješanje s guarom je otopina prebiotika, Nutriose® FB06. Koncentracija Nutriose® FB06 iznosila je 25 g/L, a pripravljena je tako da se u čašu od 250 mL doda 100 mL demineralizirane vode i 2,5 g Nutriose® FB06. Testirane koncentracije guaru u gelu bile su 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, 20 g/L i 25 g/L. Za određivanje optimalne gustoće gela koristio se volumen od 10 mL otopine Nutriose® FB06 (25 g/L) i odgovarajuće mase guaru (0,05 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g i 0,25 g) kao što je prikazano na Slici 5. Otopine su miješane pomoću magnetne miješalice s grijačem. Za koncentracije 5 g/L i 10 g/L koristio se križni magnetič, a za ostale koncentracije se koristio ravni magnetič. Gel koncentracije 5 g/L je miješan 5 minuta pri 40 °C i 500 okr/min. Gel koncentracije 10 g/L miješan je 5 minuta pri 40 °C i 500 okr/min, a onda 5 minuta pri 60 °C i 700 okr/min. Gel koncentracije 15 g/L miješan je 10 minuta pri 60 °C i 500 okr/min zatim 5 minuta pri 60 °C i 700 okr/min. Gelovi koncentracija 20 g/L i 25 g/L su miješani 15 minuta pri 60 °C i 500 okr/min. Nakon potpunog otapanja guaru u otopini gelovi se hlade na sobnu temperaturu.



Slika 5. Priprema guar gela određene koncentracije

3.6. Analiza preživljavanja probiotičkih bakterija

Lactobacillus plantarum D13 i *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 naciepljuju se u 5 mL MRS bujona u tikvice od 100 mL za prekonocni uzgoj. Nakon 24 h prekonocne kulture *Lactobacillus plantarum* D13 i *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 naciepljuju se u 50 mL MRS bujona u tikvice od 250 mL za prekonocni uzgoj. Nakon 24 h suspenzije se prebacuju u kivete volumena 50 mL i centrifugiraju se 6 minuta na 4200 okr/min. Zatim se odlijeva supernatant, a talog se ispere s 20 mL fiziološke otopine. Nakon tog se odlije supernatant, a talog se resuspendira u 40 mL sterilne, destilirane vode koja je prethodno temperirana na 45 °C. Izvaže se 0,75 g guara i 1,25 g Nutriose ® FB06 i doda se u bakterijske suspenzije. Suspenzije se dobro promiješaju, zatim se nadopune sterilnom, destiliranom i temperiranom vodom do 50 mL i ponovno se promiješaju.

Kada se suspenzije dobro promiješaju, uzimaju se uzorci za pripravu razrjeđenja kako bi se odredila početna koncentracija stanica u gelu. Uzimaju se uzorci od 1 mL, a prve uzorke je potrebno uzeti s pipetmanom s odrezanim nastavkom.

Gelovi se čuvaju pri +4 °C te nakon 10 i 30 dana čuvanja uzimaju se uzorci i rade se analize preživljavanja.

Za pripravu decimalnih razrjeđenja koriste se kivete volumena 10 mL i u svaku se doda 9 mL Ringerove otopine. Za uzorke *Lactobacillus plantarum* D13 potrebno je pripremiti 9 decimalnih razrjeđenja, a za uzorke *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 potrebno je pripremiti 8 decimalnih razrjeđenja. Uzorak se dobro homogenizira te se uzima 1 mL alikvota i doda u drugu kivetu. Ovim postupkom se pripreme i ostala decimalna razrjeđenja.

Tablica 1. Decimalna razrjeđenja koja se naciepljuju

	D13	Bb12
0. dan	1.-9.	1.-8.
10. dan	5.-9.	1.-8.
30. dan	3.-7.	3.-8.

Comment [K9]: Ovo se nije bas dogodilo ovako negou 5 mL prekonocne Bb12 nije narastao pa su se koristile liofilizirane stanice. Da to navedem nekako u raspravu?

Comment [jz10]: Hmmm. Pa mozda bolje ne jer je teoretski trebalo ponoviti... 😊

Comment [K11]: Mislim da se čitave suspenzije naciepljuju, odnosno nisam nigdje nasla drugaciju info.

Comment [jz12]: Da, uzima se homogenizirani bujon s naraslim stanicama...

Comment [jz13]: Ovo isto nutriioza ide.. promnjeni kak si rekla u mailu..

Uzorci s *Lactobacillus plantarum* D13 se nacjepljuju na krutu MRS podlogu pomoću štapića po Drygalskom. Uzorci s *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 se nacjepljuju tako da se zaliju s otopljenom, temperiranom TOS hranjivom podlogom u koju je neposredno prije dodan mupirocin.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje optimalne koncentracije guar brašna

Guar gel koji se koristi kao nosač probiotika sastoji se od polisaharida koji je otopljen u vodi. Hidrofilni isprepleteni lanci polisaharida čine polučvrsti sustav koji je odgovoran za formaciju gela. Pri koncentraciji od 5 g/L dolazi do potpunog otapanja guara te je uzorak potpuno tekuć. Pri koncentraciji od 10 g/L dolazi do nastajanja grudica zbog otežanog otapanja guara te nakon povišenja temperature i brzine vrtnje magnetne miješalice dolazi do razbijanja grudica i potpunog otapanja guara. Pri koncentraciji od 15 g/L ne dolazi do nastajanja grudica, a mogući razlog je da pri povišenju koncentracije dolazi do povećanja sile trenja među molekulama što rezultira boljim otapanjem guara. Gel koncentracije 20 g/L je vrlo viskoznan i prisutni su mjehurići zraka te nastaje mala količina grudica koje se s vremenom otapaju. Gel koncentracije 25 g/L je također vrlo viskoznan, prisutni su mjehurići zraka i pojavljuju se grudice. Nakon hlađenja gelova na sobnu temperaturu ustvrđeno je da su gelovi koncentracije 5 g/L i 10 g/L prerijetki i nedovoljno viskozni. Zbog toga se ne mogu koristiti kao nosači za probiotike jer pri tim koncentracijama ne bi došlo do jednolike imobilizacije bakterijskih stanica te bi se one istaložile na dno. Gelovi koncentracija 20 g/L i 25 g/L su vrlo viskozni i gusti što je nepovoljno jer otežava pravilnu homogenizaciju bakterija u gelu te je težak za upotrebu. Slika 6 prikazuje metodu analize gela iz koje se može zaključiti kako su koncentracije od 5 g/L i 10 g/L prerijetki jer su gotovo tekući, a gelovi koncentracija 20 g/L i 25 g/L imaju puno zarobljenih mjehurića zraka te je potrebna dodatna obrada kako bi se oni uklonili što otežava primjenu i uporabu gelova tih koncentracija.

Comment [jz14]: romijeni...iako ti ovo ide vise pod teoriju..
Chemically, guar gum is a [polysaccharide](#) composed of the [sugars galactose](#) and [mannose](#). The backbone is a linear chain of β 1,4-linked mannose residues to which galactose residues are 1,6-linked at every second mannose, forming short side-branches.
•guar gum, mannose:galactose ~2:1



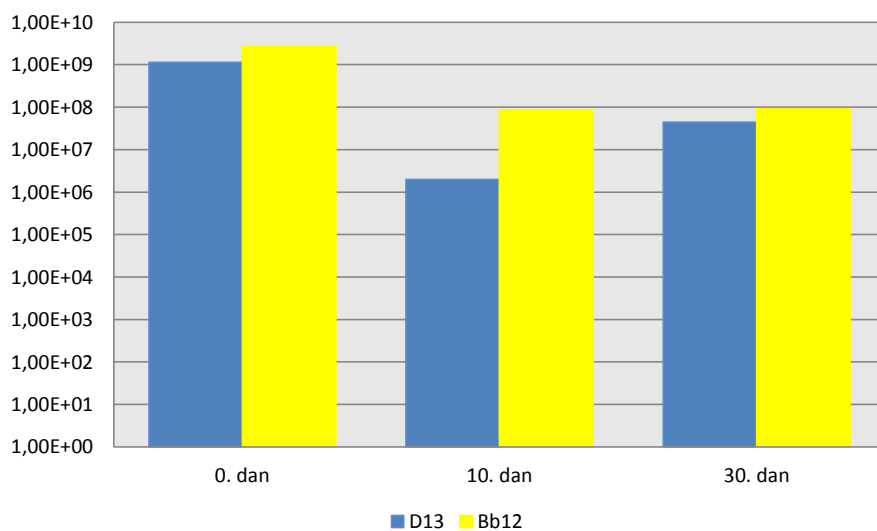
Slika 6. Određivanje optimalne koncentracije guar brašna

Gel koncentracije 15 g/L izabran je kao optimalni.

Tijekom pripreme gela s probiotičkim sojem voda koja se koristi za pripremu gela je temperirana na 45 °C jer pri višim temperaturama dolazi do odumiranja bakterijskih stanica. Guar gel koncentracije 15 g/L topi se pri nižim temperaturama te je zbog toga vrlo dobar matriks za imobilizaciju probiotičkih bakterija.

4.2. Analiza preživljavanja probiotičkih bakterija u guar gelu

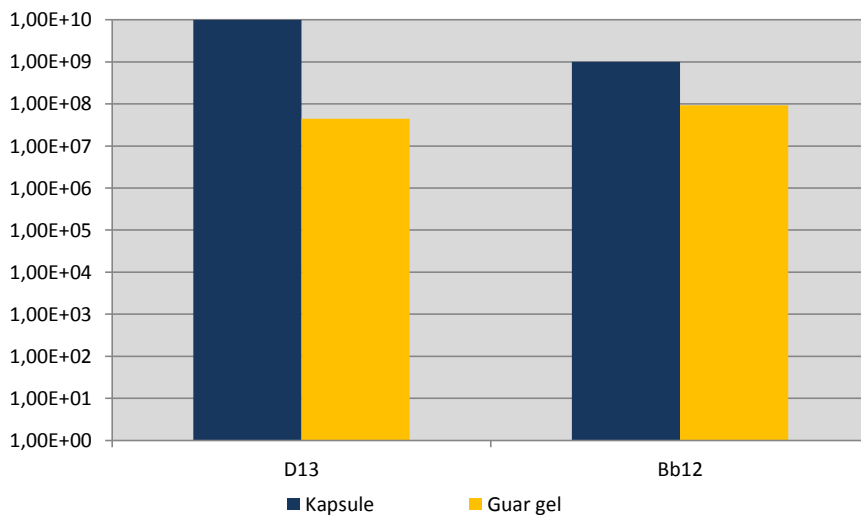
Provedeno je ispitivanje preživljavanje probiotičkih bakterija u gelu za rektalnu primjenu. Kako bi se probiotički sojevi mogli koristiti za promoviranje zdravlja ključno je da u trenutku primjene ima dovoljno vijabilnih stanica. Osim toga, analizira se uloga guara kao matriks za imobilizaciju. Za gel je bitno da se kroz duži vremenski period ne dogodi razdvajanje faza te da suspenzija bude homogena odnosno da se očuvaju svojstva gela.



Slika 7. Preživljavanje bakterija u gelu - 1,5% guar + 2,5% nutrioza

U Slici 7 prikazani su rezultati analize. Nakon 30 dana došlo je do pada broja stanica za otprilike 100 puta. Broj stanica *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 nakon 10 dana i nakon 30 dana nije se značajno promijenio. Broj stanica *Lactobacillus plantarum* D13 nakon 10 dana je značajno manja nego nakon 30 dana. Razlog tome može biti greška analitičara ili greška metode.

Nakon 30 dana postotak vijabilnih stanica *Lactobacillus plantarum* D13 iznosi 3,91%, a *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 iznosi 3,43%. Iako je postotak preživjelih stanica nizak, broj vijabilnih stanica je visoka. Slika 8 prikazuje usporedbu broja preživjelih stanica u gelu nakon 30 dana s brojem stanica koje se nalazi u komercijalno dostupnim probiotičkim kapsulama.

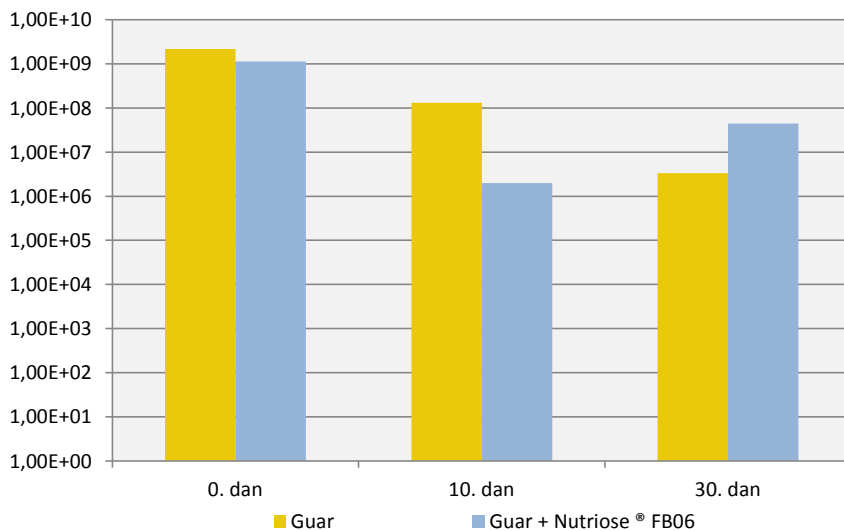


Slika 8. Usporedba broja vijabilnih stanica u komercijalno dostupnim kapsulama i u guar gelu

Broj živih stanica *Lactobacillus plantarum* D13 u kapsulama je 10^{10} CFU te je otprilike 100 puta veći od broja živih stanica u gelu koji iznosi $4,43 \times 10^7$ CFU/mL. U ovom razmatranju treba uzeti u obzir da broj živih stanica u kapsulama je broj u trenutku kada je proizvedena kapsula, dok je broj živih stanica *Lactobacillus plantarum* D13 u guar gelu broj stanica nakon 30 dana. Broj živih stanica *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 u kapsulama iznosi 10^9 CFU te je otprilike 10 puta manji od broja vijabilnih stanica u guar gelu te iznosi $9,27 \times 10^7$.

Kapsule se unose oralno te broj vijabilnih bakterija se smanjuje prolaskom kroz gastrointestinalni sustav uslijed uvjeta niskog pH i visoke koncentracije žučnih kiselina. Zbog toga je važno imati visok broj vijabilnih stanica kako bi na ciljno mjesto djelovanja probiotičkih bakterija bilo dovoljno vijabilnih bakterija. Guar gel s probiotičkim bakterijama se unose rektalno te problemi s preživljavanjem u gastrointestinalnom sustavu su izbjegnuti. Time se izbjegava potreba visokog broja vijabilnih stanica trenutku primjene gela.

Nutriose® FB06 dodan je u guar gel kako bi broj živih stanica nakon 30 dana bio što veći. Slika 9 prikazuje usporedbu broja vijabilnih stanica u guar gelu sa i bez Nutriose® FB06.



Slika 9. Usporedba broja vijabilnih stanica u guar gelu i guar gelu s Nutriose® FB06

Broj stanica 0. dan u guar gelu je malo veći od broja stanica u guar gelu s Nutriose® FB06. Nakon 30 dana broj vijabilnih stanica u guaru je otprilike 10 puta manji nego u guar gelu s Nutriose® FB06. Iz toga slijedi da prebiotik Nutriose® FB06 pospješuje preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom 30 dana.

Drugi eksperimenti preživljavanja probiotičkih sojeva pokazuju da bakterijski soj *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12 ima sposobnost razgradnje guar gela pri sobnoj temperaturi pri čemu dolazi do gubitka strukture gela. Iz toga se može zaključiti da guar gel nije dobar nosač za probiotički soj *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12.

5. ZAKLJUČAK

Mehanička svojstva guar gela su se pokazala pogodnim za primjenu nosača probiotičkih bakterija. Određivanjem optimalne koncentracije guar brašna postigla su se svojstva gela koja omogućuju dobru homogenizaciju suspenzije i imobilizaciju bakterija, a pritom gustoća nije previsoka te je rukovanje i priprema guar gela jednostavna.

Guar gel je topiv pri nižoj temperaturi što je ključno za održavanje živih bakterija tijekom pripreme gela.

Nema značajnih razlika u preživljavanju između bakterijskih sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12. Nakon 30 dana postotak preživljavanja oba bakterijska soja iznosio je oko 3% što upućuje na to da je guar gel prikladan matriks različitih probiotičkih bakterija.

Iako postotak preživjelih bakterijskih stanica iznosi oko 3% za oba probiotička soja, konačne koncentracije stanica iznose $4,43 \times 10^7$ CFU/mL za *Lactobacillus plantarum* D13 i $9,27 \times 10^7$ CFU/mL za *Bifidobacterium animalis subs. lactis* Bb12. Koncentracije stanica su dovoljno visoke za primjenu. S obzirom na to da se gel koristi rektalno, bakterijske stanice ne prolaze kroz čitavi gastrointestinalni trak te ne dolazi do gubitaka vijabilnih stanica uslijed uvjeta niskog pH i visokih koncentracija žučnih kiselina.

Dodatak prebiotika Nutriose® FB06 povećava preživljavanje probiotičkih bakterijskih sojeva u usporedbi s guar gelom bez prebiotika. Nutriose® FB06 se isto tako koristi kao dodatak prehrani te dodavanjem Nutriose® FB06 u gel, osim što je bolje preživljavanje prebiotika, može pozitivno utjecati na crijevni mikrobiom kada se aplicira.

6. LITERATURA

Ahren, Jie, Onning, Olsson, Ahrne, Molin, (2014) Antihypertensive activity of blueberries fermented by *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 and effects on the gut microbiota in healthy rats. *Clinical Nutrition* 1–14

Butel, Waligora-Dupriet (2016) Probiotics and prebiotics: what are they and what can they do for us? *The Human Microbiota and Chronic Disease* 467-481

Chatelier, Nielsen, Qin, Pridfti, Hildebrand, Falony, Almeida, Arumugam, Batto, Kennedy, Leonard, Li, Burgdorf, Grarup, Jorgensen, Brandslund, Nielsen, Juncker, Bertalan, Levenz, Pons, Rasmussen, Sungawa, Tap, Tims, Zoetendal, Sicheritz-Ponten, Vos, Zucker, Raes, Hansen, Bork, Wang, Ehrlich, Pedersen (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **10**. 541-545

Chiu, Lu, Ou, Lin, Tsai, Huang, Lin, (2013) *Lactobacillus plantarum* MYL26 induces endotoxin tolerance phenotype in Caco-2 cells. *BMC Microbiology* **13** 190

Crebelli, Oskarsson, Mortensen, Aguliar, Domenico, Frutos, Galtier, Gott, Gundert-Remy, Lambre, Leblanc, Lindtner, Moldeus, Mosesso, Massin, Stankovic, Waalkens-Berendsen, Woutersen, Wright, Younes, Brimer, Peters, Wiesner, Christodoulidou, Lodi, Tard, Dusemund (2017) *EFSA Journal* **10**.2903

de Vries, Vaughan, Kleerebezem, de Vos (2006) *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal* **16**. 1018–1028

Gowda Kadajji, Betageri (2011) Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymer* **3**.1972-2009

Hoare, Kohane (2017) Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* **49** 1993-2007

Karkman, Lehtimaki, Ruokolainen (2017) The ecology of human microbiota: dynamics and diversity in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* ISSN **0077**-8923

Lin, Chang, Lu, Martel, Ojcius, Ko, Young, Lai (2014) Impact of the Gut Microbiota, Prebiotics, and Probiotics on Human Health and Disease. *Biomed Journal* **5**. 259-268

Marchesi, Adams, Fava, Hermes, Hirschfield, Hold, Nabil Quraishi, Kinross, Smidt, Tuohy, Thomas, Zoetendal, Hart (2015) The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Produced by BMJ Publishing Group Ltd **10**.1136

Martinez-Villaluenga, Frias, Gomez (2006) Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. *International Dairy Journal* **7**. 768-774

Nootriment - Bifidobacterium BB-12 Probiotic Supplement Benefits & Side Effects <<https://nootriment.com/bifidobacterium-bb-12/>> Pristupljeno 9.rujna 2017.

Probiotics Database - Strains and Supplements, <<http://probioticsdb.com/probiotic-strains/bifidobacterium-lactis/>> Pristupljeno 9. rujna 2017.

Rathod, Metha (2015) A Review on Pharmaceutical Gel. *Acta Scientifica International Journal of Pharmaceutical Science*. **1.1**

Sasikumar, Gomathi, Anbazhagan, Abhishek, Paul, Vasudevan, Sasikumar, Selvam (2014) Recombinant *Lactobacillus plantarum* expressing and secreting heterologous oxalate decarboxylase prevents renal calcium oxalate stone deposition in experimental rats. *Journal of Biomedical Science* **21**. 86

Savard, Lamarche, Paradis, Thiboutot, Laurin, Roy (2011) Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology* **149**. 50–57

Shapiro, Suez, Elinav (2016) Personalized microbiome-based approaches to metabolic syndrome management and prevention. *Journal od Diabetes* **10**.1111

Solano-Aguliar, Dawson, Restrepo, Andrews, Vinyard, Urban (2008) Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the Intestine after Feeding of Sows and Their Piglets. *Applied and Environmental Microbiology* **20**. 6338–6347

Swanson – Swanson probiotics, L. Plantarum Inner Bowel Support, <<https://www.swansonvitamins.com/swanson-probiotics-l-plantarum-inner-bowel-support-30-veg-drcaps#>> Pristupljeno 9.rujna 2017.

Valan Arasu, Al-Dhabi, Ilavenil, Choon Choi, Srigopalram (2015) In vitro importance of probiotic Lactobacillus plantarum related to medical field. *Saudi Journal of Biological Sciences* **23**. S6-S1

Zadnja stranica završnog rada

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

J. Piskalo

ime i prezime studenta