

# Primjena "Layer by Layer" nanoinkapsulacije Limosilactobacillus sojeva za dostavu probiotičkih stanica in situ

---

Vitaliani, Lucija

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:159:344932>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Lucija Vitaliani**  
0058216305

**PRIMJENA NANOINKAPSULACIJE *Lactobacillus* SOJEVA „Layer by Layer“ METODOM ZA DOSTAVU PROBIOTIČKIH STANICA IN SITU**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

**Mentor:** prof. dr. sc. Jasna Novak

**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

**Primjena „Layer by Layer“ nanoinkapsulacije *Limosilactobacillus* sojeva za dostavu probiotičkih stanica *in situ*  
Lucija Vitaliani, 0058216305**

**Sažetak:** Nanoinkapsulacija je suvremeni pristup za ciljanu zaštitu i kontroliranu dostavu probiotičkih sojeva ili pripadajućih postbiotika odnosno bioaktivnih spojeva *in situ*. Upravo cilj ovog rada je definiranje zaštitnog učinka „layer by layer“ (LbL) nanoinkapsulacije bakterijskih stanica *Limosilactobacillus* sojeva analizom postotka preživljavanja suhog aktivnog pripravka, neposredno nakon liofilizacije, te mjesec dana tijekom pohrane za pojačanu biodostupnost. Provedena je i nanoinkapsulacija egzopolisarida ovih sojeva koji se istražuju kao postbiotici. Učinkovito formiranje nanokapsula bakterijskih stanica *Limosilactobacillus fermentum* potvrđeno je mjerenjem zeta potencijala, temeljem kojeg je zabilježena promjena iz pozitivnog u negativni naboj, i obrnuto, tijekom faza nanošenja slojeva elektrolita metodom „sloj po sloj“ nanoinkapsulacije. Postotak preživljavanja nanoinkapsuliranih sojeva *Lb. fermentum* veći je nakon inkubacije u samom želučanom soku naspram postotka preživljavanja intaktnih sojeva nakon inkubacije u želučanom soku i soku tankog crijeva što upućuje na zaštitnu ulogu „LbL“ nanoinkapsulacije i mogućnost pojačanje biodostupnosti *in situ*.

**Ključne riječi:** biodostupnost, probiotici, „LbL“ nanoinkapsulacija, postbiotici

**Rad sadrži:** 30 stranica, 10 slika, 1 tablica, 39 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:** prof. dr. sc. Jasna Novak

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

**Datum obrane:**

## 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

Application of „LbL“ nanoencapsulation for enhanced delivery of *Limosilactobacillus* probiotic cells *in situ*

Lucija Vitaliani, 0058216305

**Abstract:** Nanoencapsulation is a modern approach for targeted protection and controlled in situ delivery of probiotic strains or associated postbiotics or bioactive compounds. The aim of this work is to define the protective effect of "layer by layer" (LbL) nanoencapsulation of bacterial cells of *Limosilactobacillus* strains by analyzing the survival percentage of the active freeze-dried cells, immediately after lyophilization, and after one month during storage to enhance bioavailability. Nanoencapsulation of the exopolysaccharides of these strains, which are being investigated as postbiotics, was also carried out. The effective formation of nanocapsules of *Limosilactobacillus fermentum* bacterial cells was confirmed by measuring the zeta potential, based on which the change from positive to negative charge and vice versa was recorded during the stages of layering of electrolyte layers using the "LbL" nanoencapsulation. Survival percentage of nanoencapsulated strains of *Lb. fermentum* is higher after incubation in gastric juice compared to the survival percentage of intact strains after incubation in gastric juice and small intestine juice, which points to the protective role of "LbL" nanoencapsulation and the possibility of enhancing bioavailability *in situ*.

**Keywords:** bioavailability, „layer by layer“ nanoencapsulation, probiotics, postbiotics

**Thesis contains:** 30 pages, 10 figures, 1 table, 39 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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:** Jasna Novak, PhD, Full Professor

**Technical support and assistance:** Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

**Thesis defended:**

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 prof. dr. sc. Jasne Novak, 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

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL <i>Limosilactobacillus fermentum</i> .....	2
2.2. PROBIOTICI .....	6
2.3. EGZOPOLISAHARIDI BMK.....	7
2.4. NANOINKAPSULACIJA PROBIOTIKA .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>11</b>
3.1. MATERIJALI .....	11
3.1.1. Radni mikroorganizmi .....	11
3.1.2. Hranjive podloge.....	11
3.1.3. Kemikalije.....	11
3.1.4. Pribor i aparatura.....	12
3.2. METODE.....	13
3.2.1. Održavanje i čuvanje radnih mikroorganizama .....	13
3.2.2. Nanoinkapsulacija <i>Lb. fermentum</i> sojeva „layer by layer“ metodom.....	13
3.2.3. Mjerenje zeta potencijala .....	14
3.2.4. Liofilizacija BMK i njihovih biomolekula .....	14
3.2.5. Preživljavanje nanoinkapsuliranih sojeva <i>Lb. fermentum</i> postupak liofilizacije te skladištenje.....	14
3.2.6. Preživljavanje nanoinkapsuliranih sojeva <i>Lb. fermentum</i> simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta .....	15
3.2.6.1. Priprema simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva .....	15
3.2.6.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	15
3.2.7. Statistička obrada rezultata.....	16
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>17</b>
4.1. NANOINKAPSULACIJA SOJEVA <i>Lb. fermentum</i> .....	17
4.2. MJERENJE ZETA POTENCIJALA .....	17
4.3. POSTOTAK PREŽIVLJAVANJA LIOFILIZIRANIH STANICA SOJEVA <i>Lb. fermentum</i> MC1 I D12 TIJEKOM NANOINKAPSULACIJE .....	19
4.4. PREŽIVLJAVANJE NANOINKAPSULIRANIH SOJEVA <i>Limosilactobacillus fermentum</i> SIMULIRANIH UVJETA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA .....	21
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>23</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>24</b>

# 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) imaju već dugi niz godina široku primjenu u proizvodni i očuvanju prehrambenih proizvoda. Gastrointestinalni sustav predstavlja složeni ekosustav i sa stajališta mikrobne ekologije, ekosustav je, te je prirodno stanište crijevne mikrobiote koja je u stalnoj interakciji s domaćinom, odnosno ljudskim organizmom. Crijevnu mikrobiotu čine fakultativni i obvezatni anaerobi. U obvezatne anaerobe kod ljudi spadaju bakterijski rodovi poput *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* i *Bacteroides* te oni čine 95 % crijevne bakterijske populacije, dok 1-10 % crijevne populacije čine fakultativni anaerobi poput *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Bacillus*. Crijevna mikrobiota je ključna za sazrijevanje imunološkog sustava, razvoju crijevne morfologije, održavanju kroničnog i imunološki posredovanog upalnog odgovora, održavanju funkcije crijevne sluznice, obrani od alergena te pomaže u prevenciji od pričvršćivanja patogenih mikroorganizama. Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organisation*, WHO) probiotici su živi mikroorganizmi koji u određenoj količini imaju pozitivne učinke na zdravlje domaćina.

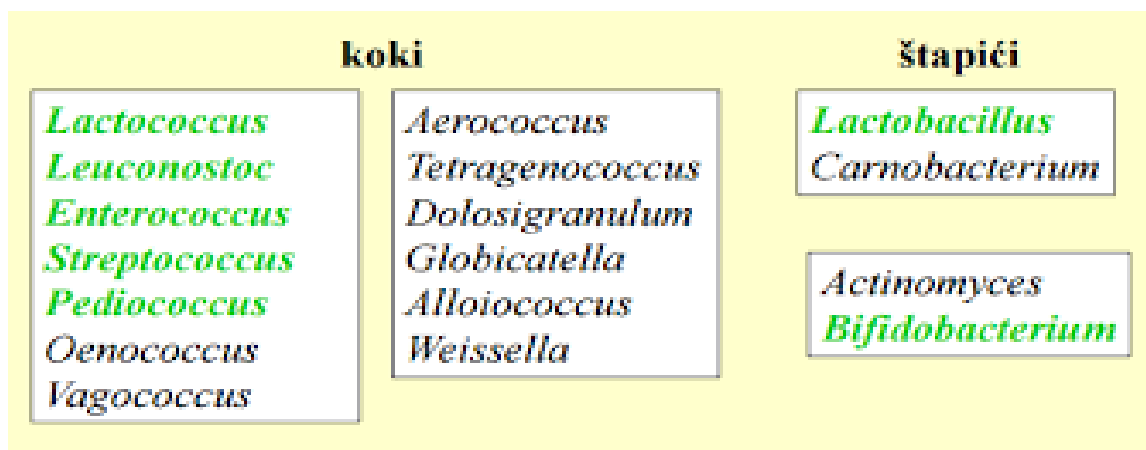
BMK su vrsta Gram-pozitivnih bakterija koje koriste ugljikohidrate kao jedini ili glavni izvor ugljika (George i sur., 2018). BMK općenito dolaze u obliku koka ili štapića i podnose dobro nizak pH. U BMK spada više od 60 rodova, ali rodovi koji često provode fermentaciju prehrambenih proizvodauključuju: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Weissella* (Mokoena, 2017). Fermentacijski sojevi BMK-a posjeduju neke važne metaboličke karakteristike, kao što su sposobnost proizvodnje kiseline i arome, sposobnost hidrolize proteina, sposobnost proizvodnje viskoznih egzopolisaharida i sposobnost inhibicije bakterija.

Cilj ovog rada bio je ispitati preživljavanje kolonija slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica bakterijskog soja *Lb. fermentum* sojeva MC1 i D12 nakon liofilizacije, te nakon liofilizacije i mjesec dana skladištenja. Također je ispitano preživljavanje liofiliziranih slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica sojeva MC1 i D12 nakon inkubacije u želučanom soku, te nakon inkubacije istih sojeva u želučanom soku i soku tankoga crijeva. Izmjeren je i zeta potencijal kako bi se potvrdilo formiranje nanokapsula tzv. „layer by layer“ metodom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL *Limosilactobacillus fermentum*

Kulture bakterije mliječne kiseline su također pronađene u majčinom mlijeku. BMK su Gram-pozitivne, nesporogene i nepokretne bakterije koje oblikom mogu biti okrugle (*cocci*) ili štapičaste (*bacilli*) (slika 1.). Optimalna hranjiva podloga za njihov rast sadrži aminokiseline, peptide, dušične baze, vitamine, minerale, masne kiseline i ugljikohidrate, a pH vrijednost se kreće između 5,5-5,8 (Khalid, 2011). Vrste koje pripadaju ovoj skupini bakterija imaju važnu ulogu u fermentaciji hrane i životinjskoj ishrani, gdje neke vrste imaju pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje (Hossain, 2022). U bakterije mliječne kiseline spadaju slijedeći rodovi: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* i *Sporolactobacillus*. Sve ove rodove BMK povezuju morfološka, metabolička i fiziološka svojstva. BMK se u organizam unose najčešće putem fermentiranih mliječnih proizvoda što ima jako dobre učinke za zdravlje čovjeka, pogotovo jer imaju direktan utjecaj na crijevnu mikrobiotu (Šušković i sur., 1997). Sojevi BMK imaju različite primjene, kao starter kulture i probiotici.



**Slika 1.** Podjela bakterija mliječne kiseline prema obliku na koke i štapiće (Šušković i Kos, predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akad. god. 2022./2023., [https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/7628179/mod\\_resource/content/1/biotehnologija%204\\_2022\\_5web.pdf](https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/7628179/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2022_5web.pdf), pristupljeno 27.08.2023.)



*Limosilactobacillus fermentum* (slika 2) pripada soju *Lactobacillus* BMK koja ima snažno antimikrobno djelovanje prema kliničkim patogenima uključujući Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije kao što su *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* i *Staphylococcus aureus* (Hossain i sur., 2022). Ova vrsta BMK posjeduje probiotičku aktivnost štiteći imuni sistem kod ljudi tako da sudjeluju u probavi hrane i reduciranju metaboličkih poremećaja. Probiotički sojevi *Lb. fermentum* proizvode antimikrobne peptide koji se često primjenjuju za konzerviranje hrane i alternativa za antibiotike, međutim danas se koriste i za snižavanje kolesterola u krvi i radi se dosta eksperimenata da bi se ustanovilo njihovo potencijalno djelotvorno djelovanje na rak debelog crijeva ljudi i cirozu jetre (Naghmouchi i sur., 2019).

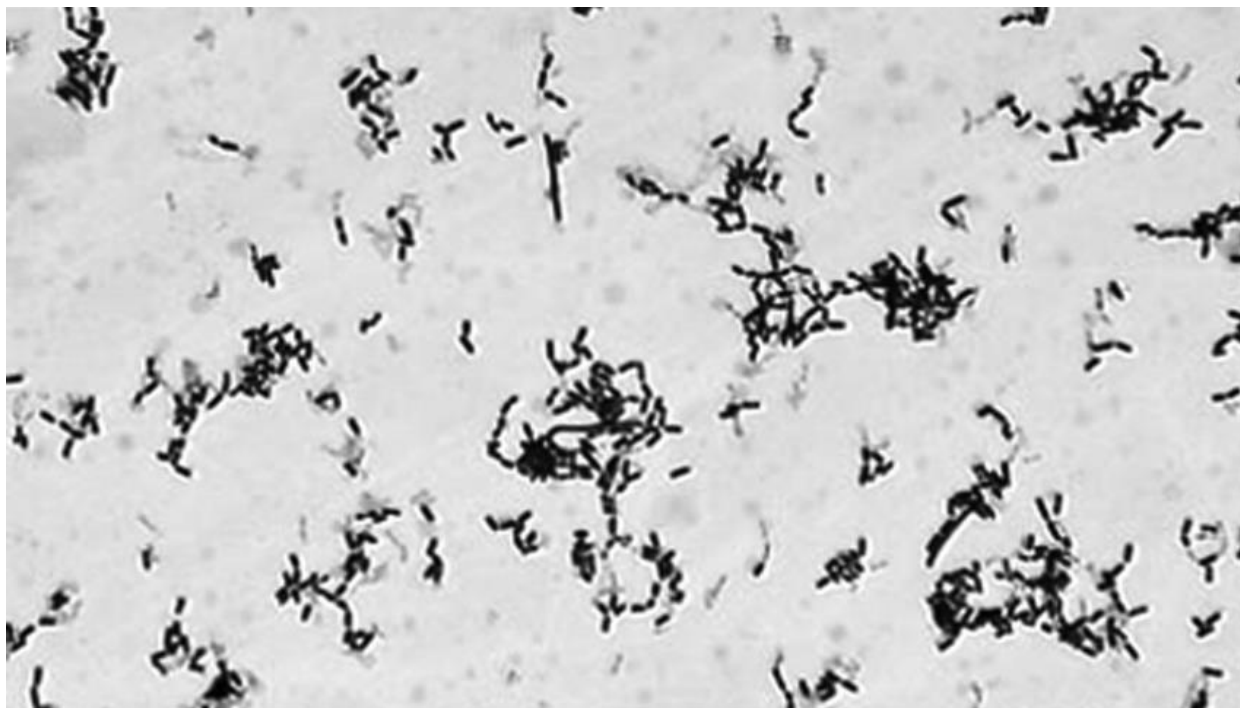
U prehrambenoj industriji *Lb. fermentum* se koristi kao starter kultura u proizvodnji kiselog tijesta pridonoseći teksturi i okusu. Ova vrsta je široko rasprostranjena u prirodi i može se izolirati iz biljnih fermentativnih materijala, prirodno fermentiranih kobasica, sline, majčinog mlijeka i iz kruha. European Food Safety Authority (EFSA) je 2007. predložila da se ova vrsta dobije sigurni status za korištenje. Glavni predstavnik ove grupe je *Lb. fermentum* CECT-5716, probiotički soj izoliran iz majčinog mlijeka. Ovaj soj karakteriziraju sigurnost, antinfektivno djelovanje, funkcionalnost i imunomodulirajuća svojstva. Kao što je već spomenuto, *Lb. fermentum* ima veliku primjenu u prehrambenoj industriji. Fermentacija je još od najranijih godina čovječanstva korištena za proizvodnju hrane i prehrambenih namirnica. *Lactobacillus* sojevi su mikroorganizmi koje koristimo kao tehnološke starter kulture za fermentirane proizvode i za prevenciju od moguće kontaminacije prehrambenih proizvoda (Naghmouchi i sur., 2019).

BMK koje proizvode egzopolisaharide imaju važnu ulogu u poboljšanju fizičkih, reoloških i senzorskih svojstava fermentiranih mliječnih proizvoda (Behare i sur., 2013). *Lb. fermentum* je heterofermentativna vrsta BMK koja proizvodi egzopolisaharide (Dan i sur., 2009). *Lb. fermentum* V10 jedan je od sojeva koji proizvodi egzopolisaharide te se koristi u proizvodnji nemasnog sira (dahi) (Behare i sur., 2013). Ovaj soj se pokazao odličnim za proizvodnju ovoga sira iz više razloga: proizvodi optimalnu količinu kiseline, smanjuje odvajanje sirutke, ima visoku viskoznost, adhezivnost i ljepljivost i ima smanjenu čvrstoću naspram neinokuliranog sira. Nielsen i sur. (2017) navode da je u fermentiranom mlijeku pomoću *Lb. fermentum* moguće postići pH vrijednost iznad 4 ako se skladišti najmanje 14 dana na 25° C. Owusu-Kwarteng i sur. (2015) navode da je *Lb.*

*fermentum* kao funkcionalna starter kultura i s inherentnim funkcionalnim karakteristikama pridonosi većoj organoleptičkoj, prehrambenoj i tehnološkoj prednosti ili se koristi za poboljšanje ljudskog zdravlja (probiotici). Kako navode Russo i sur. (2014), primjena sojeva *Lb. fermentum* mogli su obogatiti *in situ* sadržaj riboflavina u fermentiranoj hrani podrijetlom od žitarica, te proizvodi antimikrobne tvari koje inhibiraju rast patogenih sojeva bakterija.

Pri proizvodnji mliječne kiseline u gastrointestinalnom traktu dolazi do snižavanja pH vrijednosti te samim time je reduciran rast mikroorganizama u usporedbi s kontrolom. *Lb. fermentum* CECT-5716 povećava propusnost membrane Gram-negativnih bakterija, čime smanjuje njihovu održivost i povećava njihovu izloženost baktericidnim spojevima.

Ova vrsta je također prisutna u fermentiranom biljnom materijalu, kao na primjer čokoladi. Čokolada je proizvod fermentiranog zrna kakaovca, pri čemu je *Lb. fermentum* glavna bakterijska vrsta. Sawadogo-Lingani i sur. (2007) navode da je *Lb. fermentum* glavna vrsta BMK pri proizvodnji alkoholnog pića Sorghuma, koje se proizvodi presađivanjem i karakterizira ga dvofazno vrenje- mliječno pa alkoholno.



**Slika 2.** Mikroskopski prikaz *Limosilactobacillus fermentum* (Mikelsaar i Zilmer, 2009)

Mnogi sojevi *Lb. fermentum* proizvode antimikrobne peptide, odnosno bakteriocine, koji se sintetiziraju na ribosomima pomoću Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Iako je većina

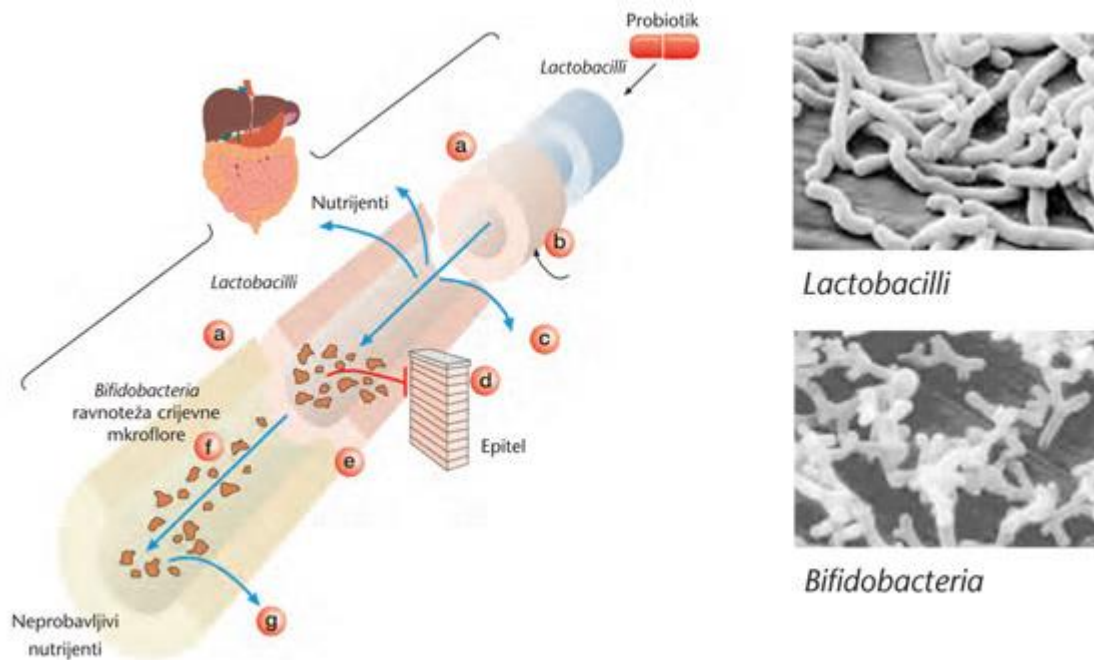
bakteriocinogenih sojeva izolirana iz mesa, povrća, voća, ribe i mlijeka (Seddik i sur., 2017; Mokoena, 2017), sojevi *Lb. fermentum* koji proizvode ove antimikrobne spojeve su izolirani iz fermentirane hrane, sirovog mlijeka, ljudske vaginalne mikrobiote, usne šupljine, majčinog mlijeka i iz gastrointestinalnog trakta. Generalno bakteriocini koje proizvode bakterije mliječne kiseline imaju relativno uzak spektar aktivnosti, ali one koje proizvode sojevi *Lb. fermentum* predstavljaju skupinu fermenticina i njih karakterizira širok spektar aktivnosti. Kao primjer mogu se uzeti fermenticin L23 i fermenticin SD11 koji inaktiviraju rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, a također je zabilježena njihova aktivnost protiv nekih gljivica (Pascual i sur., 2007). Nekoliko sojeva lactobacila koji su izolirani iz mliječnih proizvoda, uključujući *Lb. fermentum* 25, pokazali su antimikrobno djelovanje protiv Gram-pozitivnog *Staphylococcus aureus* i Gram-negativnih bakterija poput *Escherichia coli* i *Yersinia enterocolitica*. Ovi sojevi imaju antimikrobnu aktivnost jer posjeduju inhibitornu tvar sličnu bakteriocinu koju karakterizira stabilnost na visokim temperaturama i velika molekulska masa od 29kDa. Jedan od najvećih problema današnjice, kada je u pitanju liječenje bakterijskih infekcija, je da su bakterije sve otpornije na antibiotike kao posljedica njihove dugogodišnje primjene. Danas se sve više razmatraju alternative za rješavanje ovog problema, pa kao jedno od potencijalnih rješenja je korištenje probiotika, ali u obzir dolaze i bakteriocini koje proizvode BMK koji se pojavljuju kao nova skupina terapijskih sredstava. Zasad, laboratoriji koji proizvode bakteriocine su najviše fokusirani na samu biomedicinsku aplikaciju bakteriocina, tražeći alternativne strategije protiv raka, infekcija, oralne njege, vaginalnih infekcija, kontracepcije, njege kože i bakterija koje su otporne na više vrsta lijekova. Mnogo sojeva *Lb. fermentum* se koriste kao zaštita protiv infekcija urinarnog trakta i usne šupljine, vaginoza i protiv patogena koji su otporni na više lijekova uključujući MRSA-u, ili protiv patogenih gljivica poput *Candida albicans* i *C. glabrata*, za što je odgovoran soj *Lb. fermentum* HV6b MTCC 10770 koji je izoliran iz ljudskog vaginalnog ekosustava. Bakteriocinogeni sojevi *Lb. fermentum* se također primjenjuju u konzerviranju raznih mliječnih proizvoda, povrća, voća i sokova. Pri konzerviranju ovih prehrambenih proizvoda, proučavao se učinak sojeva *Lb. fermentum* i njihovih bakteriocina na kontrolu širokog spektra mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje. Pod te kvarne mikroorganizme se ubrajaju: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* i *Micrococcus luteus* (Naghmouchi i sur., 2019).

## 2.2. PROBIOTICI

1965. godine je predložena prva definicija probiotika, koju su dali znanstvenici Lilly i Stillwell, a glasila je da su probiotici tvari koje proizvode bakterije, a oni sami potiču rast drugih bakterija (Lilly i Stillwell, 1965). Današnja definicija probiotika glasi da su to živi mikroorganizmi koji se moraju unositi u dovoljnoj količini kako bi imali pozitivan učinak generalno na zdravlje, pri čemu nisu ograničeni samo na nutritivan učinak (Hill i sur., 2014; Guarner i Schaafsma, 1998). Dakle, probiotici utječu na naše zdravlje tako što imaju direktan utjecaj na lokalnu mikrobiotu, stanice crijevnog epitela i generalno imunološki sustav. Ljudsko tijelo sadrži mikrobiom koji se sastoji od raznih mikroorganizama uključujući bakterije, gljivice, arheje, viruse i protozoe (Shukla i sur., 2017). Svaki čovjek sadrži oko 10-100 trilijuna mikroba, od kojih su većina bakterije koje žive u crijevima. Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u razvoju i sudjeluje u procesu održavanja zdravlja i otpornosti na bolesti (Fan i Pedersen, 2020). Probiotici se smatraju sigurnim za korištenje i oni imaju svoju dugogodišnju primjenu kroz povijest. Najčešće korištene vrste koje pripadaju rodu *Lactobacillus* uključuju *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. coryneformis*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* i *Lb. jensenii* (Naghmouchi i sur., 2019).

Prvi probiotici su sadržavali uglavnom jednu vrstu mikroorganizama, uglavnom iz rodova *Saccharomyces* i *Lactobacillus*. Nakon mnogih provedenih ispitivanja, ustanovljeno je da su ovi probiotici jako učinkoviti u prevenciji infektivnog proljeva i proljeva koji se dobiva obično nakon primjene antibiotika, odnosno pseudomembranoznog kolitisa, kojeg uzrokuju toksini iz probavnog trakta. Te toksine proizvode sojevi *Clostridium difficile* (Goldenberg i sur., 2017). Kako su prvi probiotici sadržavali samo jednu vrstu mikroorganizama, tako su kasniji probiotici sadržavali raznolike i puno veći broj mikroorganizama. Broj mikroorganizama u kasnije razvijenim probioticima se kreće od  $10^8$  do više od  $10^{10}$ . Većina probiotika je sposobna da se odupre niskoj želučanoj pH vrijednosti, što dovodi do razvitka različitih varijanti probiotika s nepoznatim fiziološkim svojstvima. Jedna od nedovoljno istraženih uloga je prebiotička uloga mrtvih probiotičkih mikroorganizama u stanicama. Probiotici nove generacije imaju bolje definirana svojstva i kliničke indikacije (Satokari, 2019). Klinički učinci probiotika se još uvijek istražuju, a ta klinička istraživanja su dosta usporena ne samo iz evolucijskih razloga, nego se svake godine otkriju brojne nove bakterijske vrste. Ovisno o kojem dijelu probavnog sustava se govori, mikrobi koji žive u sluzi ili na stijenci crijeva (parijetalna mikrobiota) razlikuju se od mikroba koji žive u hrani u tranzitu ili stolici (luminalna mikrobiota). Sastav mikrobiote ovisi o prehrani, unesenim

probiotičkim bakterijama, o okolnom utjecaju drugih dijelova crijeva i ostalim čimbenicima koji su povezani sa samim domaćinom (Wieërs i sur., 2020).



**Slika 3.** Djelovanje probiotika u gastrointestinalnom sustavu (Prema InPharma)

### 2.3. EGZOPOLISAHARIDI BMK

BMK mogu sintetizirati niz polisaharida. Polisaharidi se sastoje od velike skupine velike molekulske mase, te se oni sastoje od monosaharidnih jedinica povezanim glikozidnom vezom. Polisaharidi sudjeluju u stvaranju matriksa izvanstaničnog biofilma, a osim toga imaju važnu ulogu u zaštiti bakterija od nepovoljnih vanjskih čimbenika i vezanju mikrobnih stanica na čvrste površine. Polisaharide koje proizvode BMK mogu se pronaći u strukturama na površini stanice pa se oni nazivaju lipopolisaharidima. Lipopolisaharidi su glavna komponenta vanjske membrane bakterija te oni štite bakterijske stanice, posredujući u izravnim interakcijama s okolinom. S obzirom da su oni vezani na površinu stanice, mala je vjerojatnost da će biti izolirani ili odvojeni od stanične biomase. S druge strane, egzopolisaharidi (EPS) su jako slabo vezani za površinu stanice ili se u jako malim količinama otpuštaju u izvanstanični medij. EPS se mogu sintetizirati

izvan stanice pomoću enzima koje izlučuje bakterija ili se proizvode unutarstanično i zatim izlučuju izvan stanice. Egzopolisaharidi imaju razne zaštitne mehanizme za mikrobnu stanicu, kao što su zaštita od abiotičkog ili biotičkog stresa, pH i temperature. Njih također odlikuju posebna fizikalno-kemijska svojstva koja imaju potencijal za farmaceutsku i prehrambenu industriju. Najviše današnjih istraživanja, kada su u pitanju EPS-i, fokusirano je na njihovu primjenu u prehrambenoj industriji zbog njihovih strukturnih svojstava poput emulgiranja, teksturiranja, zaslađivanja, želatiniranja, njihove sposobnosti vezanja vode ili bioaktivnih svojstava. Nedavna istraživanja su također pokazala potencijal EPS-a za promicanje zdravlja, uključujući prebiotičke, protuupalne i antioksidativne aktivnosti (Jurášková i sur., 2022).

EPS-i koje proizvode BMK imaju raznoliku i složenu kemijsku strukturu, koja utječe na njihovu funkciju i biološka svojstva. Mogu se podijeliti na homopolisaharide (HoPS- sadrže jednu vrstu monosaharida) i heteropolisaharide (HePS- sadrže dvije ili više vrsta monosaharida). Većina EPS-a koje proizvode BMK su heteropolisaharidi i sintetiziraju se intercelularno, dok neki sojevi BMK-a proizvode homopolisaharidne EPS-e pomoću izvanstaničnih enzima. Homopolisaharide koje proizvode BMK mogu se klasificirati kao glukani, fruktani ili galaktani, koji sadrže D-glukozu, D-fruktozu ili D-galaktozu. Glukani se mogu podijeliti na  $\alpha$ -glukane i  $\beta$ -glukane raznih rodova BMK poput *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Weissella*. Fruktani su polimeri fruktoze koji su topivi u vodi i koje proizvode sljedeći sojevi: *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Limosilactobacillus rauteri*, *Lactobacillus johnsonii* i *Fructilactobacillus sanfranciscensis*. Galaktani koji su topivi u vodi su manje zastupljeni, a proizvode ih sljedeći sojevi: *Weissella confusa*, *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. HePS-i imaju složeniju strukturu od HoPS-a jer su sastavljeni od nekoliko ponavljajućih jedinica šećera, kao što je pentoza, heksoza, N-acetilirani monosaharidi ili uronskih kiselina, koje mogu biti razgranate ili nerazgranate. HePS-e proizvode rodovi poput *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Streptococcus* (Jurášková i sur., 2022).

Biosinteza egzopolisaharida je složen bioproces koji uključuje velik broj enzima i regulatornih proteina. Biosintezu EPS-a u BMK se može podijeliti na četiri koraka: počevši od transporta šećera u citoplazmu, sinteza šećera, polimerizacija ponavljajućih jedinica prekursora i transport EPS-a izvan stanice (Sanlibaba i Çakmak, 2016).

## 2.4. NANOINKAPSULACIJA PROBIOTIKA

Probiotici su jako korisni za ljudsko zdravlje djelujući na crijevnu mikrobiotu, stvaranjem metaboličkih entiteta, neutralizacijom kancerogenih tvari u prehrani, indukcijom sinteze citokina i kontrolom patogena (Kalantzopoulos, 1997). Međutim, kako bi probiotici uspješno stigli na ciljno mjesto u organizmu i pričvrstili se za crijevni epitel, a da su pritom zaštićeni od niskog želučanog pH, ostalih enzima, antimikrobne aktivnosti žučnih soli i kompeticije s ostalim bakterijama, u tu svrhu koristi se inkapsulacija. Najčešći pristupi inkapsulacije su: mikroinkapsulacija, ekstruzija, emulzija, sušenje raspršivanjem i nanoinkapsulacija. Od svih ovih metoda, nanoinkapsulacija se zasada pokazala kao najodrživija alternativa, međutim ni ova metoda nije najučinkovitija.

Dok se metode tzv. „bulk“ kapsulacije temelje na imobilizaciji crijevnih bakterija u matricu gela u mikrometarskoj skali, jednostanična kapsulacija temelji se na stvaranju nanofilma oko pojedinačne probiotičke stanice, što rezultira s nekoliko prednosti za dostavu probiotika kao što je pružanje citozaštitnog sloja, koje ima određena poželjna svojstva kao što su poboljšana adhezija, otpornost *in vivo* i prevenciju bolesti. U suvremene metode inkapsulacije jedne stanice koje se koriste za probiotike uključuju pristup sloj po sloj, kemijsku konjugaciju, inkapsulaciju u staničnu membranu i samolipidni proces. Primjena ovih strategija za inkapsulaciju probiotika je ograničena i zahtjeva buduća istraživanja (Centurion i sur., 2021). Nanorazmjerni tanki filmovi nabijenih polimera mogu se pripremiti izmjeničnim taloženjem polianiona i polikationa na površinu supstrata (Richardson i sur., 2016). Metoda sloj-po-sloj (Lbl) se temelji na sekvencionalnom taloženju suprotno nabijenih polimera koji obično pokreću elektrostatske interakcije. Ova metoda se može primijeniti na planarne i koloidne podloge. Prvotno je ovu metodu u svom radu demonstrirao R. K. Iler 1966. godine alternativnom adsorpcijom pozitivno i negativno nabijenih koloidnih čestica, dok su Decher i sur. predstavili koncept sa suprotno nabijenim parovima elektrolita na supstratima (Decher i sur., 1997; Iler, 1966). Ovaj koncept prvi su uveli Donath i sur. za koloidne nosače, a razvijen je tek kasnije. Iako su strategije Lbl s nabijenim polimerima za stvaranje višeslojnih nanorazmjernih filmova usvojene za različite vrste živih stanica, njihova primjena za inkapsulaciju probiotičkih stanica prilično ograničena. Anselmo i sur. prikazao je jednostaničnu inkapsulaciju probiotičkih stanica korištenjem kombinacije kationskog polisaharida i anionskog polimera. Morfologija obloženih probiotičkih stanica se nije jako promijenila taloženjem polimernih slojeva zbog njihovih glatkih karakteristika na nanoskali. Također je uočeno da je dioba stanica obloženih probiotika odgođena ovisno o broju polimernih slojeva. Ova strategija je pokazala poboljšanu

zaštitu i kontrolirano otpuštanje probiotičkih stanica u gastrointestinalnim uvjetima. Usprkos učinkovitoj zaštiti od fizikalnih i kemijskih faktora, svojstva prijanjanja obloženih probiotika su jako poboljšana. Lbl metoda zahtjeva puno vremena, a korak automatizacije taloženja polimera teško je povećati (Centurion i sur, 2021).

Jednostanična inkapsulacija probiotika ima nekoliko prednosti naspram tzv. „bulk“ inkapsulacije, a tu spada poboljšana bioraspodjelivost protiv napada iz okoliša, poboljšana mukoadhezija, otpornost *in vivo* i može potencijalno imati ulogu u prevenciji i liječenju bolesti na staničnoj razini. Metode tzv. „bulk“ inkapsulacije pokazale su uspješnu zaštitu probiotika od gastrointestinalne okoline, međutim zakazivale bi kod sinteze i željenog učinka pa su se u tu svrhu koristile alternativne metode. Tako je jednostanična inkapsulacija probiotika postala napredniji pristup, gdje su pojedinačne probiotičke stanice obložene nanomaterijalima, koji daju različitu zaštitu na pH, enzimsku aktivnost, na različite antibiotike i kemikalije (Cao i sur., 2019; Anselmo i sur., 2016). Cilj probiotičkih stanica je doprijeti do crijevnih stanica, međutim postoji samo nekoliko izvješća o prednostima adhezije sustava za inkapsulaciju u kojima su neki materijali pokazali da povećavaju prijanjanje obloženih mikrokapsula u crijevima prema studijama *in vitro* (Mawad i sur., 2018). S druge strane, metode inkapsulacije jedne stanice su pokazale značajno povećanje obloženih bakterija u probavnom traktu i provođenje u *in vivo* istraživanja u životinjama. Također, bakterije obložene biofilmom pokazale su poboljšanu mukoadheziju *in vivo*. Probiotičke bakterije za borbu protiv drugih mikroorganizama (poput patogenih bakterija) mogu se primijeniti kroz različite mehanizme poput ometanja kompeticije, kompeticije hranjivih tvari i izlučivanja antimikrobne tvari. Dakle, metode inkapsulacije jedne stanice pružaju uvid u različite biološke značajke za prevenciju i rješavanje bolesti (Centurion i sur., 2021).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1.MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korišteni su sojevi *Limosilactobacillus fermentum*, koji sintetiziraju egzopolisaharida. Soj MC1 izoliran je iz mikrobiote majčinog mlijeka, dok je soj D12 izoliran iz dimljenog sira. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

**Tablica 1.** Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> D12	MRS, 37°C, anaerobno

##### 3.1.2. Hranjive podloge

U ovom radu su korištene sljedeće hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biovit“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 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

- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol 70 %, „Kemika“, Hrvatska

- etanol 96 %, „Kemika“, Hrvatska
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- obrano mlijeko, „Sigma Aldrich“, SAD
- pankreatin, „Fluka“, Švicarska
- pepsin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- poli(dialildimetilamonij klorid) (*engl.* poly(diallyldimethylammonium chloride), PDDA), „Sigma-Aldrich“, SAD
- poli(stirensulfonat) (*engl.* poly(styrenesulfonate), PSS), „Sigma-Aldrich“, SAD
- žučne soli, „Difco“, SAD

#### 3.1.4. Pribor i aparatura

- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „Shimatzu“, Japan
- celulozna vata, „Lola Ribar“, Hrvatska
- centrifuga Centric 160, „Tehtenica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje (15 mL i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- kivete za mjerenje zeta potencijala, „Malvern Panalytical“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- mikrotitarske pločice s 96 jažica, „Falcon“, 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 epruvete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za tubice, „neoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibromješač Vortex V-1 plus, „BioSan“, Latvija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- Zetasizer Ultra, „Malvern Panalytical“, Ujedinjeno Kraljevstvo

## 3.2.METODE

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje radnih mikroorganizama

Sojevi BMK čuvani su pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježu hranjivu podlogu te inkubirati u optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 1.

### 3.2.2. Nanoinkapsulacija *Lb. fermentum* sojeva „layer by layer“ metodom

Nanoinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata egzopolisaharida, provedena je „layer by layer“ metodom. Princip metode temelji se na stvaranju slojeva različitih naboja na površini stanične stijenke bakterije. Kao kationski polielektrolit korištena je otopina poli (dialil-dimetil-amonij klorid) (PDDA), dok je kao anionski polielektrolit korištena otopina natrijev polistiren sulfonat (PSS). Budući da je površina stanica BMK negativno nabijena, nanoinkapsulacija započinje dodatkom kationskog polielektrolita (PDDA), a zatim anionskog (PSS), i to sve do formiranja željenog broja slojeva.

300 mL prekonoćne kulture sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12, uzgojene u MRS bujonu pri 37 °C u anaerobnim uvjetima, cetrifugirane su 10 min pri 4200 o/min. Talozi stanica isprani su dva puta s 25 mL sterilne deionizirane vode. Nakon ispiranja destiliranom vodom, suspenzije stanica pojedinih sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 su se podijelile na dva dijela, kontrolu (odnosi se na stanice sojeva MC1 i D12 koje neće biti podvrgnute procesu nanoinkapsulacije, tzv. slobodne stanice) i nanoinkapsulirane stanice (stanice sojeva MC1 i D12 koje će se nanoinkapsulirati „layer by layer“ metodom). Dio suspenzija koji se inkapsulira se centrifugira 5 min na 4200 o/min, talozi stanica se resuspendiraju u 15 mL otopine polimera pozitivnog naboja (PDDA) koncentracije 2

mg/mL te inkubira 10 min. Nakon inkubacije, suspenzije se centrifugiraju 5 min na 4200 o/min, a talozi stanica se isperu dva puta sa sterilnom destiliranom vodom. Nakon ispiranja, talozi stanica se resuspendiraju u 15 mL otopine polimera negativnog naboja (PSS) koncentracije 2 mg/mL te inkubiraju 10 min. Nakon inkubacije, suspenzija se centrifugira 5 min na 4200 o/min i talog bakterijskih stanica ispere dva puta s deioniziranom vodom, čime se dobiju stanice sojeva MC1 i D12 s jednim slojem polielektrolita. Kako bi se dobile nanokapsule s 3 sloja, ovaj postupak se ponovi još dva puta.

### 3.2.3. Mjerenje zeta potencijala

Kako bi se potvrdilo formiranje nanokapsula tzv. „layer by layer“ metodom provedeno je mjerenje zeta potencijala na uređaju Zetasizer Ultra. Uzorci za mjerenje zeta potencijala uzeti su prije prvog koraka nanoinkapsulacije i nakon svakog od sljedećih koraka (po soju 7 uzoraka). U tu svrhu, 20 µL uzorka je pomiješano s 2 mL destilirane vode te prebačeno u kivetu za mjerenje zeta potencijala.

### 3.2.4. Liofilizacija BMK i njihovih biomolekula

Po 7 x 0,3 mL slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica dobivene prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. je potrebno centrifugirati i resuspendirati u 0,3 mL obranog mlijeka (za 1. tjedan; 1, 2, 3, 6 i 12 mjeseci, za liof.). Zatim se po 2 x 1 mL slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica centrifugira i resuspendira u 1 mL obranog mlijeka (za ŽS i GIT). Nakon toga se 5 mL slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica centrifugira i talog se resuspendira u 5 mL obranog mlijeka i rasporedi u penicilinke. Nakon toga se stanice zamrznu i liofiliziraju. Penicilinku označenu s „liof.“ resuspendirati u 0,3 mL destilirane vode i napraviti razrjeđenja i odrediti CFU/mL nanoinkapsuliranih i slobodnih stanica nakon liofilizacije (do 10<sup>8</sup> raz.). Na kraju se izvade ploče iz inkubatora i prebroje kolonije.

### 3.2.5. Preživljavanje nanoinkapsuliranih sojeva *Lb. fermentum* postupak liofilizacije te skladištenje

Kako bi se ispitala uloga nanoinkapsulacije sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 u preživljavanju procesa liofilizacije, suspenzije nanoinkapsuliranih stanica sojeva su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min. Suspenzije slobodnih stanica (kontrola) su također centrifugirane 10 min pri 4200 o/min. Dobiveni talozi su resuspendirani u odgovarajućem volumenu 10 %-tnog (w/v)

obranog mlijeka. Pripremljeni su alikvoti tako da je 1 mL dobivene suspenzije prebačen u penicilinke te su uzorci smrznuti na -80 °C i podvrgnuti procesu liofilizacije. Nakon liofilizacije, u penicilinke je dodan 1 mL sterilne destilirane vode te je broj živih slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica nakon liofilizacije određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.6.

Nakon 1 mjeseca, u penicilinke s liofiliziranim slobodnim i nanoinkapsuliranim stanicama je dodano 1 mL sterilne destilirane vode te je broj živih stanica nakon liofilizacije te skladištenja tijekom 1 mjesec je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.6.

### 3.2.6. Preživljavanje nanoinkapsuliranih sojeva *Lb. fermentum* simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta

#### 3.2.6.1. Priprema simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) 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) i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

#### 3.2.6.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje nanoinkapsuliranih sojeva *Lb. fermentum*

Liofilizirani uzorci slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12, prema postupku opisanom u poglavlju 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, 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. 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 3.2.6.

#### 3.2.6.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Broj živih bakterija određen je indirektnom metodom tako da su priređena decimalna

razrjeđena suspenzija bakterijskih stanica u sterilnoj fiziološkoj otopini nacijepljena na MRS agar u obliku kapi (10  $\mu$ L) 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.

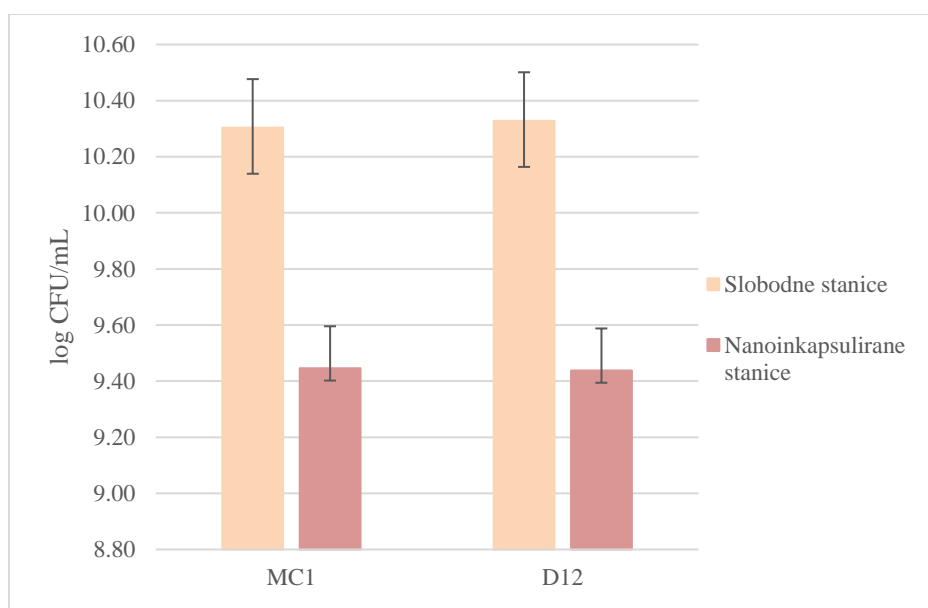
#### 3.2.7. Statistička obrada rezultata

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 prikazana je na grafovima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Nanoinkapsulacija sojeva *Lb. fermentum*

Ovim radom provedeno je ispitivanje kojim se pratio početni broj stanica *Lb. fermentum* sojeva MC1 i D12 prije i nakon „LbL“ nanoinkapsulacije. Prilikom nanoinkapsulacije, veličina čestica izravno utječe na isporuku bioaktivnih spojeva u ljudskom organizmu (Lopez-Rubio i sur., 2006). Nanoinkapsulacija samim time ima potencijal povećati bioraspoloživost, poboljšati kontrolirano otpuštanje i omogućiti preciznu dostavu bioaktivne spojeva u usporedbi s mikroinkapsulacijom. Nanoinkapsulacija je provedena prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. te je na slici 4 prikazan početan broj bakterijskih kolonija prije i nakon nanoinkapsulacije kao log (CFU/mL).

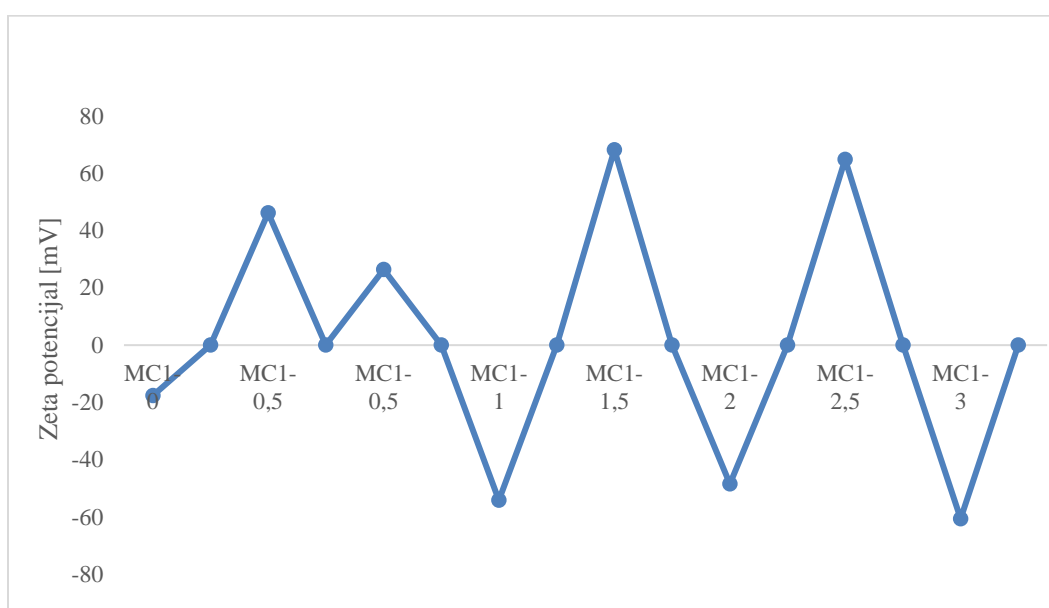


**Slika 4.** Početan broj bakterijskih kolonija sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 prije i nakon nanoinkapsulacije izražen kao logaritamska vrijednost CFU/mL

### 4.2. Mjerenje zeta potencijala

Nakon provođenja postupka (opisanom u poglavlju 3.2.3.) mjerenja zeta potencijala uzoraka sojeva MC1 i D12 koji su uzeti prije prvog koraka nanoinkapsulacije i nakon svakog sljedećeg koraka (po sloju 7 uzoraka) dobiveni su rezultati prikazani u grafički. 7 uzoraka po sloju

stanica BMK se mjerio površinski naboj. Mjerio se zeta potencijal uzoraka MC1-0, MC1-0,5, MC1-0,5, MC1-1, MC1-1,5, MC1-2, MC1-2,5, MC1-3 te uzoraka D12-0, D12-0,5, D12-1, D12-1,5, D12-2, D12-2,5, D12-3. Uzorak soja MC1 prije nanoinkapsulacije imao je negativan naboj. Uzorci kroz daljnje korake nanoinkapsulacije mijenjaju naboj, pa su tako neki uzorci sojeva pozitivno, a neki negativno nabijeni. Ovo bilježenje promjene naboja iz pozitivnog u negativni i obrnuto različitih uzoraka ukazuje na uspješno formiranje nanokapsula (Franz i sur., 2010). Sličan rezultat dobiven je za uzorke soja D12. Rezultati očitovanja zeta potencijala u mV prikazani su na slikama 5 i 6 za bakterijske sojeve *Lb. fermentum* MC1 i D12.



**Slika 5.** Vrijednosti zeta potencijala određene za slobodne stanice, te tijekom postupnog nanošenja slojeva različitih elektrolita u postupku „sloj po sloj“ nanoinkapsulacije *Lb. fermentum* MC1

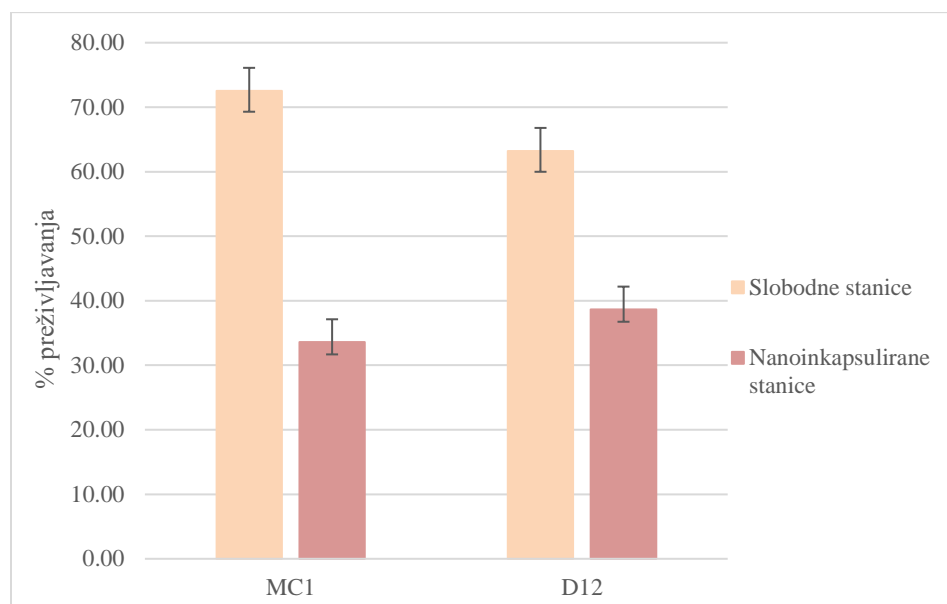




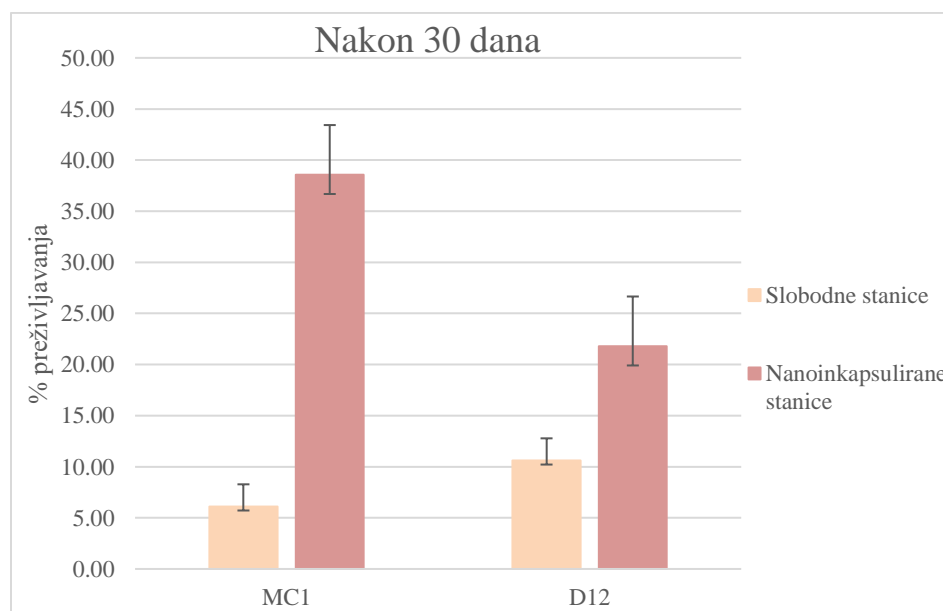
**Slika 6.** Vrijednosti zeta potencijala određene za slobodne stanice, te tijekom postupnog nanošenja slojeva različitih elektrolita u postupku „sloj po sloj“ nanoinkapsulacije *Lb. fermentum* D12

#### **4.3. Postotak preživljavanja liofiliziranih stanica sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 tijekom nanoinkapsulacije**

Liofilizacija je provedena prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4. te je kasnije provedena liofilizacija i postupak skladištenja nanoinkapsuliranih sojeva *Lb. fermentum* također prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4. Ovim postupkom pratio se postotak preživljavanja liofiliziranih slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 te postotak preživljavanja istih liofiliziranih stanica nakon 1 mjeseca skladištenja. Liofilizacija je skup tehnološki postupak, ali kojim se osiguravaju visokokvalitetni proizvodi (Ivančević i Mitrović, 2012). Na slikama 7 i 8 prikazani su rezultati preživljavanja stanica bakterijskih sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12. Rezultat je prikazan kao postotak preživljavanja. Analizirajući rezultate može se zaključiti da je kod soja MC1 nakon liofilizacije i skladištenja mjesec dana postotak preživljavanja slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica manji u odnosu na postotak preživljavanja slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica nakon samog provođenja liofilizacije. Istovjetno se može zaključiti za soj *Lb. fermentum* D12.



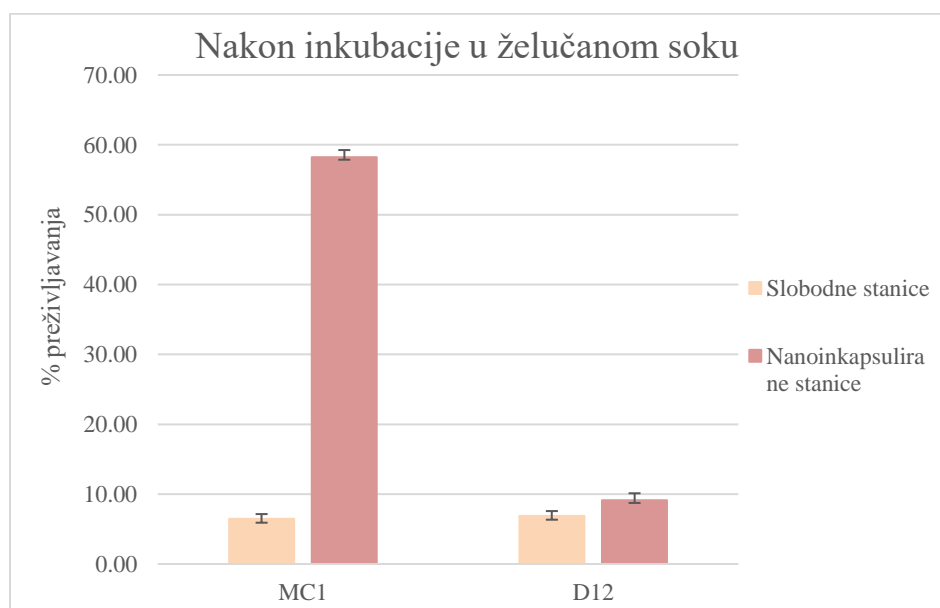
**Slika 7.** Postotak preživljavanja kolonija slobodnih i nanoinkapsularanih stanica bakterijskih sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 nakon liofilizacije



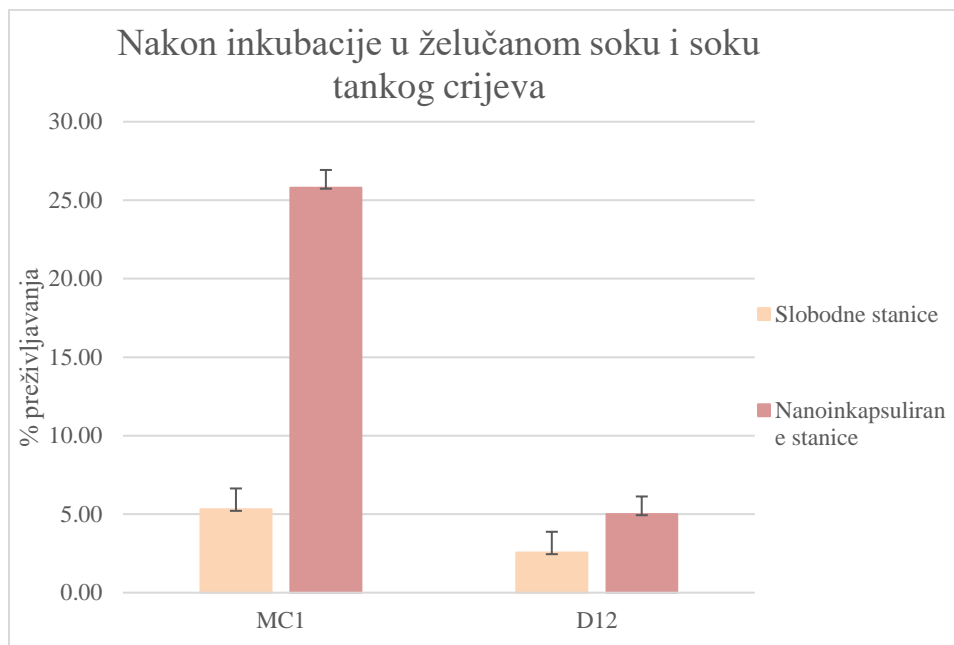
**Slika 8.** Postotak preživljavanja kolonija slobodnih i nanoinkapsularanih stanica bakterijskih sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 nakon liofilizacije i mjesec dana skladištenja

#### 4.4. Preživljavanje nanoinkapsuliranih sojeva *Limosilactobacillus fermentum* simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta

Ovim postupkom opisanom u poglavlju 3.2.5. praćeno je preživljavanje liofiliziranih slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica *Limosilactobacillus fermentum* sojeva MC1 i D12 nakon inkubacije u želučanom soku te nakon inkubacije u želučanom soku i soku tankog crijeva. Na slikama 9 i 10 prikazani su rezultati preživljavanja stanica bakterijskih sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 nakon inkubacije u želučanom soku i nakon inkubacije u želučanom soku i soku tankog crijeva. Analizirajući rezultate može se zaključiti da liofilizirane slobodne i nanoinkapsulirane stanice bakterijskog soja MC1 imaju veći postotak preživljavanja nakon inkubacije u samom želučanom soku nego nakon inkubacije u želučanom soku i soku tankog crijeva. Isto vrijedi i za bakterijski soj D12.



**Slika 9.** Postotak preživljavanja kolonija liofiliziranih slobodnih i nanoinkapsularanih stanica bakterijskih sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 nakon inkubacije u želučanom soku



**Slika 10.** Postotak preživljavanja kolonija liofiliziranih slobodnih i nanoinkapsularanih stanica bakterijskih sojeva *Lb. fermentum* MC1 i D12 nakon inkubacije u želučanom soku i soku tankog crijeva

## 5. ZAKLJUČCI

S obzirom na rezultate provedenog eksperimenta, može se zaključiti:

1. Učinkovito formiranje nanokapsula bakterijskih stanica *Limosilactobacillus fermentum* potvrđeno je mjerenjem zeta potencijala, temeljem kojeg je zabilježena promjena iz pozitivnog u negativni naboj i obrnuto tijekom nanošenja slojeva elektrolita kroz faze „sloj po sloj“ nanoinkapsulacije.
2. Postotak preživljavanja liofiliziranih stanica *Limosilactobacillus fermentum* se tijekom razdoblja skladištena u trajanju od mjesec dana se reducira, ali primjenom „LbL“ nanoinkapsulacije postiže se manja razlika u odumiranju bakterijskih stanica s obzirom na određenii početni broj kolonija.
3. Postotak preživljavanja nanoinkapsuliranih sojeva *Limosilactobacillus fermentum* veći je nakon inkubacije u samom želučanom soku naspram postotka preživljavanja intaktnih sojeva nakon inkubacije u želučanom soku i soku tankog crijeva što upućuje na zaštitnu ulogu nanoinkapsulacije i mogućnost pojačanje biodostupnosti *in situ*.

## 6. POPIS LITERATURE

Anselmo AC, McHugh KJ, Webster J, Langer R, Jaklenec A (2016) Layer-by-Layer Encapsulation of Probiotics for Delivery to the Microbiome. *Advanced Materials* **28**, 9486–9490. <https://doi.org/10.1002/adma.201603270>

Behare P V., Singh R, Nagpal R, Rao KH (2013) Exopolysaccharides producing *Lactobacillus fermentum* strain for enhancing rheological and sensory attributes of low-fat dahi. *J Food Sci Technol* **50**, 1228–1232. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0999-6>

Cao Z, Wang X, Pang Y, Cheng S, Liu J (2019) Biointerfacial self-assembly generates lipid membrane coated bacteria for enhanced oral delivery and treatment. *Nat Commun* **10**. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13727-9>

Centurion F, Basit A, Liu J, Gaisford S, Rahim A, Kalantar-Zadeh K (2021) Nanoencapsulation for Probiotic Delivery, *ACS Nano* **15**, 18653–18660. <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c09951>

Dan T, Fukuda K, Sugai-Bannai M, Takakuwa N, Motoshima H, Urashima T (2009) Characterization and expression analysis of the exopolysaccharide gene cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 2656–2664. <https://doi.org/10.1271/bbb.90502>

Decher G (1997) Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* **277**, 1232–1237. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1232>

Fan Y, Pedersen O (2021) Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* **19**, 55–71. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>

Franz B, Balkundi SS, Dahl C, Lvov YM, Prange A (2010) Layer-by-Layer nano-encapsulation of microbes: Controlled cell surface modification and investigation of substrate uptake in bacteria. *Macromol Biosci* **10**, 164–172. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900142>

George F, Daniel C, Thomas M, Singer E, Guilbaud A, Tessier FJ, i sur. (2018) Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. *Front Microbiol* **9**, 410823. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02899>

Goldenberg JZ, Yap C, Lytvyn L, Lo CKF, Beardsley J, Mertz D, i sur. (2017) Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* **12**, <https://doi.org/10.1002/14651858.cd006095.pub4>

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, i sur. (2014) Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Hossain TJ (2022) Functional genomics of the lactic acid bacterium *Limosilactobacillus fermentum* LAB-1: metabolic, probiotic and biotechnological perspectives. *Heliyon* **8**. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11412>

Hossain TJ, Mozumder HA, Ali F, Akther K (2022) Inhibition of Pathogenic Microbes by the Lactic Acid Bacteria *Limosilactobacillus Fermentum* Strain LAB-1 and *Levilactobacillus Brevis* Strain LAB-5 Isolated from the Dairy Beverage Borhani. *Current Research in Nutrition and Food Science* **10**, 928–939. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.10.3.10>

Iler RK (1966) Multilayers of colloidal particles. *J Colloid Interface Sci* **21**, 569-594. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(66\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0095-8522(66)90018-3)

inPharma (2023), <http://www.inpharma.hr/index.php/news/51/19/Probiotici-i-imunitet>. pristupljeno 21. srpnja 2023.

Ivančević S (2012) specifičnosti sušenja proizvoda liofilizacijom. *Cont Agr Engng* **38**, 97-108.

Jurášková D, Ribeiro SC, Silva CCG (2022) Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods* **11**, 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>

Kalantzopoulos G (1997) Fermented Products with Probiotic Qualities. *Anaerobe* **3**, 185-190. <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0099>

Khalid K (2011) An overview of lactic acid bacteria *J Biosci Med* **2**, 8–13. <http://dx.doi.org/10.4236/jbm.2014.29002>

- Lilly DM, Stillwell RH (1965) Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147**, 747–748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>
- Lopez-Rubio A, Gavara R, Lagaron JM (2006) Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Sci Technol* **17**, 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.012>
- Mawad A, Helmy YA, Shalkami AG, Kathayat D, Rajashekara G (2018) E. coli Nissle microencapsulation in alginate-chitosan nanoparticles and its effect on *Campylobacter jejuni* in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 10675–10690. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9417-3>
- Mikelsaar M, Zilmer M (2009) *Lactobacillus fermentum* ME-3 - An antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb Ecol Health Dis* **21**, 1–27. <https://doi.org/10.1080/08910600902815561>
- 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>
- Naghmouchi K, Belguesmia Y, Bendali F, Spano G, Seal BS, Drider D (2019) *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* **60**, 3387-3399. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688250>
- Owusu-Kwarteng J, Tano-Debrah K, Akabanda F, Jespersen L (2015) Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough Applied microbiology. *BMC Microbiol* **15**. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0602-6>
- Pascual LM, Daniele MB, Giordano W, Pájaro MC, Barberis IL (2008) Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol* **56**, 397–402. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9094-4>



- Richardson JJ, Cui J, Björnmalm M, Braunger JA, Ejima H, Caruso F (2016) Innovation in Layer-by-Layer Assembly. *Chem Rev* **116**, 14828–14867. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00627>
- Russo P, Capozzi V, Arena MP, Spadaccino G, Dueñas MT, López P, i sur. (2014) Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 3691–3700. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5484-7>
- Sanalibaba P, Cakmak GA (2016) Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Appli Micro Open Access* **2**. <https://doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>
- Satokari R (2019) Modulation of gut microbiota for health by current and next-generation probiotics. *Nutrients* **11**, 1921. <https://doi.org/10.3390/nu11081921>
- Sawadogo-Lingani H, Lei V, Diawara B, Nielsen DS, Møller PL, Traoré AS, i sur. (2007) The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *J Appl Microbiol* **103**, 765–777. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03306.x>
- Seddik HA, Bendali F, Gancel F, Fliss I, Spano G, Drider D (2017) *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics Antimicrob Proteins* **9**, 111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>
- Shukla SD, Budden KF, Neal R, Hansbro PM (2017) Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clin Transl Immunology* **6**, e133. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.6>
- Šušković J, Brkić B, Matošić S (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**, 57-73. <https://hrcak.srce.hr/94894>
- Šušković i Kos, predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akad. god. 2022./2023., [https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/7628179/mod\\_resource/content/1/biotehnologija%204\\_2022\\_5web.pdf](https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/7628179/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2022_5web.pdf)
- Wieërs G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Philippart de Foy JM, Dequenne I, i sur. (2020) How Probiotics Affect the Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* **9**, 490925. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Lucija Vitaliani 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