

# Analiza funkcionalnosti višesojnog probiotičkog pripravka

---

**Balun, Marta**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*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:159:485398>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-03**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Marta Balun

**ANALIZA FUNKCIONALNOSTI  
VIŠESOJNOG PROBIOTIČKOG  
PRIPRAVKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak.

*Posebno se želim zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Novak na pomoći, susretljivosti i vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Također, želim se zahvaliti i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura.*

*Najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima na iskazanoj podršci i ljubavi tijekom cijelog studiranja. Hvala vam što ste bili uz mene i uljepšali mi studentske dane.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

Diplomski sveučilišni studij: Nutricionizam

### ANALIZA FUNKCIONALNOSTI VIŠESOJNOG PROBIOTIČKOG PRIPRAVKA

Marta Balun, univ. bacc. nutr.  
0058215724

**Sažetak:** Probiotički pripravci se učestalo primjenjuju u profilaksi, te kao suportivna terapija prilikom poremećaja funkcije gastrointestinalnog trakta odraslih osoba, ali i dojenčadi. Na tržištu su dostupni brojni probiotički pripravci, koji prema deklaraciji, sadrže bilo jedan soj ili su višesojni pripravci, te se podrazumijeva da su im znanstveno dokazani i opisani mehanizmi funkcionalnosti. Cilj ovog rada bio je validacija kvalitete nasumično odabrane, tržišno dostupne formulacije za dojenčad, procjenom broja probiotičkih stanica i sadržaja, te analizom preživljavanja sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Pri tome su primijenjene mikrobiološke analize, a analiza prisutnih probiotičkih kultura provedena je pristupom sekvenciranja slijedeće generacije. Prema rezultatima pripravak sadrži broj bakterijskih stanica kako je navedeno na deklaraciji te premašuje vrijednost minimalne propisane koncentracije bakterijskih stanica po mililitru probiotičke formulacije, čime je ispunjen ključni zahtjev za procjenu kvalitete probiotika. Konzorcij učinkovito preživljava simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta. Analiza rezultata sekvenciranja potvrdila je prisutnost sojeva *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus reuteri*. Rezultati ovog rada potvrđuju važnost kontinuiranog praćenja kvalitete probiotičkih pripravaka, proizvedenih po principima dobre proizvođačke prakse, s ciljem reduciranja broja nepouzdanih pripravaka te osiguranja primjene visokokvalitetnih probiotičkih formulacija.

**Ključne riječi:** probiotici, probiotički pripravak, gastrointestinalni trakt

**Rad sadrži:** 44 stranice, 10 slika, 17 tablica, 34 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Novak (mentor)
3. prof. dr. sc. Irena Keser (član)
4. prof. dr. sc. Ines Panjkota Krbavčić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 19. prosinca 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technologies

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

**Graduate university study programme:** Nutrition

### ANALYSIS OF FUNCTIONALITY OF THE MULTISTRAIN PROBIOTIC FORMULATION

Marta Balun, univ. bacc. nutr.  
0058215724

**Abstract:** Probiotic formulations are often used in prophylaxis and as a supportive therapy in the case of gastrointestinal tract function disorders in adults and infants. Numerous monostrain or multistrain probiotic formulations are available on the market. Before launching of the probiotic product, the mechanisms of action must be scientifically proven and described. The aim of this work was to validate the quality of a randomly selected, commercially available formulation for infants, by assessing the number of probiotic cells and content strains, and by analyzing the survival of strains in simulated conditions of the gastrointestinal tract. According to that, microbiological analyses were applied, and the analysis of the present probiotic cultures was carried out using the next generation sequencing approach. Following the results, formulation contains the number of bacterial cells as stated on the declaration and exceeds the value of the minimum prescribed concentration of bacterial cells per milliliter of probiotic formulation, which fulfills the key requirement for assessing the quality of probiotics. The probiotic consortium effectively survived simulated conditions of the gastrointestinal tract. Sequencing analysis confirmed the presence of *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* strains. The presence of contaminating bacteria is excluded. The results of this work confirm the importance of continuous monitoring of the quality of probiotic formulations, especially those produced according to the principles of good manufacturing practice, with the aim of reducing the number of unreliable formulations and ensuring the use of high-quality probiotic products.

**Keywords:** probiotics, probiotic formulation, gastrointestinal tract

**Thesis contains:** 44 pages, 10 figures, 17 tables, 34 references

**Original in:** Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Jasna Novak, PhD, Full professor

#### Reviewers:

1. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (president)
2. Jasna Novak, PhD, Full professor (mentor)
3. Irena Keser, PhD, Full professor (member)
4. Ines Panjkota Krbavčić, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** December 19<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. MIKROBIOTA DOJENČADI</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2. HRANA ZA DOJENČAD</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3. PROBIOTIČKI PRIPRAVCI ZA DOJENČAD</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4. PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH SOJEVA U PROBAVNOM SUSTAVU DOJENČADI</b> .....	<b>9</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>11</b>
3.1.1. Probiotički pripravak.....	11
3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge.....	12
3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor .....	13
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>14</b>
3.2.1. Bakterijska inokulacija i kultivacija sojeva iz probiotičkog pripravka.....	14
3.2.2. Brojanje kolonija.....	14
3.2.3. Određivanje morfologije stanica i fizioloških karakteristika .....	14
3.2.4. Praćenje preživljavanja probiotičkih kultura u otopini žučnih soli .....	15
3.2.5. Procjena preživljavanja probiotika <i>in vitro</i> u simuliranom probavnom traktu dojenčadi.....	15
3.2.6. Identifikacija bakterijskih stanica .....	17
3.2.7. Obrada podataka .....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>19</b>
<b>4.1. ANALIZA BAKTERIJSKOG RASTA PROBIOTIČKOG PRIPRAVKA</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2. MORFOLOGIJA STANICA I KOLONIJA</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3. PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA</b> .....	<b>29</b>
<b>4.4. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH STANICA PROBIOTIČKOG PRIPRAVKA</b> .....	<b>39</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>41</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>42</b>



## 1. UVOD

Organizam čovjeka kolonizira oko stotinu trilijuna različitih mikroorganizama poznatih pod nazivom mikrobiota. Važnost mikrobiote očituje se u očuvanju ljudskog zdravlja, značajnom utjecaju na imunološki sustav te regulaciji metabolizma. Gastrointestinalni trakt područje je koje je nastanjeno velikim brojem mikroorganizama te sadrži 95 % cjelokupne čovjekove mikrobiote. Upravo zbog toga crijevna mikrobiota često se definira kao „organ“ koji sadrži brojne stanice koje su u stalnoj interakciji kako međusobno tako i s domaćinom. Domaćin i njegova komenzalna mikrobiota žive u simbiozi, omogućujući uspostavu imunološkog sustava kao i sazrijevanje i razvoj intestinalnog epitela. Čovjek mikrobiotu stječe već tijekom porođaja, a razvoj crijevne mikrobiote pri rođenju progresivan je i brz. Tijekom prvih godina života intenzivno se formira te sazrijeva do treće godine kada postiže uravnotežen i stabilan sastav. Glavna karakteristika stjecanja mikrobiote pri rođenju je velika individualna različitost koja omogućuje stjecanje raznolikog ekosustava svakog pojedinca. Kolonizacija gastrointestinalnog trakta novorođenčadi započinje rodovima bakterija *Enterobacteriaceae*, a zatim s *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium* (Lemoine i sur., 2023). Dojenje ostaje čimbenik koji najviše utječe na mikrobiotu probavnog sustava dojenčadi tijekom prve godine života. Ono omogućuje nastanjivanje bakterija *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. i *Staphylococcus* sp., prirodno prisutnih u majčinom mlijeku. Unatoč mnogim benefitima, postoje razni slučajevi u kojima novorođenčad i dojenčad ne mogu imati korist od dojenja. U tim slučajevima cilj mliječne industrije je osigurati da su formule za dojenčad što sličnije majčinom mlijeku, kako po svom sastavu tako i po fiziološkim svojstvima. Zbog toga se često uvodi suplementacija probioticima i prebioticima te se time pridonosi postizanju cjelovitosti formule. Svrha suplementacije probioticima kod dojenčadi je nadoknađivanje unosa bakterija s dokazanim pozitivnim zdravstvenim djelovanjima te time unaprjeđenje zdravlja, rasta i obrane od bolesti. Međutim, neki probiotici nemaju dovoljnu stopu preživljavanja u uvjetima gastrointestinalnog trakta, koji uključuju niski pH želučane tekućine i prisutnost žučnih soli u tankom crijevu. Funkcionalnost probiotičkog pripravka očituje se i u kapacitetu probiotičkih bakterija da prežive uvjete probavnog sustava, odnosno da prilikom proizvodnje, ali i tijekom skladištenja održe visok broj probiotičkih stanica što je ključno za kvalitetu samog proizvoda (Naissinger da Silva i sur., 2021).

Cilj ovog rada bio je ispitati kvalitetu nasumično odabranog tržišnog probiotičkog pripravka za dojenčad s aspekta analize viabilnosti i preživljavanja probiotičkih stanica i mogućnosti preživljavanja bakterijskih kolonija u pripravku u visokom broju tijekom životnog ciklusa proizvoda. Također cilj je bio i definirati mikrobiološku sigurnost te preispitati kontrolu kvalitete probiotičke formulacije te provjeriti toleranciju sojeva prisutnih u formulaciji na simulirane uvjete

gastrointestinalnog trakta.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MIKROBIOTA DOJENČADI

Crijevna mikrobiota utječe na brojne procese u čovjekovom organizmu kao što je sazrijevanje imunološkog sustava, apsorpcija hranjivih tvari, regulacija metabolizma i sprječavanje kolonizacije patogena. Razvoj prirodne simbioze čovjeka i njegove mikrobiote u ranim fazama života pokazao se kao ključan za zdravlje dojenčadi te ima utjecaj na cjeloživotne posljedice. Promjene u sastavu crijevne mikrobiote povezane su s kratkoročnim i dugoročnim zdravstvenim poremećajima kao što su prekomjerna tjelesna masa, pretilost, atopije, metabolički sindrom i kronične upalne bolesti. Upravo zbog toga, rani život pruža jedinstvenu priliku za modulaciju crijevne mikrobiote s ciljem promicanja dugoročnog zdravlja (Derrien i sur., 2019).

Razvoj i sazrijevanje crijevne mikrobiote vrlo su dinamični i složeni procesi koji su pod utjecajem mnogih perinatalnih stanja uključujući čimbenike kao što su način poroda, vrsta hranjenja, upotreba antibiotika, način života te obilježja samog domaćina. Ovisno o vrsti poroda, rana mikrobiota dojenčadi se razlikuje. U slučaju vaginalnog poroda crijevna mikrobiota djeteta pod utjecajem je vaginalne mikrobiote majke dok je kod porođaja carskim rezom pod utjecajem okolišne mikrobiote (npr. s majčine kože ili iz zraka). Bertelsen i sur. (2016) navode kako se crijevna mikrobiota dojenčadi rođene vaginalnim putem sastoji od bakterija *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Escherichia* i *Streptococcus*. Novorođenčad rođena carskim rezom obično ima smanjenu razinu bakterija *Bifidobacterium* i *Bacteroides*, a sadrži više bakterija *Clostridium* i potencijalno patogenih bakterija te bakterije mikrobioma kože majke, uključujući *Staphylococcus*. Značajne razlike u mikrobioti uzrokovane vrstom porođaja nestaju između 6. i 14. mjeseca starosti (Lemoine i sur., 2023).

Već je poznato kako se crijevna mikrobiota dojenčadi hranjene majčinim mlijekom razlikuje od crijevne mikrobiote dojenčadi koja je hranjena dječjim formulama. Crijevna mikrobiota dojenog djeteta manje je raznolika no sadrži više razine bakterijskih vrsta *Bifidobacterium*, uključujući *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* i *Bifidobacterium longum*, koje su najbrojnije te se mogu razvijati na oligosaharidima majčinog mlijeka (HMO). Utvrđeno je kako navedeni bakterijski sojevi imaju različite mehanizme korištenja šećera što sugerira kako dostupnost hranjivih tvari među dojenčadi može pospješiti kolonizaciju specifičnim vrstama *Bifidobacterium* (Derrien i sur., 2019). Također, endogena sinteza sekretornog imunoglobulina A (slgA) putem limfocita sluznice crijeva u lumen, uvjetovana je prisutnošću mikrobiote, osobito

bakterija *Bifidobacterium*, nakon prvih tjedana života kada slgA može biti osiguran jedino majčinim mlijekom. Sekretorni IgA važno je oružje u imunološkoj obrani organizma od toksina i patogena (Lemoine i sur., 2023). S druge strane, dojenčad hranjena formulama ima brže sazrijevanje crijevne mikrobiote u usporedbi s dojenom djecom. Njihova mikrobiota ranije postaje raznolika što je rezultiralo obogaćivanjem anaerobnim bakterijama kao što su *Bacteroides* i *Clostridium*, a manjom zastupljenošću bakterija *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*.

Liječenje antibioticima također može imati utjecaj na zajednicu mikroba u crijevima. Primjena antibiotika kod novorođenčadi rezultirala je smanjenom prevalencijom *Clostridia*, a crijeva neliječene dojenčadi više su kolonizirale bakterije *E. coli* i *S. aureus*. Također, Bertelsen i sur. (2016) navode kako su primijećene razlike u mikrobiomu dojenčadi majki liječenih antibioticima tijekom poroda te je takva dojenčad pokazivala smanjeni broj vrsta *Bifidobacterium* i *Bacteroides* neposredno nakon rođenja, u trajanju do 12 mjeseci.

Općenito, manja brojnost bakterija *Bifidobacterium*, kao što je primijećeno kod porođaja carskim rezom ili kod upotrebe adaptiranih dječjih formula, faktor je rizika poremećaja metabolizma kratkolančanih masnih kiselina, povećanja pH stolice i slabljenja funkcije crijevne barijere. Posljedično, poremećen je odnos domaćina i mikrobiote te može doći do povećanja rizika od kolonizacije patogenima ili probavne upale. Svi ovi parametri mogu sudjelovati i u promijenjenom djelovanju imunološkog sustava te utjecati na povećan rizik od razvoja alergija, autoimunih bolesti i ostalih bolesti povezanih s imunološkim sustavom (Lemoine i sur., 2023).

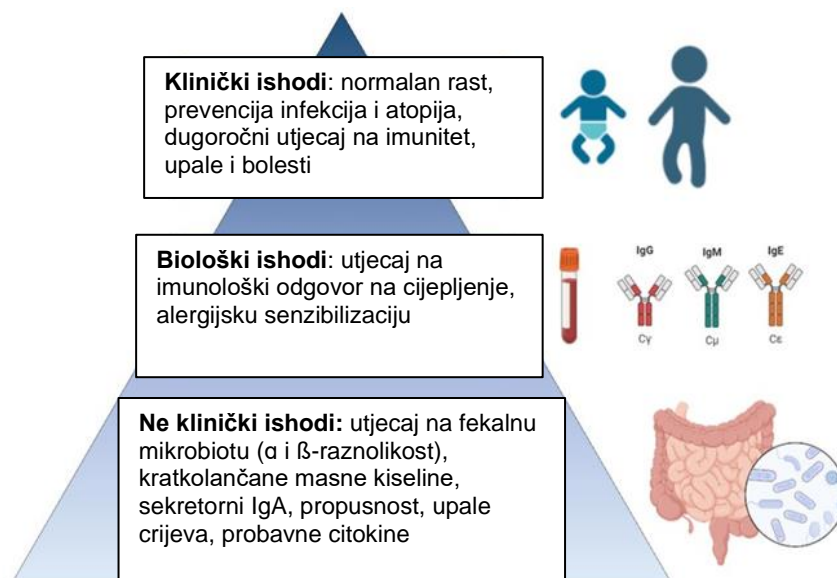
Iako se pokazalo kako dojenje ima koristan učinak na razvoj i sazrijevanje crijevne mikrobiote dojenčadi, postoje situacije u kojima ono nije uvijek moguće. Tada se koriste adaptirane dječje formule koje nastoje biti što sličnije majčinom mlijeku.

## 2.2. HRANA ZA DOJENČAD

Komercijalne formule za dojenčad koriste se diljem svijeta, a mogu djelomično ili potpuno zamijeniti majčino mlijeko kod dojenčadi ili male djece između 0 do 36 mjeseci starosti. Hrana za dojenčad tj. mliječne formule mogu se podijeliti u tri veće kategorije, a to su standardna početnička hrana za dojenčad (0 do 6 mjeseci starosti), prijelazna dojenačka hrana (6 do 12 mjeseci starosti) i hrana za malu djecu (1. do 3. godina života). Radi se o procesiranoj hrani s tipičnom sastavom od mliječnih proteina, laktoze i drugih šećera, biljnih ulja, mikronutrijenata i ostalih komponenti. Standardne početničke formule mogu biti u formi koncentrirane tekućine, praha ili gotove i spremne za upotrebu. Pri tome, ekonomski najisplativije su formule u prahu koje se miješaju s vodom, dok su najskuplje gotove formule koje ne zahtijevaju dodatnu pripremu. Konzumacija hrane za dojenčad u porastu je svakoga dana, a neki od razloga su porast slučajeva malnutricije, zabrinutost oko prehrane dojenčadi, porast prihoda srednje klase te sve veći broj zaposlenih majki (Bakshi i sur., 2023). Dojenačke formule osmišljene su tako da održavaju ravnotežu makro i mikronutrijenata, a većinom su izvedene iz kravljeg mlijeka koje se pokazalo kao najbolja alternativa majčinom mlijeku. Kao izvor proteina najčešće se koriste mliječni izvori kao što su izolat proteina sirutke, obrano mlijeko u prahu, koncentrat proteina sirutke i slično. Također, kao izvor masti većinom se koriste biljni izvori masti no mogu biti zamijenjeni i mastima iz životinjskog mlijeka. Legislativa Europske Unije navodi kako minimalan sadržaj ukupnih ugljikohidrata u početnoj hrani za dojenčad treba iznositi 9 g/100 kcal, a kod formula baziranih na kravljem mlijeku glavni izvor ugljikohidrata je laktoza. Također, uz laktozu dopušteni su i drugi izvori kao što su saharoza, maltoza i glukoza koji su se pokazali uspješni u poboljšanju okusa formule. Pokazalo se kako sastav dojenačkih formula znatno utječe na razvoj intestinalnog mikrobioma dojenčadi. Tako je utvrđeno kako je dojenčad hranjena formulama s proteinom sirutke imala fekalnu mikrobiotu sličniju dojenoj djeci nego dojenčad hranjena formulom s kazeinom (Bakshi i sur., 2023). Osim toga, dojenačke formule obogaćene su vitaminima i mineralima te se zbog porasta upotrebe aktivno radi na poboljšavanju njihovih formulacija. Radi toga se često obogaćuju raznim bioaktivnim komponentama koje pokazuju poželjne zdravstvene benefite i time hranu za dojenčad čine što sličniju majčinom mlijeku. Neke od komponenti kojima se obogaćuju dojenačke formule, a utječu na kompoziciju mikrobiote dojenčadi su probiotici i prebiotici (Ahern i sur., 2019).

### 2.3. PROBIOTIČKI PRIPRAVCI ZA DOJENČAD

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), probiotici su živi mikroorganizmi koji u adekvatnim količinama pružaju zdravstvenu korist domaćinu. Ovi mikroorganizmi direktno ili indirektno pridonose nekim od zdravstvenih benefita uključujući zaštitu od patogena, hipertenzije, upale, dijabetesa, oksidativnog stresa te su uključeni u modulaciju mikrobioma i imunološkog sustava (Naissinger da Silva i sur., 2021). Konkretno, probiotički pripravci često se koriste kod liječenja ili prevencije mnogih gastrointestinalnih bolesti uzrokovanih infekcijama, neravnotežom mikrobioma i poremećajima crijevne sluznice. To uključuje stanja kao što su upalne bolesti crijeva, dijareje uslijed putovanja ili upotrebe antibiotika, sindrom iritabilnog crijeva, infekcije s *H. pylori* i *C. difficile* i slično. Posljednjih godina, upotreba probiotika se širi te se oni počinju koristiti i kod mnogih drugih stanja i poremećaja uključujući intoleranciju na laktozu, respiratorne i urinarne infekcije, atopijski dermatitis, alergije te neurološke, kardiovaskularne i autoimune bolesti (Mazzantini i sur., 2021). Probiotici pomažu obnoviti crijevnu mikrobiotu kroz adheziju i kolonizaciju crijevne sluznice te sprječavaju proliferaciju patogenih bakterija pomoću nadmetanja za dostupne nutrijente. Slika 1 prikazuje očekivane kliničke i ne kliničke ishode probiotika tijekom djetinjstva.



**Slika 1.** Piramida očekivanih kliničkih i ne kliničkih ishoda uzimanja probiotika tijekom djetinjstva (prema Lemoine i sur., 2023)

Čimbenici okoliša imaju bitnu ulogu u razvoju crijevne mikrobiote pa se stoga pretpostavlja da upravljanje sastavom crijevnih mikroba kod dojenčadi, putem probiotičkih i prebiotičkih dodataka, nudi potencijalnu priliku za promicanje zdravlja. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) u Europi te GRAS (engl. *Generally recognized as safe*) status u SAD-u pružaju sigurnosne procjene te navode kako su probiotici u formulama za dojenčad dodani u odgovarajućim količinama, sigurni te osiguravaju odgovarajući rast zdrave dojenčadi (Lemoine i sur., 2023). Ipak, EFSA preporučuje provedbu daljnjih istraživanja kako bi se dobila najviša kvaliteta dokaza njihove učinkovitosti. Uzimajući u obzir zdravu intestinalnu mikrobiotu majki i dojenčadi, najčešće proučavana i korištena vrsta probiotika pripada rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Saccharomyces*. Također, postoje inicijative za korištenje bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka, s ciljem dobivanja formula koje što bliže oponašaju majčino mlijeko (Bertelsen i sur., 2016).

*Bifidobacterium animalis* sp. *lactis* Bb-12 je bakterija originalno izolirana iz fermentiranog mlijeka, a nastanjuje crijeva zdravih odraslih osoba i dojenčadi. Istraživanje je pokazalo kako je *B. lactis* Bb-12 imao imunomodulatorni učinak na dojenčad staru 6 tjedana te je stimulirao proizvodnju probavnog slgA. Također je smanjio rizik za nastanak akutnog gastroenteritisa kod dojenčadi koja su probiotik uzimala kroz dojenačke formule. Dojenčad rođena carskim rezom te hranjena dojenačkim formulama suplementiranim s *B. lactis* Bb-12 imala je fekalne razine *Bifidobacteria* slične dojenoj dojenčadi rođenoj carskim rezom (Lemoine i sur., 2023).

Utvrđeno je kako neki probiotici imaju sposobnost mijenjanja sastava crijeva. Studija je pokazala kako je zdrava dojenčad koja je primala formulu obogaćenu bakterijom *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) bila češće kolonizirana laktobacilima nego dojenčad koja je primala standardnu formulu (Bertelsen i sur., 2016). Također suplementacija ekstenzivno hidrolizirane formule kazeina LGG-om kod dojenčadi alergične na proteine kravljeg mlijeka, imala je pozitivan utjecaj na probavne upale, brže stjecanje tolerancije na proteine mlijeka te poboljšanje stanja poremećaja crijeva kod dojenčadi. Kombinacija eHCF i LGG pozitivno je utjecala na funkciju mikrobiote, s povećanom proizvodnjom butirata koji sudjeluje u modulaciji stjecanja imunološke tolerancije (Lemoine i sur., 2023).

*Lactobacillus fermentum* CECT5716 izoliran je iz mlijeka majke 4 dana nakon poroda te je zatim karakteriziran kao ljudski probiotik. Istraživanje koje su proveli Maldonado i sur. (2019) pokazalo je kako je dojenčad koja je bila suplementirana s *L. fermentum* CECT5716 imala rjeđu pojavu dijareja te su one kraće trajale nego kod dojenčadi koja je uzimala nesuplementirane formule. Veća razina *Bifidobacterium sojeva* u fecesu povezana je s manjim rizikom od pojave dijareje. Također, istraživanje je pokazalo kako je soj *Bifidobacterium breve* CECT7263 imao pozitivan utjecaj na simptome infantilnog kolitisa zbog mogućeg djelovanja na intestinalnu funkciju. Maldonado i sur. (2019) navode kako je suplementacija dječjih formula sa sojevima *L.*

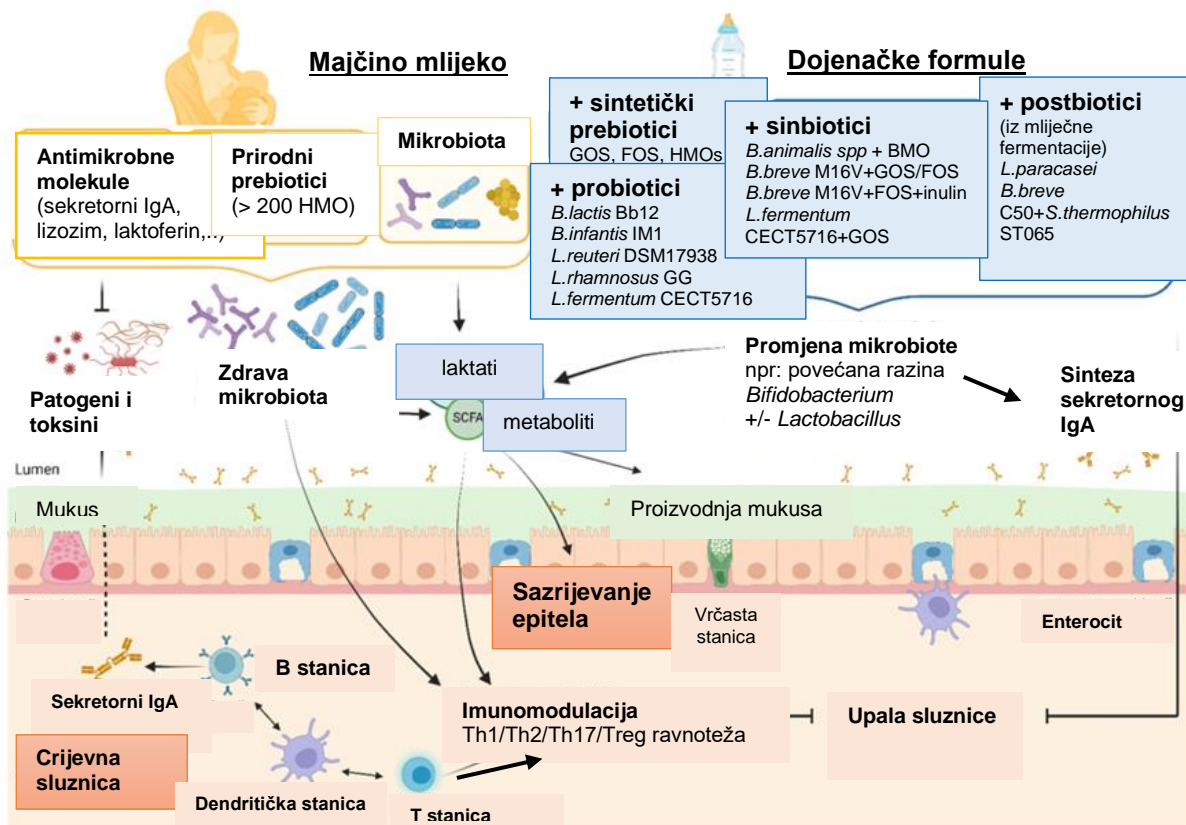
*fermentum* CECT5716 i *B. breve* CECT7263 tijekom prve godine života sigurna te ima pozitivna djelovanja na zdravlje dojenčadi. Uzimajući u obzir da su oba soja prirodno prisutna u majčinom mlijeku, kombinacija oba soja i dodatak u dojenačke formule može biti strategija za poboljšanje zdravlja dojenčadi hranjene dojenačkim formulama.

Ukoliko je cilj suplementacije probioticima uspostava stabilne mikrobiote crijeva, prvo se treba posvetiti očuvanju i uspostavi kolonizacije svakog taksona. Vjeruje se kako je to već tijekom prvih mjeseci nakon rođenja. Međutim, ne događa se kolonizacija svakog taksona u isto vrijeme te se zbog toga vjeruje kako je potrebno identificirati uvjete za svaku vrstu posebno. Duljina trajanja suplementacije probioticima kako bi se postigao željeni pozitivni učinak, još uvijek nije poznata (Bertelsen i sur., 2016).

Osim probioticima, dječje formule često su suplementirane i prebioticima. Prebiotici se definiraju kao neprobavljivi sastavni dijelovi hrane koje metaboliziraju mikroorganizmi domaćina te imaju blagotvoran učinak na zdravlje. Mogu selektivno stimulirati rast i aktivnost specifičnih bakterija te tako promovirati sintezu kratkolančanih masnih kiselina koje imaju protuupalni učinak te sudjeluju u stimuliranju proliferacije i diferencijacije stanica crijevne sluznice. Prebiotici se prirodno nalaze u hrani bogatoj vlaknima. Neki od njih su rezistentni škrob, celuloza, pektin te oligosaharidi strukturirani u fruktooligosaharide (FOS) i galaktooligosaharide (GOS). Majčino mlijeko također sadrži velik broj prirodnih prebiotika koje zovemo oligosaharidi ljudskog mlijeka (engl. *human milk oligosaccharides*, HMO). Sadržaj oligosaharida u kravljem mlijeku znatno je niži nego u majčinom mlijeku, a suplementacija dojenačkih formula s prebioticima u svrhu unaprjeđenja zdravlja dobro je utemeljena. Najčešće se koriste kombinacije FOS-a i GOS-a dok su ostali oligosaharidi majčinog mlijeka nedavno uključeni u pojedine formule. Upotreba dojenačkih formula obogaćenih prebioticima povezuje se sa smanjenim rizikom od intestinalnih i respiratornih infekcija te povećanjem razine fekalnog sekretornog IgA. Međutim, nije dokazano da ima bilo kakve učinke na humoralni i stanični imunitet te regurgitaciju i povraćanje. Kombinacije GOS-a i FOS-a pomažu rastu bifidobakterija te laktobacila u fecesu dojenčadi koje su hranjene obogaćenom formulom. Pokazalo se kako prebiotici imaju poseban utjecaj na neke vrste *Bifidobacterium* kao što je *B. breve*. Razine fekalnog soja *B. breve* kod dojenčadi hranjene formulama obogaćenim prebioticima, bile su slične razini tog soja kod dojenčadi hranjene majčinim mlijekom (Maldonado, 2020).

Pokazalo se kako koncept sinbiotika koji združuje probiotike i prebiotike u istom proizvodu podržava preživljavanje, poboljšava metaboličke aktivnosti probiotičkih sojeva te potiče autohtone laktobacile i bifidobakterije u crijevima. Sposobnost fermentacije probiotika važan je kriterij za odabir probiotičkih sojeva dok je selektivna fermentacija preduvjet za prebiotičku tvar (Adamberg i sur., 2014). Očekivane utjecaje dojenačkih formula suplementiranih s probioticima,

prebionicima i sinbionicima na intestinalnu barijeru, imunološki sustav i mikrobiotu te usporedbu s majčinim mlijekom prikazuje slika 2.



**Slika 2.** Očekivani utjecaj dojenačkih formula suplementiranih s pro-, pre-, sin- i postbionicima na intestinalnu barijeru, imunološki sustav i mikrobiotu u usporedbi s majčinim mlijekom (prema Lemoine i sur., 2023)

BMO – oligosaharidi kravljeg mlijeka, FOS – fruktooligosaharidi, GOS – galaktooligosaharidi, HMO – oligosaharidi majčinog mlijeka, SCFA – kratkolančane masne kiseline



## **2.4. PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH SOJEVA U PROBAVNOM SUSTAVU DOJENČADI**

Utvrđeno je kako se u 11 do 30 % djece liječene antibioticima javlja neugoda u crijevima i dijareja. Pojava dijareje posebno predstavlja opasnost za dojenčad i malu djecu jer u kratkom vremenu može doći do poremećaja ravnoteže vode i elektrolita u njihovim tijelima. Kako bi se smanjili negativni utjecaji antibiotika, koriste se razni probiotički dodaci. Međutim, ponekad djeca pate od postantibiotičke dijareje unatoč suplementaciji probiotičkim sojevima. To je, vjerojatno, uzrokovano smanjenim preživljavanjem probiotičkih sojeva u uvjetima probavnog trakta. Nakon oralnog unosa pripravka, probiotičke bakterije izložene su niskom pH u želucu te žučnim solima u tankom crijevu zbog čega mnoge od njih ne prežive prolaz kroz gastrointestinalni trakt (Stasiak-Rózanska i sur., 2021).

Učinkovitost probiotičkog pripravka određena je skupom mikrobiološke kvalitete i funkcionalnih svojstava tog pripravka. Funkcionalna svojstva mogu ovisiti o načinu isporuke, mjestu primjene i vrsti populacije dok je mikrobiološka kvaliteta određena izravnije. Kako bi se postigli očekivani benefiti probiotika, potrebno je osigurati adekvatan broj određenih mikrobioloških vrsta i sojeva u probiotičkoj formulaciji te u dovoljnoj količini očuvati njihovo preživljavanje u uvjetima gastrointestinalnog trakta. Prema tome, potrebno je procijeniti odgovara li mikrobni sastav probiotika podacima navedenim na pakiranju (Ghelardi i sur., 2023). Postoje posebni zahtjevi za označavanje probiotičkih formulacija koji moraju biti ispunjeni, uzimajući u obzir zakone i regulatorne specifikacije svake države. Organizacija za prehranu i poljoprivredu (FAO) te Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) objavili su popis informacija koje se proizvođačima preporuča navesti na proizvodu. Točnije, svaki probiotički pripravak trebao bi jasno navesti minimalan broj svakog bakterijskog soja do isteka roka trajanja, identifikaciju svakog mikroorganizma sadržanog u formulaciji te očekivane korisne učinke. Prema smjernicama FAO/WHO, oznake bi također trebale sadržavati preporučenu dozu za konzumaciju potrebnu za postizanje očekivanih zdravstvenih benefita te odgovarajuće uvjete skladištenja (FAO/WHO, 2002). Međunarodno udruženje probiotika je 2017. godine zajedno s Vijećem za odgovornu prehranu predložilo nove smjernice usmjerene na poboljšanje dosljednosti i razumijevanja potrošača te promičući usporedbe između različitih probiotičkih formulacija. Prema njima oznake proizvoda trebaju sadržavati kvantitativnu količinu živih mikroorganizama izraženu kao jedinice koje tvore kolonije (CFU) i rok trajanja proizvoda. Također, za formulacije koje sadrže više vrsta i/ili sojeva preporuča se navesti podatke o ukupnoj količini mikroorganizama te, ukoliko je tehnički izvedivo, podatke o količini svake vrste posebno (Mazzantini i sur., 2021).

Metaboličku i biokemijsku aktivnost probiotika tijekom prolaska kroz probavni sustav moguće je očuvati prethodnom inkapsulacijom stanica. Međutim, proizvođači probiotičkih pripravaka savjetuju uklanjanje zaštitne kapsule prije davanja djeci te konzumaciju u tekućoj formi kako bi se izbjeglo gušenje i problemi s gutanjem. Još jedan od načina očuvanja probiotika u nepovoljnim uvjetima je njihova primjena zajedno s prebioticima. Oralna primjena najmanje  $10^7$  stanica probiotičkih sojeva po mililitru ili gramu hrane trebala bi osigurati poželjne utjecaje na zdravlje i u slučaju kada neke od njih ne prežive uvjete probavnog trakta (Stasiak-Rózanska i sur., 2021). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji minimalna koncentracija bakterijskih stanica po gramu ili mililitru sadržaja u probiotičkom pripravku koja pokazuje probiotičku aktivnost iznosi  $10^6$  CFU/ml (FAO/WHO, 2002). Također, kako bi se ostvario željeni utjecaj probiotika, probiotičke kulture u pripravku moraju preživjeti uvjete procesiranja i skladištenja te biti konzumirane u adekvatnim količinama.

Najveća prepreka industrijama kod proizvodnje probiotičkih pripravaka upravo je održavanje preživjelih probiotičkih kultura. Zbog toga se koriste *in vitro* modeli probave kako bi se kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta proučavale strukturne promjene, probavljivost te tolerancija sojeva na uvjete u probavnom sustavu (Naissinger da Silva i sur., 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom eksperimentalnom radu provedeno je ispitivanje tolerancije probiotičkih sojeva na uvjete u gastrointestinalnom traktu te provjera kvalitete probiotičke formulacije za dojenčad, a postupak je činilo više koraka. Provedba eksperimenta obuhvaćala je određivanje količine probiotičkih stanica koje se mogu kultivirati na odabranom mediju uz korištenje različitih uvjeta kultivacije, određivanje morfologije kolonija i fizioloških karakteristika, procjenu preživljavanja kolonija u simuliranom gastrointestinalnom traktu dojenčadi *in vitro*, identifikaciju bakterijskih stanica metodom sekvenciranja nove generacije te zatim obradu podataka. Unutar procjene preživljavanja probiotika u simuliranom probavnom traktu provedena je priprema simuliranih probavnih tekućina, izlaganje probiotičkih sojeva simuliranim probavnim tekućinama te određivanje preživjelih stanica. Identifikacija bakterijskih stanica uključivala je izolaciju DNA, određivanje koncentracije DNA pomoću nanodrop spektrofotometrije te, na kraju, analizu sekvenci.

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Probiotički pripravak

Korišten je nasumično odabrani tržišni probiotički pripravak namijenjen dojenčadi. Probiotički pripravak sadrži konzorcij bakterijskih sojeva koji pripadaju bakterijama iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Tijekom eksperimenta korištene su dvije serije probiotičkog pripravka: probiotički pripravak starije serije s istekom roka trajanja u prosincu 2024. godine (PP1) te probiotički pripravak novije serije s istekom roka trajanja u svibnju 2025. godine (PP2).

### 3.1.2. Kemikalije i hranjive podloge

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava (g/L): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1;  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05; natrijev acetat 5; agar 20; pH vrijednost podloge 6,5; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min
- MRS tekuća hranjiva podloga (sastav isti kao MRS agar samo bez dodanog agara), Biolife, Italija
- Hranjivi agar (Biolife, Italija) sastava (g/L destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3; agar 18. pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min
- TOS propionat (Sigma, SAD) agar s mupirocinom sastava (g/L): amonijev sulfat 3; dikalijev hidrogenfosfat 4,8; enzimski hidrolizat kazeina 10; galaktooligosaharid 10; kalijev dihidrogenfosfat 3; kvašćev ekstrakt 1; L-cistein hidroklorid monohidrat 0,5; magnezijev sulfat heptahidrat 0,2; natrijev propionat 15; agar 15; sterilizacija pri 115 °C/ 15 min; nakon sterilizacije dodano 10 mL mupirocina u 190 mL podloge
- M17 agar (Biolife, Italija) sastava (g/L destilirane vode): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5; laktoza 5; natrijev glicerofosfat 19; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1; sterilizacija pri 121 °C/15 min
- BHI (Brain heart infusion) agar (Biolife, Italija) sastava (g/L destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min
- Anaerocult® reagens za stvaranje anaerobnog medija u anaerobnim posudama, Merck KGaA, Njemačka
- 0,9 % otopina natrijeva klorida, Kemika, Hrvatska
- Pepsin, Sigma, SAD
- Pankreatin, Fluka, Švicarska
- Klorovodična kiselina, Sigma-Aldrich, SAD
- Žučne soli goveđe žuči, Difco, SAD
- Natrijeva lužina, Kemika, Hrvatska
- 0,5 % otopina natrijeva klorida, Kemika, Hrvatska
- TE pufer (pH 8,0, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA)
- Lizozim, EuroBio, Francuska
- Safranin, Merck, Njemačka
- Lugolova otopina (otopina I<sub>2</sub> u KI)
- Kristal violet, Merck, Njemačka
- Etanol, Kemika, Hrvatska

### 3.1.3. Laboratorijski uređaji i pribor

#### Uređaji

- Anaerobni sistem inkubacije – anaerobna komora s atmosferom koja sadrži oko 5 % ugljikovog dioksida
- Termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- Analitička vaga, Sartorius, Hrvatska
- Vaga, Tehnica, Slovenija
- Centrifuga, Digitor21R, OrtoAlerisa, Španjolska
- Laboratorijski zamrzivač, Eppendorf Cyrocube F101h, SAD
- Vortex v-1 plus, Kemolab, Hrvatska
- Svjetlosni mikroskop, Olympus CX21, Japan
- Brojač kolonija BZG30 Colony Counter, WTW, Njemačka
- Uređaj za sonikaciju Ultrasonic Sonoplus homogenizer mini 20, Bandelin, Njemačka
- Maxwell® 16 device, Promega
- Spektrofotometar BioSpec Nano, Shimadzu, Japan
- Bunsenov plamenik, OMM Laboratory Equipment, Italija
- pH metar, Metrohm, Švicarska

#### Pribor

- Petrijeve zdjelice, Golias, Slovenija
- Automatske pipete (500 – 5000 µL), Eppendorf, SAD
- Kivete za centrifugu
- Eppendorf Epruvete (1,5 mL; 2 mL; 5 mL), Eppendorf, SAD
- Anaerobne posude
- Staklene epruvete, Scherf Präzision Europe GmbH, Njemačka
- Falcon epruvete (50 mL), neoLab, Njemačka
- Stalci za epruvete, neoLab, Njemačka
- Mikrotitarska ploča za ispitivanje kulture tkiva 96F, TPP, Švicarska
- Stalci za mikroeprevete, neoLab, Njemačka
- Staklene čaše
- DNA isolation kit "Maxwell® 16 Cell DNA Purification Kit", Promega
- Erlenmeyerova tikvica (100 mL)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Bakterijska inokulacija i kultivacija sojeva iz probiotičkog pripravka

Uljna suspenzija probiotičkog pripravka homogenizirana je, te je 1 mL pripravka kultiviran u 5 mL MRS bujona. Početno razrjeđenje pripremljeno je miješanjem 100  $\mu$ L homogenizirane uljne suspenzije koja je sadržavala smjesu probiotičkih bakterija, s 900  $\mu$ L fiziološke otopine. Početno razrjeđenje zatim je serijski razrijeđeno i inokulirano na ploče s agarom kako bi se potvrdila tvrdnja o jedinicama koje stvaraju kolonije (engl. *Colony forming units*, CFU) po mL uzorka. Korištene su selektivne podloge za izolaciju *Lactobacillus* spp., MRS agar i TOS-mupirocin za selektivnu izolaciju *Bifidobacterium* spp. Također su korišteni i hranjivi agar, M17 agar i BHI agar za preliminarni pregled prisutnosti rasta bakterija. Konačna razrjeđenja u rasponu od  $10^{-3}$  do  $10^{-10}$  dodana su u tri ponavljanja u petrijeve zdjelice. Ploče su inkubirane anaerobno na 37 °C, 48 ili 72 sata u anaerobnim uvjetima.

### 3.2.2. Brojanje kolonija

Kvantifikacija bakterijskog sadržaja provedena je standardnom metodom brojanja CFU. Brojanje bakterijskih kolonija potvrđeno je korištenjem BZG30 Colony Counter WTW. Za izračun konačne CFU, dobivene kolonije pomnožene su s faktorom razrjeđenja i izračunat je prosjek između ponavljanja.

### 3.2.3. Određivanje morfologije stanica i fizioloških karakteristika

Za procjenu fenotipskih karakteristika kao što je morfologija kolonija, provedena je reakcija bojenja po Gramu. Pojedinačne bakterijske kolonije odabrane su s MRS agar ploče i obojene metodom bojenja po Gramu. Protokol je uključivao tretiranje stanične biomase otopinom kristal violet nakon čega je slijedio tretman lugolovom otopinom. Na kraju se predmetno stakalce prelilo otopinom safranina i ostavilo 3 – 5 minuta. Za ispitivanje bakterija korišteni su objektivi velikog povećanja (uljna imerzijska mikroskopija, 100x povećanje), a između stakalca i objektiva stavljene su kapi imerzijskog ulja kako bi se smanjio lom svjetlosti te poboljšala jasnoća slike.

Također provedeno je i ispitivanje fizioloških karakteristika pomoću određivanja pH vrijednosti, stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline. Određena je pH vrijednost supernatanta probiotičkog pripravka uzgojenog u MRS hranjivoj podlozi tijekom noći. Zatim je

1 mL uzorka supernatanta razrijeđen s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak titriran je s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator. Stupanj kiselosti i postotak proizvedene kiseline izračunati su prema sljedećim jednadžbama:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 20 \times f_{\text{NaOH}} \times 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}\text{SH} \times 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

$$f_{\text{NaOH}} = 1$$

$$(1 \text{ } ^{\circ}\text{SH} \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%))$$

#### 3.2.4. Praćenje preživljavanja probiotičkih kultura u otopini žučnih soli

Praćenje preživljavanja bakterijskih kultura u otopini žučnih soli provedeno je prema *in vitro* metodologiji Charteris i sur. (1998). Stanice (1 % inokuluma) su rasle preko noći u MRS bujonu, a zatim su centrifugirane i isprane 3 puta u sterilnoj destiliranoj vodi. Priređena je 0,3 %-tna otopina žučnih soli u 100 mL MRS bujona. Stanice su inokulirane u otopinu žučnih soli te je 250  $\mu\text{L}$  otopine dodano u mikrotitarsku pločicu. Također dodana je i kontrola koja je sadržavala bakterijsku kulturu i MRS bujon. Očitane su vrijednosti apsorbancije pri 620 nm nakon čega su pločice s uzorcima inkubirane na 37 °C tijekom 7 sati, a vrijednosti apsorbancije očitavane su u intervalima od sat vremena.

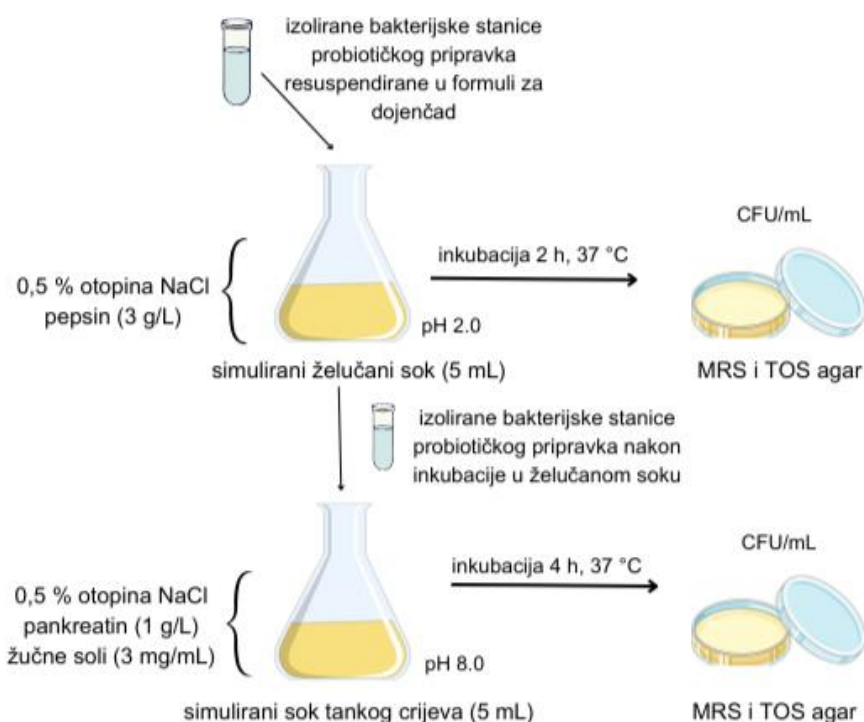
#### 3.2.5. Procjena preživljavanja probiotika *in vitro* u simuliranom probavnom traktu dojenčadi

Praćenje preživljavanja bakterijskih sojeva iz probiotičke formulacije za dojenčad u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta provedeno je prema protokolu Fernández i sur. (2003) uz manje izmjene. Uspostavljanje simuliranih uvjeta probavnog trakta obuhvaćalo je pripremu probavnih tekućina – želučanog soka te soka tankog crijeva. Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5 %-tnoj otopini natrijeva klorida, a dodavanjem klorovodične kiseline pH je podešen na 2.0.

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je otapanjem pankreatina (1 g/L) i žučnih soli (3 mg/mL) u 0,5 %-tnoj otopini natrijeva klorida dok je pH podešen je na 8.0 pomoću natrijeve lužine.

Ispitivanje preživljavanja sojeva probiotičkog pripravka u uvjetima gastrointestinalnog trakta provedeno je u dva slučaja: uz dodatak hrane za dojenčad te bez dodatka hrane za dojenčad.

Prekonoćna kultura probiotičkog pripravka u MRS mediju centrifugirana je 5 minuta na 3500 okretaja. Nakon ispiranja kulture probiotičkog pripravka u 1 mL fiziološke otopine, izolirane bakterijske stanice resuspendirane su u 5 mL pripremljenog simuliranog želučanog soka. U slučaju dodatka hrane za dojenčad, uljna suspenzija probiotičkog pripravka vorteksirana je te je 1 mL suspenzije dodan u 1 mL prethodno pripremljene hrane (hrana za dojenčad pripremljena je prema uputama na pakiranju). Zatim je suspenzija vorteksirana te resuspendirana u 5 mL simuliranog želučanog soka. Probiotičke stanice inkubirane su u želučanoj tekućini na 37 °C. Alikvoti od 100 µL uzeti su nakon 0., 1. i 2. sata te su naciepljeni na MRS i TOS agar radi brojanja porasta kolonija i stavljeni na inkubaciju pri 37 °C, 48 sati. Nakon 2 sata inkubacije u želučanom soku, bakterije su odvojene centrifugiranjem (3500 okretaja, 5 min) i suspendirane u 5 mL soka tankog crijeva te inkubirane 4 sata na 37 °C. Alikvoti (100 µL) bakterijske suspenzije uzeti su nakon 1., 2., 3. i 4. sata te naciepljeni na ploče s MRS i TOS agarom te stavljeni na inkubaciju 48 sati pri 37 °C nakon čega će biti korišteni za brojanje preživjelih probiotičkih kolonija (slika 3). Pokus je izveden u nekoliko ponavljanja. Broj preživjelih stanica određen je indirektnom metodom brojanja te je izračunat broj poraslih kolonija (CFU) po mL probiotičkog pripravka.



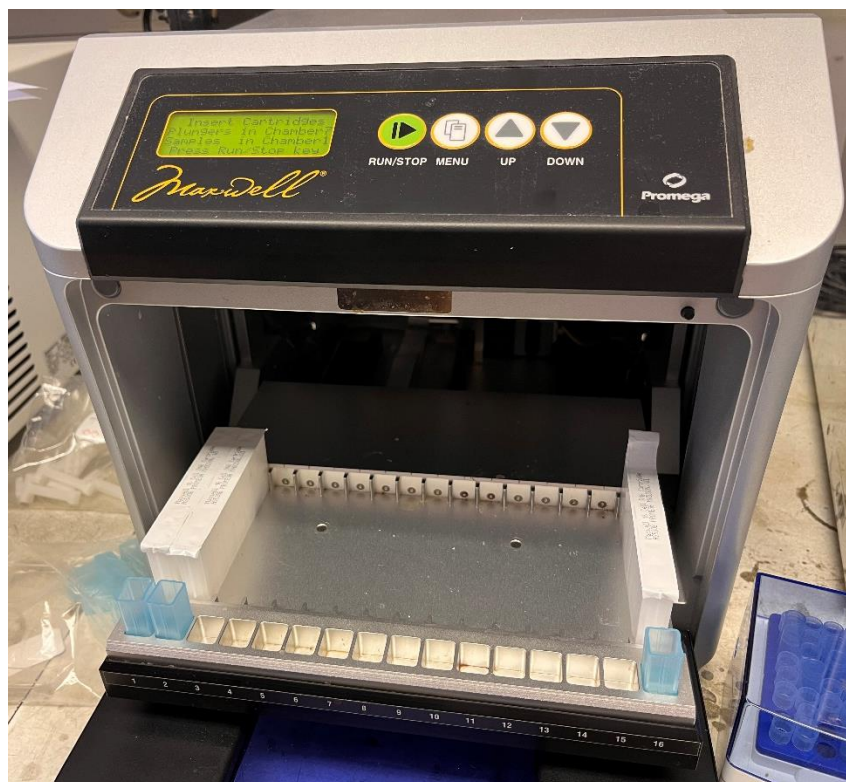
**Slika 3.** Slikovni prikaz provedbe eksperimenta preživljavanja probiotika *in vitro* u simuliranom probavnom traktu dojenčadi



### 3.2.6. Identifikacija bakterijskih stanica

Identifikacija bakterijskih stanica probiotičkog pripravka provedena je primjenom sekvenciranja nove generacije. 5 mL prekonocne kulture sojeva sadržanih u probiotičkom pripravku centrifugirano je 5 min pri 4000 okretaja, te je talog stanica ispran u fiziološkoj otopini i opet centrifugiran. Nakon uklanjanja supernatanta i masnog sloja, bakterijske stanice prisutne u talogu lizirane su dvosatnom inkubacijom u 200  $\mu$ L otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Nakon inkubacije, uzorci su uronjeni u ledenu kutiju kako bi se spriječilo zagrijavanje tijekom sonikacije. Sonikacija je provedena pomoću uređaja Sonopuls mini20 tri puta po 30 s s pauzom od 15 s između svakog ciklusa, nakon čega su uzorci prebačeni u kazetne jažice Maxwell 16 Tissue DNA purification kit, koje su umetnute u Maxwell 16 Research Sistemski uređaj za automatsku izolaciju DNA (slika 4). Nakon završetka ekstrakcije DNA, eluati 3 paralelno izoliranih DNA uzoraka su skupljeni.

Koncentracija DNA određena je spektrofotometrijski u uzorcima od 2  $\mu$ L pomoću BioSpec-nano na valnoj duljini od 0,7 nm, s otopinom, puferom za ispiranje, u kojem je DNA resuspendirana kao slijepa proba, te su uzorci do daljnje analize pohranjeni na -20 °C. Amplifikacija hipervarijabilnih regija gena 16S rRNA provedena je sa specifičnim početnicama. HotStarTaq Plus Master Mix Kit korišten je za pripremu uzoraka za PCR. Nakon početnog koraka denaturacije DNA na 94 °C tijekom 3 minute, uslijedilo je 28 ciklusa (30 s na 94 °C, 40 s na 53 °C i 1 min na 72 °C) nakon čega je uslijedio završni korak elongacije (5 minuta na 72 °C). Uspjeh amplifikacije je provjeren na agaroznom gelu (2 % (w/v)). Nekoliko uzoraka spojeno je u jedan na temelju molekulske mase i koncentracije DNA u jednakim omjerima, nakon čega su pročišćeni Ampure XP kuglicama. Pročišćeni PCR produkti korišteni su za pripremu Illumina DNA biblioteke pomoću protokola Illumina TruSeq DNA biblioteke i sekvencionirani na MiSeq uređaju u skladu s uputama proizvođača.



**Slika 4.** Maxwell 16 Research Sistemski uređaj za automatsku izolaciju DNA u koji su umetnute kazetne jažice s uzorcima

### 3.2.7. Obrada podataka

Svi eksperimenti provedeni su u minimalno tri biološka ponavljanja, točnije, svako od eksperimentalnih ispitivanja provedeno je tri puta kako bi se osigurala pouzdanost i reprezentativnost rezultata. Na temelju dobivenih podataka izračunate su srednje vrijednosti te standardna devijacija kako bi se ocijenio stupanj preciznosti i stabilnosti rezultata.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

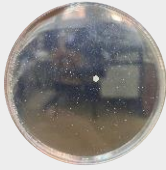
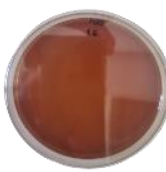


Spoznaje o važnosti probiotičkih sojeva u zdravlju intestinalnog trakta, te njihove primjene za ublažavanje brojnih simptoma ili kao popratne terapije, potaknuo je i značajan interes znanstvene zajednice, ali je utjecao i na komercijalizaciju probiotičkih pripravka, te je na tržištu dostupan veliki broj probiotičkih formulacija. Evidentno je da pojedini probiotički pripravci ne zadovoljavaju znanstvene kriterije za probiotičko djelovanje zbog čega se nameće izazov kontrole kvalitete takvih proizvoda (Salminen i sur., 2022; Patro i sur., 2016). Stoga je u ovom radu nasumično odabran probiotički pripravak namijenjen dojenčadi za provjeru ispravnosti deklaracije. Provedeno je ispitivanje kvalitete probiotičke formulacije navedene kao PP1 ili PP2 (ovisno o broju serije) i preživljavanja probiotičkih sojeva formulacije u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, a rezultati su navedeni u ovom poglavlju. Dobivene su vrijednosti ukupnog broja stanica sastavnih sojeva pripravka kao i broj preživjelih stanica nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt te rezultati procjene fenotipskih i fizioloških karakteristika i identifikacija stanica u pripravku.

Kao konačni cilj, na temelju rezultata procijenjena je kvaliteta temeljem praćenja preživljavanja probiotičkih stanica iz probiotičkog pripravka za dojenčad.

#### 4.1. ANALIZA BAKTERIJSKOG RASTA PROBIOTIČKOG PRIPRAVKA

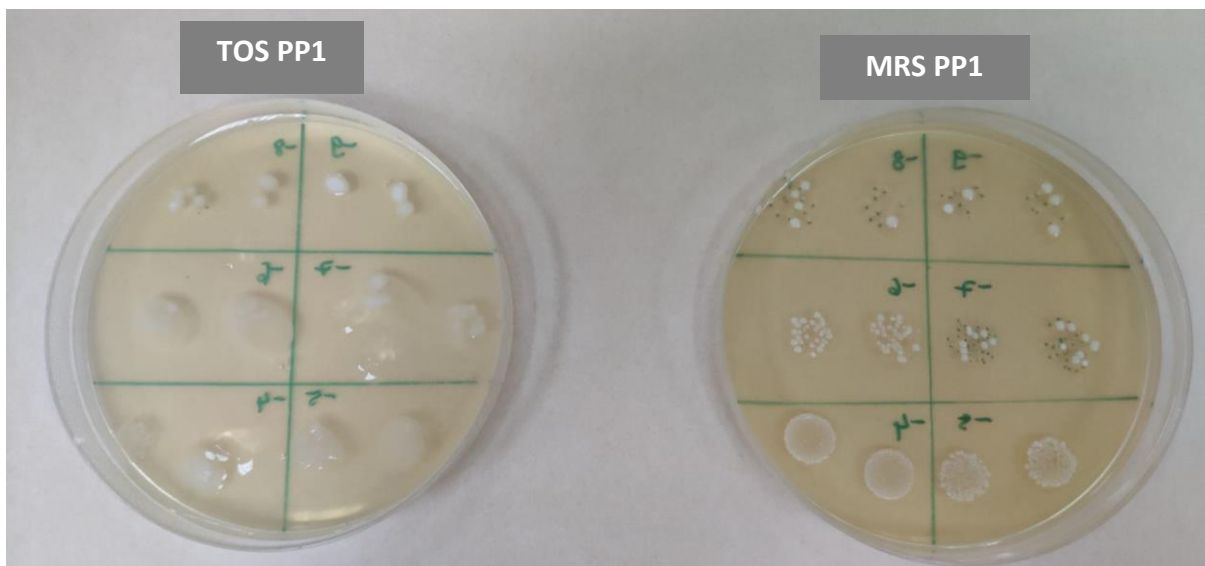
Najvažnija značajka formulacije probiotika je preživljavanje i točan sadržaj bakterija naveden na proizvodu. Cilj je bio odrediti ukupan broj izraslih kolonija iz bakterijskog konzorcija sadržanog u formulaciji probiotika, za kasniju analizu preživljavanja bakterijskih stanica u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta *in vitro*. Kako pripravak prema deklaraciji sadrži *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrste, za mikrobiološku analizu korištene su selektivne hranjive podloge koje potiču rast ovih vrsta. Rezultate preliminarnog pregleda rasta bakterijskih stanica probiotičkog pripravka na hranjivim podlogama prikazuje tablica 1 te slika 5. U tablicama 2 – 6 prikazani su rezultati analize broja kolonija PP1 i PP2 na MRS, TOS agaru i hranjivom agaru.

**Tablica 1.** Preliminarni pregled bakterijskog rasta na selektivnim hranjivim podlogama i hranjivom agaru nakon inokulacije uzorka probiotičkog pripravka

	Naziv hranjive podloge	Rast
	Hranjivi agar	prisutan
	MRS	prisutan (visoka gustoća)
	TOS propionat	prisutan (visoka gustoća)
	M17	prisutan
	BHI	nema rasta

Neizravnom metodom određena je provjera preživljenja i broj bakterijskih stanica u uzorku probiotičke formulacije. Preživljavanje prisutnih mikrobnih vrsta analizirano je praćenjem prekonocnog rasta na MRS hranjivoj podlozi namijenjenoj izolaciji *Lactobacillus* spp., TOS-mupirocin hranjivoj podlozi za izolaciju vrsta *Bifidobacterium* spp. te hranjivom agaru, BHI agaru i M17 agaru za preliminarni pregled prisutnosti bakterijskog rasta nepoželjnih sojeva. Pregled rezultata mikrobiološke analize prikazan je u tablici 1 te pokazuje kako je bakterijski rast prisutan na svim hranjivim podlogama osim na BHI agaru. Prema tome, BHI agar nije se pokazao kao pogodna podloga za rast bakterija probiotičkog pripravka za dojenčad. Kao što je i očekivano, rezultati su potvrdili veću gustoću rasta na MRS i TOS-mupirocin agaru u odnosu na druge hranjive podloge. Slične rezultate pokazuje istraživanje Süle i sur. (2014) koji navode kako se TOS-mupirocin agar pokazao kao uspješan u izolaciji bakterijskih vrsta *Bifidobacterium* te se time može koristiti za određivanje bakterijskog rasta bifidobakterija u prehrambenim proizvodima koji sadrže više sojeva ove vrste te drugih vrsta bakterija mliječne kiseline, uključujući neke od vrsta *Lactobacillus*. Također, navode kako se MRS agar pokazao uspješnim za izolaciju bakterijskih vrsta *Lactobacillus* pri anaerobnoj inkubaciji na 37 °C tijekom 72 sata, a M17 agar je pokazao slabu selektivnost nakon aerobne inkubacije na 37 °C tijekom 48 sati. Kao što je očekivano, jer je već empirijski odavno utvrđeno, a u skladu s pregledom literature te dobivenim rezultatima, za praćenje preživljavanja bakterija probiotičkog pripravka u simuliranim gastrointestinalnim uvjetima, koristile su se hranjive podloge MRS i TOS-mupirocin agar.

Bakterije mliječne kiseline imaju tendenciju rasta u anaerobnim i kiselim sredinama koje sadrže ugljikohidrate te su bogate spojevima potrebnim za anaboličke reakcije (Rombouts i sur., 2020). Prema tome, provedena je inkubacija u optimalnim uvjetima za rast rodova bakterija mliječne kiseline, točnije bez prisutnosti kisika, anaerobno i na optimalnoj temperaturi rasta od 37 °C te je detektiran učinkovit rast rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (slika 5).



**Slika 5.** Porasle pojedinačne bakterijske kolonije iz probiotičke formulacije PP1 kultivirane na selektivnim hranjivim podlogama za uzgoj velikog broja bakterijskih stanica (engl. *colony forming units* CFU/mL): TOS mupirocin hranjivi agar (lijevo) i MRS hranjivi agar (desno)

Uzimajući u obzir važnost kvalitete sastava komercijalnih probiotičkih proizvoda, provedena je analiza količine stanica u probiotičkom pripravku. Rezultati mikrobiološke analize probiotičkog pripravka PP1, prve isporučene serije, prikazani su u tablici 2. Broj poraslih kolonija probiotičkog pripravka PP1 nakon inkubacije određen je i na TOS mupirocin agaru što prikazuje tablica 3, a rezultati poraslih kolonija probiotičkog pripravka PP2 na hranjivom agaru, MRS agaru i TOS mupirocin agaru prikazani su u tablicama 4 – 6.

**Tablica 2.** Analiza broja poraslih kolonija probiotičkog pripravka PP1 na MRS agaru nakon anaerobne inkubacije pri 37 °C

razrjeđenje	CFU/ml	CFU/ml	Log	Log	prosječna vrijednost	SD
	I. ponavljanje	II. ponavljanje	(CFU/ml) I. ponavljanje	(CFU/ml) II. ponavljanje		
-9	$1,25 \cdot 10^{12}$	$1,15 \cdot 10^{12}$	12,096	12,061		
-8	$1,1 \cdot 10^{12}$	$1,3 \cdot 10^{12}$	12,041	12,114		
-7	$4,1 \cdot 10^{12}$	$4,15 \cdot 10^{12}$	12,613	12,618	<b>12,26</b>	<b>0,25</b>

**Tablica 3.** Analiza broja poraslih kolonija probiotičkog pripravka PP1 na TOS mupirocin agaru nakon anaerobne inkubacije pri 37 °C

razrjeđenje	CFU/ml	Log (CFU/ml)	prosječna vrijednost	SD
-10	$1,5 \cdot 10^{11}$	11,176		
-9	$3,5 \cdot 10^{10}$	10,554	<b>10,87</b>	<b>0,31</b>

**Tablica 4.** Analiza broja poraslih kolonija probiotičkog pripravka PP2 na hranjivom agaru nakon anaerobne inkubacije pri 37 °C

razrjeđenje	CFU/ml	Log (CFU/ml)	prosječna vrijednost	SD
-10	$3,33 \cdot 10^{12}$	12,552		
-9	$4,0 \cdot 10^{11}$	11,602		
-8	$2,2 \cdot 10^{11}$	11,342		
-7	$2,5 \cdot 10^{10}$	10,398	<b>11,47</b>	<b>0,77</b>

**Tablica 5.** Analiza broja poraslih kolonija probiotičkog pripravka PP2 na MRS agaru nakon anaerobne inkubacije pri 37 °C

Log (CFU/ml) I. ponavljanje	Log (CFU/ml) II. ponavljanje	prosječna vrijednost	SD
12,044	11,780	<b>11,912</b>	<b>0,132</b>

**Tablica 6.** Analiza broja poraslih kolonija probiotičkog pripravka PP2 na TOS mupirocin agaru nakon anaerobne inkubacije pri 37 °C

Log (CFU/ml) I. ponavljanje	Log (CFU/ml) II. ponavljanje	Prosječna vrijednost	SD
11,050	12,418	<b>11,734</b>	<b>0,684</b>

Budući da je mikrobiološka analiza pokazala kako brojanje poraslih kolonija pri nižim razrjeđenjima nije bilo moguće zbog značajno visokog broja bakterija, replikati su pripremljeni s višim razrjeđenjima prekonocne kulture probiotičkog pripravka.

Kvantifikacija bakterijskog sadržaja u određenom uzorku probiotičke formulacije postignuta je brojanjem ukupnog broja jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) poraslih na agar ploči iz serijskih razrjeđenja, izraženih kao CFU po mililitru stvarnog uzorka. Na taj način procijenjen je broj poraslih stanica na temelju prisutnog broja kolonija na agar ploči. Radi se o procjeni jer se broje samo stanice koje mogu formirati kolonije u danim eksperimentalnim uvjetima (npr. medij, temperatura, vrijeme i prisutnost kisika). Kolonije se mogu razviti iz individualnih stanica ili grupe stanica koje su bile odvojene nakon inokulacije na podlogu, uzimajući u obzir koncentraciju prije razrjeđivanja (Davis, 2014).

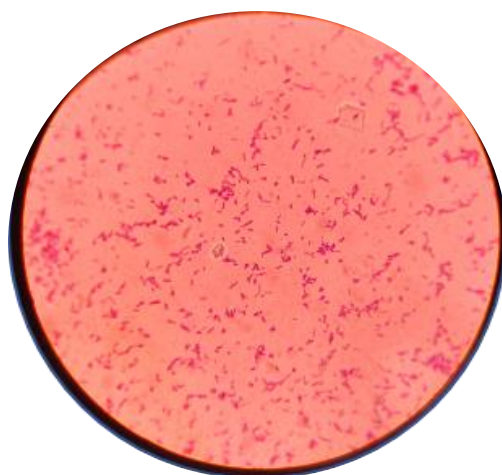
Nadalje, primjenom indirektna metode brojanja bakterijskih kolonija utvrđeno je da formulacija probiotika sadrži više od  $10^6$  CFU/ml, što je prema preporuci minimalna propisana koncentracija bakterijskih stanica po gramu ili mililitru sadržaja za određeni probiotički pripravak kako bi se pokazalo probiotičko djelovanje (FAO/WHO, 2002). Međutim, pojedine države, na nacionalnoj razini, preporučuju i više vrijednosti broja bakterija u pripravcima. Talijansko ministarstvo zdravstva izdalo je 2013. godine nove smjernice o upotrebi probiotičkih pripravaka prema kojima se putem probiotičkih proizvoda treba unijeti minimalno  $10^9$  CFU dnevno (Vecchione i sur., 2018).

Na temelju mikrobiološke analize utvrđeno je kako je broj probiotičkih stanica u skladu s deklaracijom probiotičkog pripravka te prelazi vrijednost propisanu kao minimalna koncentracija bakterijskih stanica po mililitru ili gramu probiotičke formulacije. Proizvod je sadržavao količine živih probiotičkih kultura u skladu s podacima navedenim na pakiranju.

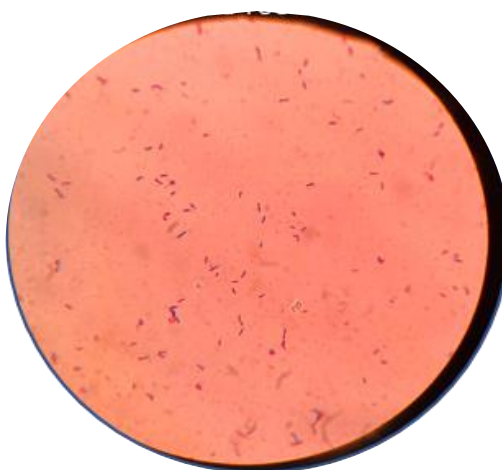


## 4.2. MORFOLOGIJA STANICA I KOLONIJA

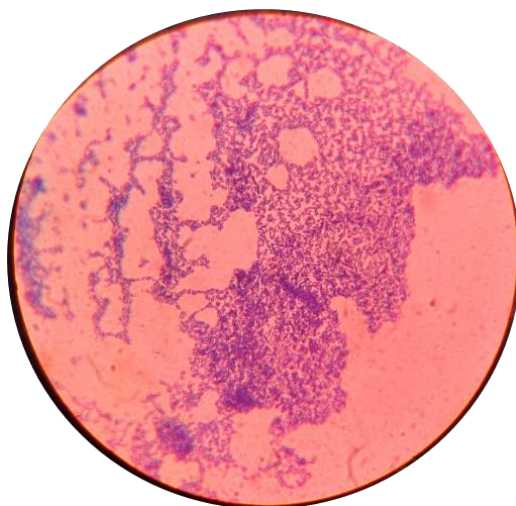
S ciljem dokazivanja da se radi o vrstama koje pripadaju Gram-pozitivnim bakterijama mliječne kiseline, provedena je rutinska metoda razlikovanja Gram-pozitivnih od Gram-negativnih sojeva, odnosno metoda bojanja bakterijskih stanica po Gramu. Rezultati karakterizacije morfologije bakterijskih kolonija iz probiotičkog pripravka pomoću metode bojanja po Gramu te mikroskopske analize prikazani su na slikama 6 – 8.



**Slika 6.** Stanice probiotičkog pripravka PP1 porasle na MRS agaru nakon 24 h inkubacije pri 37 °C +5 % CO<sub>2</sub> pod mikroskopskim povećanjem od 100x



**Slika 7.** Stanice probiotičkog pripravka PP1 porasle na TOS agaru nakon 24 h inkubacije pri 37 °C +5 % CO<sub>2</sub> pod mikroskopskim povećanjem od 100x



**Slika 8.** Stanice probiotičkog pripravka PP2 porasle na MRS agaru nakon 24 h inkubacije pri 37 °C +5 % CO<sub>2</sub> pod mikroskopskim povećanjem od 100x

Slike 6 – 8 prikazuju porasle stanice probiotičkog pripravka dvaju serija nakon metode bojanja po Gramu pri čemu su porasle stanice na slikama obojene ljubičasto. Probiotičke stanice deklarirane u formulaciji probiotika pripadaju predstavnicima bakterijskih sojeva iz skupine *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* te se stoga mogu razlikovati prema sastavu stanične stijenke. Mikroskopska analiza otkrila je da su prisutne bakterije Gram-pozitivne bakterije i imaju stanične stijenke s debljim slojevima peptidoglikana, koji se boji ljubičasto, metodom bojanja po Gramu.

U MRS bujonu, sojevi rastu pri 37 °C. Nakon što su inokulirani na MRS agar ili TOS agar te inkubirani preko noći na 37 °C anaerobno, uočen je učinkovit rast. Međutim, na MRS agaru uočene su dvije vrste morfologije kolonija: one kada bakterije stvaraju konveksne, bijele kolonije koje dobro rastu, ali i druge vrste šiljastih kolonija znatno manje veličine. Nakon bojanja po Gramu i pregleda pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od 100x (Olympus CX41) uočeno je da su Gram-pozitivne bakterije morfološkog oblika dugačkih i uskih štapića koji su bili u pojedinačnim stanicama ili u skupinama i lancima od dvije ili tri stanice. Nakon bojenja spora i pregleda pod mikroskopom nisu pronađene spore. Rezultati su uspoređeni s istraživanjem Liu i sur. (2020) koji su karakterizirali potencijalne probiotičke sojeve bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija izoliranih iz majčinog kolostruma. Ispitivanjem morfologije kolonija otkrili su kako su sojevi obje vrste, *Bifidobacterium lactis* i *Lactobacillus rhamnosus*, pokazali pozitivnu reakciju bojanja po Gramu. Mikroskopskom analizom utvrdili su kako je soj *B. lactis* na MRS agaru proizveo bacile pravilne na oba kraja, s mnogo vidljivih čvorova, a *L. rhamnosus* štapićaste kratke kolonije koje su bile povezane u lance. Sojevi *Lactobacillus* su Gram-pozitivni te nepomični ili rijetko pomični, štapićastog oblika ponekad poput kokobacila. Često se formiraju

u lance pri čemu sklonost povezivanja u lance varira među sojevima te ovisi o fazi rasta i pH medija (König i Fröhlich, 2017). Obzirom da mikroskopski prikaz kolonija probiotičkog pripravka ispitivanog u ovom radu odgovara opisu bakterija mliječne kiseline, potvrđeno je da se radi o rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

Dodatno, za potvrdu fizioloških karakteristika tipičnih za rodove *Lactobacillus* kao predstavnike bakterija mliječne kiseline, ali i za *Bifidobacterium* spp. kao glavnog proizvođača kiselina kratkog lanca, procijenjen je kapacitet pH zakiseljavanja i proizvodnja mliječne kiseline. Rezultati analize pH zakiseljavanja probiotičkog pripravka te kvantifikacija proizvedene kiseline prikazani su u tablicama 7 i 8.

**Tablica 7.** Analiza pada pH vrijednosti prekonocnog konzorcija probiotičkog pripravka uzgojenog u MRS bujonu

	pH	prosječna vrijednost	SD
uzorak 1	3,83		
uzorak 2	3,84		
uzorak 3	3,82	<b>3,83</b>	0,008165

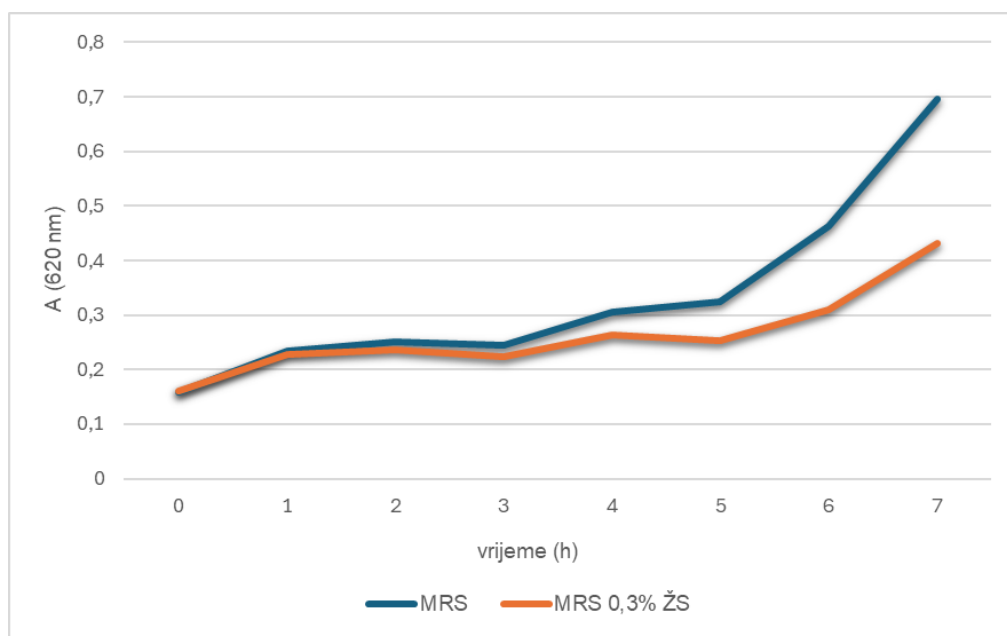
**Tablica 8.** Analiza kvantifikacije proizvedenih kiselina u supernatantu kulture probiotičkog pripravka

	mL (NaOH)	° SH	% kiseline	prosječna vrijednost	SD
I. ponavljanje	1,9	76	1,71 %		
II. ponavljanje	1,9	76	1,71 %		
III. ponavljanje	2,0	80	1,80 %	<b>1,74 %</b>	0,042426

Sposobnost bakterija mliječne kiseline da inhibiraju rast raznih drugih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija već je poznata, a to je moguće zbog proizvodnje organskih kiselina kao i vodikovog peroksida, bakteriocina i ostalih sličnih spojeva. Upravo takvi produkti imaju mogućnost suzbijanja patogena, a proizvode ih različite vrste rodova *Lactobacillus*. Navedene karakteristike mogu biti vrlo korisne za domaćina zbog čega su jedne od poželjnih svojstava probiotičkih pripravaka (Fernández i sur., 2003). Mliječna kiselina nastaje kao glavni krajnji katabolički produkt iz glukoze te pokazuje potencijalna antimikrobna svojstva (König i Fröhlich, 2017). Kako bi se potvrdile karakteristike bakterija mliječne kiseline koje su glavni sastojci ispitivanog probiotičkog pripravka, rast sojeva praćen je mjerenjem pada pH vrijednosti, stupnja kiselosti te proizvodnje mliječne kiseline. Rezultati analize potvrdili su da metaboličkom aktivnošću konzorcija probiotičkog pripravka nakupljaju se kiseline što upućuje na prisutnost bakterija mliječne kiseline, a to proizlazi iz sastava navedenog na deklaraciji proizvoda. Proizvodnja mliječne kiseline značajno je smanjena kada se uspostavlja stacionarna faza rasta što odgovara vremenskom periodu od otprilike 12 – 16 sati nakon inokulacije.

### 4.3. PREŽIVLJAVANJE PROBIOTIČKIH SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Odabir potencijalnih probiotičkih sojeva koji posjeduju fiziološku sposobnost uspješnog preživljavanja u uvjetima gastrointestinalnog trakta kritičan je izazov za odabir probiotičkog proizvoda. Tijekom prolaska kroz gastrointestinalni sustav, probiotički sojevi susreću se s nekoliko izazova uključujući niski pH želuca te prisutnost žučnih soli i probavnih enzima. Obzirom na neutralan pH tankog crijeva koji nije inhibitoran, prepreku u preživljavanju mikroorganizama tijekom prolaska kroz tanko crijevo predstavlja prisutnost žučnih soli (Ayyash i sur., 2021). Visoka koncentracija žučnih kiselina, koja se izlučuje u gornjem dijelu tankog crijeva (duodeumu), često je ograničavajući faktor rasta bakterija u probavnom sustavu, što znači da može inhibirati i rast probiotičkih sojeva. Stoga, kriterij koji se koristi za odabir probiotičkih sojeva mora uključivati njihovu sposobnost tolerancije na žučne soli. Uzimajući to u obzir, provedeno je preliminarno ispitivanje preživljavanja sojeva iz probiotičkog pripravka u prisutnosti 0,3 % žučnih soli u MRS hranjivoj podlozi. Rezultati ispitivanja tolerancije bakterijskih sojeva probiotičkog pripravka na žučne soli prikazani su na slici 9. Preživljavanje probiotičkih bakterija u otopini žučnih soli prikazano je odnosom izmjerenih vrijednosti apsorbancija uzoraka tijekom 7 sati, u vremenskim intervalima od sat vremena.



**Slika 9.** Vrijednosti apsorbancije uzoraka probiotičkog pripravka PP2 u MRS te u MRS + 0,3 %-tnoj otopini žučnih soli (MRS 0,3 % ŽS), u ovisnosti o vremenu inkubacije

Žučne soli su natrijeve ili kalijeve soli koje su nastale djelovanjem glicina ili taurina i žučne kiseline (Liu i sur., 2020). Glavna uloga žuči je emulgiranje i razgradnja unesenih masti no postiže se i značajan baktericidni učinak djelovanjem na degradaciju lipidne membrane. Međutim, bakterije mliječne kiseline i bifidobakterije kao glavni predstavnici probiotičkih bakterija trebale bi pokazati potencijalnu toleranciju u prisutnosti žučnih soli. Prema istraživanjima koncentracija žuči koja iznosi 0,3 % govede žuči (oxgall) smatra se vitalnom koncentracijom za probir rezistentnih Gram-pozitivnih bakterija mliječne kiseline, bifidobakterija i kvasaca (Begley i sur., 2005). Koristeći spomenutu koncentraciju soli, provedeno je ispitivanje tolerancije sojeva probiotičkog pripravka te su vrijednosti apsorbancije izmjerene pri 620 nm u vremenskom periodu od inokulacije u 0. satu do 7. sata inkubacije iznosile od 0,2 do 0,4. Rezultati su pokazali relativno očekivanu stopu preživljenja bakterija probiotičkog pripravka u simuliranoj otopini žučnih soli jer je rast u usporedbi s kontrolnim rastom reduciran. Time se da zaključiti kako su žučne soli uzrokovale smrtnost dijela bakterija probiotičkog pripravka. To je vjerojatno uzrokovano disrupcijom bakterijske membrane i staničnih materijala (Ayyash i sur., 2021). Visoki osmotski tlak žučnih soli utječe na poremećaj fosfolipida i proteina u staničnoj membrani čime se mijenja propusnost membrane uzrokujući smrt ili oštećenje bakterijske stanice (Liu i sur., 2020). Unatoč tome, dio bakterijskih sojeva pokazao je pozitivnu stopu preživljenja te upućuje na poželjna svojstva probiotika. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Kozak i sur. (2015) koji su ispitivali toleranciju 13 izolata bakterija *Lactobacillus* u 0,3 %-tnoj otopini žučnih soli. Utvrdili su uspješno preživljavanje *L. fermentum* izolata te *L. rhamnosus* izolata dok izolati *L. gasseri* nisu pokazali odgovarajuću toleranciju. Također Liu i sur. (2020) u svom istraživanju zaključuju kako sojevi *Bifidobacterium lactis* te *Lactobacillus rhamnosus* imaju visoku stopu tolerancije na žučne soli te imaju sposobnost preživljavanja u uvjetima tankog crijeva. Stoga se da zaključiti kako bakterije roda *Lactobacillus* uspješno preživljavaju u otopini žučnih soli što se pokazalo i u konzorciju probiotičkog pripravka.

Kako bi se bakterijski sojevi karakterizirali kao probiotički, moraju preživjeti i očuvati aktivnost tijekom proizvodnje, pohrane te prolaska kroz probavni sustav. *In vitro* metode preživljavanja u simuliranim uvjetima želuca najčešće su među prvim koracima ispitivanja probiotičkog proizvoda. To obuhvaća inkubaciju sojeva u simuliranom želučanom soku čiji je pH između 2,0 i 3,0 te sadrži pepsin. Probava u želucu traje između 1 i 3 sata nakon čega se nastavlja u tankom crijevu (Liu i sur., 2020). Inkubacija u tankom crijevu obično traje između 2 i 5 sati te se radi o neutralnom okruženju čiji pH iznosi oko 6,7 – 7,5, a prisutne su žučne soli i pankreatin (Judkins i sur., 2020). Uzimajući u obzir navedene uvjete provedeno je ispitivanje učinka simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta na preživljavanje odabranih vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* iz probiotičkog pripravka za dojenčad. Rezultati preživljavanja kultura probiotičkog pripravka prve serije (PP1) prikazani su u tablicama 9 – 12 dok su rezultati preživljavanja kultura probiotičkog pripravka druge serije (PP2) prikazani u tablicama 13 – 16.

**Tablica 9.** Analiza preživljenja probiotičkih sojeva iz probiotičkog pripravka PP1 nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku, izražena kao broj poraslih kolonija na TOS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

vrijeme inkubacije	CFU/ml	Log CFU/ml	prosječna vrijednost	SD
<b>0 h</b>	2,0 · 10 <sup>11</sup>	11,301		
	2,5 · 10 <sup>11</sup>	11,398		
	2,5 · 10 <sup>9</sup>	9,398		
	3,5 · 10 <sup>8</sup>	8,544	<b>10,16</b>	<b>1,227</b>
<b>1 h</b>	1,0 · 10 <sup>11</sup>	11,176		
	3,5 · 10 <sup>10</sup>	10,544		
	1,5 · 10 <sup>9</sup>	9,176		
	2,0 · 10 <sup>8</sup>	8,301		
	4,5 · 10 <sup>7</sup>	7,653	<b>9,348</b>	<b>1,324</b>
<b>2 h</b>	1,5 · 10 <sup>11</sup>	11,176		
	2,0 · 10 <sup>10</sup>	10,301		
	2,5 · 10 <sup>9</sup>	9,398		
	4,0 · 10 <sup>8</sup>	8,602		
	6,5 · 10 <sup>7</sup>	7,813		
	1,85 · 10 <sup>7</sup>	7,267	<b>9,093</b>	<b>1,360</b>

**Tablica 10.** Analiza preživljenja probiotičkih sojeva iz probiotičkog pripravka PP1 nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva, izražena kao broj poraslih kolonija na TOS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

vrijeme inkubacije	CFU/ml	Log (CFU/ml)	prosječna vrijednost	SD
<b>1h</b>	1,5 · 10 <sup>11</sup>	11,176		
	1,0 · 10 <sup>10</sup>	10,0		
	1,0 · 10 <sup>9</sup>	9,0		
	1,0 · 10 <sup>8</sup>	8,0		
	3,5 · 10 <sup>7</sup>	7,544		
	1,9 · 10 <sup>7</sup>	7,279	<b>8,833</b>	<b>1,393</b>
<b>2h</b>	1,0 · 10 <sup>9</sup>	9,0		
	4,5 · 10 <sup>8</sup>	8,653		
	9,0 · 10 <sup>7</sup>	7,954		
	1,7 · 10 <sup>7</sup>	7,230	<b>8,210</b>	<b>0,679</b>
<b>3h</b>	1,5 · 10 <sup>10</sup>	10,176		
	2,0 · 10 <sup>9</sup>	9,301		
	2,0 · 10 <sup>8</sup>	8,301		
	3,5 · 10 <sup>7</sup>	7,544		
	1,4 · 10 <sup>7</sup>	7,146	<b>8,494</b>	<b>1,117</b>
<b>4h</b>	4,0 · 10 <sup>10</sup>	10,602		
	2,0 · 10 <sup>9</sup>	9,301		
	2,5 · 10 <sup>8</sup>	8,398		
	7,25 · 10 <sup>7</sup>	7,860		
	3,6 · 10 <sup>7</sup>	7,556	<b>8,813</b>	<b>1,102</b>



**Tablica 11.** Analiza preživljenja probiotičkih sojeva iz probiotičkog pripravka PP1 nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku, izražena kao broj poraslih kolonija na MRS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

vrijeme inkubacije	CFU/ml	Log (CFU/ml)	prosječna vrijednost	SD
<b>0 h</b>	4,5 · 10 <sup>11</sup>	11,653		
	3,75 · 10 <sup>10</sup>	10,574	<b>11,134</b>	<b>0,540</b>
<b>1 h</b>	2,0 · 10 <sup>11</sup>	11,301		
	3,0 · 10 <sup>10</sup>	10,447		
	6,5 · 10 <sup>9</sup>	9,813		
<b>2 h</b>	2,5 · 10 <sup>9</sup>	9,398	<b>10,239</b>	<b>0,718</b>
	6,1 · 10 <sup>11</sup>	11,785		
	1,07 · 10 <sup>10</sup>	10,029	<b>10,907</b>	<b>0,878</b>

**Tablica 12.** Analiza preživljenja probiotičkih sojeva iz probiotičkog pripravka PP1 nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva, izražena kao broj poraslih kolonija na MRS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

vrijeme inkubacije	CFU/ml	Log (CFU/ml)	prosječna vrijednost	SD
<b>1 h</b>	4,5 · 10 <sup>11</sup>	11,653		
	1,55 · 10 <sup>12</sup>	12,190		
<b>2 h</b>	4,45 · 10 <sup>10</sup>	10,648	<b>11,497</b>	<b>0,639</b>
	8,5 · 10 <sup>11</sup>	12,929		
	1,05 · 10 <sup>10</sup>	10,021		
	2,4 · 10 <sup>10</sup>	10,380		
<b>3 h</b>	4,15 · 10 <sup>9</sup>	9,618	<b>10,737</b>	<b>1,294</b>
	7,0 · 10 <sup>11</sup>	11,845		
	4,0 · 10 <sup>10</sup>	10,602		
<b>4 h</b>	3,0 · 10 <sup>9</sup>	9,447		
	2,9 · 10 <sup>9</sup>	9,462	<b>10,399</b>	<b>0,988</b>
	4,5 · 10 <sup>11</sup>	11,653		
	5,5 · 10 <sup>10</sup>	10,740		
	1,85 · 10 <sup>10</sup>	10,267		
	3,55 · 10 <sup>9</sup>	9,550	<b>10,553</b>	<b>0,764</b>

**Tablica 13.** Analiza preživljenja probiotičkih sojeva iz probiotičkog pripravka PP2 (uz dodatak formule za dojenčad) nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku, izražena kao broj poraslih kolonija na MRS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

Vrijeme inkubacije	I. ponavljanje	II. ponavljanje	III. ponavljanje	IV. ponavljanje	prosječna vrijednost	SD
<b>0 h</b>	11,540	10,377	11,050	11,010	<b>10,994</b>	<b>0,413</b>
<b>1 h</b>	9,328	9,3425	9,490	10,044	<b>9,551</b>	<b>0,292</b>
<b>2 h</b>	9,780	9,622	9,480	10,779	<b>9,915</b>	<b>0,510</b>

**Tablica 14.** Analiza preživljenja probiotičkih sojeva iz probiotičkog pripravka PP2 (uz dodatak formule za dojenčad) nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva, izražena kao broj poraslih kolonija na MRS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

vrijeme inkubacije	I. ponavljanje	II. ponavljanje	III. ponavljanje	IV. ponavljanje	prosječna vrijednost	SD
<b>1h</b>	10,156	8,500	7,260	9,890	<b>8,952</b>	<b>1,162</b>
<b>2h</b>	9,787	8,650	6,850	8,365	<b>8,413</b>	<b>1,048</b>
<b>3h</b>	8,648	9,500	7,780	7,922	<b>8,463</b>	<b>0,684</b>
<b>4h</b>	8,605	7,707	7,588	7,430	<b>7,833</b>	<b>0,457</b>

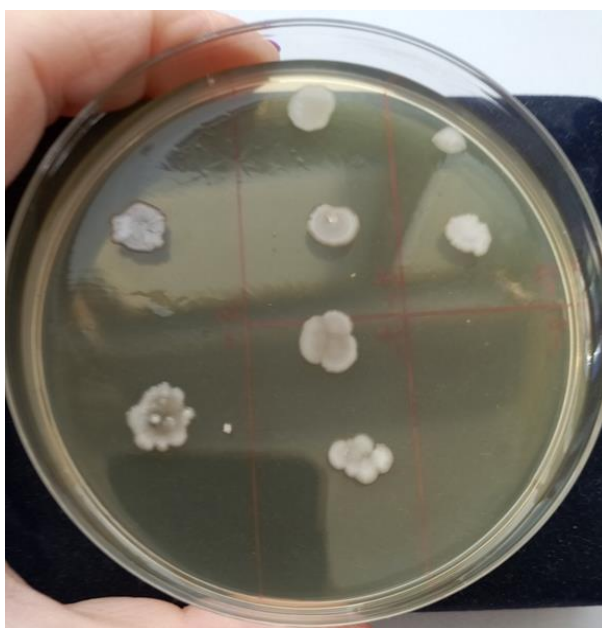
**Tablica 15.** Analiza preživljenja probiotičkih sojeva iz probiotičkog pripravka PP2 (uz dodatak formule za dojenčad) nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku, izražena kao broj poraslih kolonija na TOS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

vrijeme inkubacije	I. ponavljanje	II. ponavljanje	III. ponavljanje	IV. ponavljanje	Prosječna vrijednost	SD
<b>0 h</b>	9,894	9,674	10,312	10,882	<b>10,191</b>	<b>0,460</b>
<b>1 h</b>	8,948	8,875	10,233	11,435	<b>9,873</b>	<b>1,051</b>
<b>2 h</b>	9,058	9,583	9,584	11,060	<b>9,821</b>	<b>0,747</b>

**Tablica 16.** Analiza preživljenja probiotičkih sojeva iz probiotičkog pripravka PP2 (uz dodatak formule za dojenčad) nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva, izražena kao broj poraslih kolonija na TOS agaru nakon inkubacije 48 h pri 37 °C

Vrijeme inkubacije	I. ponavljanje	II. ponavljanje	III. ponavljanje	IV. ponavljanje	Prosječna vrijednost	SD
<b>1 h</b>	8,785	10,478	8,267	8,898	<b>9,107</b>	<b>0,827</b>
<b>2 h</b>	8,920	8,640	7,355	8,425	<b>8,335</b>	<b>0,592</b>
<b>3 h</b>	7,840	7,530	7,263	7,941	<b>7,644</b>	<b>0,267</b>
<b>4 h</b>	8,000	8,035	7,233	7,230	<b>7,625</b>	<b>0,393</b>

Tijekom brojanja poraslih kolonija na mediju, neke vrijednosti nisu mogle biti zabilježene jer je prevelik porast onemogućio raspoznavanja individualnih kolonija. Takav primjer vidljiv je na slici 10 koja prikazuje očiti porast biomase no izolirane bakterijske kolonije nisu vidljive i time određivanje vrijednosti CFU nije bilo moguće.



**Slika 10.** Porast bakterija probiotičkog pripravka PP2 kultiviranog 1 h u simuliranom želučanom soku, na TOS agaru nakon anaerobne inkubacije 48 h pri 37 °C

U ljudskom organizmu dnevno se izluči oko 2,5 litre želučanog soka čiji je pH 2,0. Također, oko 0,7 litara pankreasnog soka izluči se u proksimalni dio tankog crijeva svaki dan imajući pH oko 8,0 te sadržaj soli ne manji od 0,5 %. Upravo ovi sekreti predstavljaju enzimsku i pH barijeru za preživljavanje unesenih mikroorganizama tijekom probave te djeluju usklađeno sa žuči i peristaltikom crijeva (Charteris i sur., 1998). Kako bi probiotičke bakterije uspjele izvršiti svoje blagotvorne učinke na domaćina, trebaju preživjeti u gastrointestinalnom traktu u dovoljnom broju koji iznosi minimalno  $10^6 - 10^7$  CFU/mL (Millette i sur., 2013).

Prema rezultatima, broj preživjelih bakterija probiotičkog pripravka nakon prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta zadovoljio je vrijednosti potrebne za probiotičku aktivnost. Kako je i očekivano, broj preživjelih bakterija smanjio se nakon inkubacije u želučanom soku u odnosu na nulti sat inkubacije. Neki autori navode kako se standardom identifikacije potencijalnih probiotičkih mikroorganizama smatra stopa preživljenja od najmanje

80 % nakon inkubacije od 3 sata u želučanom soku (pH 2,5) (Liu i sur., 2020; Nawaz i sur., 2011). Preživljenje bakterija probiotičkog pripravka nakon inkubacije u želučanom soku iznosilo je više od 80 % no inkubacija je trajala 2, a ne 3 sata stoga se ne može sa sigurnošću tvrditi kolika bi stopa bila nakon 3 sata.

Preživljavanje u uvjetima gastrointestinalnog trakta razlikuje se ovisno o vrsti i soju probiotika. Prema tome, neki autori tvrde kako su vrste roda *Lactobacillus* većinom rezistentne dok su vrste roda *Bifidobacterium* osjetljivije na nizak pH te imaju niske stope preživljavanja na pH vrijednostima oko 2 i 3 (Ayyash i sur., 2021). Međutim, kako tolerancija ovisi specifično o soju, tako su pojedini sojevi kao što je soj *B. lactis* Bb-12, pokazali uspješno preživljavanje u uvjetima niskog pH (Vernazza i sur., 2006). Obzirom da u ovom istraživanju nije istraženo individualno djelovanje svakog soja u formulaciji probiotičkog pripravka, može se samo pretpostavljati da je njihova kompleksnost potencijalno utjecala na preživljavanje i prilagodbu mikrobnog konzorcija na različite gastrointestinalne uvjete.

Istraživanje Charteris i sur. (1998) pokazalo je kako su neki sojevi bakterijskih vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, točnije *L. casei* te *B. bifidum*, pokazali nesmanjeno preživljavanje tijekom simuliranog želučanog tranzita u prisutnosti natrijeva kazeinata, izolata proteina sirutke te njihove kombinacije. Ovi rezultati daju naslutiti kako neki sojevi probiotičkih vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* mogu preživjeti prolazak kroz želudac pogotovo kada se konzumiraju zajedno s mliječnim proizvodima ili namirnicama na bazi mliječnih proteina. U korelaciji s tim rezultatima, moguće je da je u ovom istraživanju konzumacija formule za dojenčad pospješila preživljavanje bakterijskih vrsta probiotičkog pripravka PP2 u gastrointestinalnom traktu. Pretpostavlja se kako proteini mlijeka mogu djelovati kao puferska sredstva i inhibitori aktivnosti probavne proteaze *in vivo*, čime se štite uneseni bakterijski sojevi tijekom gornjeg gastrointestinalnog tranzita (Charteris i sur., 1998).

Prema istraživanju Marinove i sur. (2019) koji su ispitivali mikrobiološku kvalitetu probiotičkih suplemenata, većina izolata vrsta *Lactobacillus* pokazala je slabu toleranciju na uvjete simuliranog želučanog soka (pH 2,0) uzrokujući smrt većine stanica nakon inkubacije od 90 minuta. Međutim neki od izolata sojeva *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* i *L. plantarum* ipak su pokazali potencijal tolerancije u uvjetima gastrointestinalnog trakta zbog preživljenja u otopini pepsina tijekom 90 minuta iako se broj preživjelih stanica drastično smanjio. Rezultati Marinove i sur. (2019) nisu u skladu s rezultatima ovog rada koji pokazuju visoku stopu preživljavanja nakon želučane inkubacije no to je moguće zbog toga što su probiotički suplementi ispitivani u radu Marinove i sur. sadržavali preniski broj bakterija.

Rezultati preživljavanja bakterija probiotičkog pripravka u soku tankog crijeva pokazuju očekivani pad preživljenja s povećanjem vremena inkubacije. Međutim, iako se broj preživjelih bakterija smanjio, dio bakterija je pokazao pozitivnu stopu preživljenja te toleranciju na uvjete

tankog crijeva. S druge strane, i Marinova i sur. (2019) te Charteris i sur. (1998) pokazuju visoko preživljenje bakterija u simuliranom soku tankog crijeva (pH 8,0). Međutim, za razliku od njihovih istraživanja u kojima su stanice dodavane direktno u simulirani sok tankog crijeva, u ovom istraživanju ispitivanje tolerancije na simulirani sok tankog crijeva provodi se sa stanicama koje su prvobitno bile izložene želučanom soku. Uzimajući to u obzir, istraživanje ovog rada pokazalo je kako probiotičke bakterije pokazuju visoku stopu preživljenja u soku tankog crijeva ukoliko su preživjele prolazak kroz uvjete želučanog soka. Također, preživljavanje probiotičkih sojeva u uvjetima gastrointestinalnog trakta pokazalo je slične rezultate kod starije i novije serije probiotičkog pripravka. Odnosno, broj preživjelih bakterija nije se mnogo razlikovao između serija PP1 i PP2. Dobiveni rezultati upućuju na to da kvaliteta probiotičkog pripravka ne ovisi o vremenu čuvanja tj. proizvod zadržava kvalitetu tijekom njegove pohrane.

Zaključno, uspješno preživljeni sojevi bakterijskog konzorcija probiotičkog pripravka za dojenčad u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta u skladu su s navodima na deklaraciji te upućuju na ispravnost kvalitete pripravka.

#### 4.4. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH STANICA PROBIOTIČKOG PRIPRAVKA

Primjena probiotičkih pripravaka kao alternativne medicinske opcije potiče zabrinutost oko sigurnosti takvih proizvoda te potencijalnu potrebu za dodatnom kontrolom procesa proizvodnje. Stoga, točno navođenje i opis mikroorganizama prisutnih u probiotičkim proizvodima te određivanje prisutnosti mikrobnih kontaminanata, posebno onih koji mogu predstavljati zdravstveni rizik, vrlo su važni za očuvanje javne sigurnosti i pravilnog označavanja ovakvog tipa proizvoda (Patro i sur., 2016). Zbog toga je u ovom radu provedena identifikacija bakterijskih stanica primjenom testa genetske raznolikosti s ciljem potvrđivanja dva različita roda bakterija u probiotičkom pripravku kako je navedeno na proizvodu. Rezultati provedbe eksperimenta prikazani su u tablici 17.

**Tablica 17.** Koncentracije izolirane DNA u uzorcima ukupne DNA ekstrahirane iz sojeva probiotičkog pripravka

uzorak	nukleinska kiselina (ng/ul)	OD260/280
1	163,12	1,82
2	105,98	1,76
3	106,91	106,91

Nekoliko je autora istraživalo potencijal suvremenih molekularnih metodologija za brzo označavanje probiotičkih proizvoda i identifikaciju mogućih kontaminanata, kako bi se zadovoljila kontrola kvalitete i sigurnost (Shehata i Newmaster, 2023; Tracey i sur., 2023; Kim i sur., 2022). Sekvenciranje nove generacije pokazalo se kao učinkovita metoda i alat za probir mogućih mikrobioloških kontaminanta u probiotičkim proizvodima. U ovom radu korištenjem nove generacije sekvencioniranja primjenom FLX - Titanium amplikon sekvencioniranja (bTEFAP), ustanovljena je raznolikost bakterijskih vrsta u probiotičkom pripravku za dojenčad. Primjenom ove metode sekvencioniranja, ispitana je prisutnost vrsta *Lactobacillus* navedenih na proizvodu, a analiza sekvencioniranja potvrdila je da u probiotičkom pripravku nema prisutnosti kontaminirajućih sojeva. Također visokoučinkovito sekvenciranje uzorka potvrdilo je prisutnost sojeva *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus reuteri* navedenih

na pakiranju probiotičkog pripravka. Analiza bakterijske DNA sekvenciranjem potvrdila je konzistentnost kvalitativnog sastava u serijama proizvoda, s neznatnim prividnim odstupanjima u relativnoj zastupljenosti taksonomskih skupina. Primjena nove generacije sekvenciranja kao pristupa za detekciju i provjeru prisutnih mikrobnih vrsta koriste mnoge istraživačke grupe iako još nije u primjeni za rutinsku analizu u akreditiranim laboratorijima. Tako su Shehata i Newmaster (2023) potvrdili učinkovitost sekvenciranja u validaciji detekcije prisutnih mikrobnih sojeva, a u eksperimentalnom pristupu primijenjeno je HTS sekvenciranje V3-V4 regije 16S rRNA gena, te je postignuta preciznost očitavanja 95 – 97 % po uzorku odgovaralo ciljnoj vrsti. Primjena HTS temeljem analize sekvenci amplicona V5 – V8 regije gena 16S rRNA rezultirala je s preciznošću i točnosti od 99 % ukupnih očitavanja po uzorku koji odgovaraju ciljanoj vrsti. Cilj je dugoročno implementirati integrirane metodološke pristupe, koji će kombinirati tehnike ovisne i neovisne o kultivaciji, što bi doprinijelo kontroli kvalitete proizvodnje probiotika, te praćenje primjene odgovarajućih sojeva osobito kada se radi o višesojnom probiotičkom pripravku.



## 5. ZAKLJUČCI

1. Mikrobiološkom analizom utvrđeno je kako je broj probiotičkih stanica u probiotičkom pripravku u skladu s deklaracijom te prelazi vrijednost  $10^6$  CFU/ml što je minimalna propisana koncentracija bakterijskih stanica po mililitru ili gramu probiotičke formulacije.
2. Mikrobiološka analiza i metoda sekvenciranja sljedeće generacije isključili su prisutnost kontaminirajućih neprobiotičkih bakterija u probiotičkom pripravku. Također, potvrđena je prisutnost vrsta iz roda *Lactobacillus*, odnosno sojeva *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus reuteri* navedenih na deklaraciji pripravka.
3. Ispitivanjem kvalitete utvrđen je visok broj preživjelih bakterijskih stanica probiotičkog pripravka nakon prolaska kroz uvjete gastrointestinalnog trakta čime je ispunjen jedan od prvih zahtjeva u procjeni osiguranja kvalitete probiotika.

## 6. LITERATURA

Adamberg S, Sumeri I, Uusna R, Ambalam P, Kondepudi KK, Adamberg K i sur. (2014) Survival and synergistic growth of mixed cultures of bifidobacteria and lactobacilli combined with prebiotic oligosaccharides in a gastrointestinal tract simulator. *Microb Ecol Health Dis* **25**. <https://doi.org/10.3402/mehd.v25.23062>

Ahern GJ, Hennessy AA, Ryan CA, Ross RP, Stanton C (2019) Advances in Infant Formula Science. *Annu Rev Food Sci Technol* **10**, 75-102. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-081318-104308>

Ayyash MM, Abdalla AK, AlKalbani NS, Baig MA, Turner MS, Liu SQ i sur. (2021) Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. *JDS* **104(8)**, 8363-8379. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20398>

Bakshi S, Paswan VK, Yadav SP, Bhinchhar BK, Kharkwal S, Rose H i sur. (2023) A comprehensive review on infant formula: nutritional and functional constituents, recent trends in processing and its impact on infants' gut microbiota. *Front Nutr* **10**, 1194679. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1194679>

Begley M, Gahan CG, Hill C (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 625–651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>

Bertelsen RJ, Jensen ET, Ringel-Kulka T (2016) Use of probiotics and prebiotics in infant feeding. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **30(1)**, 39-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2016.01.001>

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (1998) Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* **84(5)**, 759-68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00407>

Davis C (2014) Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods* **103**, 9-17. [10.1016/j.mimet.2014.04.012](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.04.012)

Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM (2019) The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends Microbiol* **27(12)**, 997-1010. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.001>

FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, London, Ontario.

Fernández MF, Boris S, Barbés C (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* **94(3)**, 449-55. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01850.x>

Ghelardi E, Mazzantini D, Celandroni F, Calvigioni M, Panattoni A, Lupetti A i sur. (2023) Analysis of the microbial content of probiotic products commercialized worldwide and survivability in conditions mimicking the human gut environment. *Front Microbiol* **14**, 1127321. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1127321>

Judkins TC, Archer DL, Kramer DC, Solch RJ (2020) Probiotics, Nutrition, and the Small Intestine. *Curr Gastroenterol Rep* **22(1)**, 2. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0740-3>

Kim E, Kim D, Yang SM, Kim HY (2022) Validation of probiotic species or subspecies identity in commercial probiotic products using high-resolution PCR method based on large-scale genomic analysis. *Food Res Int* **154**, 111011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111011>

König H, Fröhlich J (2017) Lactic Acid Bacteria. U: König H, Unden G, Fröhlich J (ured.) Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, 2. izdanje, Springer, Berlin, str. 3-41.

Kozak K, Charbonneau D, Sanozky-Dawes R, Klaenhammer T(2015) Characterization of bacterial isolates from the microbiota of mothers' breast milk and their infants. *Gut Microbes* **6(6)**, 341-351. <https://doi.org/10.1080%2F19490976.2015.1103425>

Lemoine A, Tounian P, Adel-Patient K, Thomas M (2023) Pre-, pro-, syn-, and Postbiotics in Infant Formulas: What Are the Immune Benefits for Infants? *Nutrients* **15**, 1231. <https://doi.org/10.3390/nu15051231>

Liu W, Chen M, Duo L, Wang J, Guo S, Sun H i sur. (2020) Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum. *JDS* **103(5)**, 4013-4025. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17602>

Maldonado J (2020) Probiotics and Prebiotics in Infant Formulae. Prebiotics and Probiotics - Potential Benefits in Nutrition and Health. *IntechOpen*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.88609>

Maldonado J, Gil-Campos M, Maldonado-Lobón JA, Benavides MR, Flores-Rojas K, Jaldo R i sur. (2019) Evaluation of the safety, tolerance and efficacy of 1-year consumption of infant formula supplemented with *Lactobacillus fermentum* CECT5716 Lc40 or *Bifidobacterium breve* CECT7263: a randomized controlled trial. *BMC pediatrics* **19(1)**, 361. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1753-7>

Marinova VY, Rasheva IK, Kizheva YK, Dermenzhieva YD, Hristova PK (2019) Microbiological quality of probiotic dietary supplements. *Biotechnol Biotechnol Equip* **33(1)**, 834-841. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1621208>

Mazzantini D, Calvigioni M, Celandroni F, Lupetti A, Ghelardi E (2021) Spotlight on the Compositional Quality of Probiotic Formulations Marketed Worldwide. *Front Microbiol* **12**, 693973. doi: 10.3389/fmicb.2021.693973

Millette M, Nguyen A, Amine KM, Lacroix M (2013) Gastrointestinal survival of bacteria in commercial probiotic products. *Int J Probiotics Prebiotics* **8**, 149-156.

Naissinger da Silva M, Tagliapietra BL, Flores VDA, Pereira Dos Santos Richards NS (2021) *In vitro* test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Curr Res Food Sci* **4**, 320-325. doi: 10.1016/j.crfs.2021.04.006

Nawaz M, Wang J, Zhou A, Ma C, Wu X, Xu J (2011) Screening and characterization of new potentially probiotic lactobacilli from breast-fed healthy babies in Pakistan. *Afr J Microbiol Res* **5(12)**, 1428-1436. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.737>

Patro JN, Ramachandran P, Barnaba T, Mammel MK, Lewis JL, Elkins CA (2016) Culture-independent metagenomic surveillance of commercially available probiotics with high-throughput next-generation sequencing. *MSphere* **1(2)**, 10-1128.

<https://doi.org/10.1128/msphere.00057-16>

Rombouts JL, Kranendonk EMM, Regueira A, Weissbrodt DG, Kleerebezem R, van Loosdrecht MCM (2020) Selecting for lactic acid producing and utilising bacteria in anaerobic enrichment cultures. *Biotechnol Bioeng* **117(5)**, 1281-1293. <https://doi.org/10.1002/bit.27301>

Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM i sur. (2022) The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **19(8)**, 551. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00628-4>

Shehata HR, Newmaster SG (2023) The power of DNA based methods in probiotic authentication. *Front Microbiol* **14**, 1158440. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1158440>

Stasiak-Rózanska L, Berthold-Pluta A, Pluta AS, Dasiewicz K, Garbowska M (2021) Effect of Simulated Gastrointestinal Tract Conditions on Survivability of Probiotic Bacteria Present in Commercial Preparations. *Int J Environ Res Public Health* **18**, 1108. <https://doi.org/10.3390/ijerph1803110>

Süle J, Kőrösi T, Hucker A, Varga L (2014) Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *Braz J Microbiol* **45(3)**, 1023-30. <https://doi.org/10.1590%2Fs1517-83822014000300035>

Tracey, H, Coates N, Hulme E, John D, Michael DR, Plummer SF (2023) Insights into the enumeration of mixtures of probiotic bacteria by flow cytometry. *BMC microbiology* **23(1)**, 48. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02792-2>

Vecchione A, Celandroni F, Mazzantini D, Senesi S, Lupetti A, Ghelardi E (2018) Compositional quality and potential gastrointestinal behavior of probiotic products commercialized in Italy. *Front Med* **5**, 59. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00059>

Vernazza CL, Gibson GR, Rastall RA (2006) Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium*. *J Appl Microbiol* **100**, 846-53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02832.x>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Marta Balun izjavljujem da je ovaj diplomski 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