

# Kompetitivna ekskluzija patogena sojem producentom egzopolisaharida *Limosilactobacillus fermentum* MC1

---

Knez, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:785892>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Petra Knez

**KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA  
PATOGENA SOJEM  
PRODUCENTOM  
EGZOPOLISAHARIDA  
*Limosilactobacillus fermentum* MC1**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, te uz pomoć Nine Čuljak, mag. ing. biotechn.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

# 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:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Molekularna biotehnologija

KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA PATOGENA SOJEM PRODUCENTOM EGZOPOLISAHARIDA  
*Limosilactobacillus fermentum* MC1

Petra Knez, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058212631

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati kompetitivnu ekskluziju test-mikroorganizma *Escherichia coli* 3014 probiotičkim sojem *Limosilactobacillus fermentum* MC1, producentom egzopolisaharida (EPS), korištenjem Caco-2 stanične linije u *in vitro* uvjetima. Također je ispitan utjecaj različitih koncentracija sintetiziranih EPS-a na kompetitivnu ekskluziju. Proučavan je i utjecaj mikroinkapsulacije soja MC1 u alginatu, uz dodatak fruktooligosaharida ili galaktooligosaharida, na preživljavanje stanica soja MC1 u procesu liofilizacije, izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta te skladištenja. Rezultati su pokazali da EPS kojeg sintetizira *L. fermentum* MC1 smanjuje adhezivna svojstva *E. coli*, s time da veća koncentracija podrazumijeva i snažnije djelovanje. Najveća antiadhezivna svojstva pokazao je uzorak koji je sadržavao 1 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a. Mikroinkapsulacija u natrijevom alginatu pokazala se kao dobra tehnika za zaštitu MC1 soja. Dodatak oligosaharida soju MC1 osigurava bolje preživljavanje liofilizacije te simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta i tijekom skladištenja, s tim da su se galaktooligosaharidi u gotovo svim segmentima istraživanja pokazali kao bolji izbor prebiotika nego fruktooligosaharidi.

**Gljučne riječi:** *probiotičke bakterije, egzopolisaharidi, adhezijska svojstva, mikroinkapsulacija, oligosaharidi*

**Rad sadrži:** 42 stranice 10 slika, 2 tablice, 42 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Jasna Novak (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (mentor)
3. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (član)
4. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (zamjenski član)

**Datum obrane:** 6. srpnja 2023.

## 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 Cultures Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

COMPETITIVE EXCLUSION OF PATHOGENS BY THE EXOPOLYSACCHARIDE-PRODUCING  
*Limosilactobacillus fermentum* MC1 STRAIN

*Petra Knez*, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058212631

**Abstract:** The aim of this work was to examine the competitive exclusion of the test microorganism *Escherichia coli* 3014 by the probiotic strain *Limosilactobacillus fermentum* MC1, an exopolysaccharide (EPS) producer, using the Caco-2 cell line *in vitro*. The influence of different concentrations of synthesized EPSs on competitive exclusion was also examined. The effect of microencapsulation of MC1 strain in alginate, with the addition of fructooligosaccharides or galactooligosaccharides, on the survival of MC1 cells during the lyophilization process, simulated gastrointestinal tract (GIT) conditions and storage was also studied. The results showed that EPSs synthesized by *L. fermentum* MC1 reduce the adhesive properties of *E. coli*, with a higher concentration implying a stronger effect. The sample containing 1 mg mL<sup>-1</sup> EPS showed the highest anti-adhesive properties. Microencapsulation in sodium alginate proved to be a good technique for the protection of the MC1 strain. The addition of oligosaccharides to MC1 strain ensures better survival of lyophilization and simulated GIT conditions and storage, with the fact that galactooligosaccharides proved to be a better choice of prebiotics than fructooligosaccharides in almost all segments of the research.

**Keywords:** *probiotic bacteria, exopolysaccharides, adhesion properties, microencapsulation, oligosaccharides*

**Thesis contains:** 42 pages, 10 figures, 2 tables, 42 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor

**Technical support and assistance:** Nina Čuljak, MSc

**Reviewers:**

1. Jasna Novak, PhD, Full professor (president)
2. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor(mentor)
3. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (member)
4. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** July 6<sup>th</sup>, 2023

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. GASTROINTESTINALNI TRAKT</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. Uloge crijevne mikrobiote .....	2
2.1.2. Sastav crijevne mikrobiote.....	3
<b>2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE</b> .....	<b>5</b>
2.2.1. Uloga BMK u prehrambenoj industriji .....	5
<b>2.3. PROBIOTICI</b> .....	<b>6</b>
2.3.1. Adhezija na crijevni epitel .....	6
2.3.2. Egzopolisaharidi .....	7
2.3.3. Mehanizam djelovanja probiotika.....	10
<b>2.4. MIKROINKAPSULACIJA PROBIOTIKA</b> .....	<b>13</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>17</b>
3.1.1. Mikroorganizmi .....	17
3.1.2. Stanične linije.....	17
3.1.3. Hranjive podloge.....	17
3.1.4. Kemikalije.....	18
3.1.5. Aparatura i pribor.....	19
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>20</b>
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama .....	20
3.2.2. Izolacija egzopolisaharida.....	20
3.2.3. Ispitivanje utjecaja egzopolisaharida i soja producenta na adheziju na Caco-2 stanice .....	20
3.2.4. Kompetitivna ekskluzija test-mikroorganizma <i>Escherichia coli</i> 3014.....	22
3.2.5. Mikroinkapsulacija soja <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1 u alginatu .....	22
3.2.6. Mikroinkapsulacija soja <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1 u alginatu uz dodatak fruktooligosaharida i galaktooligosaharida kao prebiotika.....	23
3.2.7. Ispitivanje preživljavanja mikroinkapsuliranog soja MC1 tijekom liofilizacije te nakon 2 mjeseca skladištenja .....	23
3.2.8. Preživljavanje mikroinkapsuliranog soja <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.....	24
3.2.9. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	24
3.2.10. Obrada rezultata .....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>



<b>4.1. KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA TEST-MIKROORGANIZMA <i>Escherichia coli</i> 3014.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. MIKROINKAPSULACIJA SOJA <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1 U ALGINATU UZ DODATAK FRUKTOOLIGOSAHARIDA I GALAKTOLIGOSAHARIDA KAO PREBIOTIKA.....</b>	<b>29</b>
<b>4.3. ISPITIVANJE PREŽIVLJAVANJA MIKROINKAPSULIRANOG SOJA <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1 TIJEKOM LIOFILIZACIJE .....</b>	<b>32</b>
<b>4.4. PREŽIVLJAVANJE MIKROINKAPSULIRANOG SOJA <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1 U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA .....</b>	<b>33</b>
<b>4.5. ISPITIVANJE PREŽIVLJAVANJA MIKROINKAPSULIRANOG SOJA <i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1 TIJEKOM 2 MJESECA SKLADIŠTENJA.....</b>	<b>35</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>38</b>

# 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline su mikroorganizami koji proizvode mliječnu kiselinu kao nusprodukt tijekom metaboličkih aktivnosti. Zbog mogućnosti fermentiranja ugljikohidrata već se dugo koriste u prehrambenoj industriji. Također, neki od ovih mikroorganizama djeluju na način da poboljšavaju zdravlje domaćina i objedinjeni su pod nazivom probiotici.

Za uspješno djelovanje probiotika u gastrointestinalnom traktu (GIT) domaćina, potrebna je uspješna adhezija probiotika na crijevni epitel. Za receptore na epitelu konkuriraju i drugi mikroorganizmi od kojih su neki patogeni te kod domaćina izazivaju bolesti i upalna stanja. Poželjno je da probiotici budu što kompetitivniji u vezanju za receptore kao i u natjecanju za hranjive tvari. U tome im uvelike pomaže stvaranje inter- i intramolekulskih veza što će naposljetku dovesti ili do kolonizacije GIT-a ili do inhibicije rasta i nemogućnosti djelovanja drugih mikroorganizama. Probiotici na površini mogu imati komponente koje im omogućavaju bolju adheziju na crijevni epitel poput egzopolisaharida (EPS-a), teihoičnih kiselina, S-proteina, Mub-proteina, itd.

Mnoge bakterije iz roda *Lactobacillus* imaju probiotička svojstva pa tako i *Limosilactobacillus fermentum* MC1. Soj MC1 prirodno je prisutan u humanom majčinom mlijeku, a poznat je kao producent EPS-a. Brojne su uloge koje EPS-i mogu imati kod probiotičkih sojeva. Osim što posreduju u adheziji probiotika na crijevni epitel, EPS-i mogu protiv patogenih organizama djelovati antimikrobno, antikancerogeno ili antioksidativno.

Cilj ovog rada bio je istražiti kompetitivnu ekskluziju bakterije *E. coli* 3014 sojem *Limosilactobacillus fermentum* MC1 kao i egzopolisaharidom kojeg taj soj proizvodi. Kompetitivna ekskluzija ispitivala se u *in vitro* uvjetima na Caco-2 staničnoj liniji. Odvojeno se proučavao utjecaj MC1 soja od utjecaja izoliranog egzopolisaharida na adhezijska svojstva. Važno je bilo utvrditi ovise li adhezijska svojstva o različitoj koncentraciji dodanih EPS-a. Isto tako, u ovom je radu provedena mikroinkapsulacija probiotičkog soja MC1 zbog dodatne zaštite soja kao i EPS kojeg proizvodi. Uz postupak mikroinkapsulacije, vijabilnost probiotičkog soja pratila se i nakon provedene liofilizacije, izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta te nakon dva mjeseca skladištenja. Dodatno, u svim navedenim fazama proučavan je utjecaj galaktooligosaharida i fruktooligosaharida na preživljavanje bakterijskih stanica.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. GASTROINTESTINALNI TRAKT

Gastrointestinalni trakt (GIT) sisavaca složeni je sustav koji započinje usnom šupljinom, a završava anusom. Između početne i krajnje točke sustava nalazi se niz organa koji stvaraju kemijski i fizički različite mikrookoliše. Iako su mikroorganizmi prisutni već u placenti, krvi pupkovine, mekoniju i amnionskoj tekućini, po rođenju započinje intenzivna kolonizacija gastrointestinalnog sustava raznim mikrobnim zajednicama. Brojni čimbenici utječu na sastav crijevne mikrobiote u najranijim danima, na primjer način rođenja, konzumacija antibiotika tijekom trudnoće ili dojenja, prehrana majke, hranjenje majčinim mlijekom ili adaptiranim pripravcima, uvođenjem čvrste hrane. Nakon treće godine života počinje se uspostavljati crijevna mikrobiota svojstvena odraslim osobama, no na nju i dalje utjecaj imaju prehrana, razne bolesti, uzimanje antibiotika kao i brojni čimbenici iz okoliša. Iako svaka jedinka ima jedinstven sastav crijevne mikroflore, uočeno je da pojedinci koji su genetski povezani, slične dobi ili pak oni koji konzumiraju istu prehranu, imaju sličniji crijevni mikrobiom od pojedinaca koji nemaju navedene karakteristike. Zbog navedenih značajki, sastav mikrobiote sisavaca u isto je vrijeme odraz velike dinamičnosti kao i velike stabilnosti (Coyte i Rakoff-Nahoum, 2019; Rodriguez i sur., 2015).

#### 2.1.1. Uloge crijevne mikrobiote

Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u zdravlju domaćina, a to se posebno ističe za vrijeme postnatalnog razvoja. Određene bakterijske vrste odgovorne su za modulaciju ekspresije gena uključenih u jačanje mukozne barijere, apsorpciju hranjivih tvari, postnatalno sazrijevanje crijeva, angiogenezu i metabolizam ksenobiotika. Mukozna barijera može poslužiti kao stanište mikrobnim zajednicama, ali ima i zaštitnu ulogu u smislu da sprječava adheziju mikroorganizama na epitelne stanice. Crijevna mikrobiota štiti od patogena i na način da se stvara kompeticija za hranjive tvari i receptore, a isto tako odgovorna je i za proizvodnju antimikrobnih spojeva. Još od rođenja važan je utjecaj crijevne mikrobiote na imunološki sustav. Ona sudjeluje u razvoju limfoidnih struktura, diferencijaciji imunoloških stanica te proizvodnji imunoloških medijatora. Fermentacijom ugljikohidrata u debelom crijevu dobivaju se kratkolančane masne kiseline koje su ujedno izvor energije za kolonocite. Brojne su i raznolike pozitivne uloge crijevne mikroflore, no uzimanje lijekova, loša prehrana, stres, izlaganje toksinima i drugi čimbenici mogu dovesti do narušavanja ravnoteže crijevne mikroflore to jest disbioze (Goulet, 2015). Disbioza crijevne

mikroflora odgovorna je za razvoj raznih poremećaja i bolesti kao što su upalna bolest crijeva, celijakija, alergija, kardiovaskularne bolesti, pretilost ili karcinom. Proučavanjem takvih stanja došlo se do zaključka da je uspostava zdrave mikrobiote u najranijim fazama života ključna za održavanje crijevne homeostaze (Carding i sur., 2015). Ponovo uspostavljanje ravnoteže je dugotrajan proces koji zahtjeva strpljenje, a modulacija crijevne mikrobiote probioticima, prebioticima i produktima fermentacije navodi se kao jedna od opcija, uz napomenu da takvo liječenje treba dodatno istražiti i optimizirati (Goulet, 2015).

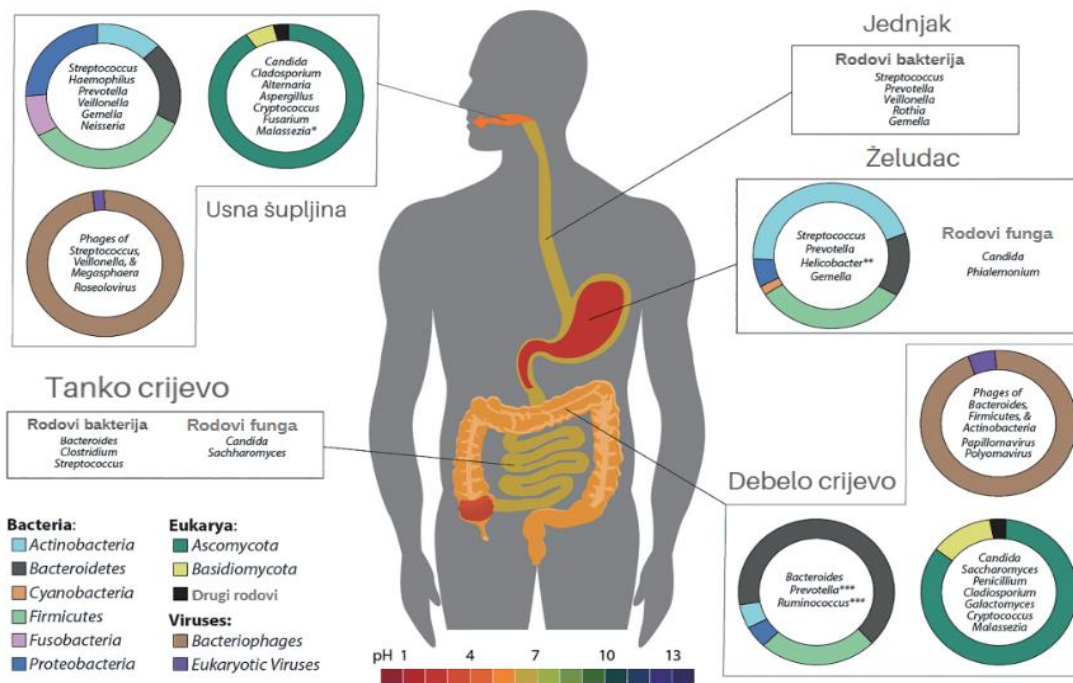
### 2.1.2. Sastav crijevne mikrobiote

Gustoća i sastav mikrobioma mijenja se duž GIT-a te u svakom dijelu prevladavaju mikroorganizmi s odgovarajućom mikrobnom funkcijom. U želucu, pod utjecajem proteolitičkih enzima, započinje probava unesene hrane, a zbog prisutnosti želučanoga soka pH vrijednost je vrlo niska. U tankom se crijevu odvija glavna probava i apsorpcije hranjivih tvari. Dodatno, u dvanaesnik ulaze i žučne soli te enzimi iz gušterače, a brz je i protok sadržaja. Svi navedeni uvjeti nepovoljni su za rast većine mikroorganizama te je skladno tome i njihov broj znatno manji nego u debelom crijevu. Hrana koju domaćin ne može probaviti koristi se kao supstrat za rast mikroorganizama u debelom crijevu. Brzina stanične izmjene ondje je niska, a vrijeme prolaska hrane traje dugo zbog čega u tom dijelu sustava vlada najveća biološka raznolikost (Hillman i sur., 2017).

Od samih početaka istraživanja crijevne mikrobiote bilo je teško odrediti točan sastav iste. Koristile su se metode ovisne o kulturi koje nisu bile najprikladnije zbog toga što se većina bakterijskih vrsta ne može uzgajati u aerobnim uvjetima. Čak i najmanji doticaj s kisikom dovoljan je za odumiranje nekoliko vrsta, što posljedično može dovesti do smanjene vitalnosti drugih vrsta (Biedermann i Rogler, 2015). U posljednjih nekoliko desetljeća razvijene su molekularne tehnike usmjerene na genetske markere za karakterizaciju i analizu bakterijskih zajednica. Kako cijena sekvenciranja tijekom godina pada, metagenomski pristup postaje uobičajena praksa kod analiza, ne samo bakterijskih, nego i svih ostalih članova crijevne mikrobiote.

Najbrojniji pripadnici GIT-a su bakterije. Velika većina identificiranih bakterija spada u 5 rodova – *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* i *Verrucomicrobia*, dok ostatak čine pripadnici rodova *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *Spirochaetes* i *Cyanobacteria*. Neke od funkcija koje bakterije imaju duž GIT-a su zaštita od patogena, apsorpcija iona ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), fermentacija neprobavljene hrane do kratkolančanih masnih kiselina (acetat, propionat, butirat) i

druge. Čak 70 % ukupnog broja bakterija ljudskog tijela nalazi se u debelom crijevu. Osim bakterija, mikrobiom GIT-a čine fungi, arheje i virusi (slika 1). Najzastupljeniji rodovi među fungima su *Saccharomyces*, *Candida* i *Cladosporium*. Međutim, smatra se da je populacija funga nestabilna i dinamično se mijenja čak i u kraćim vremenskim periodima pa sukladno tome ne postoje reprezentativni primjeri rodova. Uloga funga u crijevnom mikrobiomu je još uvijek nepoznata, a tome pridonosi i činjenica da funga čine približno 0,03 % fekalnog mikrobioma. Što se tiče arheja, najzastupljeniji pripadnici su pripadnici rodova *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Nitrososphaera*, *Thermogynomonas* i *Thermoplasma*. Poznato je da se pripadnici rodova *Methanobrevibacter* i *Nitrososphaera* međusobno isključuju te se smatra da je njihova prisutnost povezana s unosom ugljikohidrata. Iako su arheje slabo prisutne u crijevnoj mikrobioti, značajno doprinose metanogenezi. Virusi su najmanje istraženi članovi GIT-a. Koristeći metagenomske analize ustanovilo se kako se virusne zajednice uglavnom sastoje od bakteriofaga (oko 90 %) te eukariotskih virusa (oko 10 %). Iako se još uvijek ne zna koja je funkcija većine virusa u mikrobiomu, kao moguće funkcije navode se povećanje imuniteta bakterija ili domaćina te zaštita od patogena. Isto tako, virusi sadrže gene za otpornost ili toleranciju stresnih uvjeta što ih čini potencijalno korisnima za bakterije (Hillman i sur., 2017).



**Slika 1.** Sastav ljudskog mikrobioma. Gastrointestinalni sustav prikazan je u bojama sukladno pH ljestvici na dnu slike (prema Hillman i sur., 2017)

## 2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine skupinu Gram-pozitivnih bakterija koje imaju određena morfološka, metabolička i fiziološka svojstva. To su općenito koki ili štapići koji ne sporuliraju, imaju visoku toleranciju na nizak pH, a mogu biti anaerobi ili mikroaerofili. Ugljikohidrati su jedini ili glavni izvor ugljika za BMK, a kao produkt fermentacije mogu nastati mliječna kiselina, ugljikov dioksid, etanol ili acetat ovisno o kojoj se fermentaciji radi. Homolaktična fermentacija temelji se na glikolizi i iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule mliječne kiseline. Kod heterolaktične fermentacije uz jednu molekulu mliječne kiseline nastaju značajne količine ugljikovog dioksida i etanola. Iako postoji preko 60 rodova BMK, najzastupljeniji su: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Weissella* (Axelsson i von Wright, 2012).

### 2.2.1. Uloga BMK u prehrambenoj industriji

BMK imaju GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) status i često se koriste u prehrambenoj industriji. Osim što razgradnja ugljikohidrata osigurava energiju za BMK, nastala mliječna kiselina odgovorna je za poboljšavanje kvalitete hrane. U industriji prerade pića, uporabom BMK, nastoji se zamijeniti korištenje enzima dobivenih iz plijesni koji se također koriste za razgradnju polisaharida. Osim razgradnje polisaharida, BMK imaju sposobnost hidrolize proteina, a to je važno jer se na taj način poboljšava probavljivost proteina u hrani i povećava im se hranjiva vrijednost. Isto tako, razgradnjom proteina moguće je eliminirati proteinske alergene u hrani. Primjer je razgradnja kazeina koja posljedično dovodi do smanjivanja alergenosti na mliječne proizvode kod domaćina. Neki sojevi BMK mogu hidrolizirati proteine koji se nalaze u žitaricama, na primjer albumine, globuline i glijadine iz pšenice dok drugi imaju mogućnost razgradnje mikotoksina i zato se koriste prilikom konzerviranja žitarica. Metaboliziranjem aminokiselina od strane BMK mogu nastati diacetil, acetoin i butandion što su tipični spojevi arome mnogih fermentiranih mliječnih proizvoda. S druge pak strane, metabolizam glutamina, glutaminske kiseline i arginina igra važnu ulogu u prilagodbi BMK na kisele uvjete. Osim sposobnosti razgradnje, BMK su prepoznate i po sintezi raznih spojeva. Mogu sintetizirati bakteriocine i antimikrobne peptide zbog čega se koriste u procesima konzerviranja hrane. Sintaza vitamina folne kiseline, riboflavina, vitamina C i piridoksala dodatno nutritivno obogaćuje hranu.

Egzopolisaharadi koje sintetiziraju BMK koriste se u prehrambenoj industriji kao sredstva za želiranje, stabilizatori, zgušnjivači i emulgatori (Wang i sur., 2021).

## 2.3. PROBIOTICI

Probiotici su živi mikroorganizmi koji domaćinu mogu osigurati zdravstvene dobrobiti ukoliko se konzumiraju u odgovarajućim količinama. Svaki se probiotik opisuje rodom, vrstom i oznakom soja. Najčešće se kao probiotici koriste rodovi *Lactobacillus* te *Bifidobacterium*. Neke od dobrobiti koje su probiotici pokazali u istraživanjima na ljudskim i životinjskim modelima bili su: suzbijanje dijareje, ublažavanje intolerancije na laktozu, antimikrobno djelovanje, ublažavanje komplikacija koje se javljaju nakon operacija te ublažavanje simptoma i upala kod bolesti povezanih s crijevima. Ipak, pozitivne učinke probiotika ne treba generalizirati jer su oni specifični obzirom na bakterijski soj o kojoj se radi (Sanders i sur., 2018; Bermudez-Brito i sur., 2012).

### 2.3.1. Adhezija na crijevni epitel

Uspješna kolonizacija GIT-a ključni je čimbenik koji bi probioticima omogućio ostvarivanje zdravstvenih dobiti za domaćina. Kako bi kolonizacija bila uspješna, probiotici se trebaju adhezirati na mukozni sloj ili crijevne epitelne stanice. U početku se probiotici za mukozni sloj vežu nespecifičnim, slabim i reverzibilnim vezama, a tek nakon toga dolazi do stvaranja interakcija između adhezina na bakterijskim stanicama i komplementarnih receptora u mukoznom sloju ili na crijevnim epitelnim stanicama. Ne postoji standardna molekula na bakterijskim stanicama koja je odgovorna za adheziju na sastavne dijelove GIT-a, već je primijećeno da se mehanizmi adhezije probiotika razlikuju na nivou vrste pa čak i soja (Han i sur., 2021).

Često se na površini probiotika nalaze proteini koji se vežu na proteine koji su sastavni dio GIT-a. Kod raznih vrsta BMK prisutni su Mub proteini na površini koji se vežu za mucine u mukoznom sloju. Fibronektin je još jedan od glikoproteina prisutnih u mukoznom sloju, a na njega se vežu FbpA površinski proteini bakterija. Ponekad se na površini bakterija nalazi S-sloj. To je sloj koji se sastoji od identičnih proteinskih ili glikoproteinskih podjedinica, a uloga mu je održavanje oblika bakterija, zaštita od lizozima, uloga molekularnog sita te je važan za adheziju bakterija. Na površini bakterija koje imaju S-sloj nalaze se proteini površinskog sloja SlpA i SlpB koji su odgovorni za adheziju na GIT. Kod brojnih BMK prisutni su navedeni površinski proteini iz čega se može zaključiti da je ovakav mehanizam adhezije često prisutan. Još jedna proteinska

struktura igra ulogu u bakterijskoj adheziji, a to su pili (Han i sur., 2021). Pili su kratke i nitaste strukture karakteristične uglavnom za Gram-negativne bakterije. Međutim, strukture slične pilima prisutne su kod rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Te strukture imaju uži promjer od klasičnih pila, a sastoje se i od više podjedinica koje su međusobno povezane kovalentnim vezama. Podjedinice se nazivaju pilini te mogu imati različite uloge od kojih je jedna i adhezija na mukozni sloj (Alp i Kuleasan, 2019; Kankainen i sur., 2009).

Osim proteinskih, kod probiotika su prisutne i neproteinske strukture koje sudjeluju u adheziji na stanice domaćina, a to su teihonične kiseline i egzopolisaharidi. Gram-pozitivne bakterije u svom sastavu imaju teihonične kiseline. To su polimerne molekule građene od glicerol fosfata ili ribitol fosfata međusobno povezanih fosfodieterskim vezama. U stanici teihonične kiseline mogu biti pričvršćene za staničnu stijenkku (engl. *wall teichoic acid*, *WTA*) ili staničnu membranu bakterija (engl. *lipoteichoic acids*, *LTA*), a obje vrste kiselina igraju ulogu u adheziji bakterija na GIT (Wu i sur., 2021).

### 2.3.2. Egzopolisaharidi

Egzopolisaharidi (EPS) su površinske makromolekule koje se sastoje od ugljikohidrata, a mogu biti supstituirani proteinima, DNA molekulama, fosfolipidima te neugljikohidratnim supstituentima poput acetata, glicerola, piruvata, sukcinata, karboksilata i fosfata (Nwodo i sur., 2012). BMK imaju mogućnost proizvodnje EPS-a, a najznačajniji rodovi su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Weissella* sp. Probiotičke bakterije koje proizvode EPS mogu se izolirati iz različitih izvora, od voća, povrća i žitarica sve do mlijeka i mliječnih proizvoda. Neovisno o kojem se izvoru probiotičkih sojeva radi, dobiveni EPS-i bakterijama pružaju brojne prednosti zbog kojih se sve više koriste u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. EPS-i se kao izvanstanične strukture na bakterijama javljaju u dva oblika. Kapsulirani polisaharidi usko su vezani za površinu bakterijskih stanica što bakterije štiti od fagocitoze, isušivanja, osmotskog stresa ili napada od strane bakteriofaga. Drugi oblik čine slojevi sluzi koji su slabije vezani na bakterije te ih je, sukladno tome, lakše i ukloniti (Sanalibaba i Cakmak, 2016; Ruas-Madiedo i de los Reyes-Gavilán, 2005). EPS-i se međusobno razlikuju prema sastavu monosaharida, broju ponovljenih supstituenta i bočnih lanaca te naboju. Ipak, mogu se podijeliti na dvije velike skupine, a to su homopolisaharidi i heteropolisaharidi. Homopolisaharidi mogu biti razgranati i nerazgranati, a



sastoje se od glukoze ili fruktoze te ih se prema tome može kategorizirati kao  $\alpha$ -D-glukane,  $\beta$ -D-glukane, fruktane i poligalatane. Biosinteza homopolisaharida odvija se izvan stanice. Pod djelovanjem enzima saharaze, dolazi do cijepanja supstrata saharoze na glukozu i fruktozu, a zatim se pomoću glikozil transferaza i ribozil transferaza monosaharidne molekule polimeriziraju. Heteropolisaharidi se sastoje od D-glukoze, D-galaktoze, manoze, arabinoze, fukoze, a ponekad i od N-acetilglukozamina, N-acetilgalaktozamina ili glukuronske kiseline. Najčešće se klasificiraju kao kefirani, ksantani i gelani. Biosinteza heteropolisaharida odvija se u citoplazmi bakterijske stanice, a započinje unosom šećera u stanicu. Ovisno o kojem se šećeru radi, transport se može odvijati aktivnim ili pasivnim putem ili pomoću fosfoenolpiruvata. Nakon dobivanja monomernih jedinica, dolazi do djelomične polimerizacije istih te pričvršćivanja na lipidni nosač na membrani. Polimeri se zatim modificiraju raznim enzimskim aktivnostima poput acetilacije, metilacije i sulfatizacije nakon čega se transportiraju van stanice u obliku kapsuliranih polisaharida ili sloja sluzi (Angelin i Kavitha, 2020).

Biološki potencijal EPS-a proizlazi iz kemijske prirode EPS-a, a ona ovisi o vrsti monosaharida, glikozidnim vezama i kemijskim modifikacijama. Primijećeno je da EPS-i proizvedeni od strane probiotika imaju brojne terapijske pogodnosti (tablica 1). Tako su EPS uključeni u antimikrobno djelovanje probiotika, djeluju kao imunomodulatori, kontroliraju i umanjuju upalne procese u organizmu, razgradnjom superoksidnog aniona i vodikovog peroksida doprinose antioksidativnom djelovanju, prepoznata su njihova antikancerogena svojstva u smislu prevencije tumorigeneze i indukcije apoptoze, smanjuju količinu kolesterola, imaju antidijabetičko djelovanje, indirektno su uključeni u zaštitu od virusnih infekcija te smanjuje razine biofilma patogenih bakterija (Hussain i sur., 2017).

**Tablica 1.** Probiotičke bakterije koje proizvode EPS s njihovim izvorima i biološkim svojstvima (prema Angelin i Kavita, 2020)

Probiotičke bakterije	Izvor	Biološka svojstva
<i>Enterococcus faecium</i> WEFA23	Feces zdravog djeteta	Antioksidativno djelovanje i snažna inhibicija protiv adhezije <i>Listeria monocytogenes</i> CMCC54007 na HT-29 staničnoj liniji
<i>Lactobacillus</i> sp. Ca6	GIT autohtone peradi	Antimikrobno djelovanje i osjetljivost na nekoliko antibiotika; aktivnost zacjeljivanja rana EPS-Ca6 procijenjena je uporabom modela ekscizijske rane kod štakora
<i>Lactobacillus gasseri</i> FR4	Domaća piletina	<i>In vitro</i> antioksidans, djeluje antibakterijski protiv patogena unesenih hranom i EPS djeluju protiv biofilma
<i>Lactobacillus gasseri</i> FR4	Kineski Paocai	Imunološka aktivnost, aktivnost čišćenja DPPH/ABTS radikala i produktivan učinak protiv oštećenja DNA
<i>Pediococcus pentosaceus</i> M41	Sušena morska riba	Antimikrobno djelovanje, antioksidativno djelovanje, antitumorsko djelovanje, inhibicija $\alpha$ -amilaze i $\alpha$ -glukozidaze
<i>Pediococcus pentosaceus</i> M41	Pulpa ploda <i>Durio ziberthinus</i>	Antioksidativno djelovanje, smanjuje razinu kolesterola
<i>Bacillus tequilensis</i> FR9	GIT slobodno uzgojenih pilića	Veća antioksidativna vrijednost
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> C70	Devino mlijeko	Antioksidativno i citotoksično djelovanje protiv raka debelog crijeva i raka dojke
<i>Enterococcus faecium</i> (BDU7)	Tradicionalna fermentirana riba Ngari	Jaka sposobnost hvatanja DPPH i superoksidnih radikala ( <i>in vitro</i> )
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> YO175 i OF101	Napitak od fermentiranih žitarica	Antioksidativno djelovanje
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA1)	Feces dojenčadi	Antioksidativno djelovanje suzbijanjem serumskih razina malondialdehida i dušikovog oksida
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Humana vagina	Inhibira proliferaciju tumorskih stanica, inducira apoptozu u HeLa stanicama
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 606	Humani feces	Stanično vezan EPS inhibira proliferaciju HT-29 stanica raka debelog crijeva izravnim utjecajem na morfologiju stanica
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> MTCC9510	Skuta	Antitumorsko i imunomodulatorno djelovanje
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> WLPL04	Humano majčino mlijeko	Inhibira adheziju <i>E. coli</i> O157:H7 na stanice HT-29, protutumorsko djelovanje
<i>Lactobacillus paracasei</i> M7	Humano majčino mlijeko	Antioksidativno i antibiofilmsko djelovanje, snižava razinu kolesterola
<i>Enterococcus faecium</i> MC13	Utroba ribe	<i>In vitro</i> antibiofilmska aktivnost protiv <i>Listeria monocytogenes</i>

**Tablica 1.** Probiotičke bakterije koje proizvode EPS s njihovim izvorima i biološkim svojstvima  
- nastavak (prema Angelin i Kavita, 2020)

<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JLK0142	Fermentirani mliječni tofu	Povećanje sadržaja intestinalnog IgA i citokina IL-2 i TNF- $\alpha$
<i>Leuconostoc citreum</i> L3C1E7	Pico sir	Suzbija sintezu IgE specifičnih za alergene, može ublažiti alergijske simptome posredovane Th2 odgovorom
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> HY	Domaća sečuanska zimmica	Antioksidativno djelovanje i inhibicija djelovanja $\alpha$ -amilaze
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LRCC5310	Kimchi	<i>In vitro</i> antivirusno djelovanje protiv Rota virusa i regulira upalni odgovor
<i>L. plantarum</i> 86, <i>Weissellaconfusa</i> AI10, <i>Pediococcusparvulus</i> AI1, <i>Weissellacibaria</i> 142	Tradicionalna indijska fermentirana hrana	Antibakterijsko djelovanje <i>E. coli</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 70,810	Kineski Paocai	Značajna inhibicija proliferacije HepG-2, BGC-823, posebno HT-29 tumorskih stanica
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> H31	Kiseli kupus	Smanjenje aktivnosti $\alpha$ -amilaze i pojačana ekspresija GLUT-4, AKT-2 i AMPK u HepG2 stanicama otpornim na inzulin
<i>Lactobacillus helveticus</i> LZ-R-5	Tibetanski kefir	<i>In vitro</i> imunomodulatorna aktivnost
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Tradicionalna tuniska fermentirana hrana	EPS inducira ekspresiju gena u imunitetu i antioksidativnim odgovorima kod riba
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	Tradicionalni bugarski jogurt	EPS aktivira NK stanice uz doprinos INF- $\gamma$ , IL-12, IL-18 citokina putem signalizacije vođene MyD88 u miševima
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Tradicionalno kiselo tijesto	Levan pojačava protuupalni citokin IL-4

### 2.3.3. Mehanizam djelovanja probiotika

Različiti su mehanizmi kojima probiotici djeluju na domaćina no ističe se nekoliko glavnih, a to su: kompetitivna ekskluzija patogenih mikroorganizama, jačanje epitelne barijere, modulacija imunološkog sustava te proizvodnja antimikrobnih tvari (slika 2).

#### 2.3.3.1. Kompetitivna ekskluzija patogenih mikroorganizama

Kompetitivna ekskluzija podrazumijeva odnos u kojemu je jedan mikroorganizam superiorniji u odnosu na drugoga te na različite načine inhibira ili potpuno onemogućava njegov rast i razvoj. Mehanizmi kojima se postiže opisani učinak različit je na nivou vrste i često se susreće u GIT-u.

Ondje dolazi do kompeticije između probiotika s patogenim mikroorganizmima za receptore i hranjive tvari. Isto tako neki probiotici dodatno mogu sintetizirati antimikrobne tvari i selektivne metabolite što dovodi do modifikacija u mikrokolištu te on postaje nepogodan za rast patogenih bakterija. Uočeno je da neki probiotički sojevi unutar roda *Lactobacillus* imaju sposobnost inhibirati adheziju patogena poput *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* na intestinalni trakt ljudi i životinja (Bermudez-Brito i sur., 2012).

#### 2.3.3.2. Jačanje epitelne barijere

Poznato je da oslabljena epitelna barijera dovodi do veće fluktuacije mikroorganizama i staničnih metabolita između tkiva domaćina i lumena crijeva. Takva hiperpermeabilna membrana često je glavni uzrok kroničnim upalama kod domaćina. Razni probiotički sojevi mogu na različite načine dovesti do jačanja epitelne barijere. Vršaste stanice neprestano proizvode protein mucin koji je odgovoran za obnavljanje i održavanje mukoznog sloja. Određeni probiotički spojevi imaju sposobnost povećanja ekspresije gena koji su odgovorni za proizvodnju i izlučivanje mucina. Na taj način mukozni sloj zadržava svoj integritet što je osnova za obavljanje protektivne funkcije u GIT-u. Nadalje, neki probiotički sojevi imaju sposobnost štititi tijesne spojeve kojima se međusobno povezuju epitelne stanice, a to čine tako što povećavaju ekspresiju gena koji kodiraju za okludine, kladine i zonulin 1 proteine koji su sastavni dio tijesnih spojeva. Osiguravanjem dovoljnog broja navedenih proteina tijesni spoj ostaje kompaktan. Ostali mehanizmi koji dovode do jačanja epitelne barijere povezani su sa suzbijanjem oksidativnog stresa, otpuštanjem metabolita i bioaktivnih molekula, ometanjem upalnih puteva, te povećanjem ekspresije mukoznog imunoglobulina A (Liu i sur., 2018; Cornick i sur., 2015).

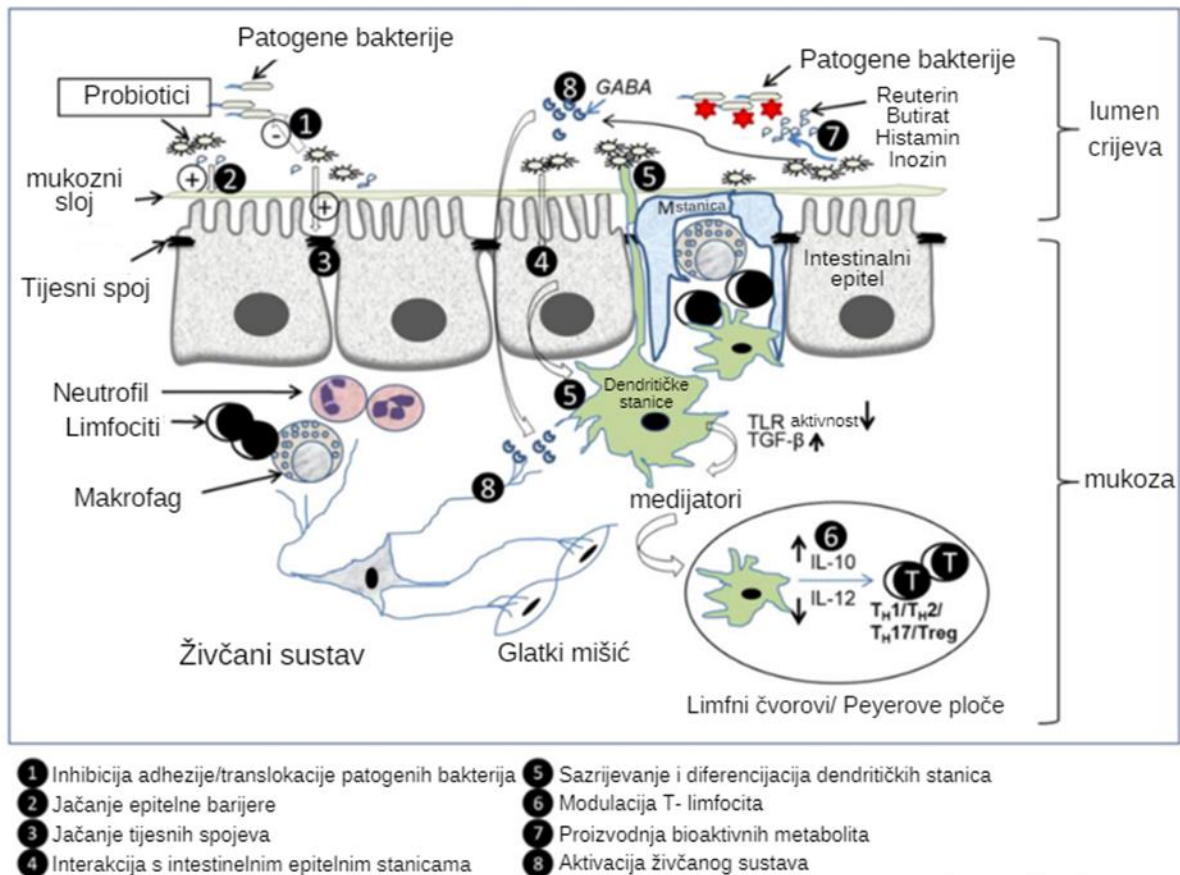
#### 2.3.3.3. Modulacija imunološkog sustava

Probiotički sojevi imaju mogućnost modulacije urođene i stečene imunosti. *Toll-like* receptori eksprimirani su na crijevnim epitelnim stanicama i imunološkim stanicama. Probiotički se sojevi kao ligandi vežu na *Toll-like* receptore, što rezultira aktivacijom raznih signalnih puteva u kojima naposljetku nastaju protuupalni spojevi citokini i kostimulacijske molekule koje potiču na aktivnost druge stanice imunskog sustava. Unutar epitela smještene su i dendritičke stanice, jedne od najpoznatijih antigen prezentirajućih stanica koje mogu aktivirati imunološki sustav na više načina. Kako se na površini dendritičkih stanica također nalaze *Toll-like* receptori, može doći do istog protuupalnog odgovora kao i kod *Toll-like* receptora smještenih na epitelu. Protiv patogena se još mogu boriti i endocitozom, nakon čega se peptidna sekvenca patogena može izložiti na

samoj površini dendritičke stanice. Na isti način probiotički sojevi mogu modulirati dendritičke stanice, a to naposljetku dovodi do diferencijacije naivnih T limfocita u TH1 limfocite (citotoksični T limfociti), TH2 limfocite (pomoćni T limfociti) ili Treg (regulacijski T limfociti). Neki probiotički sojevi mogu aktivirati i B limfocite. Navedena zapažanja sugeriraju na to da probiotički sojevi imaju široku ulogu u održavanju crijevne homeostaze odnosno ravnoteže između tolerancije i reaktivnosti na antigene unesene hranom i komenzalne mikrobiote (Yamane i Paul, 2013; Thomas i Versalovic, 2010).

#### *2.3.3.4. Proizvodnja antimikrobnih tvari*

Probiotici imaju sposobnost proizvodnje raznih bioaktivnih metabolita s protuupalnim svojstvima. Neki od spojeva su aldehid reuterin koji ima širok spektar antimikrobnog djelovanja protiv crijevnih patogena te histamin koji može dovesti do supresije kronične upale crijeva i kolorektalne tumorigeneze. Kako probiotički spojevi imaju sposobnost fermentacije određenih vrsta vlakana, dolazi do nastajanja kratkolančanih masnih kiselina. Osim što doprinose crijevnoj homeostazi snižavanjem lokalnog pH, kratkolančane masne kiseline imaju i antikancerogeno, antioksidativno i protuupalno djelovanje. Posebno se ističe butirat. Kolonocitima butirat služi kao izvor energije, ali on djeluje i kao inhibitor histon deacetilaze što omogućava bolju regulaciju ekspresije gena odgovornih za nastajanje protuupalnih spojeva. Probiotici imaju sposobnost sinteze bakteriocina. To su antimikrobni peptidi koji mogu inhibirati rast i razmnožavanje mnogih bakterija. Mehanizmi kojima to postižu su različiti; mogu inhibirati proizvodnju stanične stijenke, sintezu proteina i nukleinskih kiselina, a stupanjem u interakciju s površinom stanice povećava se permeabilnost iste (Wang i sur., 2021).



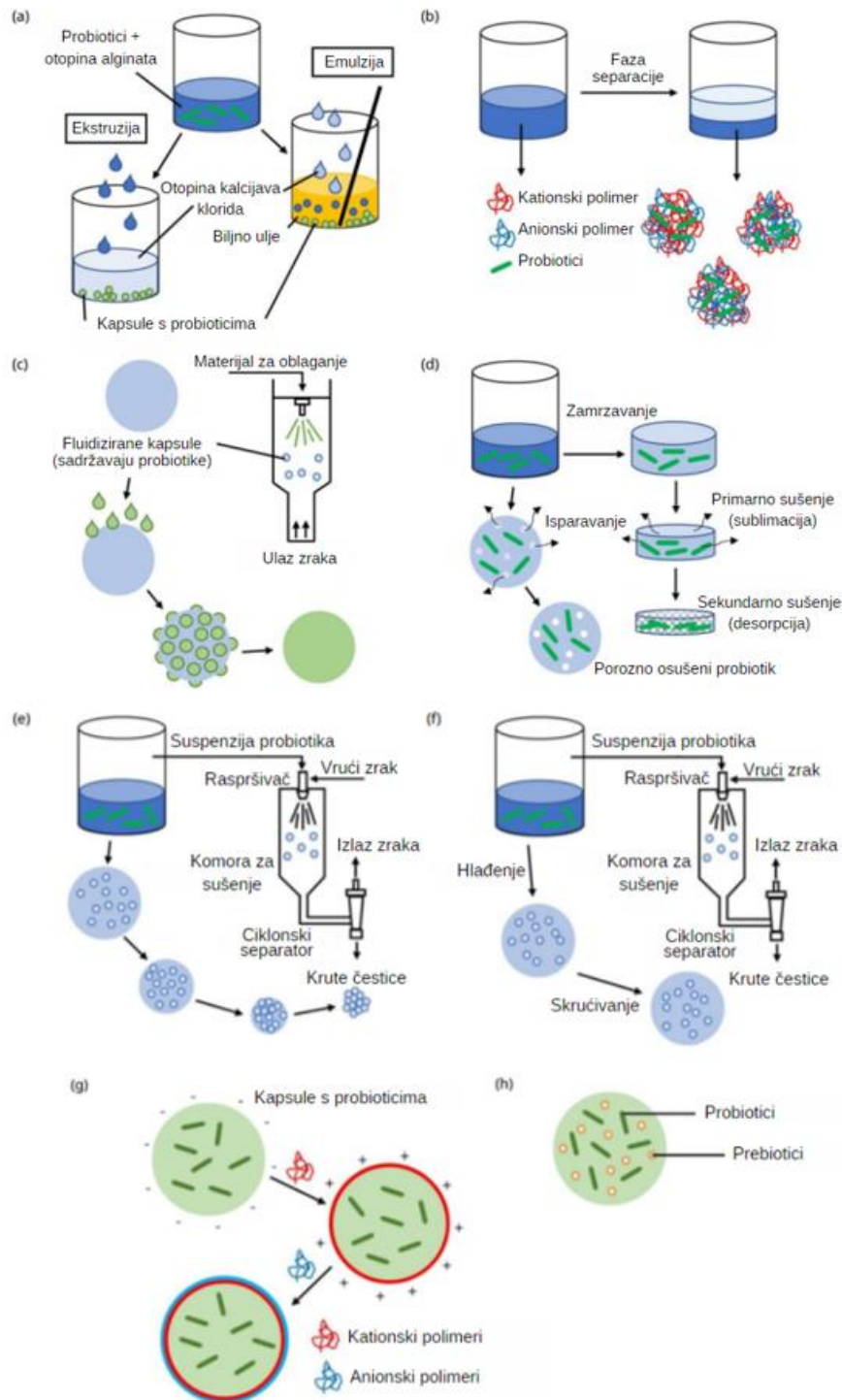
**Slika 2.** Mehanizmi djelovanja probiotika (prema Liu i sur., 2018)

## 2.4. MIKROINKAPSULACIJA PROBIOTIKA

Nakon unosa u tijelo domaćina, probiotici se suočavaju s uvjetima koji nisu povoljni za ostvarivanje njihove funkcije. Osim što ih je potrebno uzeti u dovoljnom broju da bi mogli doći do crijeva, tu su i čimbenici poput niskog pH, žučnih soli, moguća prisutnost kisika, prisutnost antibakterijskih supstanci i mnogi drugi. Kao jedno od rješenja kojim bi se prevladali ovakvi problemi nameće se mikroinkapsulacija. To je tehnologija koja podrazumijeva oblaganje čestica ili kapljica u plinovitom ili tekućem stanju formirajući male kapsule koje mogu otpuštati svoj sadržaj kontroliranim brzinama i/ili pod određenim uvjetima (Shori, 2017; de Araújo Etchepare i sur., 2015; Favaro-Trindade i sur., 2008).

Razne se tehnike koriste za inkapsulaciju probiotika: ionsko i temperaturno geliranje (ekstruzija i emulzija), koacervacija, sušenje raspršivanjem, sušenje zamrzavanjem, oblaganje u fluidiziranom sloju, hlađenje raspršivanjem, tehnika sloj po sloj, unakrsno vezanje, separacija faza, adsorpcija, kovalentno vezanje i koinkapsulacija (slika 3). Ekstruzija, poznata kao i vanjsko ionsko geliranje,

najčešća je tehnika za inkapsulaciju probiotika. Probiotici se prvo suspendiraju u otopini biopolimera, a zatim premještaju u ekstruder odakle se kapaju u otopinu za stvrdnjavanje uz lagano miješanje. Tehnika emulzije predstavlja unutarnje ionsko geliranje. Suspenzija koja sadržava probiotike i polimer dispergira se u biljnom ulju te homogenizira uz prisutnost emulgatora. Slijedi dodavanje sredstva za umrežavanje kako bi se biopolimer, koji je topljiv vodi, učinio netopljivim te očvrstnuo. Koacervacija je metoda u kojoj se početna otopina odvaja na koacervat, fazu bogatu polimerima i medij koacervacije, fazu siromašnu polimerima. Ovisno o tome radi li se o jednostavnoj ili složenoj koacervaciji, razdvajanje faza temelji se na hidrofobnim odnosno ionskim interakcijama. Tehnike sušenja često se koriste za inkapsulaciju probiotika, a razlikuju se sušenje raspršivanjem i sušenje zamrzavanjem kao i dvije modificirane tehnike sušenja: oblaganje u fluidiziranom sloju i hlađenje raspršivanjem. Sušenje raspršivanjem provodi se na način da se raspršuje otopina koja sadrži probiotike i materijal za oblaganje istih u fine kapljice, zatim nastale kapljice isparavaju u struji zagrijanog plina i naposljetku se odvaja i prikuplja nastali osušeni prah. S druge strane, kod sušenja zamrzavanjem (poznatom kao liofilizacija), uzorak probiotika prvo se zamrzava, a potom slijede faza primarnog sušenja (sublimacija) i faza sekundarnog sušenja kako bi se iz uzorka uklonili tragovi vode. Hlađenje raspršivanjem tehnika je slična sušenju raspršivanjem, ali se za raspršivanje koristi hladan zrak pa zapravo dolazi do zgušnjavanja čestica. Sušenje u fluidiziranom sloju tehnika je kod koje se osušeni, prethodno inkapsulirani probiotici, suspendiraju u struji vrućeg zraka, a potom se površine čestica fluidiziraju otopinom biopolimera. Nastala prevlaka od biopolimera skrućuje se u homogeni sloj okružen prethodno inkapsuliranim probioticima. Kako bi bili što učinkovitiji, neki se probiotici inkapsuliraju metodom sloj po sloj gdje je moguće koristiti različite polimere za svaki sloj. Još jedna od metoda inkapsulacije probiotika je koinkapsulacija. Podrazumijeva korištenje sinergijskog učinka dviju ili više bioaktivnih tvari koje pozitivno utječu jedna na drugu. Sve navedene metode imaju svoje prednosti i ograničenja i ovisno o njima odlučuje se koja je metoda najprikladnija (Koh i sur., 2022).



**Slika 3.** Tehnike koje se koriste za inkapsulaciju probiotika: a) ionsko geliranje (ekstruzija i emulzija), b) koacervacija, c) sušenje raspršivanjem, d) sušenje zamrzavanjem, e) oblaganje u fluidiziranom sloju, f) hlađenje raspršivanjem, g) tehnika sloj po sloj i h) koinkapsulacija (prema Koh i sur., 2022)



Što se tiče materijala koji se koriste za inkapsulaciju probiotika, biraju se materijali koji mogu zaštititi probiotike duž GIT-a dok ne dođu do ciljanog mjesta i tek onda otpuštati inkapsulirani sadržaj. Često se za inkapsulaciju probiotika koriste polisaharidi (alginat, agar, kitozan, škrob, celuloza, pektin, maltodekstrin, ksantan, karagenana), proteini (želatina, sirutka, kazein, zein, proteini soje, gluten) i lipidi (prirodni voskovi, biljna ulja, smole, masne kiseline, digliceridi) (Koh i sur., 2022).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu korišten je soj *Limosilactobacillus fermentum* MC1 izoliran iz humanog majčinog mlijeka, a također je korišten i test-mikroorganizam *Escherichia coli* 3014. Navedeni sojevi izolirani su na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, a dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (tablica 2).

**Tablica 2.** Sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su korišteni u ovom radu

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MC1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Escherichia coli</i>	3014	BHI, 37 °C, aerobno

##### 3.1.2. Stanična linija

Caco-2 stanična linija, koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela, korištena je u ovom radu u svrhu proučavanja adhezije BMK te u kompetitivnoj ekskluziji potencijalno patogene *E. coli*. Caco-2 stanice čuvaju se u EMEM mediju (engl. *Eagle's minimal essential medium*) na -80 °C uz dodatak 10 % glicerola koji ima krioprotektivnu ulogu. Caco-2 stanična linija korištena u eksperimentima dio je Zbirke laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (American Type Culture Collection, ATCC HTB-37, SAD)

##### 3.1.3. Hranjive podloge

Za izradu ovog rada korištene su sljedeće podloge:

- a) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj BMK

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
  - MRS bujon („Biolife“, Italija), istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- b) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj bakterije *Escherichia coli*
- BHI (Brain Heart Infusion) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L<sup>-1</sup> 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, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
  - BHI bujon („Biolife“, Italija) istog je sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.
- c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterije *Escherichia coli*
- Rapid *E. coli* 2 agar („Biovit“, Italija) sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): mesni pepton 5; želatin pepton 5; NaCl 5; kvašćev ekstrakt 3; selektivni kromogeni supstrat 6; agar 13.
- d) hranjiva podloga za kultivaciju Caco-2 stanične linije
- Eagle's minimal essential medium (EMEM) s 10 % fetalnog goveđeg seruma (Thermo Fisher Scientific, SAD) za kultivaciju Caco-2 stanične linije.

#### 3.1.4. Kemikalije

- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- fruktooligosaharid (FOS), „Sigma Aldrich“, SAD
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- galaktooligosaharid (GOS), „Biosynth“, Švicarska
- gvanidin hidroklorid (GHCl), „Sigma- Aldrich“, SAD
- kalcijev klorid „Gram mol“, Hrvatska
- led, PBF, Hrvatska
- natrijev alginat, „Fluka“, Švicarska
- natrijev citrat, „Kemika“, Hrvatska

- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijeva lužina, „Kemika“, Hrvatska
- obrano mlijeko, „Sigma Aldrich“, SAD
- pankreatin, „Fluka“, Švicarska
- pepsin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Triton X-100, „AppliChem“, Njemačka
- žučne soli, „Difco“, SAD

### 3.1.5. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igle, „B. Braun“, Njemačka
- kivete za centrifugiranje 15 mL i 50 mL, „Falcon“, Engleska
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefreitrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- magnetna mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- membrana za dijalizu (10-14 kDa), „SERVA Electrophoresis“, Njemačka
- mikrotitarske pločice s 96 i 24 jažice, „Falcon“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- plastične tubice 1,5 mL i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Prazision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za kivete, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za plastične tubice, „NeoLab“, Njemačka

- šprice, „Chirana“, Slovačka
- T-boca 25 cm<sup>3</sup>, „Corning“, SAD
- termostatski blok, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibracijski mješalica EV-100, „Kartell“, Italija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Soj BMK čuvan je na -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % glicerola (v v<sup>-1</sup>). *Escherichia coli* 3014 čuvana je pri istim uvjetima, ali u BHI bujonu. Dan prije izvođenja eksperimenta sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježiju hranjivu podlogu te inkubirani u optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 2.

### 3.2.2. Izolacija egzopolisaharida

Soj MC1 kultiviran je 72 h pri 30 °C u 500 mL MRS bujona suplementiranog s 2 % (w v<sup>-1</sup>) glukoze. Potom je supernatant odvojen od stanica centrifugiranjem 30 min pri 4 °C i 4200 o min<sup>-1</sup>, te je talog stanica tretiran s 1 volumenom 2 M NaOH i ostavljen na magnetskoj mješalici 24 h. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 30 min pri 8000 o min<sup>-1</sup> kako bi se uklonili netopljivi materijali. Izdvojen supernatant je ohlađen na ledu te je provedeno taloženje egzopolisaharida dodatkom 4 volumena hladnog etanola uz miješanje staklenim štapićem. Dobivena suspenzija je inkubirana preko noći pri -20 °C. Nakon inkubacije, egzopolisaharidi su izdvojeni centrifugiranjem 30 min pri 4 °C i 8000 o min<sup>-1</sup>. Talog je resuspendiran u destiliranoj vodi i prebačen u membranu za dijalizu veličine pora 10-14 kDa. Provedena je dijaliza suspenzije EPS-a u destiliranoj vodi tijekom 48 h uz česte izmjene. Nakon dijalize, uzorak je liofiliziran te je masa liofiliziranih EPS-a izvagana na analitičkoj vagi.

### 3.2.3. Ispitivanje utjecaja egzopolisaharida i soja producenta na adheziju na Caco-2 stanice

#### 3.2.3.1. Priprema Caco-2 stanične linije

Caco-2 stanična linija, koja je prethodno čuvana u zamrzivaču s dodatkom 10 % glicerola, odmrznuta je u vodenoj kupelji pri 37 °C. Centrifugiranjem je uklonjen supernatant koji je sadržavao glicerol i ostatke medija. Dobiveni talog stanica ispran je s 1 mL svježeg EMEM medija

prethodno zagrijanog na 37 °C te su stanice naciepljene u Petrijeve zdjelice promjera 5 cm. Nakon 24 h propagacije, Caco-2 stanice su iz Petrijevih zdjelica inokulirane u T-bocu volumena 25 cm<sup>3</sup> te su u njoj održavane na temperaturi od 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub> uz dodatak 10 % (v v<sup>-1</sup>) topline inaktiviranog (56 °C tijekom 30 minuta) fetalnog goveđeg seruma. Medij je mijenjan svakih 48 sati, a stanice su uzgajane do subkonfluentnog stanja. Uslijedilo je ispiranje stanica fosfatnim puferom kako bi se uklonio zaostali medij. Stanice su zatim inkubirane u 1-2 mL 0,25 % (w v<sup>-1</sup>) tripsina pri 37 °C kako bi se odlijepile od podloge. Odljepljivanje stanica prati se pomoću mikroskopa pri čemu se proučava prelazak stanica iz vretenastog u okrugli oblik i pokretanje u smjeru tripsina. Nakon što je utvrđeno da su se stanice odvojile od podloge, tripsin je uklonjen te su stanice resuspendirane u mediju sa serumom. Stanice su izbrojane u Bürker-Türkovoj komorici volumena 10<sup>-4</sup> mL na temelju čega je izračunata koncentracija stanica u uzorku te je pripremljena suspenzija stanica koncentracije 10<sup>5</sup> stanica mL<sup>-1</sup>. U svaku od 24 jažice na mikrotitarskoj pločici dodan je po 1 mL suspenzije stanica. Stanice su zatim inkubirane u mediju uz dodatak seruma na 37 °C i u 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub> tijekom tjedan dana, a medij se mijenjao svaka dva dana. Dan prije provedbe eksperimenta adhezije bakterijskih stanica na Caco-2 stanice, stanice su isprane fosfatnim puferom tri puta.

#### *3.2.3.2. Adhezija na Caco-2 staničnu liniju*

Stanice prekonocne kulture bakterijskog soja čija se sposobnost adhezije na Caco-2 stanice ispituje, prikupljene su centrifugiranjem 5 min pri 4200 o min<sup>-1</sup> i isprane dva puta u fosfatnom puferu (pH = 7,4). Dio tako priređenih suspenzija bakterijskih sojeva je resuspendiran u EMEM mediju, a dio u EMEM mediju uz dodatak 1 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a izoliranih iz sojeva producenata, do postizanja vrijednosti OD<sub>620</sub> = 1 te je broj živih bakterija u priređenim suspenzijama određen indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.9. Potom je u svaku jažicu s Caco-2 stanicama dodano 1 mL priređenih bakterijskih suspenzija te su nakon 1 h inkubacije pri 37 °C, Caco-2 stanice isprane tri puta s fosfatnim puferom kako bi se uklonile neadhezirane bakterije. Caco-2 stanice su zatim lizirane 10 min pri 37 °C u 0,05 % (v v<sup>-1</sup>) otopini Triton X-100, nakon čega je sadržaj jažice centrifugiran kako bi se prikupile adhezirane bakterijske stanice. Talog bakterijskih stanica je resuspendiran u fosfatnom puferu te je broj adheziranih stanica (izražen u CFU mL<sup>-1</sup>) provjeren indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.9. Postotak adhezije je izračunat prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ adhezije} = \left( \frac{\text{CFU/mL adheziranih bakterija}}{\text{CFU/mL dodanih bakterija}} \right) \cdot 100$$

### 3.2.4. Kompetitivna ekskluzija test-mikroorganizma *Escherichia coli* 3014

Prekonoćna kultura odabranog soja BMK, producenata EPS-a, uzgojena anaerobno pri 37 °C u MRS bujonu je centrifugirana pri 4200 o min<sup>-1</sup> tijekom 10 min s ciljem uklanjanja viška hranjive podloge da se spriječi mogući negativni učinak niskih pH vrijednosti ili izvanstaničnih proteina u supernatantu kulture. *Escherichia coli* 3014 uzgojena je preko noći u BHI bujonu pri 37 °C u aerobnim uvjetima i centrifugirana na isti način kao BMK. Biomasa stanica potencijalno patogene bakterije i soja BMK je resuspendirana u fiziološkoj otopini i izmjerena je optička gustoća tako priređene suspenzije pri A<sub>620</sub> u mikrotitarskoj pločici. Talog stanica je zatim resuspendiran u odgovarajućim volumenima EMEM medija do postizanja optičke gustoće OD<sub>620</sub> = 1. Osim samog soja MC1, ispitan je i dodatak EPS-a izoliranih iz soja producenta na kompetitivnu ekskluziju u koncentracijama od 0,5 i 1 mg mL<sup>-1</sup> te samih EPS-a u istim koncentracijama – biomasa stanica resuspendirana je u odgovarajućem volumenu EMEM medija uz dodatak 0,5 i 1 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a, odnosno u jažicu je dodan samo 0,5 i 1 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a resuspendiranih u EMEM mediju.

Caco-2 epitelne stanice, pripremljene prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.1., isprane su 3 puta u fosfatnom puferu (pH = 7,4) te je u jažicu dodano 1 mL suspenzije BMK/EPS-a te su stanice inkubirane 1 h pri 37 °C. Nakon inkubacije, Caco-2 stanice su ispirane fosfatnim puferom te je u jažice dodano po 1 mL suspenzije potencijalno patogenih bakterija i nastavljena je inkubacija pri 37 °C kroz 1 h. Prije dodatka suspenzije bakterijskih stanica na Caco-2 stanice, provjeren je početni broj stanica (CFU mL<sup>-1</sup>) u suspenziji indirektnom metodom (poglavlje 3.2.9.). Jažice su nakon inkubacije isprane 3 puta s 1 mL PBS-a kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu adhezirale te su inkubirane 10 min u 0,05 % (v v<sup>-1</sup>) u otopini Triton X-100 kako bi se Caco-2 stanice odlijepile od podloge, a zajedno s njima i na njih adhezirane stanice. Sadržaj svake jažice je prebačen u epicu i centrifugiran 5 min pri 13000 o min<sup>-1</sup>. Potom je talog stanica resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera, a broj adheziranih stanica je određen indirektnom metodom prema postupku opisanom u 3.2.9.

### 3.2.5. Mikroinkapsulacija soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u alginatu

Prekonoćna kultura soja *L. fermentum* MC1 uzgojena je propagacijom do 300 mL MRS bujona pri 37 °C u anaerobnim uvjetima. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o min<sup>-1</sup>, a zatim isprane

dva puta s 15 mL fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.9., resuspendiran u istom volumenu 2 %-tne ( $w v^{-1}$ ) otopine natrijeva alginata. Smjesa bakterijskih stanica i alginata je, pomoću šprice i igle, postepeno ispuštena u 1 %-tnu otopinu kalcijeva klorida uz miješanje na magnetnoj mješalici, prilikom čega dolazi do formiranja mikrokapsula. Kuglice su ostavljene 1 sat na magnetskoj mješalici da očvrstu, nakon čega je uslijedilo ispiranje dva puta s fiziološkom otopinom i određivanje broja mikroinkapsuliranih stanica nakon oslobađanja iz mikrokapsula pomoću 2 %-tnog ( $w v^{-1}$ ) Na-citrata. Broj stanica je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.9.

Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (engl. *Encapsulation Yield, EY*), odnosno broj živih stanica prije i poslije mikroinkapsulacije izračunat je prema dolje navedenoj formuli, gdje je  $N$  broj živih mikroinkapsuliranih stanica, a  $N_0$  broj slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks (alginat):

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

3.2.6. Mikroinkapsulacija soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u alginatu uz dodatak fruktooligosaharida i galaktooligosaharida kao prebiotika

U svrhu što duljeg preživljavanja mikroinkapsuliranog soja *L. fermentum* MC1, mikroinkapsulacija stanica u 2 %-tnom alginatu provedena je na način kako je opisano u poglavlju 3.2.5., ali uz dodatak prebiotičkih supstrata fruktooligosaharida (FOS) i galaktooligosaharida (GOS) u konačnoj koncentraciji od 5 % ( $w v^{-1}$ ). Kao kontrola je korišten mikroinkapsulirani soj MC1 u koji nije dodan niti jedan od navedenih prebiotika.

Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije ( $EY$ ) uz dodatak prebiotika izračunat je prema formuli navedenoj u poglavlju 3.2.5.

3.2.7. Ispitivanje preživljavanja mikroinkapsuliranog soja MC1 tijekom liofilizacije te nakon 2 mjeseca skladištenja

Kako bi se ispitala uloga mikrokapsulacije soja MC1 u alginatu, alginatu uz dodatak FOS-a te alginatu uz dodatak GOS-a u preživljavanju procesa liofilizacije, 1 gram mikroinkapsuliranih stanica soja MC1 je odvagano u penicilinke te je dodano obrano mlijeko koji služi kao lioprotektor. Uzorci su zatim zamrznuti na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i liofilizirani. Liofilizirane mikrokapsule su tretirane s 2 %-



tnim ( $w v^{-1}$ ) natrijevim citratom kako bi se oslobodile stanice, a broj živih stanica nakon liofilizacije je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.9.

Broj živih stanica nakon liofilizacije te nakon 2 mjeseca skladištenja određen je indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.9., s prethodnim otpuštanjem stanica iz mikrokapsula dodatkom 2 %-tnog ( $w v^{-1}$ ) natrijevog citrata.

3.2.8. Preživljavanje mikroinkapsuliranog soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

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

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

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina ( $1 g L^{-1}$ ) i žučnih soli ( $3,0 mg mL^{-1}$  goveđe žuči) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

#### 3.2.8.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje mikroinkapsuliranog soja *L. fermentum* MC1

Uzorci soja MC1 mikroinkapsulirani i liofilizirani prema postupcima opisanim u poglavljima 3.2.5., 3.2.6. i 3.2.7., tretirani su s 3 mL simuliranog želučanog soka kroz 2 h na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 5 min pri  $4200 o min^{-1}$ , a talog je resuspendiran u 3 mL fiziološke otopine. Nakon toga, dio suspenzije je uzet za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u želučanom soku, dok je ostatak suspenzije centrifugiran 5 min pri  $4200 o min^{-1}$ . Talog je resuspendiran u 3 mL simuliranog soka tankog crijeva te inkubiran pri 37 °C tijekom 4 sata, nakon čega je dio suspenzije korišten za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u tankom crijevu. Broj stanica je određen indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.9., s tremanom mikrokapsula s 2 %-tnim ( $w v^{-1}$ ) natrijevim citratom.

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

Broj živih bakterija određen je indirektnom metodom tako da su priređena decimalna razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u sterilnoj fiziološkoj otopini naciepljena na odgovarajuće selektivne hranjive podloge u obliku kapi ( $10 \mu L$ ) u dvije paralele. Nakon 48 h inkubacije (aerobne za *E. coli* 3014, anaerobne za BMK) pri 37 °C, izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica (engl. *colony-forming units*, CFU) po mililitru uzorka. Za određivanje broja poraslih bakterijskih stanica soja BMK korišten je MRS agar, dok je za

određivanje broja poraslih bakterijskih stanica potencijalno patogene bakterije *Escherichia coli* 3014 korištena selektivna podloga Rapid agar.

#### 3.2.10. Obrada rezultata

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

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA TEST-MIKROORGANIZMA *Escherichia coli* 3014

Gastrointestinalni trakt nastanjuje složena i dinamična populacija koja je podložna selektivnom pritisku koji dolazi od samog domaćina kao i iz okoliša. Prilagodba na teške uvjete GIT-a omogućuje probioticima bolju kolonizaciju sustava, a samim time i prednosti pred patogenim organizmima. Jedan od najčešćih patogena koji se u organizam unosi hranom i pri tome može izazvati razne gastrointestinalne bolesti je *E. coli*. Probiotici se s patogenim organizmima natječu za receptore u epitelnom i subepitelnom tkivu. Mnogi mikroorganizmi koji pripadaju rodu *Lactobacillus* imaju mogućnost sinteze EPS-a koji im omogućuju bolju interakciju s drugim mikroorganizmima kao i s epitelnim stanicama domaćina. Posredni doprinos adhezivnim svojstvima kroz elektrostatske i hidrofobne sile, omogućava bakterijama iz roda *Lactobacillus* prednost nad patogenim mikroorganizmima (Živković i sur., 2016).

U ovom je radu ispitano antimikrobno djelovanje probiotičkog soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1, koji ima mogućnost sinteze EPS-a prema bakteriji *E. coli* 3014. Uz to, ispitalo se antimikrobno djelovanje MC1 soja kojemu su dodane različite koncentracije EPS-a kao i antimikrobno djelovanje isključivo EPS-a u različitim koncentracijama, ali bez probiotičkog soja. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 4 i 5.

Na slici 4 prikazani su rezultati kompetitivne ekskluzije potencijalno patogene *E. coli* 3014 s MC1 sojem i MC1 sojem kojem je dodano 0,5 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a odnosno 1 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a. Rezultati su prikazani kao usporedba adhezije *E. coli* 3014 na Caco-2 stanice bez dodatka soja MC1 i adhezije *E. coli* nakon što je Caco-2 stanična linija predinkubirana s MC1 sojem. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je do najvećeg smanjenja adhezije *E. coli* 3014 na Caco-2 stanice došlo u slučaju kada su Caco-2 stanice bile predinkubirane s MC1 sojem u kojega je dodan 1 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a. Caco-2 stanice predinkubirane sa sojem MC1 također su dovele do smanjenja adhezije bakterije *E. coli* dok je predinkubacija sojem MC1 s dodanom koncentracijom od 0,5 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a dovela do blagog povećanja adhezije *E. coli*.

Soj *L. fermentum* MC1 prema *E. coli* pokazuje inhibicijski efekt što je u skladu s istraživanjima koje su proveli de Albuquerque i suradnici (2018). Od ukupno devet ispitivanih bakterijskih sojeva, njih čak sedam bili su različiti *L. fermentum* sojevi. Svi su sojevi okarakterizirani kao

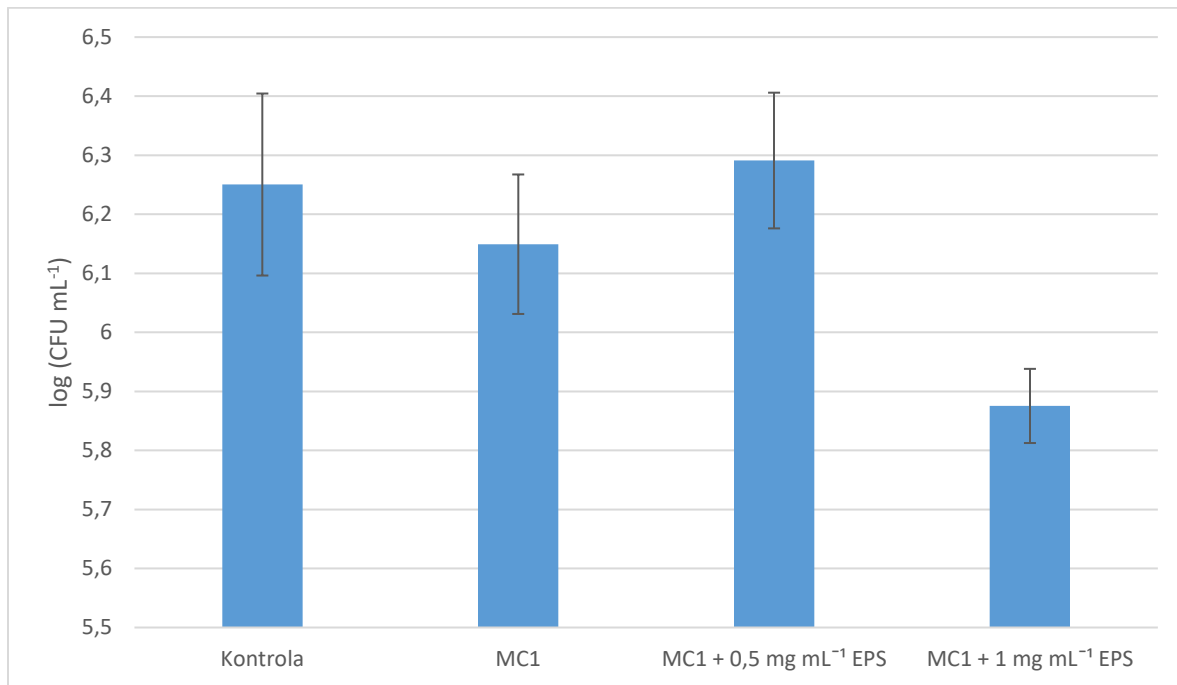
proizvođači EPS-a i proizvode ga u rasponu od 43 do 58 mg mL<sup>-1</sup>, ovisno o soju. Struktura EPS-a može pospešiti interakcije između probiotika i specifičnih receptora domaćina kao i štititi probiotik od stresnih uvjeta GIT-a. Tako su svi *L. fermentum* sojevi pokazali veliku sposobnost koagregacije s bakterijom *E. coli* što ukazuje na njihov potencijal sprječavanja kolonizacije kao i natjecanje kroz razne antagonističke interakcije sa spomenutom bakterijom. Osim prema *E. coli*, sojevi su inhibicijska svojstva pokazali i prema bakterijama: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *S. enterica serovar Entertidis* i *Listeria monocytogenes*. Inhibiciju rasta *E. coli* u prisustvu *L. fermentum* AI2 dokazali su Shah i sur. (2016) navodeći da je došlo do značajnog smanjenja rasta patogena (2-3 logaritamska ciklusa). Nadalje, Živković i suradnici (2016) navode da, iako i EPS-i i soj *L. paracasei* koji proizvodi EPS-e dovode do smanjene adhezije *E. coli* na Caco-2 staničnu liniju, ipak snažnije djelovanje imaju probiotički sojevi koji su proizvođači EPS-a.

Na slici 5 prikazan je utjecaj EPS-a na adheziju bakterije *E. coli* na Caco-2 staničnu liniju. Rezultati su prikazani kao usporedba adhezije *E. coli* 3014 na Caco-2 stanice bez dodatka EPS-a i adhezije *E. coli* nakon što je Caco-2 stanična linija tretirana s koncentracijom 0,5 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a odnosno 1 mg mL<sup>-1</sup> EPS-a. Dodavanje EPS-a u koncentraciji od 0,5 mg mL<sup>-1</sup> dovela je do tek blagog smanjenja inhibicije adhezije *E. coli* dok su dodani EPS-i u koncentraciji od 1 mg mL<sup>-1</sup> doveli do zamjetne razlike u adheziji.

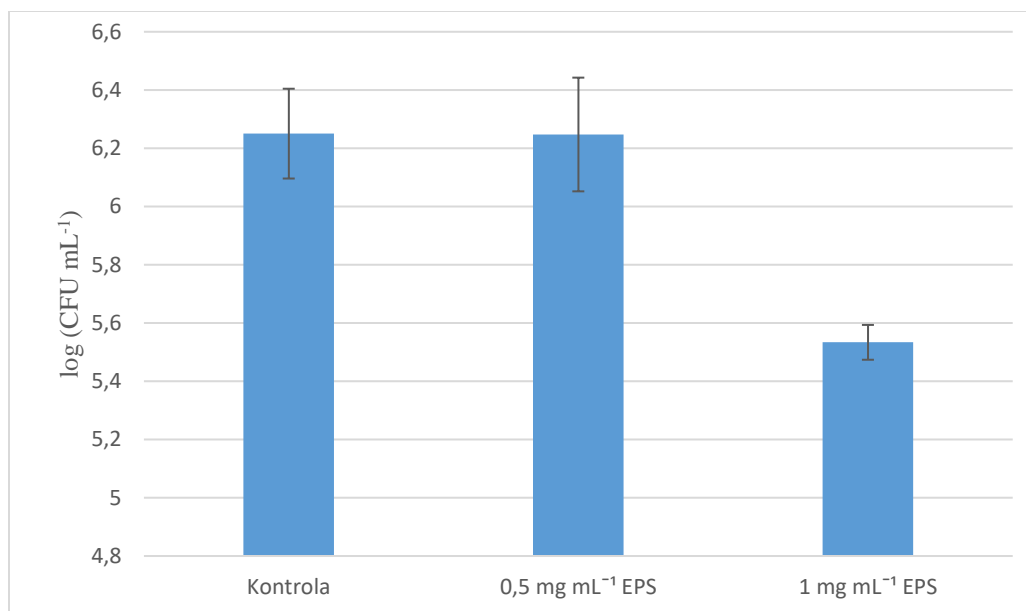
Egzopolisaharidi izolirani iz probiotičkih sojeva mogu utjecati na kolonizaciju patogena u GIT-u. Garcia-Castillo i suradnici (2020) izolirali su EPS-e iz soja *L. fermentum* UCO-979C i testirali su adheziju bakterije *Helicobacter pylori* na epitelne stanice ljudskog želučanog adenokarcinoma (AGS) uz predinkubaciju sa spomenutim EPS-ima. Predinkubacija s EPS-ima dovela je do značajnog smanjenja adhezije *H. pylori* (oko 30 %). Iako je to istraživanje bilo konkretno usmjereno na AGS staničnu liniju, nekoliko godina ranije Salas-Jaraa i suradnici (2016) istraživali su utjecaj istoga soja i na Caco-2 staničnu liniju jer bakterija *H. pylori* može utjecati i na početni dio crijeva. *L. fermentum* UCO-979C u velikoj je mjeri inhibirao adheziju *H. pylori* na Caco-2 staničnu liniju. Iako mehanizam inhibicije adhezije nije potpuno jasan, znanstvenici navode kako bi za njega mogli biti odgovorni upravo EPS-i koje soj proizvodi.

Kako je soj *L. plantarum* WLPL04 pokazao značajnu inhibiciju adhezije *E. coli* na HT-29 staničnoj liniji, Liu i suradnici (2017) izolirali su EPS-e koje ovaj soj sintetizira te testirali njihova svojstva inhibicije iste bakterije. Izolirani EPS-i dovode do inhibicije adhezije *E. coli* u slučaju

kada je HT-29 stanična linija predinkubira s EPS-ima, ali i u slučaju kada se *E. coli* i EPS-i dodaju istovremeno u staničnu liniju. Ono što valja napomenuti je da stupanj inhibicije ovisi o koncentraciji dodanih EPS-a. Tako je povećanje koncentracije EPS-a s  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$  na  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  dovelo do povećanja stope inhibicije adhezije s  $20,24 \pm 2,23 \%$  na  $29,71 \pm 1,21 \%$ .



**Slika 4.** Kompetitivna ekskluzija bakterije *Escherichia coli* 3014 sa sojem MC1 te sa sojem MC1 kojemu su dodane različite koncentracije EPS-a ( $0,5$  i  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ )  
Kontrola - bakterija *E. coli* 3014 bez predinkubacije Caco-2 stanica s MC1 sojem



**Slika 5.** Utjecaj različitih koncentracija EPS-a na adheziju *E. coli* 3014 na Caco-2 stanice  
Kontrola - bakterija *E. coli* 3014 bez dodatka EPS-a

#### **4.2. MIKROINKAPSULACIJA SOJA *Limosilactobacillus fermentum* MC1 U ALGINATU UZ DODATAK FRUKTOOLIGOSAHARIDA I GALAKTOLIGOSAHARIDA KAO PREBIOTIKA**

Potrošnja probiotika u stalnom je porastu zbog brojnih dobrobiti za zdravlje domaćina. Kako bi se probiotici što bolje zaštitili od nepovoljnih uvjeta duž gastrointestinalnog trakta i kako bi u dovoljnom broju stigli do ciljnih organa, koriste se razne tehnike inkapsulacije. Ismail i Nampoothiri (2010) u svom su istraživanju zaključili da soj *Lactiplantibacillus plantarum* u mikroinkapsuliranom obliku sintetizira veću količinu EPS-a nego u slobodnom obliku. Zbog brojnih prednosti koje EPS-i osiguravaju probiotičkim sojevima, cilj je pronaći odgovarajuću tehniku mikroinkapsulacije koja će najbolje zaštititi EPS-e i omogućiti ispoljavanje njihovih funkcija u GIT-u domaćina.

Jedan od najčešće korištenih polimera za inkapsulaciju je natrijev alginat. Razlog tomu je što je ovaj polimer netoksičan, biorazgradiv, a kompatibilan s gotovo svim tehnikama koje se koriste za inkapsulaciju probiotika. Korištenje natrijevog alginata u velikoj mjeri čuva potrebnu koncentraciju i stabilnost probiotika u vremenu skladištenja i prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Niska cijena polimera, kao i jednostavno korištenje, samo su dodatni benefiti koji omogućuju

široku primjenu.

U ovom se radu za mikroinkapsulaciju soja MC1 koristila tehnika vanjskog ionskog geliranja to jest ekstruzija. Suspenzija soja MC1 i natrijevog alginata kapana je pomoću igle u otopinu kalcijevog klorida. Kalcijevi kationi migriraju do alginata gdje stupaju u interakciju s karboksilnim skupinama zbog elektrostatskog privlačenja i dolazi do umrežavanja to jest stvaranja kompaktnih kuglica (slika 6) (Haldar i Chakraborty, 2019; de Araújo i sur., 2015).



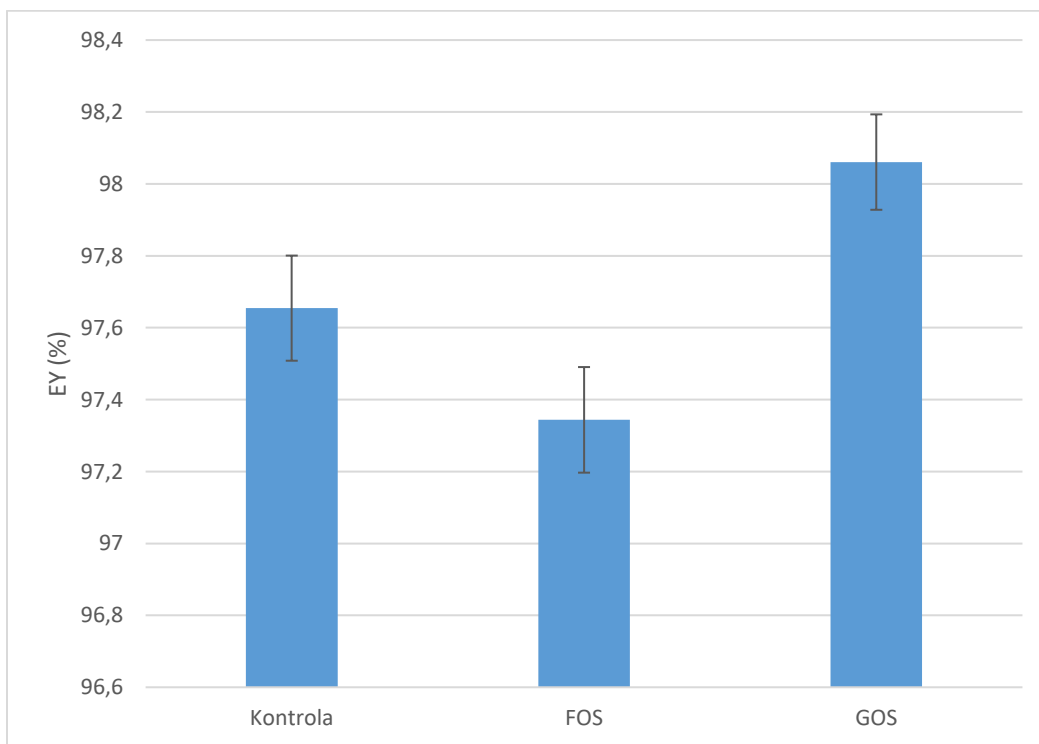
**Slika 6.** Mikroinkapsulirani soj *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u alginatu (vlastita fotografija)

Ponekad inkapsulacija ne osigurava potpunu održivost probiotika pa se zajedno s njima inkapsuliraju i prebiotici. Prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane koji stimuliraju preživljavanje i implantaciju probiotika u gastrointestinalnom traktu (Šušković i sur., 1998).

Kao prebiotički supstrati u ovom su radu korišteni FOS i GOS. FOS se dobiva djelomičnom hidrolizom inulina ili transglikozilacijom saharoze posredovanom  $\beta$ -fruktofuranozidazama iz bakterija ili funga. GOS se proizvodi iz laktoze djelovanjem  $\beta$ -D-galaktozidaze uz transgalaktozilaciju (Li i sur., 2015). Na slici 7 prikazani su rezultati provedenog procesa mikroinkapsulacije *L. fermentum* MC1 soja u alginatu uz dodatak FOS-a odnosno GOS-a. Kontrolu je bio MC1 soj bez dodatka prebiotika. Rezultati su prikazani kao usporedba učinkovitosti mikroinkapsulacije (EY) triju spomenutih uzoraka dijeljenjem logaritamskih

vrijednosti broja živih mikroinkapsuliranih stanica (N) i broja slobodnih stanica dodanih u alginat ( $N_0$ ), a izraženi su kao postotak. Iz rezultata je vidljivo da je učinkovitost mikroinkapsulacije najveća kod uzorka kojemu je dodan GOS kao prebiotik i iznosi  $98,06 \pm 0,13$  %. Učinkovitost mikroinkapsulacije za kontrolni uzorak iznosi  $97,65 \pm 0,15$  % dok je najlošiji rezultat dao uzorak u kojega je kao prebiotik dodan FOS i iznosio je  $97,34 \pm 0,15$  %.

Dobiveni rezultati nisu u skladu s rezultatima koje su u svom istraživanju objavili Liao i suradnici (2019). Ispitivanjem utjecaja mikroinkapsulacije soja *L. fermentum* L7 u alginatu uz dodatak FOS-a i GOS-a zaključili su kako su dodani prebiotici značajno povećali učinkovitost mikroinkapsulacije dok je kontrolni uzorak dao lošije rezultate. Iako su uzorci u koje su dodani prebiotici dali puno bolje rezultate nego kontrolni uzorak, svi dobiveni rezultati generalno su pokazali lošiju učinkovitost od mikroinkapsulacije MC1 soja. Nadalje, Liu i suradnici (2022) su objavili kako i FOS i GOS dovode do povećanja broja živih stanica soja *L. fermentum* DALI02 i navode kako je iskorištavanje prebiotika specifično na razini soja. To bi mogao biti razlog nepodudarnosti rezultata koje je dao MC1 soj u usporedbi s ostalim sojevima.



**Slika 7.** Usporedba učinkovitosti mikroinkapsulacije stanica *L. fermentum* MC1 u alginatu uz dodatak FOS-a i GOS-a kao prebiotika i kontrole

Kontrola - mikroinkapsulirani soj MC1 u alginatu bez dodatka prebiotika; FOS - mikroinkapsulirano soj MC1 u alginatu uz dodatak FOS-a; GOS - mikroinkapsulirani soj MC1 u alginatu uz dodatak GOS-a

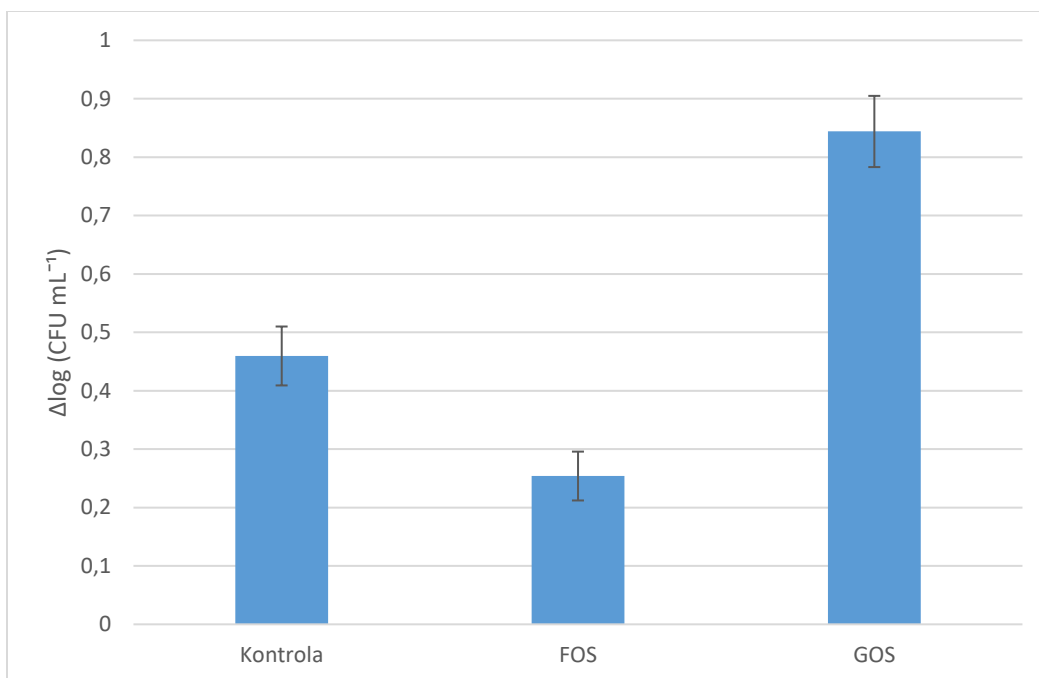


### **4.3. ISPITIVANJE PREŽIVLJAVANJA MIKROINKAPSULIRANOG SOJA *Limosilactobacillus fermentum* MC1 TIJEKOM LIOFILIZACIJE**

Sušenje smrzavanjem odnosno liofilizacija jedna je od najčešće korištenih metoda kada se nastoje očuvati broj i funkcija bakterija mliječne kiseline. Kako su probiotici termosenzibilni mikroorganizmi, prilikom liofilizacije dodaju se krioprotektori koji inhibiraju brzu dehidraciju stanica, a time i potencijalna oštećenja stanica i staničnu smrt (Koh i sur., 2022).

U ovom radu je soj *L. fermentum* MC1, mikroinkapsuliran u alginatu, podvrgnut liofilizaciji kao i druga dva uzorka mikroinkapsuliranog MC1 soja u koje su dodani FOS i GOS. Rezultati su prikazani na slici 8 i izraženi su kao razlika logaritamskih vrijednosti koncentracija živih stanica prije i nakon procesa liofilizacije [ $\Delta \log(\text{CFU g}^{-1})$ ] i kao takvi prikazuju preživljavanje MC1 soja. Iz rezultata je vidljivo da dodatak FOS-a doprinosi povećanom preživljavanju mikroinkapsuliranog MC1 soja u procesu liofilizacije. S druge pak strane, uzorak kojemu je kao prebiotik dodan GOS dao je lošije rezultate preživljavanja liofilizacije nego kontrolni uzorak.

Uspoređujući dobivene rezultate s istraživanjem koje su proveli Huang i suradnici (2019) može se primjetiti pozitivna korelacija za liofilizirane uzorke u koje je dodan FOS. Sojevi *L. helveticus* MB2-1 i *S. thermophilus* MB5-1 u koje je dodan FOS, nakon liofilizacije su pokazali visok postotak zadržavanja bakterijske vijabilnosti. Dodatak GOS-a spomenutim sojevima također je osigurao zaštitu tijekom liofilizacije, ali slabiju nego FOS. Međutim, u ovom je istraživanju dodatak GOS-a doveo do boljih rezultata nego u kontrolnom uzorku što sa sojem MC1 nije bio slučaj. Isto tako, Tymczynszyn i suradnici (2012) navode kako dodatak GOS-a štiti *L. bulgaricus* tijekom liofilizacije i dovodi do veće vijabilnosti bakterijskih stanica.



**Slika 8.** Usporedba smrtnosti mikroinkapsuliranog probiotičkog soja *L. fermentum* MC1 uz dodatak FOS-a i GOS-a, nakon procesa liofilizacije

Kontrola - mikroinkapsulirani i liofilizirani soj MC1 bez dodatka prebiotika; FOS - mikroinkapsulirani i liofilizirani soj MC1 uz dodatak FOS-a; GOS - mikroinkapsulirani i liofilizirani soj MC1 uz dodatak GOS-a

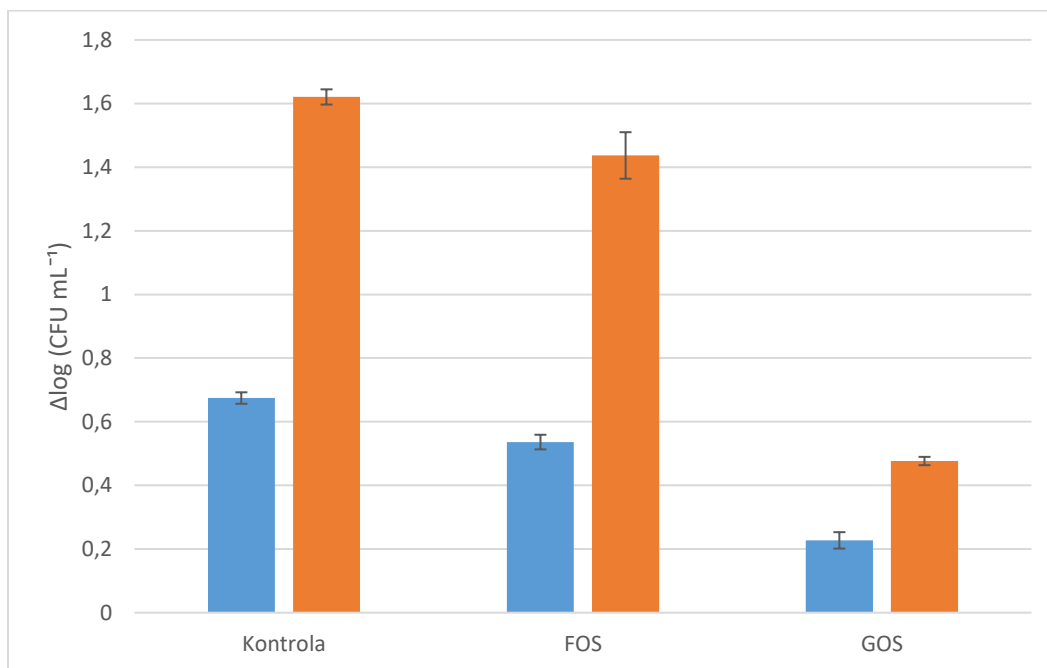
#### **4.4. PREŽIVLJAVANJE MIKROINKAPSULIRANOG SOJA *Limosilactobacillus fermentum* MC1 U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA**

Mikrookoliš želuca predstavlja kritičnu točku za preživljavanje probiotičkih sojeva. Ukoliko probiotičke bakterije uspiju preživjeti nepovoljne uvjete u odgovarajućem broju, najčešće s njihovim preživljavanjem i iskazivanjem brojnih blagotvornih funkcija u crijevima (gdje se i odvija glavina probave) nema problema.

Na slici 9 prikazani su rezultati utjecaja simuliranih uvjeta želučanog soka i simuliranih uvjeta želučanoga soka i soka tankog crijeva na soj *L. fermentum* MC1. Kao kontrola koristio se *L. fermentum* mikroinkapsuliran u alginatu, a istim su uvjetima izloženi uzorci *L. fermentum* mikroinkapsulirani u alginatu uz dodatak FOS-a i GOS-a kao prebiotika. Rezultati su prikazani kao razlika logaritamskih vrijednosti koncentracija živih stanica prije i nakon izlaganja uzoraka simuliranim uvjetima želučanog soka odnosno simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog

crijeva. Iz rezultata je vidljivo da su uzorci u koje su dodani prebiotici pokazali bolje preživljavanje soja MC1 nego kontrolni soj, bilo da se radi o simuliranim uvjetima želučanog soka ili simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva. Oba prebiotika osiguravaju probiotičkom soju preživljavanje iznad  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> što je i više nego dovoljno za ostvarivanje probiotičkih svojstava. Uspoređujući rezultate uzoraka u koje su dodani FOS i GOS, može se zaključiti da je sposobnost preživljavanja mikroinkapsuliranog MC1 soja bolja u slučaju dodatka GOS-a. Takvo zapažanje vrijedi za uvjete kada su uzorci izloženi simuliranim uvjetima želučanog soka kao i simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva.

Dobiveni rezultati djelomično se slažu s rezultatima koje su objavili Liao i suradnici (2019). Kod soja *L. fermentum* L7 kojega su koristili u istraživanju, također je primjećeno značajno povećanje preživljavanja probiotičkog soja uz dodatak dvaju prebiotika za razliku od kontrole. Razlika u rezultatima je jedino ta što soj L7 u simuliranim uvjetima želučanog soka daje bolje preživljavanje uz dodatak FOS-a.



**Slika 9.** Usporedba smrtnosti mikroinkapsuliranog probiotičkog soja MC1 uz dodatak FOS-a i GOS-a u simuliranim uvjetima želučanog soka (■) i simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva (■)

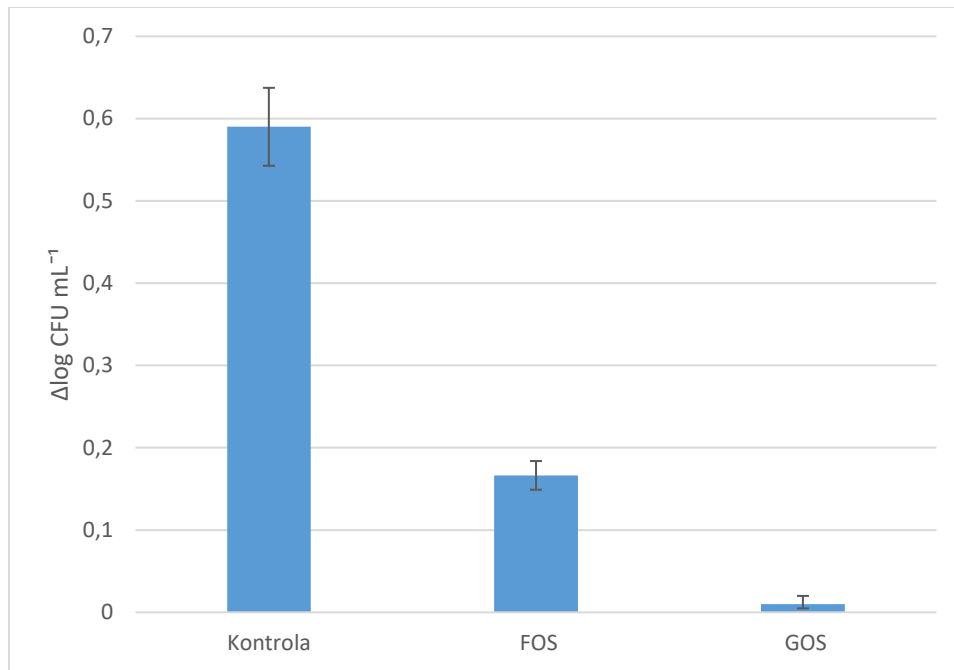
Kontrola - mikroinkapsuliran i liofiliziran soj MC1 bez dodatka prebiotika; FOS - mikroinkapsuliran i liofiliziran soj MC1 uz dodatak FOS-a; GOS - mikroinkapsuliran i liofiliziran soj MC1 uz dodatak GOS-a

#### **4.5. ISPITIVANJE PREŽIVLJAVANJA MIKROINKAPSULIRANOG SOJA**

##### ***Limosilactobacillus fermentum* MC1 TIJEKOM 2 MJESECA SKLADIŠTENJA**

Osim problema s kojim se probiotički sojevi susreću u GIT-u, dovodi se u pitanje njihova postojanost tijekom vremena skladištenja. U ovom se istraživanju pratilo i preživljavanje MC1 soja nakon perioda od 2 mjeseca. Na slici 10 prikazani su rezultati preživljavanja bakterijskih stanica nakon 2 mjeseca. Rezultati su prikazni kao razlika logaritamskih vrijednosti koncentracija živih stanica odmah nakon liofilizacije i 2 mjeseca nakon liofilizacije. Kao kontrola korišten je MC1 probiotički soj bez dodanih prebiotika. Iz rezultata se može očitati kako su uzorci probiotičkog soja MC1 u koje su dodani FOS i GOS doveli do zamjetnog preživljavanja stanica u odnosu na kontrolni uzorak. Isto tako mikroinkapsulacija uz dodatak GOS-a i u ovom se slučaju pokazala prikladnijom za *L. fermentum* MC1.

Pozitivno djelovanje oligosaharida na preživljavanje bakterija iz roda *Lactobacillus* objavili su i drugi znanstvenici (Liu i sur., 2022; Mafaldo i sur., 2022; Liao i sur., 2019). Važno je napomenuti da tijekom dužeg vremenskog perioda skladištenja probiotičkih sojeva dolazi do blagog pada broja stanica, ali je taj broj i dalje dovoljan za preživljavanje u GIT-u i ostvarivanje blagotvornih učinaka za zdravlje domaćina. Kao moguće rješenje za još bolje očuvanje visokog broja stanica tijekom mikroinkapsulacije i liofilizacije, Liao i suradnici (2019) predlažu dodavanje kitozana u natrijev alginat jer bi se tako smanjile pore u matriksu i spriječilo istjecanje stanica iz mikrokapsula.



**Slika 10.** Usporedba smrtnosti probiotičkog soja *L. fermentum* MC1 uz dodatak FOS-a i GOS-a nakon liofilizacije i 2 mjeseca skladištenja

Kontrola – Mikroinkapsuliran i liofiliziran soj MC1 bez dodatka prebiotika; FOS – mikroinkapsuliran i liofiliziran soj MC1 uz dodatak FOS-a; GOS – mikroinkapsuliran i liofiliziran soj MC1 uz dodatak GOS-a

## 5. ZAKLJUČCI

1. Egzopolisaharidi koje proizvodi soj *Limosilactobacillus fermentum* MC1 poboljšavaju adhezijska svojstva soja te je dokazana kompetitivna ekskluzija bakterije *E. coli* 3014. Veća koncentracija egzopolisaharida dovodi do snažnije inhibicije adhezijskih sposobnosti *E. coli*.
2. Mikroinkapsulacija u natrijevom alginatu i liofilizacija pokazale su se kao dobre tehnike za očuvanje vijabilnosti probiotičkog soja *L. fermentum* MC1. Korištenje ovih tehnika značajno olakšava preživljavanje soja *L. fermentum* MC1 u simuliranim uvjetima gastrointestinalog trakta kao i veću stabilnost tijekom skladištenja.
3. Dodatak oligosaharida (fruktooligosaharida i galaktooligosaharida) dodatno doprinosi očuvanju vijabilnosti probiotičkog soja *L. fermentum* MC1, a galaktooligosaharidi su se pokazali kao bolja opcija od fruktooligosaharida za ovaj soj.

## 6. LITERATURA

- Alp D, Kuleaşan H (2019) Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World J Microb Biot* **35**, 156. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2730-x>
- Angelin J, Kavitha M (2020) Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *Int J Biol Macromol* **162**, 853-865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>
- Axelsson L, von Wright (2012) Lactic acid Bacteria: An Introduction. U: Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A (ured.) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 4 izd., Taylor & Francis Group, New York, str. 1-16.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A (2012) Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* **61**, 160-174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Biedermann L, Rogler G (2015) The intestinal microbiota: its role in health and disease. *Eur J Pediatr* **174**, 151-167. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2476-2>
- Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ (2015) Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health D* **26**, 26191. <https://doi.org/10.3402%2Fmehd.v26.26191>
- Cornick S, Tawiah A, Chadee K (2015) Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* **3**, 982426. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.982426>
- Coyte KZ, Rakoff-Nahoum S (2019) Understanding Competition and Cooperation within the Mammalian Gut Microbiome. *Curr Biol* **29**, 538-544. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.017>
- de Albuquerque TMR, Garcia EF, de Oliveira Araújo A, Magnani M, Saarela M, de Souza, EL (2018) In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics antimicro* **10**, 704-716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
- de Araújo Etchepare M, Smanioto Barin J, Cichoski AJ, Jacob-Lopes E, Wagner R, Fries LLM, de Menezes CR (2015) Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Cienc Rural* **45** <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140938>

Favaro-Trindade C, Pinho S, Rocha GA (2008) Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Braz J Food Techn* **11**, 103–112.

Garcia-Castillo V, Marcial G, Albarracín L, Tomokiyo M, Clua P, Takahashi H, i sur. (2020) The exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C is partially involved in its immunomodulatory effect and its ability to improve the resistance against *Helicobacter pylori* Infection. *Microorganisms* **8**, 479. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01376>

Goulet O (2015) Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutr Rev* **73**, 32-40. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv039>

Haldar K, Chakraborty S (2019) Investigation of chemical reaction during sodium alginate drop impact on calcium chloride film. *Phys Fluids* **31**, 072102. <https://doi.org/10.1063/1.5100243>

Han S, Lu Y, Xie J, Fei Y, Zheng G, Wang Z, Liu J, Lv L, Ling Z, Berglund B, Yao M, Li L (2021) Probiotic Gastrointestinal Transit and Colonization After Oral Administration: A Long Journey. *Front Cell Infect Mi* **11**, 609722. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.609722>

Hillman, ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH (2017) Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes Environ* **32**, 300–313. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me17017>

Huang R, Zhou Z, Mo Q, Dong M, Rui X, Zhang Q, i sur. (2019) Protective effects of oligosaccharides on *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus* during freeze-drying process. *Food and Fermentation Industries* **45**, 26-31. <http://dx.doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.020935>

Hussain A, Zia KM, Tabasum S, Noreen A, Ali M, Iqbal R, Zuber M (2017) Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *Int J Biol Macromol* **94**, 10-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.104>

Ismail B, Nampoothiri KM (2010) Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Arch microbiol* **192**, 1049-1057. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0636-y>

Kankainen M, Paulin L, Tynkkynen S, von Ossowski I, Reunanen J, Partanen P, i sur. (2009) Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-



mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17193-8. <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.0908876106>

Koh WY, Lim XX, Tan T-C, Kobun R, Rasti B (2022) Encapsulated Probiotics: Potential Techniques and Coating Materials for Non-Dairy Food Applications. *Appl Sci* **12**, 10005. <https://doi.org/10.3390/app121910005>

Li W, Wang K, Sun Y, Ye H, Hu B, Zeng X (2015) Influences of structures of galactooligosaccharides and fructooligosaccharides on the fermentation in vitro by human intestinal microbiota. *J Funct Foods* **13**, 158-168. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.044>

Liao N, Luo B, Gao J, Li X, Zhao Z, Zhang Y, i sur. (2019) Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnol Lett* **41**, 263-272. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-02634-6>

Liu X, Chen D, Li Q, Zhang C, Zhang L, Qu H, i sur. (2022) Effect of Complex Prebiotics on the Intestinal Colonization Ability of *Limosilactobacillus fermentum* DALI02. *Fermentation* **9**, 25. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010025>

Liu Y, Tran DQ, Rhoads JM (2018) Probiotics in Disease Prevention and Treatment. *J Clin Pharmacol* **58**, 10S164-S179. <https://doi.org/10.1002/jcph.1121>

Liu Z, Zhang Z, Qiu L, Zhang F, Xu X, Wei H, Tao X (2017) Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *J Dairy Sci* **100**, 6895-6905. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11944>

Mafaldo ÍM, de Medeiros VPB, da Costa WKA, da Costa Sassi CF, da Costa Lima M, de Souza EL, i sur. (2022) Survival during long-term storage, membrane integrity, and ultrastructural aspects of *Lactobacillus acidophilus* 05 and *Lactocaseibacillus casei* 01 freeze-dried with freshwater microalgae biomasses. *Food Res Int* **159**, 111620. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111620>

Nwodo UU, Green E, Okoh AI (2012) Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int J Mol Sci* **13**, 14002-15. <https://doi.org/10.3390/ijms131114002>

Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC (2015) The composition of the gut microbiota

throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health D* **26**, 26050. <https://doi.org/10.3402%2Fmehd.v26.26050>

Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán CG (2005) Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* **88**, 843-56. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72750-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72750-8)

Salas-Jara MJ, Sanhueza EA, Retamal-Díaz A, González C, Urrutia H, García A. (2016) Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling* **32**, 1245-1257. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2016.1249367>

Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R (2018) Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin* **43**, 212-225. <https://doi.org/10.1111/nbu.12334>

Sanlibaba P, Çakmak G (2016) Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Appl Microbiol: open access*. <http://dx.doi.org/10.4172/2471-9315.1000115>

Shah N, Patel A, Ambalam P, Holst O, Ljungh A, Prajapati J (2016) Determination of an antimicrobial activity of *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum* against clinical pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in co-culture. *Ann Microbiol* **66**, 1137-1143. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1201-y>

Shori AB (2017) Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI J Biosci* **24**, 1. <https://doi.org/10.4308/hjb.24.1.1>

Šušković J, Kos B, Matošić S (1998) Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend?. *Mljekarstvo* **48**, 165-176.

Thomas CM, Versalovic J (2010) Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* **1**, 148-63. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.11712>

Tymczyszyn EE, Sosa N, Gerbino E, Hugo A, Gómez-Zavaglia A, Schebor C (2012) Effect of physical properties on the stability of *Lactobacillus bulgaricus* in a freeze-dried galacto-oligosaccharides matrix. *Int J Food Microbiol* **155**, 217-221.

Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, Bai X, Xie J, Wang Y, Geng W (2021) Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

Wu X, Han J, Gong G, Koffas MAG, Zha J (2021) Wall teichoic acids: physiology and applications. *FEMS Microbiol Rev* **17**, 45(4) <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa064>

Yamane H, Paul WE (2013) Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4 (+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev* **252**, 12-23. <https://doi.org/10.1111/imr.12032>

Živković M, Miljković MS, Ruas-Madiedo P, Markelić MB, Veljović K, Tolinački M, i sur. (2016) EPS-SJ exopolisaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Fronti Microbiol* **7**, 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00286>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Petra Knez 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