

Mikro- i nanoinkapsulacija probiotičkih sojeva producersata površinskih proteina

Škibola, 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:159:790019>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Petra Škibola

**MIKRO- I NANOINKAPSULACIJA
PROBIOTIČKIH SOJEVA
PRODUCENATA POVRŠINSKIH
PROTEINA**

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

MIKRO- I NANOINKAPSULACIJA PROBIOTIČKIH SOJEVA PRODUCENATA POVRŠINSKIH PROTEINA

Petra Škibola, univ. bacc. biotechn. et pharm. inv. 0335004013

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati mikro- i nanoinkapsulaciju probiotičkih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 na uvjete procesiranja, skladištenja i preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT). Napravljena je mikroinkapsulacija u natrijevom alginatu uz dodatak prebiotika fruktooligosaharida (FOS) i galaktooligosaharida (GOS) te se ispitalo preživljenje sojeva nakon mikroinkapsulacije, liofilizacije i GIT-a. Najveće preživljenje u GIT-u zabilježeno je kod oba soja korištenjem GOS-a uz natrijev alginat tijekom mikroinkapsulacije. Dodatak prebiotika nije značajno utjecao na poboljšanje preživljenja nakon tri mjeseca skladištenja. Nadalje, ispitan je utjecaj mikroinkapsulacije, liofilizacije i uvjeta GIT-a na površinske proteine (S-proteine) soja MB13. S-proteini su očuvani što je potvrđeno SDS-PAGE metodom. Ispitana je otpornost nanoinkapsuliranih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 „layer by layer“ tehnikom korištenjem poli(dialildimetilamonij klorid) (PDDA) i poli(stirensulfonat) (PSS). Uspoređujući sa slobodnim stanicama, nanoinkapsulirane stanice pokazale su veće preživljenje i otpornost na proces liofilizacije i simulirane uvjete GIT-a.

Ključne riječi: mikroinkapsulacija, nanoinkapsulacija, probiotici, prebiotici, S-proteini, gastrointestinalni trakt

Rad sadrži: 48 stranica, 13 slika, 4 tablice, 58 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnici 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. Blaženka Kos (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (član)
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjenski član)

Datum obrane: rujan 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

MICRO- AND NANOENCAPSULATION OF PROBIOTIC STRAINS PRODUCING SURFACE PROTEINS

Petra Škibola, univ. bacc. biotechn. et pharm. inv. 0335004013

Abstract: The aim of this study was to examine the influence of micro- and nanoencapsulation of probiotic strains *Levilactobacillus brevis* MB1 and MB13 on the conditions of processing, storage, and survival in simulated conditions of the gastrointestinal tract (GIT). Microencapsulation in sodium alginate with the addition of prebiotics fructooligosaccharides (FOS) and galactooligosaccharides (GOS) was performed, and the survival of strains after microencapsulation, lyophilization and GIT was tested. The highest survival in the GIT was recorded in both strains using GOS with sodium alginate during microencapsulation. The addition of prebiotics did not significantly affect the viability after three months of storage. Furthermore, the influence of microencapsulation, lyophilization and GIT conditions on the surface proteins (S-proteins) of strain MB13 was examined. S-proteins were preserved, which was confirmed by the SDS-PAGE method. The resistance of nanoencapsulated strains *Levilactobacillus brevis* MB1 and MB13 was tested by the "layer by layer" technique using poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) and poly(styrenesulfonate) (PSS). Compared to free cells, nanoencapsulated cells showed higher survival and resistance to the lyophilization process and in simulated GIT conditions.

Keywords: *microencapsulation, nanoencapsulation, probiotics, prebiotics, S-proteins, gastrointestinal tract*

Thesis contains: 48 pages, 13 figures, 4 tables, 58 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, mag. ing. biotechn.

Reviewers:

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

Thesis defended: September 2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1. Utjecaj bakterija mliječne kiseline na čovjeka	3
2.1.2. Industrijska primjena bakterija mliječne kiseline	4
2.2. PROBIOTICI	4
2.2.1. Mehanizam djelovanja probiotika	6
2.2.2. Probiotici za zdravlje ljudi	7
2.3. S-SLOJ (engl. <i>Surface Layer, S-layer</i>)	9
2.3.1. Struktura S-sloja	10
2.3.2. Funkcije S-sloja i njihova primjena	11
2.4. MIKROINKAPSULACIJA	12
2.5. NANOINKAPSULACIJA	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Radni mikroorganizmi	17
3.1.2. Hranjiva podloga	17
3.1.3. Kemikalije	17
3.1.4. Pribor i aparatura	18
3.2. METODE	20
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	20
3.2.2. Mikroinkapsulacija sojeva <i>Levilactobacillus brevis</i> u natrijevom alginatu	20
3.2.3. Mikroinkapsulacija sojeva <i>Levilactobacillus brevis</i> u natrijevom alginatu uz dodatak prebiotika fruktooligosaharida i galaktooligosaharida	21
3.2.4. Ispitivanje preživljavanja mikroinkapsuliranih sojeva <i>Levilactobacillus brevis</i> tijekom liofilizacije te nakon 3 mjeseca skladištenja	21
3.2.5. Nanoinkapsulacija sojeva <i>Levilactobacillus brevis</i> „layer by layer“ (LbL) metodom	22
3.2.6. Mjerenje zeta potencijala	23
3.2.7. Ispitivanje preživljavanja nanoinkapsuliranih sojeva <i>Levilactobacillus brevis</i> nakon procesa liofilizacije	23
3.2.8. Preživljavanje mikro- i nanoinkapsuliranih sojeva <i>Levilactobacillus brevis</i> u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	23

3.2.9. Ispitivanje stabilnosti S-proteina tijekom prolaska liofiliziranih mikrokapsula kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta primjenom natrij dodecil sulfat-poliakrilamidnom gel elektroforezom (engl. <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE</i>)	24
3.2.10. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	25
3.2.11. Obrada rezultata	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. MIKROINKAPSULACIJA SOJEVA <i>Levilactobacillus brevis</i> U NATRIJEVOM ALGINATU S PREBIOTICIMA I DETEKCIJA S-PROTEINA SDS-PAGE ELEKTROFOREZOM.....	27
4.1.1. S-proteini soja MB13 nakon mikroinkapsulacije, liofilizacije i izlaganja gastrointestinalnim uvjetima	35
4.2. NANOINKAPSULACIJA SOJEVA <i>Levilactobacillus brevis</i> „LAYER-BY-LAYER“ TEHNIKOM I TESTIRANJE NA UVJETE GASTROINTESTINALNOG SUSTAVA.....	37
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA	43

1. UVOD

Loša prehrana, stres, putovanja i ubrzan način života dovode do disbalansa crijevne mikroflore čovjeka, što u konačnici dovodi do razvoja teških kroničnih bolesti gastrointestinalnog sustava. Kako bi se održala ravnoteža crijevne mikroflore preporuča se konzumacija probiotika kao dodatka prehrani. Ljekarnici i liječnici preporučuju konzumaciju probiotika nakon terapije antibioticima kako bi prevenirali razvoj dijareje i ostalih gastrointestinalnih poremećaja uzrokovanih narušenim mikrobiomom. Bakterije mliječne kiseline, koje su glavni sastojak mliječnih proizvoda, zadovoljavaju niz strogo definiranih kriterija zbog kojih se mogu nazvati probioticima. Posebno uspješnim bakterijskim rodovima pokazao se *Lactobacillus*. Uspješan probiotik, nakon primjene, mora proći cijeli put gastrointestinalnog sustava, doći na ciljno mjesto i imati pozitivan terapijski učinak na ljudsko zdravlje. Međutim, sam put probiotičkih sojeva je vrlo nepovoljan i zato većina sojeva ni ne dospjeje do debelog crijeva (mjesto djelovanja). Osim niskog pH želuca, tu su probavni enzimi gušterače i žučne soli koje dodatno oštećuju i inaktiviraju probiotičke sojeve. Nadalje, pojavljuje se problem prilikom obrade, procesiranja i skladištenja probiotika.

Kako bi se nadvladali spomenuti problemi, krenulo se proučavati procesi mikro- i nanoinkapsulacije. Mikroinkapsulacija predstavlja proces pakiranja probiotičkih sojeva u polupropusni matriks kako bi bakterijske stanice bile zaštićene od nepovoljnih vanjskih uvjeta. Nanoinkapsulacija, metoda istog cilja, uključuje dodatak zaštitnih slojeva na površinu bakterijske stanice. Osim zaštite, mikro- i nanoinkapsulacijom se želi povećati otpornost probiotika prilikom procesne obrade, skladištenja i same primjene. Alginat je jedan od često korištenih materijala mikroinkapsuliranja, ali dodatkom prebiotika ili drugih polimera zabilježena su bolja svojstva zaštite i otpornosti inkapsuliranih sojeva.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati uspješnost mikro- i nanoinkapsulacije sojeva *Lactobacillus brevis* MB1 i MB13 uz dodatak fruktooligosaharidnog (FOS) i galaktooligosaharidnog (GOS) prebiotika. Ispitala se otpornost inkapsuliranih sojeva na proces liofilizacije i simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta (GIT). Također, pratilo se preživljenje nakon tri mjeseca skladištenja. Nadalje, ispitala se promjena S-proteina na površini bakterijske stanice nakon liofilizacije mikroinkapsula i izlaganja simuliranim uvjetima GIT-a uz pomoć SDS-PAGE. Osim toga, ispitala se uspješnost nanoinkapsulacije mjerenjem zeta potencijala, otpornost nanokapsula na liofilizaciju i simulirane uvjete GIT-a uspoređujući sa slobodnim stanicama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Početak 20. stoljeća prihvaćen je opći naziv „bakterije mliječne kiseline“ (BMK) nakon objavljene monografije 1919. godine autora Orla-Jensena koji je postavio temelj klasifikacije bakterija mliječnih kiselina. Sustav klasifikacija rodova BMK bio je temeljen na morfologiji stanica (koki ili štapići), načinu fermentacije glukoze (hetero- ili homofermentirajući), rastu u određenom optimalnom temperaturnom rasponu (npr. 10 °C i 45 °C) i sposobnosti iskorištavanja šećera (D, L ili oboje) (Ayivi i sur., 2020; Khalid, 2011). BMK predstavljaju heterogenu grupu različitih rodova bakterija koje su filogenetski relativno blisko povezane uz zabilježenu morfološku, fiziološku i metaboličku sličnost rodova (Plavec i Berlec, 2020; Khalid, 2011). Zajedničke karakteristike rodova koji pripadaju bakterijama mliječne kiseline su: Gram-pozitivni, ne sporulirajući, anaerobni/aerotolerantni koki ili štapići koji fermentiraju egzogene ugljikohidrate i stvaraju mliječnu kiselinu kao krajnji produkt kataboličkog metabolizma (Ayivi i sur., 2020). Rodovi BMK koji se najčešće koriste i ključni su prehrambenoj industriji: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus* (Peng i sur., 2020). Međutim, uz navedene rodove bakterijama mliječne kiseline pripadaju rodovi: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*. (Plavec i Berlec, 2020; Khalid, 2011). Zahvaljujući njihovoj dugoj i sigurnoj primjeni većina BMK posjeduju GRAS status (engl. *Generally Recognized as Safe* – Općenito priznato kao sigurno) prema FDA (engl. *Food and Drug Administration*), ali ne sve bakterije jer se prvenstveno misli na probiotičke bakterije (Plavec i Berlec, 2020). Louis Pasteur, 1857. godine, dokazao je prvi put mliječnu fermentaciju mikrobnog podrijetla, a nekoliko godina kasnije izoliran je soj mliječne bakterije odgovoran za kiseljenje mlijeka. Danas, izolacija bakterija mliječnih kiselina provodi se rutinski što je pridonijelo njihovom korištenju kao starter kultura za različite industrijske proizvode (Peng i sur., 2020).

BMK se mogu pronaći u nišama mliječnog, mesnog i biljnog podrijetla, a kod ljudi i životinja u sklopu urogenitalnog, gastrointestinalnog trakta i unutar usne šupljine u sklopu normalne mikrobiote (Ayivi i sur., 2020; Peng i sur., 2020). Dokaz tomu je činjenica da crijeva sisavaca sadrže preko 100 trilijuna mikroorganizama koji čine mikrobiotu (Ayivi i sur., 2020). Mogu biti izolirani iz različitih namirnica koje čovjek svakodnevno koristi, poput procesiranog

mesa, povrća, voća i različitih mliječnih proizvoda. Dobro su prilagođeni područjima bogatim nutrijentima i ugljikohidratima, stoga bakterije mliječne kiseline rastu na kompleksnim podlogama koje moraju sadržavati vitamine, minerale, aminokiseline i ugljikohidrate kao izvor energije (Ayivi i sur., 2020; Khalid, 2011).

2.1.1. Utjecaj bakterija mliječne kiseline na čovjeka

Konzumacijom proizvoda kod kojih je fermentacija potaknuta bakterijama mliječne kiseline imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje poput imunomodulatornog, antialergijskog i antioksidativnog učinka. Istraživanja su pokazala kako BMK imaju učinak protiv razvoja kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa melitusa (Mathur i sur., 2020). Primjerice, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* i *Limosilactobacillus fermentum* posjeduju *in vivo* djelovanje na redukciju kolesterola (Peng i sur., 2020; Wang i sur., 2012).

Nakon većih fizičkih napora dolazi do oštećenja mišića te su mehanizmi za unos glukoze, posredovani inzulinom, ugroženi. Fermentirano mlijeko ima potencijal poboljšanja sposobnosti metabolizma glukoze i smanjenja boli u mišićima. Nadalje, fermentirana hrana može uvelike pomoći kod simptoma upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease, IBD*) zbog poticanja proliferacije korisnih mikroorganizama što omogućuje regeneraciju crijevne mikroflore (Mathur i sur., 2020). Mnoge bakterije mliječne kiseline imaju pozitivan terapijski učinak na dijareju (Peng i sur., 2020).

Crijevnom peristaltikom omogućeno je prianjanje bakterija mliječne kiseline za epitelne stanice crijeva. Prianjanje je potpomognuto glikoproteinom mucinom kojeg luče epitelne stanice u svrhu zaštite i podmazivanja površine. Osim olakšanog vezanja za površinu crijevnih epitelnih stanica, mucin sprječava vezanje patogenih bakterija čime se potiče aktivnost rezidentnih crijevnih bakterija koje čine gastrointestinalnu barijeru. Bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* posjeduju antimikrobna svojstva koja onemogućavaju štetno djelovanje enteropatogena (Ayivi i sur., 2020).

2.1.2. Industrijska primjena bakterija mliječne kiseline

Prilikom izrade jogurta, acidofilnog mlijeka i sira (npr. edam ili *cheddar* sira) kao starter kulture koriste se bakterije mliječne kiseline. Komercijalno su važni u preradi mesa, alkoholnih pića i povrća, što uključuje proizvode poput kobasica, vina, piva i krastavaca (Carr i sur., 2002). Osim proizvodnje prehrambenih proizvoda, posjeduju svojstvo reguliranja rasta gljivica, ali i uklanjanja mikotoksina (Peng i sur., 2020). Izolacijom 13 različitih *Lactobacillus* sojeva iz jogurta, ustanovljeni su različiti antagonistički mehanizmi prema patogenima (Prabhurajeshwar i Chandrakanth, 2019). U istraživanju s *Lactocaseibacillus casei* 0979 (mliječno kiselinska fermentacija izdanka sjemena mahunarki) zabilježeno je značajno smanjenje plijesni, a povećanje izoflavonoida (polifenolni spojevi s antioksidativnim i antimikrobnim učinkom) (Budryn i sur., 2019).

Posebnu pažnju pridodaje se bakteriocinima koji su produkti bakterija mliječnih kiselina, a smatraju se prirodnim spojevima s antimikrobnim djelovanjem. Njihova proizvodnja je jednostavna, nisu toksični za eukariotsku stanicu, osjetljivi su na proteaze, pokazuju potencijal protiv mikroorganizama koji su odgovorni za kvarenje hrane, a pri tome ne utječu na senzornu kvalitetu hrane. Predstavljaju obećavajuće biokonzervanse koji će pridonijeti smanjenim korištenjem sintetskih konzervansa (Peng i sur., 2020).

2.2. PROBIOTICI

Riječ probiotik izvorno dolazi iz grčkog izraza *pro bios* što se prevodi „za život“ jer prema definiciji probiotici predstavljaju više kultura živih mikroorganizama koji imaju sposobnost poboljšati svojstva već prisutne mikroflore i time pozitivno djelovati na zdravlje domaćina (Das i sur., 2022). Od davnina znanstvenici poput Hipokrita prepisivali su kiselo mlijeko za liječenje crijevnih i želučanih tegoba (Ayivi i sur., 2020). Znanstvenik Henry Tissier 1899. godine izolirao je bifidobakterije iz stolice dojene djece i definirao ih kao glavnu komponentu zdrave mikroflore zbog uočene dominacije nad ostalim mikroorganizmima. Predložio je konzumaciju bifidobakterija kod dojenčadi s dijarejom u nadi da će bifidobakterije istisnuti uzročnike želučanih tegoba i uspostaviti normalnu crijevnu mikrofloru. Terapija je značajno smanjila učestalost, trajanje bolesti i razdoblje hospitalizacije djece uspoređujući s konvencionalnim načinom liječenja (Ayivi i sur., 2020). Godine 1907. ruski zoolog i Nobelovac Élie Metchnikoff predložio je korištenje bakterija koje proizvode kiselinu u fermentiranim mliječnim

proizvodima kao prevenciju onečišćenja crijeva, što se kasnije utvrdilo da specifične bakterije smanjuju štetno djelovanje patogenih crijevnih bakterija. Sam pojam probiotika prvi put je korišten 1965. godine od strane znanstvenika Lillya i Stillwella kao opis bakterijskih sojeva koji potiču rast drugih mikroba (Das i sur., 2022; Ayivi i sur., 2020;).

Najčešći rodovi koji se koriste kao probiotici su *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, a važnije vrste prikazane su u tablici 1. Uz bakterijske sojeve koji pripadaju bakterijama mliječne kiseline, pod definiciju probiotika pripadaju i kvasci poput *Saccharomyces boulardii* i *Saccharomyces cerevisiae* (Das i sur., 2022). Kvasci pripadaju jednostaničnim eukariotima klasificiranim u carstvu gljiva. Interes za kvascima kao probioticima raste zbog utjecaja na povećanje bioraspoloživosti minerala zahvaljujući hidolizi fitata, sposobnosti pojačanja imunomodulatornih učinaka crijevne barijere i održavanje integriteta epitelne barijere (Das i sur., 2022).

Tablica 1. Mikroorganizmi koji su prihvaćeni kao probiotički sojevi (Vivek i sur., 2023; Das i sur., 2022)

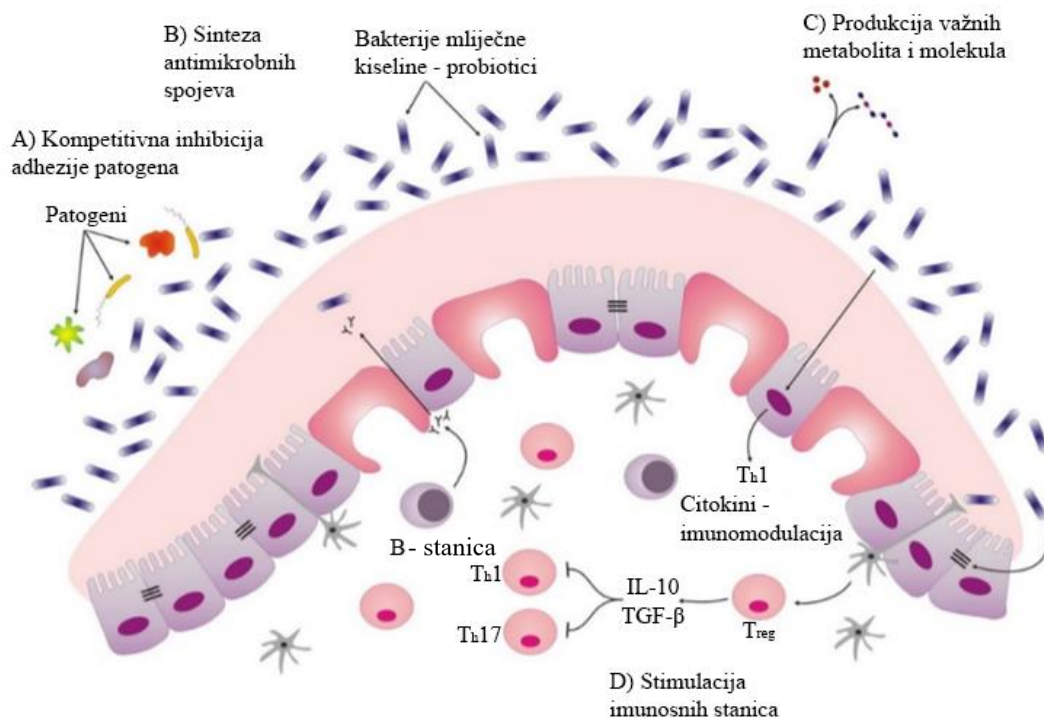
Rod	Vrsta
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylovorous</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. murinus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudolongum</i> , <i>B. thermophilum</i>
Kvasci	<i>S. boulardii</i> , <i>S. carlsbergensis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianu</i>
Drugi mikroorganizmi	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroids</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Sporolactobacillus inulinus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bacillus cereus</i> (Toyoi; <i>Propionibacterium freudenreichii</i>), <i>Escherichia coli</i> (Nissle, 1917), <i>Propionibacterium freudenreichii</i>

Probiotički sojevi, osim djelotvornog učinka na crijevnu mikrofloru, posjeduju svojstva preživljavanja kiselog pH želudca, žučnih soli i probavnih enzima tankog crijeva tako da u što većem broju dospiju do debelog crijeva (van Zyl i sur., 2020).

2.2.1. Mehanizam djelovanja probiotika

U znanstvenoj literaturi predloženi su različiti mehanizmi djelovanja probiotika, međutim, potrebno je uzeti u obzir puno parametara zbog kojih nije moguća generalizacija mehanizama djelovanja na sve probiotike. Ključno je povezati mehanizam djelovanja s vrstom soja, dozom i načinom primjene probiotika (Ayivi i sur., 2020). Postoje tri opća načina djelovanja probiotika prema autoru Oelschlaeger iz 2010. godine koji su se zadržali do danas:

- 1) Probiotici imaju sposobnost modulirati imunološki odgovor domaćina i time utjecati na stečeni i urođeni imunološki sustav. Zaslužni su za prevenciju infekcija, liječenje (kroničnih) upala gastrointestinalnog sustava.
- 2) Probiotici pozitivno i izravno djeluju na komenzalne mikroorganizme, a negativno, odnosno antagonistički na patogene kako bi se održala mikrobna ravnoteža crijeva.
- 3) Utjecaj probiotika i njihovih metabolita na metaboličke produkte patogena (npr. toksine) (Ayivi i sur., 2020; Oelschlaeger, 2010).



Slika 1. Mehanizmi kojima probiotički sojevi bakterija mliječne kiseline ostvaruju pozitivno djelovanje. A) Kompetitivna inhibicija adhezije patogena – fizička nemogućnost vezanja i zaštita crijevnog epitela. B) Sinteza antimikrobnih spojeva – smanjenje broja već adheziranih patogena. C) Produkcija važnih metabolita i molekula – poticanje rasta korisnih i komenzalnih bakterija. D) Stimulacija imunskih stanica – bolja reakcija imunološkog sustava u obrani od patogena (*prema* Ayivi i sur., 2020)

Uz Oelschlaegera i drugi znanstvenici pokušali su generalizirati mehanizme djelovanja koji se svode na to da se probiotici većim afinitetom vežu za crijevni epitel i onemogućavaju vezanje patogenih mikroorganizama (slika 1). Poboljšavaju funkciju crijevnog epitela proizvodnjom mucina kao i funkciju mukozne barijere inducirajući ekspresiju antimikrobnih peptida. Probiotici sintetiziraju antioksidanse poput egzopolisaharida (osobito roda *Lactobacillus*), karotenoide i feruličnu kiselinu, što omogućava toleranciju na oksidativni stres (Feng i Wang, 2020). Nadalje, izlučuju bakteriocine kojima inhibiraju rast patogena (slika 1), a sojevi koji pripadaju bakterijama mliječne kiseline stvaraju kiseli okoliš na koji su patogeni osjetljivi (Petrova i sur., 2022). Što se tiče imunološkog sustava, probiotici potiču stvaranje protutijela IgA koji su ključni u intestinalnom humoralnom imunitetu. Također, pospješuju fagocitozu i aktivnost prirodnih stanica ubojica, smanjuju proizvodnju upalnih citokina, sprječavaju apoptozu i inhibiraju proliferaciju T stanica u svrhu sprječavanja upalnih stanja (slika 1). Kako bi se svi navedeni učinci ostvarili, probiotik mora preživjeti kiselo i alkalno okruženje te posjedovati sposobnost adhezije i kolonizacije debelog crijeva (Ayivi i sur., 2020).

2.2.2. Probiotici za zdravlje ljudi

Čovjek se može opisati kao rezervoar heterogene grupe mikroba što predstavlja formu čovjek-mikrorbion kao superorganizam. Intestinalni trakt čovjeka posjeduju više od 1000 različitih vrsta mikroorganizama koji mogu modulirati unutarnji okoliš domaćina i time utjecati na zdravlje. Želudac zdravog čovjeka posjeduje 10^3 CFU/g različitih bakterijskih vrsta, dok se u debelom crijevu ta brojka kreće od 10^{11} do 10^{12} CFU/g (engl. *Colony Forming Unit, CFU*). Bakterijska kolonizacija započinje rođenjem i promjenjiva je kroz život. Posebno kod osoba starijih od 60 godina zabilježen je pad bifidobakterija, što se i povezuje s razdobljem oslabjelog imunološkog sustava. Stoga, briga o crijevnom mikrobiomu može olakšati nezaustavne biološke procese poput starenja i uvelike poboljšati kvalitetu života (George Kerry i sur., 2018). Briga za crijevu mikrofloru može se postići konzumacijom:

- Prebiotika – neprobavljivi spojevi koji potiču rast određene vrste bakterija, a paralelno pozitivno djeluju na domaćina.
- Postbiotika – neživi bakterijski ili metabolički proizvodi koji pozitivno djeluju na domaćina.
- Sinbiotika – pripravci koji sadrže prebiotike i probiotike.
- Probiotika o kojima se pisalo u prethodnim poglavljima (George Kerry i sur., 2018).

Najveća probiotička prednost je već spomenuta antipatogenetska aktivnost koja je istražena koristeći humane patogene poput *Salmonella enterica* serovar Typhimurium i *Clostridium difficile* u *in vitro* uvjetima. Probiotici proizvode kratkolančane masne kiseline (engl. *Short-Chain Fatty Acids, SCFA*) kao što su maslačna, mliječna, octena i propionska kiselina koje održavaju pH lumena debelog crijeva i stvara okoliš nepogodan za razvoj patogena, ujedno ojačavaju crijevnu barijeru poticanjem produkcije mucina. Spojevi poput etanola, acetaldehida, vodikovog peroksida i peptida sintetizirani su i izlučeni od strane probiotika s ciljem povećanja permeabilnosti stanične membrane bakterijske stanice, što će dovesti do depolarizacije membranskog potencijala, pa čak i smrti (George Kerry i sur., 2018).

Probiotici nisu namijenjeni samo za regulaciju gastrointestinalnog sustava već i za održavanje balansa urogenitalne mikroflore. Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention, CDCP*) u svijetu boluje više milijardu žena od nesekusalno prenosivih urogenitalnih infekcija kao što je infekcija urinarnog trakta (engl. *Urinary Tract Infection, UTI*) ili bakterijske vaginoze (engl. *Bacterial Vaginosis, BV*) čiji su uzročnici *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis*. S druge strane, raste broj i seksualno prenosivih bolesti uzročnika *Neisseria gonorrhoeae* i *Chlamydia trachomatis*. Porastom bakterijskih infekcija raste i rezistencija na antibiotike, a poznata je poveznica između abnormalne vaginalne mikrobne flore i povećane incidencije urinarnih infekcija. Više od 50 vrsta naseljava vaginalno područje, a jedne od češćih pripadaju rodu *Lactobacillus* (npr. *Levilactobacillus brevis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Ligilactobacillus salivarius*, *Limosilactobacillus reuteri* i *Lacticaseibacillus rhamnosus*). Narušen balans vaginalnog mikrookoliša može se ponovno uspostaviti korištenjem probiotičke suplementacije i time smanjiti rizik ponovnog razvoja infekcije (George Kerry i sur., 2018).

Imunomodulacijski efekt probiotičkih mikroorganizama na domaćina obuhvaća utjecaj na urođeni i stečeni imunološki odgovor zbog sposobnosti regulacije funkcija dendritičkih stanica, monocita/makrofaga i limfocita B i T. Crijevni patogeni izazivaju upalne reakcije koje pogoduju rastu patogena na račun prirodne mikrobiote. Stoga, probiotički mikroorganizmi potiču protuupalni odgovor urođenog imunološkog sustava uz lučenje interleukina 10 (IL-10) od strane probiotički aktiviranih dendritičkih stanica. Smanjenje izlučivanja proupalnih citokina iz imunoloških stanica rezultat je interferencije probiotičkih bakterija s proupalnim signalima, poput nuklearnog faktora (NF- κ B) i mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) koji su aktivirani od strane crijevnih patogena, a mogu ozbiljno oštetiti crijevni epitel (van Zyl

i sur., 2020; Tsai i sur., 2012). Provedena su istraživanja koja dokazuju supresiju izlučivanja proupalnih citokina od strane patogena koristeći probiotičke bakterije. *Lactobacillus casei* OLL2768 ima sposobnost suzbijanja proupalnog odgovora izazvanog enterotoksičnom *Escherichia coli* (ETEC) inhibicijom MAPK i NF- κ B signalnih puteva (van Zyl i sur., 2020; Takanashi i sur., 2013). S druge strane, utjecaj probiotika na produkciju protutijela imunoglobulina A (IgA) inhibira adheziju patogena za epitelne stanice crijeva. Istraživanja na *Saccharomyces boulardii* i *L. rhamnosus* GG zabilježila su povećane sekretorne razine IgA ili stanice koje luče imunoglobuline u gastrointestinalni sustav (van Zyl i sur., 2020; Kaur i sur., 2002).

Dodatne pogodnosti korištenja probiotičkih sojeva uključuje protualergijsko djelovanje, pozitivan efekt na centralni živčani sustav, antikancerogena, angiogenska te antidiabetička aktivnost (George Kerry i sur., 2018). U medicini liječnici preporučuju probiotike nakon antibiotske terapije, putničke dijareje izazvane bakterijama (češća je *Escherichia coli*), sindroma iritabilnog kolona, pa čak i kod atopijskog dermatitisa (Islam, 2016).

2.3. S-SLOJ (engl. *Surface Layer, S-layer*)

Stanični zid jedna je od važnih rigidnih struktura prokariota koji pruža zaštitu, oblik i čvrstoću mikroorganizmu. Površinska struktura arheja, Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija prožeta je mononuklearnim kristalnim nizovima proteinskih podjedinica koje tvore S-sloj (Hynönen i Palva, 2013; Sára i Sleytr, 2000). Proteini S-sloja odgovorni su za adheziju bakterija za stanice domaćina ili proteine ekstracelularnog matriksa, agregaciju, zaštitu od kiseline i probavnih enzima, te sudjeluju u formiranju specifične stanične topologije (Alp i sur., 2020; Hynönen i Palva, 2013). Proteini S-sloja roda *Lactobacillus* posjeduju adhezivna i imunomodulacijska svojstva, pa time pokazuju potencijal za upotrebu kao antigeni u dizajnu živih oralnih cjepiva (Hynönen i Palva, 2013). Potrebno je napomenuti kako je S-sloj pronađen samo kod nekih vrsta roda *Lactobacillus*. Primjeri vrsta za koje postoje dokazi prisutnosti S-sloja su: *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii* i *Lactobacillus acidophilus* (Hynönen i Palva, 2013). S-proteini pripadajućeg S-sloja posjeduju sposobnost vezanja za tip-V kolagena koji je najzastupljeniji protein crijevne sluznice (Alp i sur., 2020).

2.3.1. Struktura S-sloja

Sastavljen je od jednakih proteinskih ili glikoproteinskih podjedinica koje mogu varirati u molekularnoj masi od 40 kDa do 200 kDa, dok se debljina kreće 5 – 25 nm (Alp i sur., 2020; Hynönen i Palva, 2013). S-proteini roda *Lactobacillus* nešto su manje molekulske mase uspoređujući s drugim rodovima, a kreću se u rasponu 25 – 71 kDa (Alp i sur., 2020; Hynönen i Palva, 2013). S-proteini formiraju visoko poroznu kristalnu rešetku koja može posjedovati različite simetrije: kosa (p1, p2), tetragonalna (p4) ili heksagonalna (p3, p6) (dominantnija u arhejama) simetrija (Hynönen i Palva, 2013; Sára i Sleytr, 2000). Gram-pozitivne bakterije i bakterije koje pripadaju domeni *Archaea* nekovalentno povezuju proteinske podjedinice S-sloja s pseudomureinom, peptidoglikanskim slojem ili sekundarnim polimerima stanične stijenke (engl. *Secondary Cell Wall Polymers, SCWP*), dok Gram-negativne pričvršćuju S-sloj za lipopolisaharide koji su komponenta vanjske membrane (Pavkov-Keller i sur., 2011; Sára i Sleytr, 2000). Analizom aminokiselina zabilježen je sličan ukupan sastav S-sloja kod različitih filogenetskih grana. Proteinske podjedinice bogate su kiselim i hidrofobnim aminokiselinama. Najzastupljenija bazična aminokiselina je lizin, dok je sadržaj arginina i histidina nizak (Sára i Sleytr, 2000). Prisutnost aminokiselina koje sadrže sumpor u svojoj strukturi (npr. cistein) prisutne su samo u određenim S-slojevima (Sára i Sleytr, 2000). Izoelektrična točka (pI) većine proteina S-sloja nalazi se u blago kiselom području i može iznositi od 4 do 6 pH, dok je za različite bakterije roda *Lactobacillus* raspon od 9 do 11 pH (Sleytr i sur., 2014; Sára i Sleytr, 2000). Otprilike 20 % aminokiselina organizirano je u strukturu α -uzvojnica, dok se 40 % javlja u obliku β -ploča. Proteini S-sloja Gram-pozitivnih bakterija i arheja mogu imati kovalentno vezane ugljikohidrate, odnosno glikanske lance sastavljene od 20 do 50 identičnih ponavljajućih jedinica heksoze, pentoze, heptoze ili amino šećera. Glikanski lanci S-proteina Gram-pozitivnih bakterija slični su lipopolisaharidima vanjske membrane Gram-negativnih bakterija. Promotori koji prethode genima S-proteina iznimno su jaki, zapravo promotor gena S-sloja *Lactobacillus acidophilus* dvostruko je jači od promotora laktat dehidrogenaze koji se inače smatra jednim od najjačih bakterijskih promotora (Sára i Sleytr, 2000).

Većina proteina S-sloja roda *Lactobacillus* nije glikozilirana i najveća sličnost zabilježena je na C-terminalnoj regiji primarne strukture (Pavkov-Keller i sur., 2011). Niska je podudarnost N-krajeva S-proteina u sojevima *L. acidophilus* ATCC 4356 (SlpA), *L. helveticus* ATCC 12046 (SlpH) i *L. crispatus* JCM 5810 (CbsA), ali postoji visoka podudarnost u signalnom peptidu. Nasuprot tome, S-protein SlpA iz *L. brevis* ATCC 8287 nije sličan sekvencama proteina SlpA *L. acidophilus* i *L. crispatus*, kao ni SlpH iz *L. helveticus*, ali zato je kod proteina S-sloja *L.*

brevis zabilježena podudarnost N-terminalnog kraja, dok je C-kraj poprilično divergentan (Pavkov-Keller i sur., 2011).

2.3.2. Funkcije S-sloja i njihova primjena

Interakcija *Bacteria* i *Archaea* s vanjskim okolišem ostvarena je pomoću proteina S-sloja koji tvore izoporozne proteinske rešetke, što predstavlja prilagodbu na razne okolišne čimbenike. S-sloj se ne može smatrati zasebnim slojem jer je dio složenijih strukturnih ovojnica, ali funkcije S-sloja još se uvijek intenzivno istražuju (Sleytr i sur., 2014). Proteini S-sloja zaduženi su za prijanjanje bakterija za razne podloge i površine, a povezani su s auto- i koagregacijskom sposobnošću s drugim mikroorganizmima (Gerbino i sur., 2015). Ukoliko dođe do gubitka ili prekrivanja S-sloja tada pada sposobnost adhezije i agregacije. Nadalje, posreduju prijanjanju na epitelne stanice crijeva sisavca (dokazano na staničnim linijama Caco-2, HeLa i Hep-2 stanice) i na komponente izvanstaničnog matriksa npr. kolagena, fibronektina i laminina. S-sloj odgovoran je za imunomodulaciju citokina jer ulazi u interakciju s TLR2 i TLR4 (engl. *Toll-like receptors*, *TLR*). Jedna od važnijih učinka S-sloja je stvaranje zaštitne barijere koja pridonosi zaštiti i stabilizaciji bakterija od niskog pH, proteolitičkih enzima, visokih temperatura, teških metala i gama zračenja (Gerbino i sur., 2015; Hynönen i Palva, 2013).

S-sloj roda *Lactobacillus* može se primijeniti za izradu cjepiva, odnosno fuzijskih proteina S-sloja koji bi se koristili u imunizaciji čovjeka i životinja (Hynönen i Palva, 2013). Proteini koji čini S-sloj u nekim patogenim bakterijama ključni su u virulenciju, stoga su dobri kandidati za izradu cjepiva (Sleytr i sur., 2014). Pogotovo sojevi roda *Lactobacillus* koji na površini posjeduju hibridne proteine. Ovu ideju podupire činjenica da se radi o nepatogenim laktobacilima koji oralnom primjenom mogu izdržati prolazak kroz gastrointestinalni trakt. Stanice laktobacila s imunomodulirajućim molekulama u S-sloju mogu dodatno pojačati imunološki odgovor. Nadalje, pokazuje prednost u ciljanoj isporuci antigenskih molekula u obliku antigen-nosač (Hynönen i Palva, 2013). Biotehnološke metode primjenjuju se u stvaranju liposoma koji posjeduju proteine S-sloja. Liposomi su fosfolipidne nanovezikule korištene za inkapsulaciju hidrofobnih i hidofilnih lijekova, a često se koriste kao nosači antineoplastičnih i antimikrobnih lijekova. Međutim, konvencionalnim liposomima nedostaje stabilnost i duže vrijeme zadržavanja *in vivo* pa su prijevremena curenja lijeka česta. Površinskim inženjerstvom stvoren je liposom obloženim Slp-om (protein S-sloja) koji pokazuje poboljšanu stabilnost membrane i gastrointestinalnu adheziju (Luo i sur., 2019).

Stoga, u posljednjih nekoliko godina raste broj istraživanja liposoma koji u svojoj membrani posjeduju proteine S-sloja.

Potrebno je napomenuti kako S-sloj postoji i u nekim patogenim bakterijama poput *Bacillus anthracis* (uzročnik antraksa), *Clostridium difficile* (uzročnik pseudomembranoznog kolitisa i dijareje nakon uzimanja antibiotika) i *Bacillus cereus* (uzročnik respiratorne infekcije slične antraksu). Radi se o sojevima kod kojih S-proteini mogu biti zaduženi za stvaranje biofilma (Gerbino i sur., 2015; Sleytr i sur., 2014; Pavkov-Keller i sur., 2011).

Probiotičke bakterije koje posjeduju S-sloj imaju prednost pri prolasku kroz gastrointestinalni sustav kao i prianjanju za epitelne stanice. Dovoljne količine probiotičkih bakterija moraju dospjeti u intestinalno područje kako bi imali terapijski učinak, stoga je ključno zaštititi ih od kiselog želučanog soka i probavnih enzima. Kako bi se bolje razumjela zaštita bakterija, provedena su istraživanja kojima se utvrđuje učinak S-sloja bakterija mliječnih kiselina za sposobnost agregacije, vezanja za epitel i otpornosti na probavne enzime. Učinjeno je uklanjanjem S-sloja s 5 različitih sojeva bakterija litijevim kloridom (5 M LiCl), a zatim su stanice ponovno podvrgnute testovima na otpornost, agregaciju i sposobnosti prianjanja za epitel. Dokazano je kako uklanjanje S-sloja utječe na auto- i koagregacijska svojstva, kod nekih sojeva sposobnost prianjanja je nestala (dokazana u sličnim istraživanjima). Proteini S-sloja imaju važnu ulogu u adheziji, ali odsutnost S-sloja više utječe na agregaciju nego sposobnost prianjanja (Alp i sur., 2020; Gerbino i sur., 2015).

2.4. MIKROINKAPSULACIJA

Oralnom primjenom probiotik prolazi kroz cijeli gastrointestinalni sustav koji je poprilično nepovoljan. Zaštita probiotičkih bakterija je neophodna jer se radi o živim, nepatogenim mikroorganizmima koji samo metabolički aktivni mogu ostvariti pozitivno djelovanje na ljudstvo zdravlje. Minimalna terapijska koncentracija preporučena od strane FDA koja mora dospjeti u intestinalni dio čovjeka iznosi 10^6 CFU/mL (Vivek i sur., 2023). Stoga, biotehnološko područje intenzivno istražuje i razvija nove metode zaštite probiotičkih sojeva. Metode mikro- i nanoinkapsulacije pokazale su obećavajuće rezultate, ali ne samo u području pakiranja probiotika već predstavlja budućnost prehrambene i farmaceutske industrije. Cilj mikroinkapsulacije probiotičkih bakterija je stvaranje fizičke barijere koja će štititi pakirane sojeve od vanjskih nepovoljnih utjecaja (zaštita od bakteriofaga, kiselog pH i niskih temperatura) te spriječiti pad broja stanica. Smanjuje se mogućnost kontaminacije, ali se

poboljšava stabilnost tijekom proizvodnje i skladištenja, a dodano su stanice zaštićene u procesu liofilizacije (Pavunc i sur., 2011).

Mikroinkapsulacija predstavlja fizikalno-kemijski i tehnološki proces u kojem sitne čestice ili kapljice/krutog materijala bivaju okružene omotačem ili ugrađene u homogeni ili heterogeni film polimerne matrice. Na kraju nastaju mikrokapsule kojima je cilj zadržati svojstva probiotičkih sojeva, ali i očuvanju dovoljnog broja stanica s bioterapeutskim učinkom (Pech-Canul i sur., 2020; Poshadri i Kuna, 2010). Prema veličini, kapsule se dijele na makro- ($>5000 \mu\text{m}$), mikro- ($0,2$ do $5000 \mu\text{m}$) i nano-kapsule ($<0,2 \mu\text{m}$) (Pech-Canul i sur., 2020). Mikrokapsula je sastavljena od polupropusne, čvrste stijenke koja omogućava transport metabolita i supstrata te se naziva nosačem, dok su mikrobne stanice raspršene u nosaču i tvore jezgru mikrokapsule (Frakolaki i sur., 2021; Pavunc i sur., 2011).

Postoje različite metode kojima se nastoji probiotičke stanice imobilizirati u svrhu postizanja otpornosti i zaštite. Sušenje raspršivačem jedna je od tehnika mikroinkapsulacije, pogodna za industrijsku primjenu (primjena u većim mjerilima). Princip tehnike zasniva se na raspršivanju emulzije ili suspenzije u sitne kapljice pomoću strujanja vrućeg zraka (Frakolaki i sur., 2021; Chavarri i sur., 2012). Koristi se kada je aktivni sastojak topiv u sredstvu za kapsuliranje i time tvori emulziju ili suspenziju, a otapalo je hidrokoloid (npr. želatina, modificirani škrob i dekstrin). Pomoću mlaznice ili rotacijskog raspršivača materijal jezgre raspršuje se u male kapljice (Chavarri i sur., 2012). Značajne faze su priprema disperzije, homogenizacija disperzije, raspršivanje dovodne disperzije i dehidracija atomiziranih čestica. Odnosno, bioaktivni sastojak koji je otopljen u otopini polimera biva zarobljen u osušenoj čestici (Rajagopal, 2009). Međutim, probiotički sojevi teško podnose visoke temperature i dehidraciju, stoga često dolazi do oštećenja membrane, što rezultira smanjenjem broja vijabilnih stanica (Heidebach i sur., 2012; Chavarri i sur., 2012). Izloženost stanica ekstremnom osmotskom stresu dovodi do niske stope preživljavanja, ali i stabilnosti za vrijeme skladištenja (Frakolaki i sur., 2021; Chavarri i sur., 2012).

Dvije metode koje se najčešće koriste u mljekarstvu su tehnika emulzije i tehnika ekstruzije. Emulzija obilježava disperzni sustav dviju tekućina koje se međusobno ne miješaju. Imobilizacija probiotika u dispergiranu tekućinu dovodi do njihove inkapsulacije koja je pogodna za preživljavanje uvjeta gastrointestinalnog sustava (Frakolaki i sur., 2021; Chavarri i sur., 2012). Tehnika se temelji na interakciji kontinuirane (uljna/organska faza) i diskontinuirane faze (disperzija stanica u polimernoj suspenziji na bazi vode). Diskontinuirana faza dodaje se kontinuiranoj do formiranja emulzije vode i ulja. U vodi topiv biopolimer

prevodi se u netopljiv dodatkom sredstva za skrućivanje (npr. kalcijev klorid) te dolazi do formiranja zrnca unutar uljne faze (Frakolaki i sur., 2021; Pech-Canul i sur., 2020; Chavarri i sur., 2012). Mliječni proteini koriste se za enzimsko inducirano geliranje jer posjeduje dobra svojstva geliranja. Dok s druge strane, primjena škroba s visokim udjelom amiloze poboljšava otpornost mikroznaca na visoke temperature. Osim probiotičkih mikroorganizama, minerali, enzimi i vitamini se ovom metodom inkapsuliraju (Vivek i sur., 2023). Veličina mikrokapsula definirana je brzinom miješanja dobivene smjese (Pech-Canul i sur., 2020). Primjer uspješno provedene tehnike emulzije zabilježeno je na stanicama *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* čije se preživljenje u gastrointestinalnom sustavu povećalo za 10^4 u emulziji sezamovog ulja (Vivek i sur., 2023).

Nadalje, fizička metoda inkapsulacije probiotičkih stanica u hidrokolojne materijale, poput alginata i karagenana je tehnika ekstruzije. Odvija se po principu prisilnog prolaska suspenzije bakterija s otopinom biopolimera kroz male otvore pod visokim pritiskom na uređajima za stvaranje kapljica, a kapljice se sakupljaju u otopini za skrućivanje (kalcijev klorid) (Frakolaki i sur., 2021). Proces je jeftin i jednostavan, stoga se često primjenjuje, a otopina biopolimera alginata i karagenana štite probiotičku kulturu od vanjskih stresova (npr. skladištenje). Tehnikom ekstruzije dobivaju se veće kapsule nego tehnikom emulzije, ali inače veličina mikrokapsula ovisi o promjeru otvora za kapljice, udaljenosti otvora, otopini za stvrdnjavanje i viskoznosti same smjese stanica (Vivek i sur., 2023; Heidebach i sur., 2012).

Odabir nosača ovisi o tehnici koja se primjenjuje za imobilizaciju i vrsti tvari/spoja koji se imobilizira, ali neki od najbolje zabilježenih nosača za imobilizaciju probiotičkih sojeva su:

- a) Alginat – heteropolisaharid izoliran iz morskih algi, sastavljen je od D-manuronske i L-guluronske kiseline, povezani β -1,4-glikozidnom vezom. Inače nisu topivi u vodi, ali zato natrijeve i magnezijeve soli alginata jesu.
- b) κ -karagenan – heteropolisaharid, sulfatirani galakton. Disaharid sastavljen od 1,3- β -d-galaktopiranoze-4-sulfata i 1,4-povezane-3,6-anhidro- α -d-galaktoze (Chavarri i sur., 2012).

Jednostavni mikrogelovi alginata sadrže velike pore koje omogućavaju difuziju iona vodika i enzima koji negativno djeluju na imobilizirane probiotike. Međutim, uključivanje magnezijeva hidroksida u mikrogelove kalcijeva alginata poboljšava se stabilnost u kiselom mediju (želučani sok) i stvara se neutralni pH unutar kapsule (Yao i sur., 2020).

2.5. NANOINKAPSULACIJA

Tradicionalne metode mikroinkapsuliranja imaju različite mane. Tehnikom sušenja raspršivanjem probiotici su izloženi visokim temperaturama i dehidracijskim stresom što rezultira padom broja bakterija. Uspoređujući tehniku ekstruzije s prethodnom, prevladavaju blaži uvjeti, međutim, pripremljene kapsule su relativno velike što otežava njihovu manipulaciju. Zato se tehnikom emulgiranja pripremaju mikrokapsule veličine 25 μm do 2 mm, ali zato je oblik teško kontrolirati (Xu i sur., 2022). Iz priloženog je vidljivo kako biotehnologija mora nastaviti potragu za novim tehnologijama imobilizacije probiotičkih bakterija, a jedna od ideja budućnosti je nanoinkapsulacija.

Riječ „nano“ dolazi od grčke riječi „patuljak“, a predstavlja 10^{-9} dio metra (Sekhon, 2010). Slična je mikroinkapsulaciji samo predstavlja proces imobilizacije u čestice nanometarske veličine (10 – 1000 nm). Brzina kojom se razgrađuju polimerne matrice i otpušta bioaktivni sastav ovisi o samoj veličini matrice. Veće čestice otpuštaju jezgru matrice sporije i kroz dulje vrijeme, dok redukcija veličine čestice dovodi do povećanja omjera površine i volumena što uzrokuje poboljšanu adheziju i reaktivnost (Xu i sur., 2022; Ezhilarasi i sur., 2013). Matrični sustav u kojima su bioaktivne komponente (jezgra) ravnomjerno raspoređene naziva se nanosfera, dok nanokapsula predstavlja polimernu membranu unutar koje se nalazi zatvorena bioaktivna komponentna (Pateiro i sur., 2021). Metoda predstavlja budućnost dostave terapijskih lijekova, dodataka prehrani i mnogih drugih bioaktivnih tvari (Walia i sur., 2019). U prehrambenoj industriji želja je nutriceutike (nanoceutike) pakirati u nanonosac jer smanjenjem veličine poboljšava se bioraspoloživost, topljivost i biološka aktivnost. Neki od poznatijih hidrofilnih nutriceutika su askorbinska kiselina i polifenoli, a lipofilni nutriceutici su likopen, β -karoten i lutein. Korišteni nanonosaci su biorazgradivi polimeri, a 3 najčešća su nanoliposomi, arheosomi i nanokohleati (Ezhilarasi i sur., 2013). U budućnosti probiotički sojevi bi mogli, zahvaljujući nanoinkapsulaciji, postati dio cjepiva (Sekhon, 2010).

Prirodni polimeri (npr. ugljikohidrati, guma i proteini) i sintetički polimeri mogu se koristiti kao nanostrukturni materijali za imobilizaciju probiotičkih sojeva. Nanoceluloza predstavlja netoksičan i biokompatibilan nanomaterijal. Dolazi u dva oblika: celulozni nanokristali i celulozna nanovlakna. Nanoceluloza korištena kao materijal za kapsuliranje poboljšava svojstva sustava za isporuku probiotika, a može poslužiti i kao krioprotektor. Hitozan je polikationski polisaharid koji je sastavni dio egzoskeleta člankonožaca. Kationska svojstva proizlaze iz strukture naizmjenično povezanih jedinica N-acetil-glukozamina i

glukozamina. Nanočestice hitozana pridobile su pažnju znanstvenika zbog dobre zaštite probiotika i poboljšanih mukoadhezivnih svojstava radi kojih se smatra idealnim kandidatom za razvoj sustava kontroliranog otpuštanja lijeka (Razavi i sur., 2021).

Metode nanoinkapsulacije koje pokazuju obećavajuće rezultate su elektrovrtnja (engl. *Electrospinning*) s nanovlaknima i metoda sloj-po-sloj (engl. *layer-by-layer, LbL*). Različiti polimeri poput polivinil alkohola (PVA), fruktooligosaharida (FOS)/PVA i alginata mogu se koristiti kao nanovlakna za elektrovrtnju. Primjenom nanovlakna na bazi alginata pokazala su visok stupanj preživljavanja u gastrointestinalnom okolišu (Razavi i sur., 2021). S druge strane, jednostavnija metoda koja pokazuje još bolje rezultate je metoda sloj-po-sloj koja se temelji na presvlačenju bakterijske stanice izmjeničnim kationskim (npr. hitozan) i anionskim (npr. alginat) polimerima putem elektrostatske interakcije. Metodom je zabilježena zaštita probiotika od žučnih soli i kiseline, što omogućuju proliferaciju imobiliziranih probiotičkih bakterija na crijevnim tkivima (Razavi i sur., 2021).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Prilikom izrade diplomskog rada korišteni su sojevi *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13. Radni mikroorganizmi izolirani su iz majčina mlijeka, a pripadaju Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK) te su prikazani u tablici 2.

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

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB13	MRS, 37 °C, anaerobno

3.1.2. Hranjiva podloga

Uzgoj i održavanje *Levilactobacillus* sojeva:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biovit“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvaščev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 801,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- MRS bujon („Biovit“, Italija) istog sastava kao i MRS agar, samo bez dodatka agara.

3.1.3. Kemikalije

- akrilamid, „Sigma“, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- bromfenol plavo, „Sigma“, SAD
- Coomassie Brilliant Blue, „Termo Fisher Scientific“, SAD
- destilirana voda, PBF, Hrvatska

- etanol 70 %, „Kemika“, Hrvatska
- etanol 96 %, „Kemika“, Hrvatska
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), „Sigma-Aldrich“, SAD
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- fruktooligosaharid (FOS), „Sigma Aldrich“, SAD
- galaktooligosaharid (GOS), „Biosynth“, Švicarska
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- kalcijev klorid, „Gram mol“, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev alginat, „Fluka“, Švicarska
- natrijev citrat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat (SDS), „Sigma“, SAD
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- obrano mlijeko, „Sigma Aldrich“, SAD
- pankreatin, „Fluka“, Švicarska
- pepsin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- poli(dialildimetilamonij klorid) (engl. *poly(diallyldimethylammonium chloride)*, *PDDA*), „Sigma-Aldrich“, SAD
- poli(stirensulfonat) (engl. *poly(styrenesulfonate)*, *PSS*), „Sigma-Aldrich“ SAD
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilen), „Sigma“, SAD
- Tris-HCl, „Invitrogen“, SAD
- žučne soli, „Difco“, SAD
- β-merkaptioetanol, „Sigma“, SAD

3.1.4. Pribor i aparatura

- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „Shimatzu“, Japan

- celulozna vata, „Lola Ribar“, Hrvatska
- centrifuga Centric 160, „Tehtenica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- igle, „B. Braun“, Njemačka
- kadica za elektroforezu, „Bio- Rad“, SAD
- kivete za centrifugiranje (15 mL i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- kivete za mjerenje zeta potencijala, „Malvern Panalytical“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- lijevak, „Normax“, Portugal
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, SAD
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio- Rad“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pincete, „Isolab“, Njemačka
- plastične tubice od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za tubice, „neoLab“, Njemačka
- sterilna gaza, „Konstill“, Slovenija
- šprice, „Chirana“, Slovačka
- temostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- vibromješač Vortex V-1 plus, „BioSan“, Latvija
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

- Zetasizer Ultra, „Malvern Panalytical“, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi BMK čuvani su na -80 °C u MRS bujonu uz dodatak 15 % glicerola (v/v). Dan prije izvođenja eksperimenta sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježu hranjivu podlogu te inkubirani u optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 2.

3.2.2. Mikroinkapsulacija sojeva *Levilactobacillus brevis* u natrijevom alginatu

Prekonočno uzgojene kulture *L. brevis* MB1 i MB13 uzgojene su propagacijom u MRS bujonu do volumena od 300 mL pri 37 °C u anaerobnim uvjetima. Stanice su centrifugirane 10 minuta pri 4200 o/min, a zatim isprane dva puta s 15 mL fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.10., resuspendiran u 15 mL 2 %-tne (w/v) otopine natrijeva alginata. Suspenzija bakterijskih stanica i alginata je, uz pomoć šprice i igle, ispuštena u 200 mL 1 %-tne otopine kalcijeva klorida uz miješanje na magnetnoj miješalici, prilikom čega dolazi do formiranja mikrokapsula (slika 2). Kuglice su ostavljene 1 sat na magnetskoj miješalici da očvrstnu, nakon čega je slijedilo ispiranje, pomoću lijevka i sterilne gaze, dva puta s fiziološkom otopinom i određivanje broja mikroinkapsuliranih stanica nakon oslobađanja iz mikrokapsula pomoću 2 %-tnog (w/v) natrijevog citrata i vorteksiranja. Broj stanica je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.10.

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):

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



Slika 2. Mikro kapsule soja *Levilactobacillus brevis* MB1 u alginatu nakon ispuštanja u 1 %-tnu otopinu kalcijeva klorida

3.2.3. Mikroinkapsulacija sojeva *Levilactobacillus brevis* u natrijevom alginatu uz dodatak prebiotika fruktooligosaharida i galaktooligosaharida

U svrhu što uspješnijeg preživljavanja mikroinkapsuliranih sojeva *L. brevis* MB1 i MB13, mikroinkapsulacija stanica u 2 %-tnom alginatu provedena je na način kako je opisano u poglavlju 3.2.2., ali uz dodatak prebiotika fruktooligosaharida (FOS) i galaktooligosaharida (GOS) u konačnoj koncentraciji od 5 % (w/v). Kao kontrola su korišteni mikroinkapsulirani sojevi MB1 i MB13 bez dodatka navedenih prebiotika.

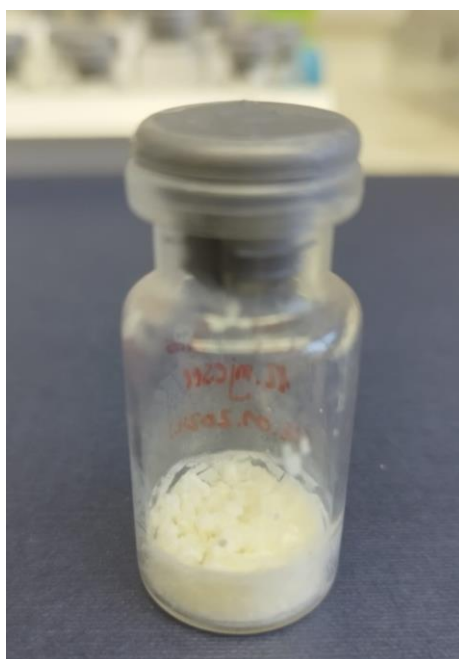
Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (EY) uz dodatak prebiotika izračunat je prema formuli navedenoj u poglavlju 3.2.2.

3.2.4. Ispitivanje preživljavanja mikroinkapsuliranih sojeva *Levilactobacillus brevis* tijekom liofilizacije te nakon 3 mjeseca skladištenja

Kako bi se ispitala uloga mikroinkapsulacije sojeva *L. brevis* MB1 i MB13 u alginatu, alginatu uz dodatak FOS-a te alginatu uz dodatak GOS-a tijekom preživljavanja procesa liofilizacije, po 1 gram mikroinkapsuliranih stanica sojeva MB1 i MB13 je odvagano u

penicilinke te je dodano obrano mlijeko koji služi kao lioprotektor (slika 3). Nakon smrzavanja na -80 °C, uzorci su liofilizirani. Takve liofilizirane mikrokapsule su tretirane s 2 %-tnim (w/v) natrijevim citratom kako bi se oslobodile stanice, a broj živih stanica nakon liofilizacije je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.10.

Broj živih stanica nakon liofilizacije te nakon 3 mjeseca skladištenja određen je indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.10., s prethodnim otpuštanjem stanica iz mikrokapsula dodatkom 2 %-tnog (w/v) natrijevog citrata.



Slika 3. Mikrokapsule soja *Levilactobacillus brevis* MB1 u alginatu nakon liofilizacije s obranim mlijekom kao lioprotektorom

3.2.5. Nanoinkapsulacija sojeva *Levilactobacillus brevis* „layer by layer“ (LbL) metodom

Prekonočno uzgojene kulture *L. brevis* MB1 i MB13 uzgojene su propagacijom u MRS bujonu do volumena od 300 mL pri 37 °C u anaerobnim uvjetima. Stanice su centrifugirane 10 minuta pri 4200 o/min, a zatim isprane dva puta s 25 mL sterilne deionizirane vode. Nakon ispiranja stanica, suspenzija pojedinih sojeva se raspodijelila u dva dijela – kontrola (stanice sojeva MB1 i MB13 koje neće biti podvrgnute procesu nanoinkapsulacije, tzv. slobodne stanice) i stanice sojeva MB1 i MB13 koje će se nanoinkapsulirati „layer by layer“ metodom. Dio suspenzija koji se inkapsulira je centrifugiran 5 min na 4200 o/min, talog stanica je resuspendiran u 15 mL otopine polimera pozitivnog naboja (PDDA; 2 mg/mL) te inkubiran 10 min. Nakon inkubacije, suspenzije su centrifugirane 5 min na 4200 o/min, a talozi stanica isprani dva puta sa sterilnom destiliranom vodom. Nakon ispiranja, talozi stanica su

resuspendirani u 15 mL otopine polimera negativnog naboja (PSS; 2 mg/mL) te inkubirani 10 min. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 5 min na 4200 o/min i talog bakterijskih stanica je ispran dva puta s deioniziranom vodom, čime su dobivene stanice sojeva MB1 i MB13 s jednim slojem polielektrolita. Kako bi se dobile nanokapsule s tri sloja, ovaj postupak se ponovio još dva puta.

3.2.6. Mjerenje zeta potencijala

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

3.2.7. Ispitivanje preživljavanja nanoinkapsuliranih sojeva *Levilactobacillus brevis* nakon procesa liofilizacije

Kako bi se ispitala uloga nanoinkapsulacije sojeva *L. brevis* MB1 i MB13 u preživljavanju procesa liofilizacije, suspenzije slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica sojeva MB1 i MB13 su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min. Dobiveni talozi resuspendirani su u odgovarajućem volumenu 10 %-tnog (w/v) obranog mlijeka. Po jedan mililitar dobivene suspenzije je prebačen u penicilinke te su uzorci smrznuti na -80 °C i podvrgnuti procesu liofilizacije. Broj živih slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica nakon liofilizacije je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.10., s prethodnim resuspendiranjem liofiliziranih stanica u 1 mL sterilne destilirane vode.

3.2.8. Preživljavanje mikro- i nanoinkapsuliranih sojeva *Levilactobacillus brevis* 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) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,5 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom.

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

3.2.8.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje mikro- i nanoinkapsuliranih sojeva *Levilactobacillus brevis*

Uzorci sojeva *L. brevis* MB1 i MB13 mikro- i nanoinkapsulirani te liofilizirani prema postupcima opisanim u poglavljima 3.2.2., 3.2.3., 3.2.4., 3.2.5. 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, a talog je resuspendiran u 3 mL fiziološke otopine. Nakon toga, dio suspenzije je uzet za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u želučanom soku, dok je ostatak suspenzije centrifugiran 5 min pri 4200 o/min. Talog je resuspendiran u 3 mL simuliranog soka tankog crijeva te inkubiran pri 37 °C tijekom 4 sata, nakon čega je dio suspenzije korišten za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u tankom crijevu. Broj stanica je određen indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.10., s tretmanom mikrokapsula s 2 %-tnim (w/v) natrijevim citratom kako bi se oslobodile stanice.

3.2.9. Ispitivanje stabilnosti S-proteina tijekom prolaska liofiliziranih mikrokapsula kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta primjenom natrij dodecil sulfat-poliakrilamidnog gel elektroforezom (engl. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*)

Mikrokapsule dobivene prema postupcima opisanim u poglavljima 3.2.2 i 3.2.3. su, nakon liofilizacije (opisano u poglavlju 3.2.4.) i prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a (opisano u poglavlju 3.2.8.), razbijene tretmanom s 2 %-tnim (w/v) natrijevim citratom kako bi se oslobodile stanice te kako bi se s oslobođenih stanica ekstrahirali površinski proteini i analizirali primjenom SDS-PAGE. Nakon tretmana s 2 %-tnim (w/v) natrijevim citratom, uzorci su centrifugirani (5 min pri 4200 o/min), a dobiveni talozi stanica su isprani dva puta s destiliranom vodom i resuspendirani u 50 µL 2 %-tne otopine SDS-a. Tako priređeni uzorci su prokuhani 10 min te centrifugirani (5 min pri 4200 o/min). U jažice unaprijed pripremljenog poliakrilamidnog (10 % (v/v)) gela, naneseo je 20 µL supernatanta u kojima su prisutni proteini. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 150 V tijekom 1,5 h. Kao standard je korišten ProSieve QuadColor Protein Marker koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu od 4,6 do 315 kDa. Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) 2 h, a zatim u otopini octene kiseline (10 % (v/v)) do obezbojenja pozadine.

Priprema poliakrilamidnog gela (10%):

Tablica 3. Popis kemikalija i njihovih volumena za izradu donjeg gela za separaciju u 100 mL kod SDS-PAGE metode

	Kemikalije	Volumen
Donji gel	Tris-HCl (pH 8,8)	82,5 mL
	Akrlamid	2,5 mL
	Destilirana voda	2,5 mL
	TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin):	5 µL
	APS (10 %)	38 µL

Tablica 4. Popis kemikalija i korištenih volumena za izradu gornjeg gela za sabijanje u 100 mL kod SDS-PAGE metode

	Kemikalije	Volumen
Gornji gel	Tris-HCl (pH 6)	82,13 mL
	Akrlamid	0,3 mL
	TEMED	5 µL
	APS (10 %)	22,5 µL

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

30 g Tris
144 g glicin
10 g SDS

3.2.10. 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 MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37 °C, izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka.

3.2.11. Obrada rezultata

Svi pokusi provedeni su u tri paralele nakon čega je u programu Microsoft Excel napravljena statistička analiza čime je određena srednja vrijednost te standardna devijacija koja je prikazana na grafovima u nastavku rada.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. MIKROINKAPSULACIJA SOJEVA *Levilactobacillus brevis* U NATRIJEVOM ALGINATU S PREBIOTICIMA I DETEKCIJA S-PROTEINA SDS-PAGE ELEKTROFOREZOM

Zbog različitih gastrointestinalnih poremećaja, koji zahvaćaju svakim danom sve veći broj ljudi, porasla je peroralna primjena probiotika. Najčešći pripravci su u obliku tvrdih kapsula koje sadrže žive liofilizirane bakterije mliječne kiseline. Međutim, postavlja se pitanje njihove učinkovitosti. Peroralnom primjenom probiotički sojevi moraju proći cijeli gastrointestinalni sustav koji započinje u usnoj šupljini, zatim prolaze ždrijelom, jednjakom, želucem i tankim crijevom, te dolaze do debelog crijeva gdje će primarno djelovati. Zbog dugog puta i surovog okruženja, mali broj probiotičkih sojeva zaista dođe do debelog crijeva. Potrebno je savladati niski pH želuca, probavne enzime u tankom crijevu iz gušterače, žučne soli iz žuči te motilitet svih organa probavnog sustava. Prije same konzumacije, probiotici moraju izdržati procesne uvjete proizvodnje, pakiranja i skladištenja. Pogotovo temperature iznad 45 °C koje uzrokuju redukciju vijabilnosti slobodnih probiotičkih bakterija prilikom obrade hrane (Oberoi i sur., 2021). Minimalan broj probiotičkih bakterija, koji mora biti prisutan u funkcionalnoj hrani prije konzumacije, kako bi se postigao terapijski učinak na čovjeka, iznosi više od 10^6 – 10^7 CFU/g ili CFU/mL (Oberoi i sur., 2021; Nasiri i sur., 2021; Li i sur., 2009). Budućnost predstavljaju procesi mikro- i nanoinkapsulacije kojima se probiotici pakiraju u mikro/nano kapsule te time omogućuju kontrolirano oslobađanje pri različitim uvjetima (Camelo-Silva i sur., 2022; Oberoi i sur., 2021). Stoga, cilj ovog rada bio je povećati vijabilnost probiotika, otpornost na nepogodan okoliš gastrointestinalnog sustava i produžiti vrijeme skladištenja.

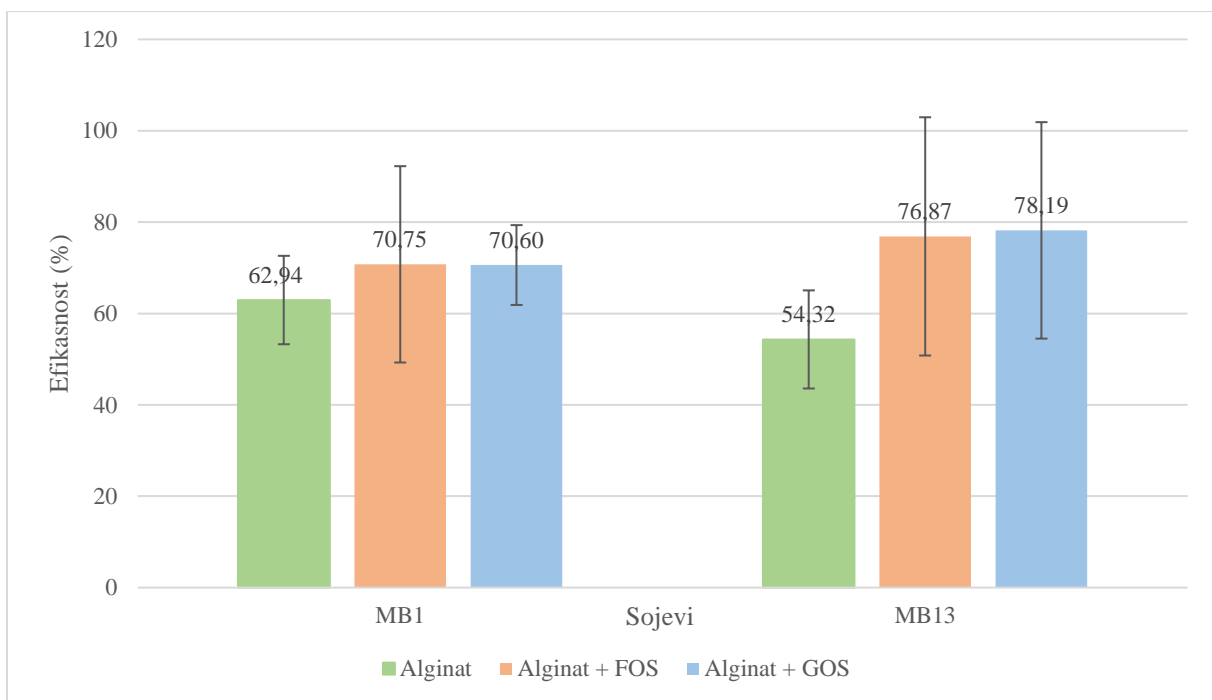
Alginat je jedan od češćih i boljih materijala za inkapsulaciju živih stanica zbog brojnih prednosti kao što su netoksičnost, niska cijena, jednostavnost i biokompatibilnost. S druge strane, alginatne kuglice su dovoljno porozne kapsule da u doticaju s izrazito niskim pH dolazi do smanjenja umreženih alginatnih matičnih sustava. Stanice tada nisu kompletno zaštićene, a uzrokovana je i brža razgradnja i oslobađanje aktivnih sastojaka (Camelo-Silva i sur., 2022; Oberoi i sur., 2021; Nasiri i sur., 2021; Li i sur., 2009). Prednost je reverzibilnost inkapsulacije koja podrazumijeva otapanje alginatnog gela izdvajanjem kalcijevih iona i time oslobađanje probiotičkih bakterija (Li i sur., 2009). Postoje mnoga istraživanja koja vrše mikroinkapsulaciju s alginatom, ali uz dodatak različitih prebiotika kako bi osigurali veću stabilnost i otpornost probiotika. Često su istraživanja vršena kombinacijom alginata i hitozana (engl. *chitozan*) kao

materijalom mikroinkapsulacije. Nadalje, korištenjem prebiotika, poput oligosaharida, dokazana je veća stopa preživljenja probiotičkih sojeva nakon prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog sustava te produljeno vrijeme skladištenja (Camelo-Silva i sur., 2022). Istraživanje Nasirija iz 2021. predlaže korištenje sluzi sjemena divlje kadulje kao novog prebiotskog kandidata za vrijeme mikroinkapsulacije s alginatom. Rezultati pokazuju dobru otpornost na gastrointestinalne uvjete, ali bez testiranja na probavne enzime. U radu je predstavljena ideja korištenja drugačijih i nestandardnih sastojaka mikroinkapsulacije što može predstavljati budućnost inkapsulacije funkcionalne hrane (Nasiri i sur., 2021). Stoga, korištenje alginata uz različite prebiotike može uvelike poboljšati stabilnost, otpornost i produljiti vrijeme skladištenja probiotika. Konkretno u ovom radu koristio se natrijev alginat kao glavni polimer, a kao prebiotici korišteni su fruktooligosaharid i galaktooligosaharid. Prebiotici na život probiotika mogu pozitivno djelovati na tri načina: kao izvor ugljika koji će osigurati rast bakterija, kao apsorberi vode što će produljiti vrijeme skladištenja i treći način koji podrazumijeva stvaranje zaštitne barijere oko bakterija što će povećati stopu preživljenja (Camelo-Silva i sur., 2022).

Istraživanje ovog rada vršeno je u tri paralele za svaki soj. Prva mikroinkapsulacija je *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 s alginatom koja ujedno predstavlja kontrolu. Druga mikroinkapsulacija je u alginatu s prebiotikom fruktooligosaharidom, dok treća predstavlja mikroinkapsulaciju u alginatu s galaktooligosaharidom. Mikroinkapsulirane stanice sojeva *L. brevis* MB1 i MB13, pripremljene su prema postupku opisanom u poglavljima 3.2.2. i 3.2.3., podvrgnute su procesu liofilizacije, a zatim su testirane na uvjete želučanog soka i simuliranog soka gastrointestinalnog sustava. Nadalje, testirano je preživljenje nakon 3 mjeseca. Pratio se rast kolonija naciepljenih na MRS agar u dvije paralele do osmog razrijeđena na temelju čega se izračunala CFU/mL vrijednosti. Postotak preživljenja izračunat je usporedbom CFU/mL vrijednosti dobivenim prije i nakon mikroinkapsulacije (slika 4), nakon mikroinkapsulacije i nakon liofilizacije (slika 5), nakon liofilizacije i prolaska kroz želučani sok (slika 6) te naposljetku kroz ukupne simulirane uvjete gastrointestinalnog sustava (slika 7). Nadalje, vrijednosti CFU/mL nakon liofilizacije i nakon tri mjeseca skladištenja, korištene su u svrhu izračunavanja postotka preživljenja koje je prikazano na slici 8. Naposljetku, SDS-PAGE metodom su detektirani S-proteini kako bi se provjerilo je li došlo do promjena ili razgradnje u S-sloju, točnije S-proteina zaduženih za adheziju i terapijski učinak.

U svrhu praćenja uspješnosti mikroinkapsulacije ispitan je postotak preživljenja nakon mikroinkapsulacije čiji su rezultati prikazani na slici 4, a ujedno predstavlja i efikasnost

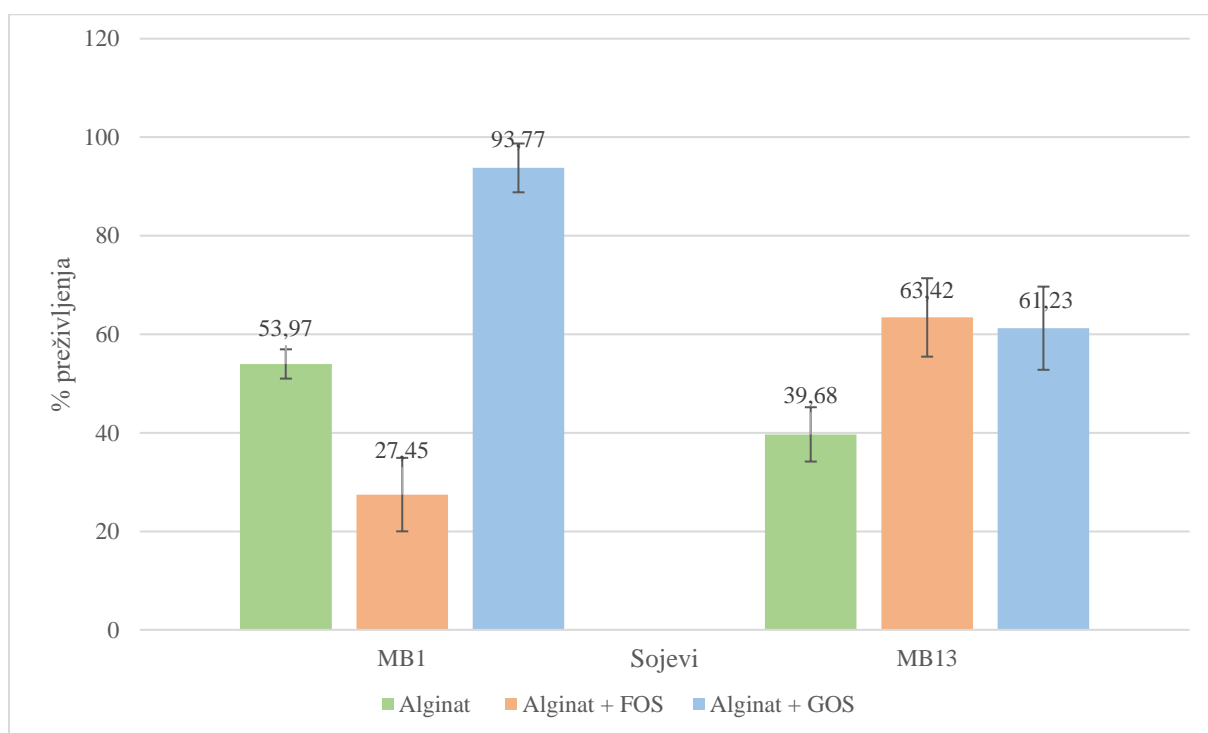
mikroinkapsulacije (formula prikazana u poglavlju 3.2.2.). Iz grafa je vidljivo kako je preživljenje svih sojeva između 50 % i 80 % nakon procesa mikroinkapsulacije. Najslabiji rezultat zabilježen je za kontrolnu skupinu soja MB13 koja sadrži samo alginat i preživljenje je manje od 60 %. Međutim, nije zabilježena statistički značajna razlika. Efikasnost mikroinkapsulacije u alginatu zabilježena je u nekoliko radova, te su dobiveni podaci ovog rada u skladu s prethodno provedenim sličnim istraživanjima. Također, mikroinkapsulacija s prebioticima premašuje 70 % preživljenja, a time su se prebiotici pokazali učinkovitijim u samom procesu stvaranja kapsula i stanice nisu naknadno oštećene.



Slika 4. Efikasnost mikroinkapsulacije sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 u alginatu, alginatu s fruktooligosaharidom (FOS) i alginatu s galaktooligosaharidom (GOS)

Liofilizacija predstavlja proces koji se odvija u tri faze i to su smrzavanje, sublimacija i desorpcija. Svrha procesa je sušenje, odnosno uklanjanje viška vode koja se najprije zamrzne, a onda sublimira. Prilikom liofilizacije živih stanica potrebno je koristiti lioprotektore, kao što je, primjerice, u ovom istraživanju korišteno obrano mlijeko. Svrha lioprotektora je inhibicija stvaranja leda i ledenih kristalića unutar stanice za sprječavanje denaturacije proteina i oštećenja stanice. Proces se često koristi u farmaceutskoj industriji kako bi se produžio rok trajanja proizvoda (npr. cjepiva). Koristan je i u prehrambenoj industriji kod izrade astronautske hrane. Dokazano je kako proces liofilizacije održava bolju stabilnost živih stanica od slobodnih stanica, kao i produljenje vremena skladištenja inkapsuliranih probiotika (Camelo-Silva i sur., 2022; Gaidhani i sur., 2015; Serna-Cock i Vallejo-Castillo, 2013; Li i sur., 2009). Stvorene

mikrokapsule podvrgnute su procesu liofilizaciji, a postotak preživljenja prikazan je na slici 5. Liofilizacija se najboljom pokazala kod soja MB1 u kombinaciji s galaktooligosaharidom, gdje je zabilježen postotak preživljenja od 93,8 %. Najlošiji rezultat je kod MB1 s alginatom i fruktooligosaharidom s 27,45 % preživljenja. Pretpostavka je bila da će mikrokapsule s prebioticima biti više zaštićene, što bi im pružalo veće preživljenje procesa liofilizacije. Međutim, moguće da je došlo do pogreške u radu s uzorkom MB1 alginat + FOS te su zato zabilježene niže vrijednosti preživljenja od kontrole. Dok je za MB13 pretpostavka zadovoljena, odnosno dokazano je da će bakterijske stanice, procesom liofilizacije, biti više zaštićene uz prisutnost prebiotika. Drugim riječima, zabilježeno preživljenje je više od 60 %.

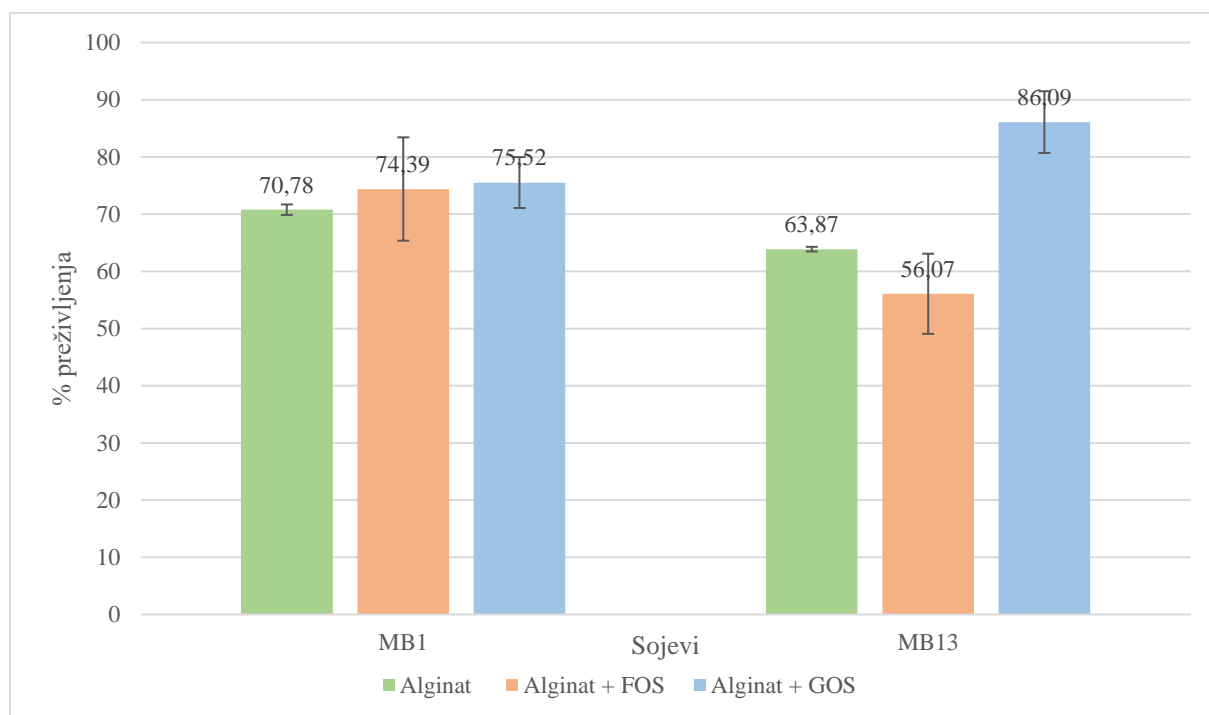


FOS – fruktooligosaharid; GOS – galaktooligosaharid

Slika 5. Postotak preživljenja sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 nakon procesa liofilizacije

Nakon liofilizacije sve tri paralele mikrokapsula oba soja podvrgnute su simuliranom želučanom soku vrlo niskog pH (slika 6) te simuliranim sokom gastrointestinalnog sustava (slika 7). Na slici 6 sojevi MB1 i MB13 pokazuju visoku otpornost na niski pH želučanog soka, a postotak preživljenja je kod svih uzoraka veći od 50 %. Preživljenje mikroinkapsuliranih MB1 bakterija s prebioticima nakon liofilizacije i prolaska kroz želučani sok je više od 70 %, što predstavlja visoke vrijednosti preživljenja. Međutim, vrijednosti s prebioticima ne razlikuju se značajno od kontrolne vrijednosti koja također premašuje preživljenje od 70 %. Iako je soj MB1

za sve tri paralele postigao visoke vrijednosti preživljenja, prebiotici nisu imali značajan utjecaj na povećanje vrijednosti preživljenja. S druge strane, kod soja MB13 zabilježeno je nešto manje preživljenje uzorka alginat + FOS (56 %), međutim, za uzorak alginat + GOS zabilježen je najveći postotak preživljenja od 86,09 %. Bilo kakvim oblikom inkapsulacije, a pogotovo dodatkom prebiotika, poboljšala se otpornost na kiseli pH želuca. Međutim, za kontrolu su se očekivale manje vrijednosti zbog alginatne nestabilnosti u kiselom pH, ali i poroznosti da propušta kiseli sadržaj u samu kapsulu (Shi i sur., 2013). GOS se pokazao boljim prebiotikom od FOS-a u ispitivanju preživljenja u simuliranom želučanom soku.

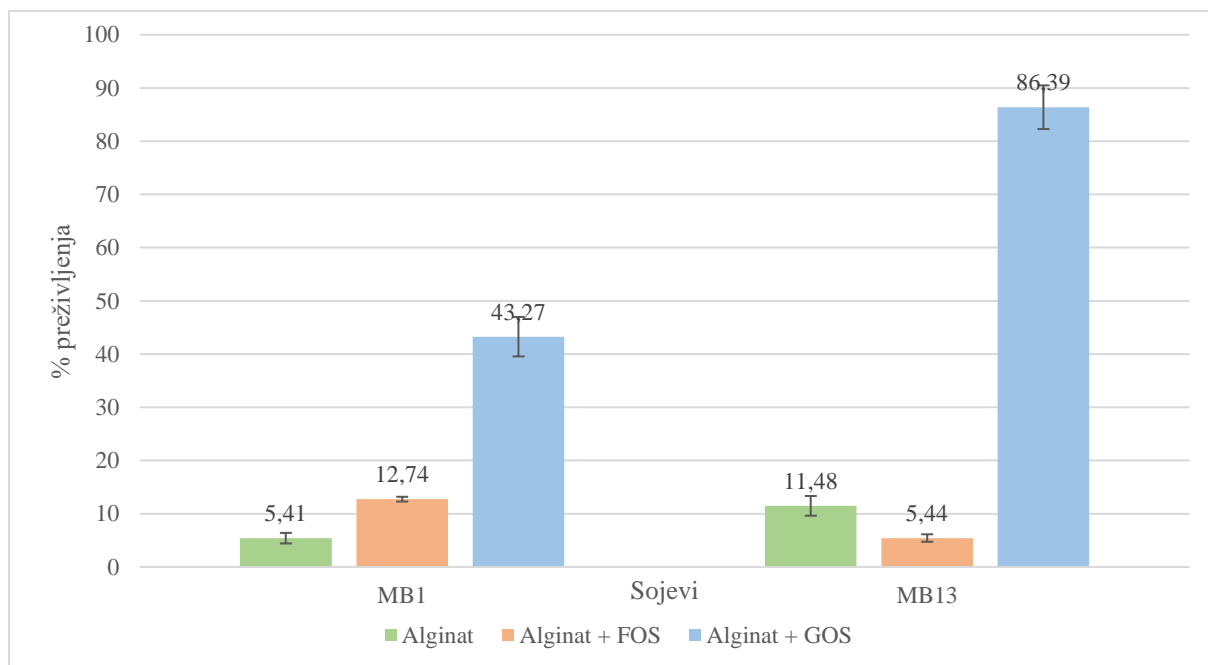


FOS – fruktooligosaharid; GOS – galaktooligosaharid

Slika 6. Postotak preživljenja mikroinkapsuliranih i liofiliziranih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 nakon što su stanice izložene želučanom soku

S druge strane, promatrajući uzorke MB1 i MB13 nakon tretiranja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava, što uključuje simulirani želučani sok i simulirani sok tankog crijeva, zabilježen je pad preživjelih stanica, odnosno pad postotka preživljenja za alginat i alginat + FOS kod oba soja. Fruktooligosaharid jedan je od poznatijih prebiotika koji poboljšava vijabilnost probiotika, a o tome postoje radovi koji potvrđuju znatnu sinergiju prebiotika FOS-a i alginata unutar mikrokapsula s *Lactocaseibacillus rhamnosus* što pruža bakteriji zaštitu od nepovoljnih uvjeta (Azam i sur., 2020). U drugom radu smatra se da je FOS pridonio boljem umrežavanju što je uzrokovalo još veću zaštitu bakterija, točnije *Lactobacillus*

acidophilus (Silva i sur., 2018). Očekivane su više vrijednosti za mikrokapsule alginat + FOS MB13. Uzorak je pokazao manji postotak preživljenja u odnosu na kontrolu, iako i ovdje postoji mogućnost da je došlo do pogreške koja se protegnula s ispitivanja na želučani sok na testiranje u simuliranom soku cijelog GIT-a. Postoje radovi koji potvrđuju uspješnu zaštitu *Lactobacillus* sojeva mikroinkapsuliranih samo s alginatom, ali minimalno u usporedbi s kombinacijom alginata i drugih polimera/oligosaharida npr. alginat-hitozan mikrokapsulama (Abdulzhanova i sur., 2019; Muthukumarasamy i sur., 2005). S druge strane, prebiotik galaktooligosaharid pokazao se iznimno uspješnom zaštitom *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 sojeva, a pogotovo kod MB13 soja s preživljenjem od 86,39 % (slika 7). Konkretno, za mikroinkapsulaciju s galaktooligosaharidom nedostaju podaci istraživanja drugih znanstvenika kako bi se dobiveni rezultati mogli usporediti. Radi se o prebiotiku s visokim potencijalom za buduće primjene zbog njegove otpornosti na gastrointestinalne uvjete što pruža bolju zaštitu *Levilactobacillus brevis* sojeva uz osiguranje visokih vrijednosti preživljenja nakon prolaska kroz cijeli probavni sustav i dolaska na ciljno mjesto tj. debelo crijevo. Nadalje, potvrdno istraživanje mikroinkapsulacije metodom ekstruzije na *Lactobacillus bulgaris* pokazala je da se mikrokapsulama alginat-mlijeko može povećati otpornost na gastrointestinalne uvjete, pogotovo pri pH 2 želuca (Shi i sur., 2013).



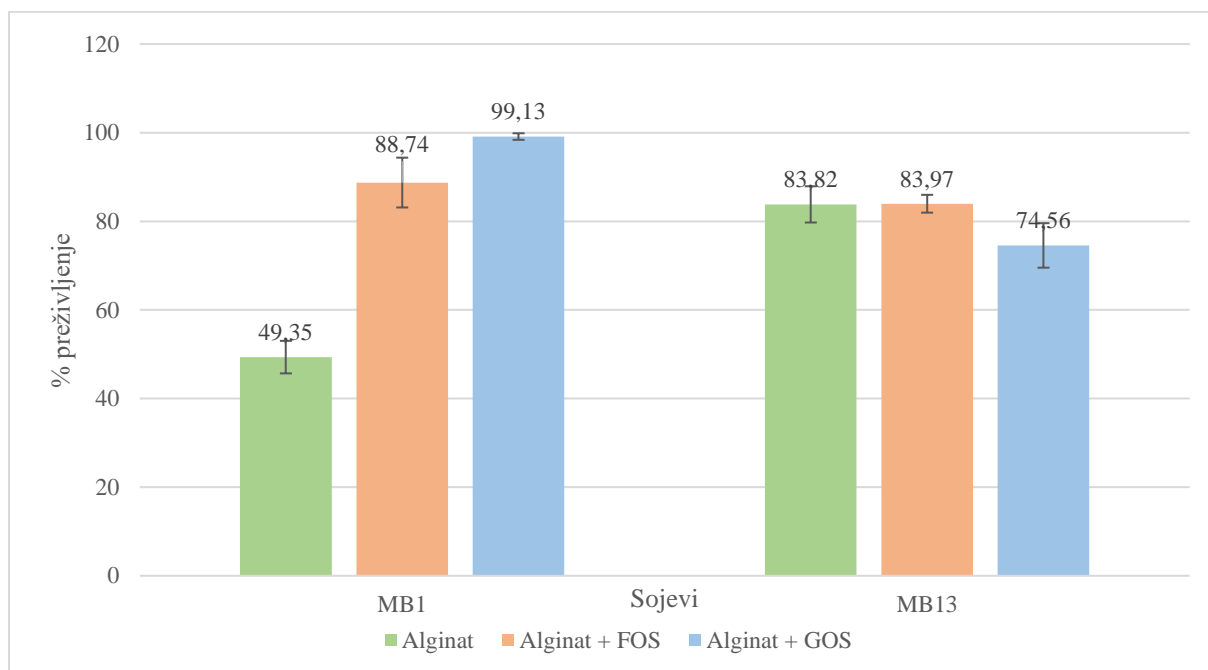
FOS – fruktooligosaharid; GOS – galaktooligosaharid

Slika 7. Postotak preživljenja mikroinkapsuliranih i liofiliziranih *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 sojeva nakon izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava

Dong i sur. (2020) testirali su otpornost mikroinkapsuliranih sojeva *Lactiplantibacillus plantarum* uz dodatak pektina i maltodekstroze tehnikom emulzije. Mikrokapsule su stavljene u tijesto za kolačiće (engl. *cupcakes*) koji su podvrgnuti visokim temperaturama pečenja te simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava. Mikroinkapsulirani probiotici s prebioticima pokazali su veće preživljenje u odnosu na kontrolne stanice. Prebiotička komponentna ojačala je mrežu mikrokapsula i pomogla u zaštiti vijabilnosti *L. plantarum*. Također, vrlo visoka temperatura nije utjecala na promjenu senzoričkih osjeta (Dong i sur., 2020). U budućnosti će se moći kombinirati probiotici s različitom hranom, čak i onom koja mora biti izložena visokoj temperaturi. Upravo ovaj rad dokazuje izdržljivost mikroinkapsuliranih bakterija pri visokim temperaturama, a u nastavku rada i izdržljivost na niske temperature skladištenja.

Osim otpornosti mikroinkapsuliranih probiotika s prebioticima, ispitivalo se i preživljenje liofiliziranih mikrokapsula nakon tri mjeseca inkubacije na + 4 °C što predstavlja temperaturu skladištenja. Rezultati su prikazani na slici 8 na kojoj je zabilježen neobičan trend. Kod soja MB1 najmanje preživljenje je zabilježeno kod kontrole (samo s alginatom) što je i očekivano, dok se kod MB13 kontrola pokazala najuspješnijom, odnosno, s najvećim postotkom preživljenja nakon tri mjeseca skladištenja uspoređujući s vrijednostima za FOS i GOS. Očekivane su niže vrijednosti za kontrolu kod oba soja, dok bi kombinacije s prebiotikom trebale imat veće preživljenje. Preživljenje od 99 % zabilježeno je kod MB1 alginat + GOS, ali prati ga i uzorak FOS s 89 % preživljenja. Većina ispitivanja mogućeg vremena skladištenja mikroinkapsuliranih probiotika s prebioticima provodi se unutar 30 dana. U radu Dong i sur. (2020) provedeno je i ispitivanje mogućnosti skladištenja mikrokapsula *L. plantarum* s pektinom (prebiotik) i maltodekstrinom u tijestu. Veći broj vijabilnih stanica zabilježen je nakon vremena skladištenja, a autori smatraju da su probiotici u kolaču poslužili kao biokonzervansi (Dong i sur., 2020). Nadalje, mikroinkapsulacija *Lacticaseibacillus paracasei* s FOS-om u matrici kalcijeva alginata i želatinom kao materijalom za oblaganje je nakon 35 dana skladištenja na + 4 °C pokazala bolje rezultate stabilnosti i preživljenja od slobodnih stanica (Conceição i sur., 2021). Znači da prebiotici imaju utjecaj na probiotike za vrijeme skladištenja, a posebno FOS koji je u ovom radu nakon tri mjeseca održao preživljenje iznad 80 % u oba ispitana soja. Rad Silve i suradnika iz 2017. godine podržava činjenicu da sinbiotsko mikroinkapsuliranje s FOS-om osigurava veću vijabilnost *L. acidophilus* tijekom skladištenja u jogurtu. Objasňuje da FOS tvori poboljšanu mrežu jer je popunio intersticijske prostore u matrici, samim time su manje pore i bakterije su bolje zaštićene (Silva i sur., 2018).

Mikroinkapsulacija se pokazala dobrom tehnikom koja će poslužiti u osiguravanju dužeg roka trajanja proizvoda s probioticima.



FOS – fruktooligosaharid; GOS - galaktooligosaharid

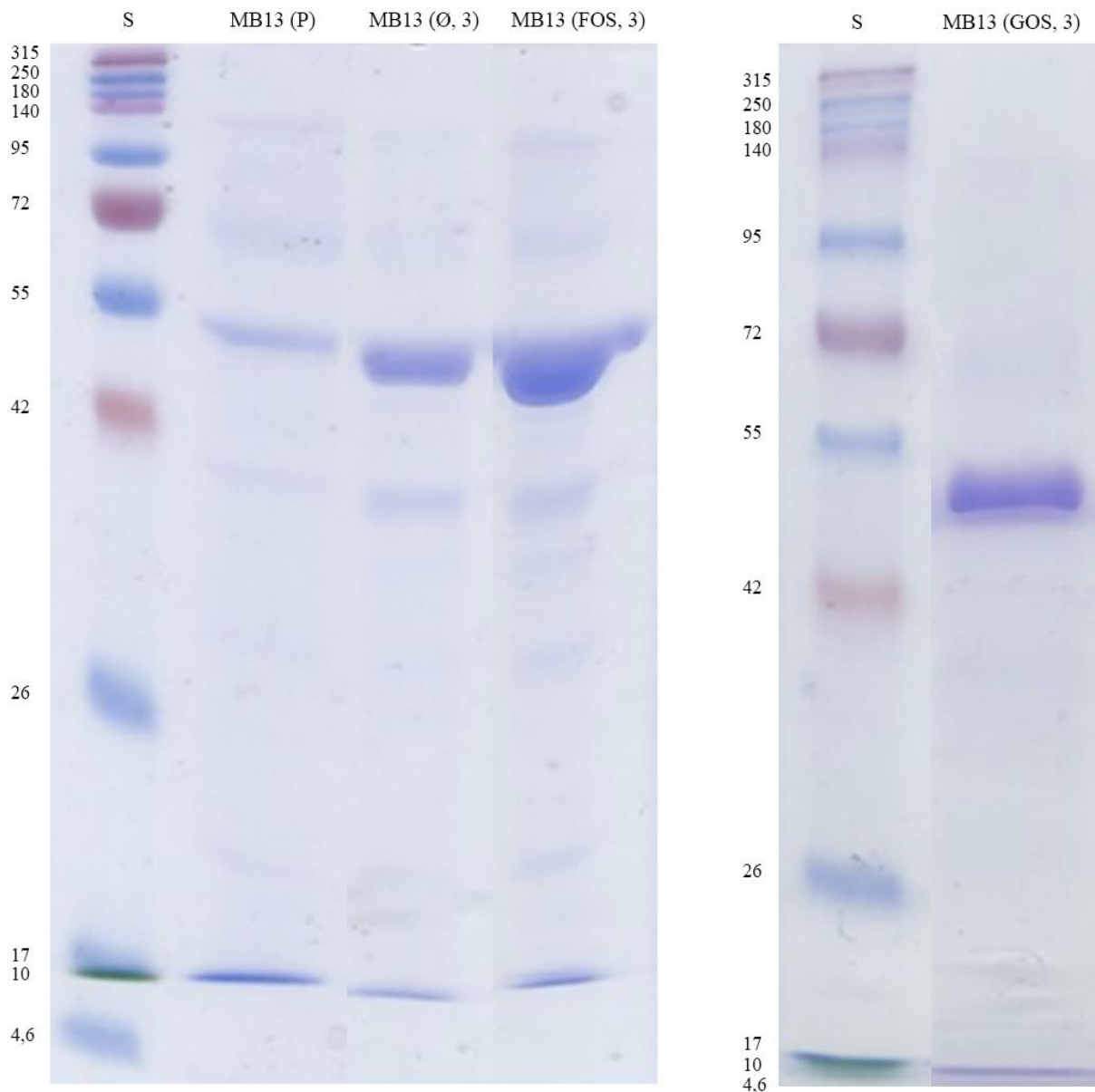
Slika 8. Postotak preživljenja liofiliziranih mikro kapsula s *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 sojeva nakon 3 mjeseca skladištenja

4.1.1. S-proteini soja MB13 nakon mikroinkapsulacije, liofilizacije i izlaganja gastrointestinalnim uvjetima

Nakon ispitane otpornosti mikrokapsula s *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13, bilo je potrebno ispitati opstanak S-proteina tijekom postupka mikroinkapsulacije i liofilizacije te prolazak kroz simulirani gastrointestinalni trakt. Sposobnost adhezije jedno je od važnih svojstva bakterija da bi bile probiotici. S-proteini, koji su dio S-sloja, posjeduju važnu ulogu u sposobnosti adhezije probiotičkih sojeva za crijevni epitel, ali i mogućnost kompeticije s patogenim bakterijama. Ispitivanje prisutnosti S-proteina je ključno zbog činjenice da se slobodnim stanicama, nakon prolaska kroz GIT te, pad vijabilnosti, smanji ekspresija različitih proteina te iz tog razloga poželjna koinkapsulacija (Nazzaro i sur., 2009).

Detekcija S-proteina izvršena je pouzdanom SDS-PAGE metodom. SDS-PAGE elektroforeza označava kvalitativnu analizu proteina, praćenje pročišćenosti i determinaciju relativne molekulske mase. Uzorak se najprije termički obrađuje i tretira s anionskim detergentom tj. natrijevim dodecil sulfatom (SDS) i redukcijskim sredstvom u svrhu dobivanja denaturiranih proteina. Za dobivanje bendova potrebno je koristiti dva gela, od kojih prvi predstavlja sabijajući gel, a drugi razdvajajući. Sabijajući gel ima velike pore koje omogućavaju slobodno kretanje proteina i njihovo sabijanje, a zatim nastupa razdvajajući gel pomoću kojeg se mogu bendovi kasnije usporediti sa standardom i odrediti njihova molekulska masa. Razdvajanje se odvija na temelju veličine proteina, tako da će se veći proteini sporije kretati i bit će pri vrhu gela, dok će se manji proteini kretati brže i bit će vidljivi na kraju gela. Cijeli proces se odvija propuštanjem električne struje pokrećući uzorak prema anodi.

Slika 9 prikazuje prisutnost S-proteina izoliranih s površine soja MB13 prije mikroinkapsulacije, pa soj MB13 s alginatom, MB13 s alginatom i FOS-om i MB13 s alginatom i GOS-om, ali sve nakon procesa mikroinkapsulacije, liofilizacije te GIT-a. Kod sva četiri uzorka vidljiv je veliki bend oko 55 kDa što predstavlja S-protein. Jači signal benda zabilježen je kod FOS-a i GOS-a u usporedbi s MB13 u alginatu (Ø). 55kDa je u skladu s veličinom samih S-proteina oni mogu varirati od 40 – 170 kDa, a S-proteini *Lactobacillus* bakterija su u rasponu 25 – 75 kDa (Sleytr i sur., 2014; Hynönen i Palva, 2013). Može se zaključiti da su mikroinkapsulacijom očuvani S-proteini koji će iskazati adhezivno djelovanje na epitelne stanice gastrointestinalnog trakta. Simulirani uvjeti GIT-a nisu utjecali gubitkom S-proteina prisutnih na površini stanica soja *L. brevis* MB13. Također, može se povući paralela sa sojem *L. brevis* MB1 te zaključiti da mikroinkapsulacija, liofilizacija i simulirani uvjeti GIT-a nisu utjecali na stabilnost S-proteina koje eksprimira MB1.



S – standard; P – soj prije mikroinkapsulacije; Ø – soj u alginatu; 3 – sojevi nakon mikroinkapsulacije, liofilizacije i GIT-a; FOS – fruktooligosaharid; GOS – galaktooligosaharid

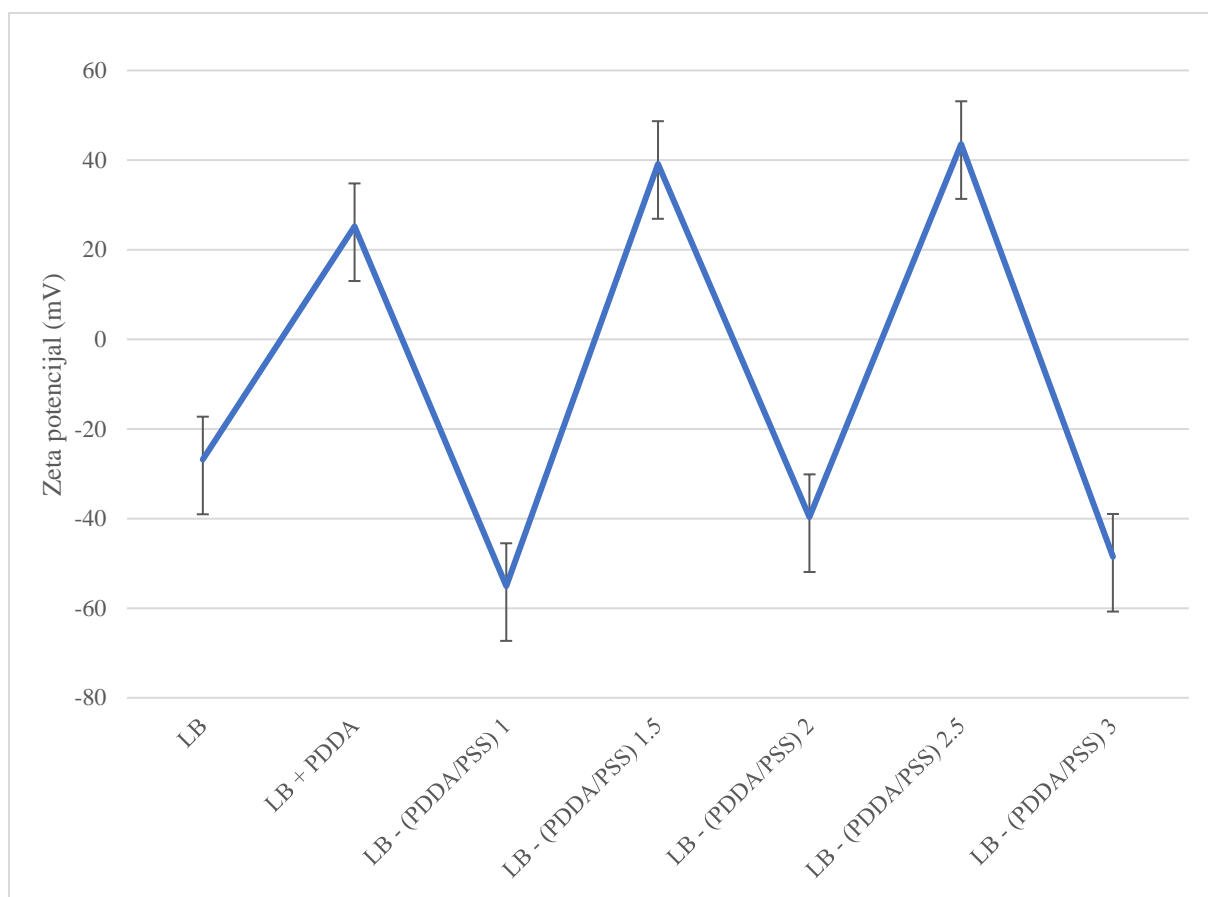
Slika 9. Rezultati SDS-PAGE elektroforeze u svrhu detekcije promjena S-proteina nakon mikroinkapsulacije, liofilizacije, simuliranog želučanog soka i simuliranih uvjeta gastrointestinalnog sustava za *Levilactobacillus brevis* MB13

4.2. NANOINKAPSULACIJA SOJEVA *Levilactobacillus brevis* „LAYER-BY-LAYER“ TEHNIKOM I TESTIRANJE NA UVJETE GASTROINTESTINALNOG SUSTAVA

Mikroinkapsulacija se kao tehnika zaštite probiotika pokazala vrlo dobrom, međutim posjeduje nekoliko mana. Veliki je izazov stvoriti zaštitu za probiotičke sojeve zbog udovoljavanja različitih uvjeta. Kako bi inkapsulacija bila uspješna, stanice moraju biti vijabilne nakon samog procesa inkapsulacije, pa time i sami radni uvjeti moraju biti blagi. Slojevi kapsuliranja moraju biti dovoljno otporni na različite uvjete GIT-a uz zadržana senzorna svojstva (Priya i sur., 2011). Tehnika nanoinkapsulacije pokazala se uspješnom u području zaštite lijekova ili cjepiva, odnosno bioloških agensa, od razgradnje prilikom prolaska kroz gastrointestinalni sustav nakon peroralne administracije (Wang i sur., 2019).

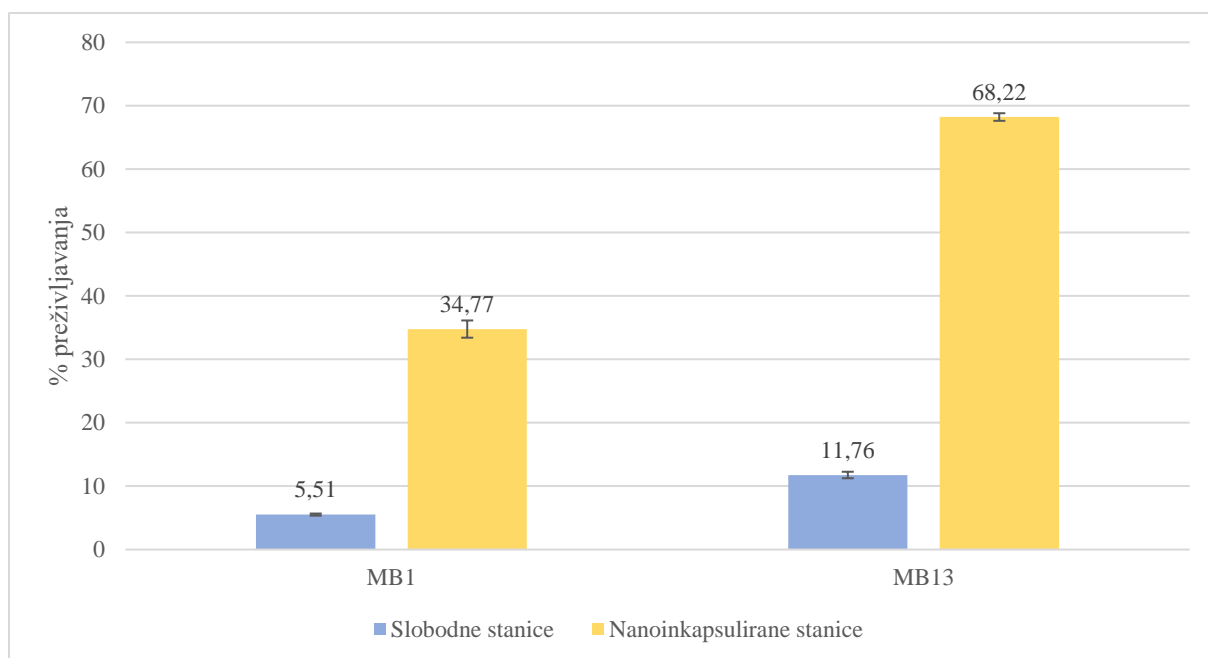
Ispitivanje stabilnosti nanokapsula rađeno je u dvije paralele, od kojih prva predstavlja kontrolu sa slobodnim stanicama, a druga nanoinkapsulirane stanice. Nanoinkapsulacija je vršena prema prethodno opisanom protokolu iz poglavlja 3.2.5. „layer by layer“ (LbL) metodom koristeći poli(dialildimetilamonij klorid) (PDDA) i poli(stirensulfonat) (PSS). Uspješnost formiranja nanokapsula praćena je mjerenjem zeta potencijala. Otpornost stanica nakon nanoinkapsulacije pratio se rastom kolonija na MRS agaru za dobivanje vrijednosti CFU/mL koje su se koristile u izračunu postotka preživljenja. Za sliku 11 korištene su CFU/ml vrijednosti prije i nakon liofilizacije, za sliku 12 korištene su vrijednosti nakon liofilizacije i želučanog soka, dok je za sliku 13 CFU/mL korišten nakon liofilizacije i simuliranih uvjeta gastrointestinalnog sustava. Slobodne stanice predstavljaju kontrolu, tj. stanice prije nanoinkapsulacije, te su vrijednosti uspoređene s nanoinkapsuliranim bakterijskim stanicama.

Adsorpcija svakog sloja u LbL tehnici očituje se promjenom površinskog naboja nakon adsorpcije pojedinog sloja, a prati se mjerenjem zeta potencijala, kao što je prikazano na slici 10. Zeta potencijal predstavlja svojstvo koloidnih čestica i predstavlja potencijal difuznog sloja iona oko nabijene čestice koja je također koloid. Tako da je ukupni potencijal bakterije negativan, a razlog tomu je prisutnost kiselih skupina na površini stanične stijenke, što je vidljivo iz grafa, ali i potvrđeno u radu iz 2011. autora Priya i sur. Negativna površina predstavlja supstrat za prvi polikationski sloj PDDA, a zatim polianionski sloj PSS koji potpuno neutralizira naboj PDDA. Izmjena negativnih i pozitivnih vrijednosti zeta potencijala prikazana je na slici 10, što ukazuje na uspješno provedenu LbL tehniku inkapsulacije. Raspon potencijala kreće se od -55 mV do 43 mV.



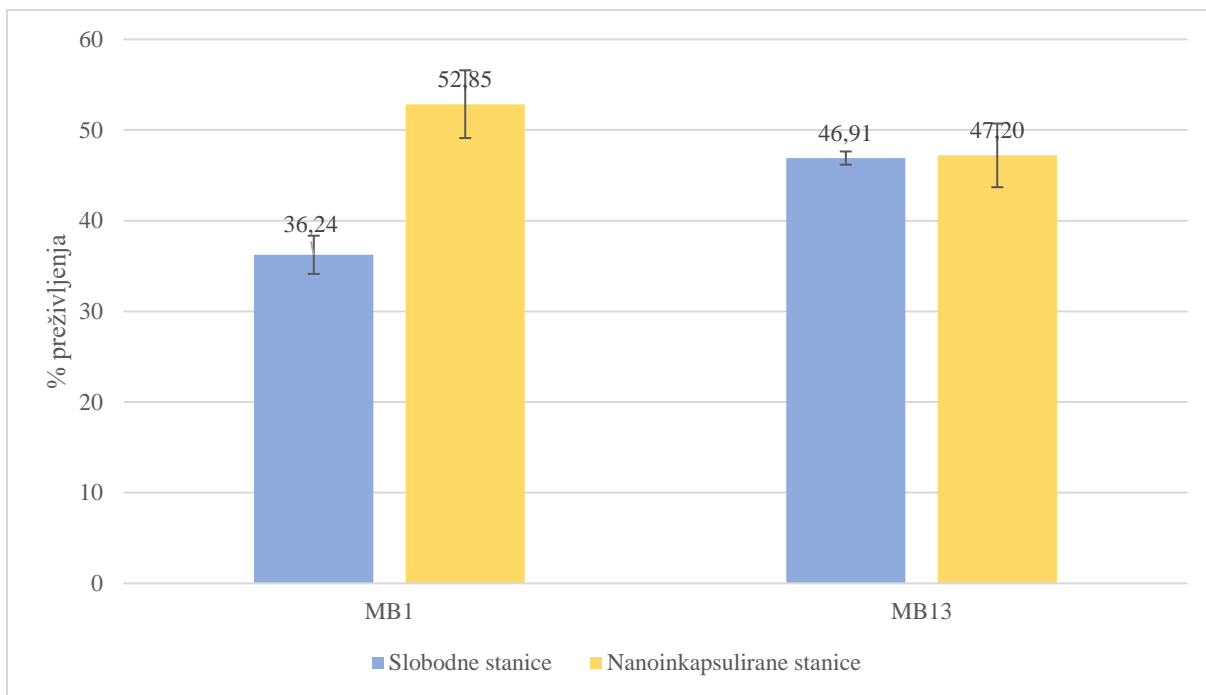
Slika 10. Uspješnost nanoinkapsulacije praćena promjenama zeta potencijala nakon svakog dodatka novog sloja poli(dialildimetilamonij klorid) (PDDA) i poli(stirensulfonat) (PSS) na površini *Levilactobacillus brevis* (LB)

Stvorene nanoćestice, kao i slobodne stanice, podvrgnute su procesu liofilizacije, a iz slike 11 vidljiv je manji gubitak vijabilnosti kod nanoinkapsuliranih stanica, odnosno zabilježeno je njihovo veće preživljenje. Razlog tomu je prisutnost nanoslojeva koji pružaju zaštitu od oštećenja stanične membrane tijekom procesa zamrzavanja, a inače je glavni uzrok stanične smrti kako navode Priya i sur. (2011).

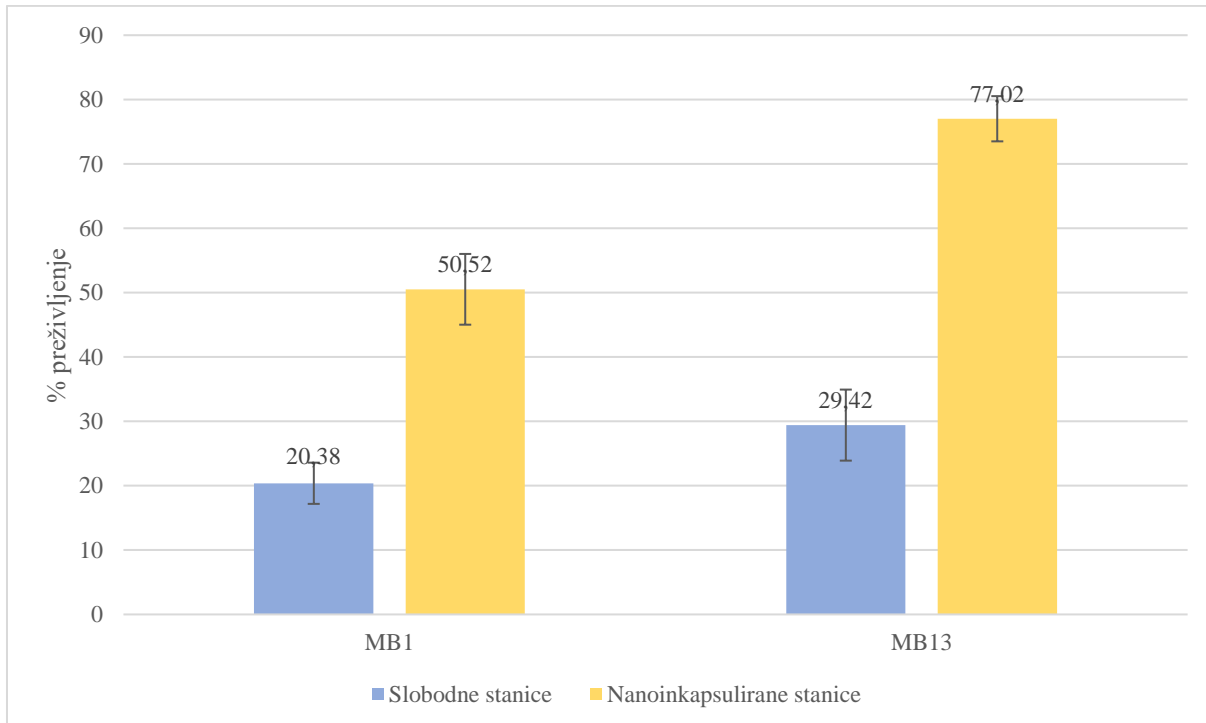


Slika 11. Postotak preživljenja *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 sojeva nakon liofilizacije slobodnih stanica bakterija i stanica bakterija prethodno podvrgnutim nanoinkapsulaciji

Slobodne stanice i nanoinkapsulirane stanice podvrgnute su testiranju otpornosti na želučani sok (slika 12) i simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava (slika 13). Kod želučanog soka na slici 12, vidljivo je vrlo slično preživljenje slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica, a postotak preživljenja iznosi oko 40 %. Najbolje preživljenje imaju nanoinkapsulirane stanice MB1 soja, dok kod MB13 preživljenje za slobodne i nanoinkapsulirane stanice je gotovo jednako. S druge strane, veće razlike zabilježene su nakon tretiranja stanica simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Na slici 13 kod GIT-a zabilježeno je puno veće preživljenje nanoinkapsuliranih stanica čije su vrijednosti veće od 50 %, a pogotovo za MB13 čije preživljenje premašuje 70 %. Slobodne stanice puno su manje otpornije na produkte gastrointestinalnog sustava, dok u želučanom soku prate trend nanoinkapsuliranih stanica. Otpornost nanokapsula na želučani sok i simulirane uvjete gastrointestinalnog sustava potvrđene su u nekoliko radova, a posebice na žučne soli (Wang i sur., 2019; Priya i sur., 2011).



Slika 12. Postotak preživljenja slobodnih i nanoinkapsuliranih bakterija *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 sojeva nakon liofilizacije i nakon prolaska kroz želučani sok



Slika 13. Postotak preživljenja slobodnih i nanoinkapsuliranih bakterija *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 sojeva nakon liofilizacije i nakon prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog sustava

Priya i sur. (2011) pokazali su da inkapsulacija tehnikom „layer by layer“, rađena s hitozanom i karboksimetil celulozom, poboljšava otpornost i preživljenje bakterija nakon dva sata tretiranja želučanim sok i simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava, pogotovo onih koje su obložene s tri nanosloja polielektrolita na *Lactobacillus acidophilus*. Povećani postotak preživljenja može se prepisati polielektrolitnom nanosloju koji je nepropustan za probavne enzime koji uzrokuju proteolizu kao što su pankreatin i pepsin. Nadalje, polielektrolitni slojevi pridonose smanjenju gubitka vijabilnosti nakon procesa smrzavanja kao što je liofilizacija (Priya i sur., 2011).

LbL tehnika pokazuje veliki potencijal u biotehnološkoj industriji kao strategija uvođenja novih probiotika u gastrointestinalni sustav. Neke od zabilježenih prednosti su preživljavanje kiselih uvjeta, enzima probavnog trakta, mukoadhezija, rast na površini cijevnog tkiva i preživljavanje *in vivo*, što je i dokazano u radu Anselmo i sur. (2016). Smatra se kako je LbL - probiotička inkapsulacija moguća s različitim nabijenim polielektrolitima, proteinima ili polisaharidima (Anselmo i sur., 2016).

Wang i sur. (2019.) proveli su nanoinkapsulaciju vrste *Lactobacillus pentosus* koristeći hitozan i natrijev fitat. Došli su do zaključka da nanoinkapsulirane probiotičke bakterije tehnikom „layer by layer“ imaju manji pad vijabilnosti kroz 30 dana nakon držanja u simuliranim uvjetima skladištenja pri temperaturi od 4 °C. Također, probiotički sojevi moraju preživjeti visoke temperature obrade samog proizvoda, poput pasterizacije koja se odvija 65 °C unutar 30 minuta. Nanokapsule su bile izložene temperaturi od 65 °C te su pokazale otpornost na visoke temperature dok kod nekapsuliranih *Lactobacillus pentosus* nije zabilježen rast (Wang i sur., 2019). Ovo je samo dokaz da nanoinkapsulacija ima veliki potencijal u stvaranju funkcionalne hrane budućnosti s još većim potencijalom na ljudsko zdravlje.

5. ZAKLJUČCI

1. Mikroinkapsulacija sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 u alginatnoj matrici posjeduju veću otpornost na simulirane uvjete gastrointestinalnog sustava uz prisutnost prebiotika galaktooligosaharida.

2. Mikroinkapsulacijom su očuvani S-proteini bakterije *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 sojeva. Zaštitom prebiotika i očuvanjem S-proteina, koji su dio S-sloja, očuvano je svojstvo adhezije za epitelne stanice. Nakon peroralne primjene povećana je vjerojatnost zadržavanja pozitivnog terapijskog učinka unutar gastrointestinalnog sustava.

3. Dodatak prebiotika nije značajno utjecao na poboljšanje vijabilnosti prilikom tromjesečnog skladištenja pri + 4 °C.

4. U usporedbi sa slobodnim stanicama, kod kojih je zabilježena velika smrtnost, nanoinkapsulacijom se povećala otpornost na proces liofilizacije korištenjem „layer by layer“ tehnike s poli(dialildimetilamonij klorid) (PDDA) i poli(stirensulfonat) (PSS).

5. Nanoinkapsulirani *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB13 sojevi pokazali su povećanu otpornost na simulirane uvjete gastrointestinalnog sustava i veće preživljenje stresnih i nepogodnih uvjeta.

6. LITERATURA

Abdulzhanova M, Savitskaya I, Kistaubayeva A, Shokatayeva D, Pogrebnyak A, Ignatova L (2019) Delivery of Probiotic to Microbiome by Layer-by-Layer Encapsulation. U: Proceedings of the 2019 IEEE 9th International Conference on Nanomaterials: Applications and Properties, NAP 2019. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.

Alp D, Kuleşan H, Korkut Altıntaş A (2020) The importance of the S-layer on the adhesion and aggregation ability of Lactic acid bacteria. *Mol Biol Rep* **47**, 3449–3457. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05430-6>

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

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

Azam M, Saeed M, Pasha I, Shahid M (2020) A prebiotic-based biopolymeric encapsulation system for improved survival of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Biosci* **37**, 100679. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100679>

Budryn G, Klewicka E, Grzelczyk J, Gałązka-Czarnecka I, Mostowski R (2019) Lactic acid fermentation of legume seed sprouts as a method of increasing the content of isoflavones and reducing microbial contamination. *Food Chem* **285**, 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.178>

Camelo-Silva C, Verruck S, Ambrosi A, Di Luccio M (2022) Innovation and Trends in Probiotic Microencapsulation by Emulsification Techniques. *Food Eng Rev* **14**, 462–490.

Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol* **28**, 281–370.

Conceição RCN, Batista RD, Leal Zimmer FMDA, Trindade IKM, de Almeida AF, Santos CCADA (2021) Effect of co-encapsulation using a calcium alginate matrix and fructooligosaccharides with gelatin coating on the survival of *Lactobacillus paracasei* cells. *Braz J Microbiol* **52**, 1503–1512. doi: 10.1007/s42770-021-00484-5

- Das TK, Pradhan S, Chakrabarti S, Mondal KC, Ghosh K (2022) Current status of probiotic and related health benefits. *Applied Food Research* **2**, 100185. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100185>
- Dong LM, Luan NT, Thuy DTK (2020) Enhancing the viability rate of probiotic by co-encapsulating with prebiotic in alginate microcapsules supplemented to cupcake production. *Microbiol Biotechn Lett* **48**, 113–120. <https://doi.org/10.4014/mbl.1910.10015>
- Ezhilarasi PN, Karthik P, Chhanwal N, Anandharamakrishnan C (2013) Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioproc Tech* **6**, 628–647.
- Feng T, Wang J (2020) Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes* **12**, 1801944. doi:10.1080/19490976.2020.1801944
- Frakolaki G, Giannou V, Kekos D, Tzia C (2021) A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. *Food Sci Nutr* **61**, 1515–1536. doi: 10.1080/10408398.2020.1761773
- Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS (2015) LYOPHILIZATION / FREEZE DRYING-A REVIEW. *World J Pharm Res* **4**, 517.
- George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal* **26**, 927–939. doi: 10.1016/j.jfda.2018.01.002
- Gerbino E, Carasi P, Mobili P, Serradell MA, Gómez-Zavaglia A (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* **31**, 1877–1887.
- Heidebach T, Först P, Kulozik U (2012) Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. *Food Sci Nutr* **52**, 291–311. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499801>
- Hynönen U, Palva A (2013) Lactobacillus surface layer proteins: Structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 5225–5243.
- Islam SU (2016) Clinical Uses of Probiotics. *Medicine* **95**, e2658. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002658>

- Kaur IP, Chopra K, Saini A (2002) Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci* **15**, 1–9. doi: 10.1016/s0928-0987(01)00209-3
- Khalid K (2011) An overview of lactic acid bacteria. *Int J Biosci* **1**, 1–13.
- Li XY, Chen XG, Cha DS, Park HJ, Liu CS (2009) Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. *J Microencapsul* **26**, 315–324. <https://doi.org/10.1080/02652040802328685>
- Luo G, Yang Q, Yao B, Tian Y, Hou R, Shao A, et al. (2019) Slp-coated liposomes for drug delivery and biomedical applications: Potential and challenges. *Int J Nanomedicine* **14**, 1359–1383.
- Mathur H, Beresford TP, Cotter PD (2020) Health benefits of lactic acid bacteria (Lab) fermentates. *Nutrients* **12**, 1–16.
- Muthukumarasamy P, Allan-Wojtas P, Holley RA (2006) Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *J Food Sci* **71**, 20–24.
- Nasiri H, Golestan L, Shahidi SA, Darjani P (2021) Encapsulation of *Lactobacillus casei* in sodium alginate microcapsules: improvement of the bacterial viability under simulated gastrointestinal conditions using wild sage seed mucilage. *J Food Meas Charact* **15**, 4726–4734. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01022-5>
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Sada A, Orlando P (2009) Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *J Funct Foods* **1**, 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.02.001>
- Oberoi K, Tolun A, Altintas Z, Sharma S (2021) Effect of alginate-microencapsulated hydrogels on the survival of *Lactobacillus rhamnosus* under simulated gastrointestinal conditions. *Foods* **10**, 1999. <https://doi.org/10.3390/foods10091999>
- Oelschlaeger TA (2010) Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int J Med Microbiol* **300**, 57–62.
- Pateiro M, Gómez B, Munekata PES, Barba FJ, Putnik P, Kovačević DB, et al. (2021) Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products. *Molecules* **26**, 1547. <https://doi.org/10.3390/molecules26061547>

- Pavkov-Keller T, Howorka S, Keller W (2011) The structure of bacterial S-layer proteins. *Prog. Mol Biol Transl Sci* **103**, 73–130. doi: 10.1016/B978-0-12-415906-8.00004-2
- Pavunc AL, Beganović J, Kos B, Buneta A, Beluhan S, Šušković J (2011) Influence of microencapsulation and transglutaminase on viability of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92 and consistency of set yoghurt. *Int J Dairy Technol* **64**, 254–261. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00647.x>
- Pech-Canul AdlC, Ortega D, García-Triana A, González-Silva N, Solis-Oviedo RL (2020) A Brief Review of Edible Coating Materials for the Microencapsulation of Probiotics. *Coatings* **10**, 197. <https://doi.org/10.3390/coatings10030197>
- Peng K, Koubaa M, Bals O, Vorobiev E (2020) Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. *Food Res Int* **137**, 109544. doi:10.1016/j.foodres.2020.10954
- Petrova P, Arsov A, Tsvetanova F, Parvanova-mancheva T, Vasileva E, Tsigoriyna L, i sur. (2022) The Complex Role of Lactic Acid Bacteria in Food Detoxification. *Nutrients* **14**, 2038. <https://doi.org/10.3390/nu14102038>
- Plavec TV, Berlec A (2020) Safety Aspects of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms* **8**, 297. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020297>
- Poshadri A, Kuna A (2010) MICROENCAPSULATION TECHNOLOGY: A REVIEW. *J Res Angra* **38**, 86–120.
- Prabhurajeshwar C, Chandrakanth K (2019) Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clin Nutr Exp* **23**, 97–115. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.10.001>
- Priya AJ, Vijayalakshmi SP, Raichur AM (2011) Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach. *J Agric Food Chem* **59**, 11838–11845. <https://doi.org/10.1021/jf203378s>
- Rajagopal V (2009) Encapsulation “The Future of Probiotics”-A Review. *ABR* **3**, 96–103.

- Razavi S, Janfaza S, Tasnim N, Gibson DL, Hoorfar M (2021) Nanomaterial-based encapsulation for controlled gastrointestinal delivery of viable probiotic bacteria. *Nanoscale Adv* **3**, 2699–2709.
- Rigobelo EC (2012) Probiotics. U: Chavarri M, Maranon I, Carmen M Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria, InTech , str. 501–540. doi:10.5772/50046 (grad izdavanja?)
- Sára M, Sleytr UB (2000) S-layer proteins. *J Bacteriol* **182**, 859–868.
- Sekhon BS (2010) Food nanotechnology-an overview. *Nanotechnol Sci Appl*, **3** 1–15. <https://doi.org/10.2147/nsa.s12187498>
- Serna-Cock L, Vallejo-Castillo V (2013) Probiotic encapsulation. *Afr J Microbiol Res*, **7**, 4743.
- Shi LE, Li ZH, Li DT, Xu M, Chen HY, Zhang ZL, i sur. (2013) Encapsulation of probiotic lactobacillus bulgaricus in alginate'milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *J Food Eng* **117**, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.012>
- Silva KCG, Cezarino EC, Michelon M, Sato ACK (2018) Symbiotic microencapsulation to enhance Lactobacillus acidophilus survival. *LWT* **89**, 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.026>
- Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D (2014) S-layers: Principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 823–864. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12063>
- Takanashi N, Tomosada Y, Villena J, Murata K, Takahashi T, Chiba E, i sur. (2013) Advanced application of bovine intestinal epithelial cell line for evaluating regulatory effect of lactobacilli against heat-killed enterotoxigenic Escherichia coli-mediated inflammation. *BMC Microbiol* **13**. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-54>
- Tsai YT, Cheng PC, Pan TM (2012) The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**, 853–862.
- van Zyl WF, Deane SM, Dicks LMT (2020) Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes* **12**, 831339. doi: 10.1080/19490976.2020.1831339

- Vivek K, Mishra S, Pradhan RC, Nagarajan M, Kumar PK, Singh SS, i sur. (2023) A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends. *Appl Food Res* **3**, 100248. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100248>
- Walia N, Dasgupta N, Ranjan S, Ramalingam C, Gandhi M (2019) Methods for nanoemulsion and nanoencapsulation of food bioactives. *Environ Chem Lett* **17**, 1471–1483.
- Wang J, Zhang H, Chen X, Chen Y, Menghebilige, Bao Q (2012) Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *J Dairy Sci* **95**, 1645–1654. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4768>
- Wang M, Yang J, Li M, Wang Y, Wu H, Xiong L, i sur. (2019) Enhanced viability of layer-by-layer encapsulated *Lactobacillus pentosus* using chitosan and sodium phytate. *Food Chem* **285**, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.162>
- Xu C, Ban Q, Wang W, Hou J, Jiang Z (2022) Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems. *J Control Release* **349**, 184–205. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2022.06.061>
- Yao M, Xie J, Du H, McClements DJ, Xiao H, Li L (2020) Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **19**, 857–874.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Petra Škibola 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