

# Razvoj nutraceutičkih proizvoda s probioticima

---

**Penava, Lenkica**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:909480>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-07**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Lenkica Penava

# **RAZVOJ NUTRACEUTIČKIH PROIZVODA S PROBIOTICIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Lenkica Penava

# **DEVELOPMENT OF NUTRACEUTICAL PRODUCTS WITH PROBIOTICS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor

Zagreb, 2022

*Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, kojeg je pročelnica prof. dr. sc. Blaženka Kos te u tvrtkama Podravka d.d. i Belupo d.d., a pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, u okviru projekata „Razvoj funkcionalnih probiotičkih proizvoda prerađene hrane na bazi žitarica“ (suradnja PBF-a i tvrtke Podravka d.d.) i „Razvoj funkcionalnog probiotičkog proizvoda za posebne medicinske potrebe namijenjenog za dijetalnu prehranu bolesnika s malnutricijom ili rizikom njezine pojave“ (suradnja PBF-a, Instituta Ruđer Bošković i tvrtke Belupo d.d.) (voditeljice projekata na PBF-su: dr. sc. Jagoda Šušković, prof. emerita i prof. dr. sc. Blaženka Kos).*

*Informacije o mentoru:*

dr. sc. Andreja Leboš Pavunc, docentica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

## ŽIVOTOPIS

doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc, rođena je 14. siječnja 1981. u Zagrebu. Diplomirala je 2006. godine, a doktorirala 2012. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2007. godine je zaposlena na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, najprije kao asistent, zatim kao viši asistent, a od 2017. godine u znanstveno-nastavnom zvanju docent.

Aktivno je bila uključena u realizaciju 10 nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekata od čega na jednom projektu Ministarstva znanosti i obrazovanja, 6 potpora Sveučilišta u Zagrebu i 3 projekta Hrvatske zaklade za znanost; zatim na jednom tehnologijskom, razvojno-istraživačkom projektu i 2 projekata suradnje s gospodarstvom (Podravka d.d. i Belupo d.d.). Kao istraživač je sudjelovala na međunarodnom EUREKA projektu „Development of probiotic yoghurt technology with improved yoghurt characteristics“ (2006.-2009.), zatim FP7 SEE-ERA.NET projektu „Conservation and standardization of traditional technologies of fermented milk products based on autochthonous lactic acid bacteria“ (2010.-2012.) i bilateralnom projektu Hrvatska/Slovenija „Lactic acid bacteria as live biotherapeutic products“ (2014.-2015.). Sudjelovala je također na projektu financiranim iz European Education and Culture Executive Agency (EACEAE): HarISA - Harmonizacija i inovacije u doktorskim studijskim programima biljnog zdravlja za održivu poljoprivredu – Radionica za mentore na temu: Transfer of own experiences - mentoring doctoral students who are collaborators on a scientific research project. Aktivno sudjeluje u radu znanstvenog Centra izvrsnosti za bioprospekting mora „BioProspecting Jadranskog mora“ (BioProCro), Europskog fonda za regionalni razvoj.

Znanstveno-istraživački rad doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc obuhvaća područje biotehnologije s posebnim naglaskom na bakterije mliječne kiseline u okviru probiotičkog i prebiotičkog koncepta te njihove primjene kao starter kultura uz izdvojena ispitivanja antimikrobnog djelovanja. Do sada je objavila 30 znanstvenih radova od kojih je 24 iz grupacije A1, 2 iz iz A2, a 4 iz grupacije A3 radova. Radovi su prema Web of Science citirani 530 puta; a h-indeks iznosi 11. Aktivno je sudjelovala na preko 50 domaćih i međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova i radionica.

2009. godine je dobila FEMS-ovu stidendiju za tromjesečni boravak u Laboratoriju Génétique Microbienne, u istraživačkom institutu INRA, Francuska, za rad na projektu „The interaction between the host and its digestive microbiota and related microorganisms“. 2008. godine je dobila nagradu za najbolji poster u području Prehrambene biotehnologije na CEFood kongresu održanom u Cavtatu, pod naslovom “The use of *Lactobacillus plantarum* L4 for the production of probiotic drink with cabbage juice”, 2010. godine je dobila Potporu Biotehničke zaklade, a 2017. godine Srebrnu medalju na 9. međunarodnom sajmu inovacija, Agro Arca. Tajnica je i članica Hrvatskog mikrobiološkog društva te članica Hrvatskog društva za biotehnologiju i udruga Ljetna tvornica znanosti i Bioteka. Pod njenim mentorstvom izrađeno je 6 završnih i 5 diplomskih radova. Recenzirala je 27 radova u različitim hrvatskom i inozemnim znanstvenom časopisima. Suautorica je 5 skripta i 2 poglavlja u sveučilišnim udžbenicima.

Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sudjeluje u nastavi na predmetima „Biotehnologija 4“, „Tehnologija antibiotika“, „Tehnologija enzima“, „Probiotici i starter kulture“, „Mikrobna ekologija“ i „Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje“. Na istom Fakultetu aktivno sudjeluje u Smotri Sveučilišta, Danima otvorenih vrata PBF-a te Festivalu znanosti. 2018. godine je kao mentorica sudjelovala na Ljetnoj tvornici znanosti. Od 2018. do 2020. je kao mentorica sudjelovala na projektu društveno korisnog učenja Europskog socijalnog fonda „U društvu mikroba“ u okviru kojeg je stvoren virtualni muzej mikroba „Microseum“. S udrugom Bioteka je sudjelovala na projektu PANDA (projektna nastava za darovitu djecu), a trenutno je aktivna u projektu Europskih strukturnih i investicijskih fondova „Razvoj mreže STEM ambasadora“.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akad. god. 2018./2019. održanoj dana 20. svibnja 2019., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 18. veljače 2020. godine.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 579.86:602.3:549.864:641-053.2:641.56-053.3(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

### RAZVOJ NUTRACEUTIČKIH PROIZVODA S PROBIOTICIMA

mr. sc. Lenkica Penava

**Rad je izrađen** u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u tvrtkama Podravka d.d. i Belupo d.d.

**Mentor:** doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

#### Kratki sažetak:

U ovom radu su razvijeni novi nutraceutički proizvodi namijenjeni prehrani dojenčadi od 4. mjeseca starosti, koji uključuju instant pahuljice od riže, instant pahuljice od riže s voćem i instant pahuljice od pšenice uz dodatak probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> te hrana za posebne medicinske potrebe uz dodatak probiotičkog soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Dodatak probiotičkih sojeva u ove proizvode čini ih funkcionalnim pripravcima. Pristunost kulture BB-12<sup>®</sup> u proizvodima dječje hrane je potvrđena AFLP metodom te PCR-om s početnicama specifičnim za *Bifidobacterium* vrste. PCR-om za *Lacticaseibacillus paracasei* vrstu te sekvenciranjem je potvrđena prisutnost tog soja u hrani za posebne medicinske potrebe. Daljnji cilj je bio *in vitro* ispitati utjecaj ovih različitih matriksa na specifična probiotička svojstva korištenih bakterija. Dječja hrana je imala pozitivan utjecaj tijekom preživljavanja BB-12<sup>®</sup> u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, u asimilaciji kolesterola, koagregaciji s drugim mikroorganizmima, na antagonističko djelovanje prema drugim Gram-pozitivnim bakterijama ispitano metodom dvostrukog sloja te na antagonističko djelovanje prema bakterijama mliječne kiseline i test-mikroorganizmima ispitano turbidimetrijskom metodom. Hrana za posebne medicinske potrebe je imala pozitivan utjecaj na soj *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* prilikom asimilacije kolesterola, koagregacije s drugim mikroorganizmima, na antagonističko djelovanje prema test-mikroorganizmima ispitano metodom s rupama u agaru te na inhibicijsko djelovanje prema srodnim bakterijama mliječne kiseline i test-mikroorganizmima ispitano turbidimetrijskom metodom. Adhezija na proteine ekstracelularnog matriksa i Caco-2 stanice, u kombinaciji s antibakterijskom aktivnošću su potvrdile kompetitivnu eksluziju patogena *S. Typhimurium* FP1 i *E. coli* 3014 probiotičkim sojevima *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> i *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

**Broj stranica:** 111

**Broj slika:** 21

**Broj tablica:** 18

**Broj literaturnih navoda:** 172

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** dječja hrana, hrana za posebne medicinske potrebe, probiotici, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*

**Datum obrane:** 25. travnja 2022.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Jagoda Šušković, prof. emerita

2. izv. prof. dr. sc. Martina Bituh

3. dr. sc. Ivanka Jerić, znanstveni savjetnik

4. prof. dr. sc. Jadranka Frece (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4 i u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

PhD Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

UDK: 579.86:602.3:549.864:641-053.2:641.56-053.3(043.3)

Postgraduate University Doctoral Study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Nutrition

### DEVELOPMENT OF NUTRACEUTICAL PRODUCTS WITH PROBIOTICS

MSc Lenkica Penava

**Thesis performed in** the Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology, the Faculty of Food Technology and Biotechnology, the University of Zagreb and in companies Podravka Inc. and Belupo Inc.

**Supervisor:** PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor

#### Short abstract:

In this research new nutraceutical products intended for infants from 4 months of age have been developed, including instant rice flakes, instant rice flakes with fruit and instant wheat flakes with the addition of probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, and food for special medical purposes with the addition of the probiotic strain *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. The addition of probiotic strains to these products makes them functional preparations. The presence of BB-12<sup>®</sup> culture in baby food products was confirmed by AFLP and PCR with primers specific for *Bifidobacterium* species. PCR for *Lacticaseibacillus paracasei* species and sequencing confirmed the presence of this strain in food for special medical purposes. A further aim was to examine *in vitro* the influence of these different matrices on the specific probiotic properties of the used bacteria. Baby food had a positive effect on the survival of BB-12<sup>®</sup> in simulated gastrointestinal tract conditions, in cholesterol assimilation, coaggregation with other microorganisms, antagonistic activity against other Gram-positive bacteria tested by the agar spot-test method and antagonistic activity against lactic acid bacteria (LAB) and test-microorganisms tested by turbidimetric method. Food for special medical purposes have had a positive effect on the *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* during cholesterol assimilation, coaggregation with other microorganisms, antagonistic activity against test-microorganisms tested by agar hole method and inhibitory activity against related LAB and test-microorganisms tested by turbidimetric method. Adhesion to extracellular matrix proteins and Caco-2 cells, combined with antibacterial activity, confirmed the competitive exclusion of *S. Typhimurium* FP1 and *E. coli* 3014 pathogens by probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> and *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

**Number of pages:** 111

**Number of figures:** 21

**Number of tables:** 18

**Number of references:** 172

**Original in:** Croatian

**Key words:** infant food, food for special medical purposes, probiotics, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*

**Date of the thesis defense:** April 25<sup>th</sup>, 2022

#### Reviewers:

1. PhD Jagoda Šušković, professor emerita
2. PhD Martina Bituh, Associate Professor
3. PhD Ivanka Jerić, Scientific Adviser
4. PhD Jadranka Frece, Full Professor

**Thesis deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, and in the University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske, 14.

## SAŽETAK

Porastom znanstvenih spoznaja o utjecaju hranjivih tvari na očuvanje zdravlja i prevenciju bolesti, raste i interes za razvoj nutraceutičkih proizvoda, za koje se očekuje povoljan učinak na zdravlje. U ovom radu su razvijeni novi nutraceutički proizvodi namijenjeni prehrani dojenčadi od 4. mjeseca starosti, koji uključuju instant pahuljice od riže, instant pahuljice od riže s voćem i instant pahuljice od pšenice uz dodatak probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> te hrana za posebne medicinske potrebe uz dodatak probiotičkog soja *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Dodatak probiotičkih sojeva u ove proizvode čini ih funkcionalnim pripravcima. Kako bi se dokazalo da su u razvijenim proizvodima uistinu prisutne korištene probiotičke bakterije, bakterije su izolirane iz proizvoda i identificirane primjenom fenotipskih i genotipskih metoda. Pristunost kulture BB-12<sup>®</sup> u proizvodima dječje hrane je potvrđena AFLP metodom te PCR-om s početnicama specifičnim za *Bifidobacterium* vrste. PCR-om za *Lactocaseibacillus paracasei* vrstu te sekvenciranjem je potvrđena prisutnost tog soja u hrani za posebne medicinske potrebe. Daljnji cilj je bio *in vitro* ispitati utjecaj ovih matriksa na probiotička svojstva korištenih bakterija kroz niz eksperimenata u okviru probiotičkog koncepta koji su uključivali osjetljivost na antibiotike, preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, dekonjugacijsku aktivnost prema žučnim solima, asimilaciju kolesterola, antagonističko djelovanje protiv nepoželjnih mikroorganizama te adhezijska svojstva na Caco-2 staničnoj liniji i proteinima ekstracelularnog matriksa. Ispitivanjem osjetljivosti na antibiotike korištenih i izoliranih probiotičkih kultura, dobiveni su rezultati koji su u skladu s EFSA-inim smjernicama. Sva tri matriksa dječje hrane su imala podjednako dobar zaštitni utjecaj tijekom izlaganja BB-12<sup>®</sup> soja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta pri čemu je preživljavanje stanica za 2,5 log jedinice bilo veće nego kod čiste kulture. U slučaju probiotičke bakterije *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, obje kulture (čista liofilizirana i izolirana iz hrane za posebne medicinske potrebe) su vrlo uspješno preživjele nepovoljne uvjete, ali nije bilo značajnijeg utjecaja hrane za posebne medicinske potrebe na protektivni učinak. Stanice BB-12<sup>®</sup> su pokazale dekonjugacijsku aktivnost tijekom rasta u mediju uz dodatak natrijevog taurokolata, a minimalno veća aktivnost je uočena kod kulture izolirane iz instant pahuljica od riže i voća. Isti matriks je povećao i asimilaciju kolesterola za 18 %, a instant pahuljice od pšenice za 13 %. Kod kulture *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* također je uočen minimalan utjecaj hrane za posebne medicinske potrebe na dekonjugacijsku aktivnost, ali je asimilacija kolesterola povećana za 16,4 %. U ispitivanju antagonističkog djelovanja stanica BB-12<sup>®</sup> prema Gram-

pozitivnim bakterijama metodom s dvostrukim slojem, stanice tog soja u dječjoj hrani su iskazale srednji ili jaki inhibicijski učinak dok su stanica soja iz liofilizirane kulture uglavnom pokazale slabu ili srednju inhibiciju što znači da proizvodni matriksi dječje hrane pojačavaju inhibicijsko djelovanje. Kod bakterije *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* koja je pokazala slabu inhibiciju, nije uočen niti značajan utjecaj matriksa na antimikrobno djelovanje. Prilikom ispitivanja antagonističkog djelovanja stanica BB-12<sup>®</sup> prema test-mikroorganizmima metodom difuzije u agar, veći promjeri inhibicije su postignuti za stanice u čistoj liofiliziranoj kulturi nego iz dječje hrane zbog otežane difuzije antimikrobnih metabolita. U slučaju stanica *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je postignut obrnuti rezultat. Stanice kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe su pokazale značajno veći inhibicijski učinak na rast test-mikroorganizama što znači da je taj matriks pojačao inhibicijsko djelovanje soja. I matriks dječje hrane i hrane za posebne medicinske potrebe su pojačali antimikrobni učinak soja BB-12<sup>®</sup> odnosno *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* prilikom ispitivanja inhibicije rasta test-mikroorganizama i bakterije mliječne kiseline turbidimetrijskom metodom što može biti posljedica poticanja metaboličke aktivnosti i proizvodnje antimikrobnih metabolita u prisutnosti matriksa. Proizvodni matriksi nisu imali signifikantni utjecaj na stupanj autoagregacije kultura BB-12<sup>®</sup> i *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Instant pahuljice od riže i instant pahuljice od pšenice te hrana za posebne medicinske potrebe su utjecali na značajnije veći postotak koagregacije probiotičkih kultura sa srodnim bakterijama mliječne kiseline te primijenjenim test-mikroorganizmima. Adhezija stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na fibronektin i kolagen je učinkovitija od adhezije na laminin, dok nije bilo značajnije razlike između adhezija na fibronektin i kolagen, a medijatori adhezije na proteine ekstracelularnog matriksa su neproteinske prirode. U slučaju kulture *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kod svih proteina je došlo do smanjenja adhezije nakon tretmana proteinazom K, a najveća adhezija je zabilježena na laminin. Dokazano je da se Caco-2 stanične linije mogu uspješno koristiti za ispitivanje sposobnosti adhezije korištenih bakterija pri čemu je najveći adhezivni kapacitet BB-12<sup>®</sup> postignut pri multiplicitetom infekcije 100 i nakon 12 sati inkubacije, a u slučaju stanica *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je najveći kapacitet postignut pri multiplicitetom infekcije 10. Ista stanična linija je korištena za ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogena pri čemu je adhezija soja BB-12<sup>®</sup> na Caco-2 staničnu liniju smanjila vezivanje *S. Typhimurium* FP1 za otprilike 1,5 log jedinicu, dok ekskluzija stanica *E. coli* 3014 nije bila statistički značajna. Adhezija soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je smanjila vezivanje *E. coli* 3014 za 1,81 log jedinicu, a vezanje *S. Typhimurium* FP1 za 1,85 log jedinicu.

## SUMMARY

Increased scientific knowledge about the impact of nutrients on health and disease prevention has resulted with a growing interest in the development of nutraceutical products, which are expected to have a beneficial effect on health. In this paper, new nutraceutical products intended for infants from 4 months of age have been developed, including instant rice flakes, instant rice flakes with fruit and instant wheat flakes with the addition of probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> and food for special medical purposes with the addition of the probiotic strain *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. The addition of probiotic strains to these products makes them functional preparations. To prove that the probiotic bacteria used were indeed present in the developed products, the bacteria were isolated from the product and identified using phenotypic and genotypic methods. The presence of BB-12<sup>®</sup> culture in baby food products was confirmed by AFLP and PCR with primers specific for *Bifidobacterium* species. PCR for *Lacticaseibacillus paracasei* species and sequencing confirmed the presence of this strain in food for special medical purposes. A further aim was to examine *in vitro* the influence of these different matrices on the specific probiotic properties of the used bacteria through a series of experiments within the probiotic concept that included sensitivity to antibiotic, survival in simulated gastrointestinal tract conditions, bile salt deconjugation activity, cholesterol assimilation, antagonistic activity against undesirable microorganisms and potential bacteriocin activity, and adhesion properties to Caco-2 cells and extracellular matrix proteins. By testing the antibiotic susceptibility of used and isolated probiotic cultures, results were obtained that are in line with EFSA guidelines. All three baby food matrices had an equally good protective effect during exposure of BB-12<sup>®</sup> probiotic strain to simulated gastrointestinal tract conditions where cell survival was 2.5 log units higher than in pure culture. In the case of the probiotic bacterium *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, both cultures (pure lyophilized and isolated from food for special medical purposes) survived the adverse conditions very successfully, but there was no significant effect of food for special medical purposes on the protective effect. BB-12<sup>®</sup> cells showed deconjugation activity during growth in medium with the addition of sodium taurocholate, and minimally higher activity was observed in cultures isolated from instant rice and fruit flakes. The same matrix also increased the assimilation of cholesterol by 18 % and instant wheat flakes by 13 %. In the case of *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* culture, it was also observed minimal effect of matrix on deconjugation activity, but cholesterol assimilation was increased by 16.4 %. In a study of the antagonistic activity of BB-12<sup>®</sup> cells against Gram-positive bacteria by the agar

spot-test method, cells of this strain in infant food showed moderate or strong inhibitory effect while cells from lyophilized culture generally showed weak or moderate inhibition, which means that baby food enhanced the inhibitory effect. Concerning *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, which showed weak inhibition, no significant effect of matrix on antimicrobial activity was observed. When testing the antagonistic activity of BB-12<sup>®</sup> cells against test-microorganisms by agar diffusion method, higher diameters of inhibition were achieved for cells in pure lyophilized culture than from baby food due to impaired diffusion of antimicrobial metabolites. In the case of *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* the reverse result was achieved. Culture cells from food for special medical purposes showed a significantly higher inhibitory effect on the growth of test-microorganisms, which means that this matrix enhanced the inhibitory effect of strains. Both the matrix of baby food and food for special medical purposes enhanced the antimicrobial effect of strain BB-12<sup>®</sup> and *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* when testing the inhibition of growth of test-microorganisms and lactic acid bacteria by turbidimetric method which may be due to the stimulation of metabolic activity and production of antimicrobial metabolites in the presence of matrix. Production matrices did not have a significant effect on the degree of autoaggregation of cultures of BB-12<sup>®</sup> and *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Instant rice flakes and instant wheat flakes and food for special medical purposes affected a significantly higher percentage of coaggregation of probiotic cultures with related lactic acid bacteria and test-microorganisms. Adhesion of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> to fibronectin and collagen was more effective than adhesion to laminin, while there was no significant difference between adhesion to fibronectin and collagen, and mediators of adhesion to proteins of extracellular matrices are nonprotein in nature. In the case of *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, in all proteins there was a decrease in adhesion after treatment with proteinase K, and the highest adhesion was observed to laminin. It has been shown that Caco-2 cell lines can be successfully used to test the adhesion ability of used bacteria with the highest adhesion capacity of BB-12<sup>®</sup> achieved at multiplicity of infection 100 and after 12 hours of incubation, and in the case of *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* had the highest capacity achieved at multiplicity of infection 10. The same cell line was used to test competitive exclusion of pathogens with adhesion of BB-12<sup>®</sup> strain to Caco-2 cell line which reduced *S. Typhimurium* FP1 binding by approximately 1.5 log unit, while exclusion *E. coli* 3014 cell was not statistically significant. Adhesion of *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* decreased the binding of *E. coli* 3014 by 1.81 log units and the binding of *S. Typhimurium* FP1 by 1.85 log units.

*Zahvaljujem dr. sc. Jagodi Šušković, prof. emerita i prof. dr. sc. Blaženki Kos na dugogodišnjoj uspješnoj suradnji na brojim projektima i prilici da u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Sveučilišta u Zagrebu izradim Doktorski rad.*

*Posebno zahvaljujem mojoj mentorici, doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc čija su predanost, pomoć i podrška ključne za nastanak ovoga Dokorskog rada.*

*Veliko hvala prof. dr. sc. Jasni Novak, dr. sc. Martini Banić, Katarini Butorac mag. ing. biotechn. i Nini Čuljak, mag. ing. biotechn. na kolegijalnosti i ljubaznosti.*

*Ovaj rad nastao je zahvaljujući podršci kompanijskog okruženja Belupa i Podravke na čemu svima od srca zahvaljujem.*

*Iznimno sam zahvalna svojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i podršci kojom prate moja postignuća, a posebno izradu ovoga rada.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	5
2.1. Probiotici.....	5
2.1.1. Identifikacija i karakterizacija probiotičkih sojeva .....	5
2.1.2. Utjecaj probiotika na obnavljanje intestinalne mikrobiote čovjeka .....	7
2.1.3. Probiotici kao funkcionalni dodaci hrani .....	9
2.1.4. Glavni izazovi u razvoju formulacija probiotika i njihovoj validaciji.....	10
2.2. Probiotici druge generacije-živi bioterapeutici.....	12
2.2.1. Budućnost probiotika: Ekobiotici .....	16
2.3. Bifidobakterije .....	17
2.3.1. Zdravstveni učinci bifidobakterija .....	20
2.4. <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> .....	22
2.5. Prebiotici.....	24
2.6. Sinbiotici.....	29
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	31
3.1. Materijali.....	31
3.1.1. Mikroorganizmi .....	31
3.1.2. Stanične linije .....	31
3.1.3. Hranjive podloge .....	32
3.1.4. Matriksi.....	33
3.1.5. Kemikalije .....	34
3.1.6. API 50 CHL .....	36
3.1.7. Antibiotici.....	36
3.1.8. Aparature i pribor.....	37
3.2. Metode rada .....	38
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	38
3.2.2. Priprema uzoraka dječje i hrane za posebne medicinske potrebe.....	38
3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama u uzorcima dječje hrane odnosno hrane za posebne medicinske potrebe indirektnom metodom.....	39
3.2.4. Metode identifikacije.....	40
3.2.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	44
3.2.7. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.....	46

3.2.8. Metoda za ispitivanje autoagregacijskih i koagregacijskih svojstava odabranih bakterija mliječne kiseline .....	46
3.2.9. In vitro ispitivanja adhezijskih svojstava probiotičkih sojeva na Caco-2 staničnoj liniji.....	47
3.2.10. Ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogenih bakterija probiotičkim sojevima primjenom Caco-2 stanične linije.....	49
3.2.11. In vitro adhezija na proteine ekstracelularnog matriksa.....	50
3.2.12. Dekonjugacijska aktivnost prema žučnim solima .....	50
3.2.13. Asimilacija kolesterola .....	51
3.2.14. Statistička analiza i prikaz rezultata.....	52
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	53
4.1. Fenotipska i genotipska karakterizacija probiotičkih sojeva .....	53
4.2. Kontrola funkcionalnosti probiotičkih kultura u proizvodima .....	60
4.3. Antagonističko djelovanje prema patogenim i nepoželjnim mikroorganizmima te potencijalna bakteriocinska aktivnost .....	71
4.4. Adhezijska svojstva i kompetitivna ekskluzija.....	80
5. ZAKLJUČCI .....	94
6. LITERATURA .....	96
7. ŽIVOTOPIS .....	110



## 1. UVOD

Suvremeno čovječanstvo se suočava s novim infektivnim bolestima, ponovnom pojavom starih infektivnih bolesti i rastućom rezistencijom patogenih mikroorganizama na raspoložive antibiotike. Svjetska znanost ulaže velike napore kako bi se pronašli novi antibiotici za terapiju tih bolesti, uz istovremenu borbu za smanjenje porasta antibiotske rezistencije. Smanjenje porasta antibiotske rezistencije može se postići samo smanjenjem uporabe antibiotika, odnosno smanjenjem rizika od nastajanja bolesti. Stoga svjetski trendovi sve veću važnost pridaju funkcionalnoj prehrani kao temelju dobrog zdravlja i vitalnosti. Isto tako, nutricionistička istraživanja ukazuju na sve veću važnost uloge prehrane u prevenciji bolesti i pokazuju da su nepravilna prehrana, uz nedovoljnu tjelesnu aktivnost te štetne suvremene životne navike među glavnim uzrocima pojave metaboličko-fizioloških promjena tzv. metaboličkog sindroma kojeg čini grupa rizičnih faktora: povišeni krvni tlak, povišena koncentracija šećera u krvi, povišena razina kolesterola i povećano abdominalno masno tkivo. Metabolički sindrom uzrok je sve veće pojave kroničnih nezaraznih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, pretilosti i karcinoma. Navedeno je potaknulo intenziviranje globalne istraživačke aktivnosti u područjima nutrigenomike, razvoja personalizirane hrane te hrane namijenjene sprječavanju nastanka ili ublažavanju posljedica akutnih ili kroničnih bolesti. Hrana za posebne medicinske potrebe ili enteralna hrana namijenjena je za potpunu ili djelomičnu prehranu bolesnika s ograničenom, oslabljenom ili poremećenom mogućnošću konzumiranja, probave, apsorpcije, metaboliziranja ili izlučivanja uobičajene hrane ili bolesnicima koji imaju posebne medicinske zahtjeve koji se ne mogu podmiriti modifikacijama hrane uobičajenog sastava, hranom za posebne prehrambene potrebe ili njihovom kombinacijom.

Prema europskoj legislativi probiotički pripravci kategorizirani su kao sastojci funkcionalne hrane ili kao dodaci prehrani. Probiotici kao funkcionalni sastojci hrane promoviraju zdravlje tj. pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikroflore pa tako često iste probiotičke kulture, koje prehrambene tvrtke nazivaju funkcionalnim sastojcima hrane, farmaceutska industrija naziva dodacima prehrani, a obje grupe se svrstavaju u kategoriju nutraceutika (Šušković i sur., 2009; Sleator i Hill, 2008). Probiotici se primjenjuju, ne samo kao dodaci prehrani (nutraceutici) koji promoviraju zdravlje, nego i kao strogo definirani lijekovi u terapiji bolesti, nazvani „živi bioterapijski pripravci“ (*engl. LBPs - live biotherapeutic products*) prema američkoj Agenciji za hranu i lijekove. Evaluaciju medicinskih proizvoda u Europskoj uniji provodi Europska agencija za lijekove (EMA - European Medicines Agency),

a odobrenje za stavljanje lijeka u promet daje Europska komisija te ono vrijedi za sve zemlje članice Europske unije. Osiguravanje kvalitete probiotika kao živih lijekova (LBPs) na europskom tržištu uspostavlja Komisija Europske farmakopeje. Probiotici se koriste za poboljšanje zdravlja probavnog sustava i poticanje imunološkog sustava. FAO/WHO (2002) definiraju probiotike kao žive mikroorganizme koji kada su primijenjeni u odgovarajućim količinama domaćinu donose zdravstvene koristi. Međutim, Zajedničko međunarodno znanstveno udruženje za probiotike i prebiotike usvojilo je definiciju za probiotičke bakterije koja kaže da su to živi dodaci prehrani koji doprinose zdravlju konzumenta (Martín i Langella, 2019).

Mikroorganizmi koji se obično koriste kao probiotici za humanu primjenu su bakterije mliječne kiseline (BMK). Pojam bakterija mliječne kiseline obuhvaća mnoge bakterijske vrste koje povoljno utječu na regulaciju ravnoteže crijevne mikrobiote, a tradicionalno se koriste za pripremu fermentirane hrane ili različitih probiotičkih proizvoda u koje se naknadno dodaju probiotici kao funkcionalni sastojci hrane (Šušković, 1996). Najpoznatiji probiotički mikroorganizmi potječu iz rodova *Lactobacillus* (Lb) i *Bifidobacterium* (B), ali to mogu biti i sojevi iz rodova *Bacillus*, *Pediococcus* kao i neki kvasci. Laktobacili i bifidobakterije pripadaju autohtonij mikrobiti ljudi i životinja i imaju GRAS (Generally Recognised As Safe) status prema US FDA (American Food and Drug Administration), odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema EFSA-i (European Food Safety Authority) (Ashraf i Shah, 2011). Glavne vrste laktobacila i bifidobakterija koje se koriste u mliječnim proizvodima su *Lactococcus lactis*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. lactis* i *B. bifidum*. Probiotici sljedeće generacije sadrže sojeve crijevne mikrobiote, za koje je dokazano da imaju GRAS status i potencijalno blagotvorno djelovanje, a uključuju sojeve iz klastera *Clostridium* IV, XIVa i XVIII, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides fragilis* i *Eubacterium halli* (El Hage i sur., 2017).

Intestinalne bakterije imaju ulogu u sintezi vitamina (vitamin K, folna kiselina, vitamin B2, B3, B5, B6, B7 i B12), probavi prehrambenih vlakana i proizvodnji kratkolančanih masnih kiselina, regulaciji imunološkog odgovora i prevenciji kolonizacije patogena. Izazovi suvremenog načina života i loše životne navike mogu poremetiti ravnotežu crijevne mikroflore pa se probiotici konzumiraju u sklopu prehrambenih proizvoda bilo fermentiranih mliječnih proizvoda u kojima su prirodno prisutni ili dodani kao funkcionalni sastojak u funkcionalnoj hrani i nutraceuticima: žitaricama, pićima, dječjoj hrani, hrani za posebne prehrambene potrebe

odnosno posebne medicinske potrebe, ali i kao dodaci prehrani u obliku kapsula, tableta, prašaka ili otopina (Fenster i sur., 2019).

Bifidobakterije su Gram-pozitivne, anaerobne, nepokretne, nesporulirajuće, katalaza-negativne, heterofermentativne bakterije koje su ime dobile prema latinskoj riječi „bifidus“ koja označuje „branching“ tj. grananje u y-formi (Lee i O`Sullivan, 2010). Probiotički soj *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> potječe iz kolekcije mikrobnih kultura tvrtke Chr. Hansen, u koju je pohranjen 1983. godine, a primjenjuje se u hrani za dojenčad, kao dodatak hrani (*eng. food supplement*) te u fermentiranim mliječnim proizvodima. S tehnološkog aspekta primjene ovaj probiotički soj posjeduje poželjnu fermentativnu aktivnost, acidotolerantnost, stabilnost u liofiliziranom pripravku kada se primjeni kao suha aktivna probiotička kultura i svojstvo preživljavanja u visokom broju kada se primjeni u prehrambenom proizvodu, a nema utjecaja na okus, aromu i konzistenciju proizvoda (Jungersen i sur., 2014). Probiotički soj BB-12<sup>®</sup> je jedan od najbolje proučenih na svijetu. O njegovim probiotičkim svojstvima do sada je objavljeno čak više od 300 znanstvenih publikacija, od kojih je više od 130 kliničkih istraživanja o korisnim učincima na humani gastrointestinalni i imunološki sustav. Važno probiotičko svojstvo bifidobakterija je proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina, kao i razgradnja ugljikohidrata i proteina u intestinalnom traktu. Vjeruje se da je ova karakteristika najviše cijenjena zbog dokazanih kliničkih učinaka soja BB-12<sup>®</sup> u prevenciji proljeva uzrokovanog antibioticima kod dojenčadi i malog djeteta, bakterija (najčešće *Clostridium difficile*) rotavirusa (Chatterjee i sur., 2013). Pojava alergijskih bolesti u dojenčadi i maloj djeci je u stalnom porastu, posebno u industrijaliziranim zemljama, što se može pripisati, između ostalog, prekomjernoj higijeni u ranom djetinjstvu, odnosno nedovoljnoj izloženosti mikroorganizmima koji igraju ključnu ulogu u razvoju imunološkog sustava u prve 2 godine života (Michail, 2009). Crijevna mikrobiota se stječe rođenjem i postoji značajna razlika između crijevnog mikrobnog sastava novorođenčadi i onih rođenih s carskim rezom. Dakle, novorođenčad rođena s carskim rezom imaju crijevne bakterije koje potječu s površine majčine kože, umjesto majčine vagine (Ottman i sur., 2012). Osim toga, na sastav crijevne mikrobiote utječe i prehrana. Naime, crijevna mikrobiota dojenčadi hranjene majčinim mlijekom uglavnom sadrži vrste *Bifidobacterium*, dok dojenčad hranjena industrijskim formulama ima veći broj bakterija iz rodova *Bacteroides*, *Clostridium* i *Lactobacillus*. Specifične komponente majčinog mlijeka kao što su kompleksni oligosaharidi (130 različitih molekula), stimuliraju rast bifidobakterija u intestinalnom traktu dojenčadi (Roger i sur., 2010). Probiotički soj *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> jedan je od najčešće korištenih probiotičkih

sojeva koji se dodaje formuli za dojenčad. Na taj se način potpomaže brojnost bifidobakterija u intestinalnoj mikrobioti djeteta. Da bi se dobili svi pozitivni učinci na ljudsko zdravlje, probiotici moraju biti prisutni u visokim koncentracijama. Probiotici moraju preživjeti proces prerade hrane i prolazak kroz nepovoljne uvjete gastrointestinalnog trakta (GIT) što je izazov za prehrambenu industriju da osmisli inovativne tehnologije koje će osigurati vitalnost probiotičkih bakterija. Probiotička funkcionalnost može se pojačati kada se ti mikroorganizmi ugrađuju u hranu, jer interakcija sa sastojcima hrane može zaštititi mikrobne stanice tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt (Vinderola i sur., 2011). Najčešći prehrambeni matriksi za probiotičke bakterije su različite vrste fermentiranih mliječnih proizvoda, posebno jogurti, ali nekih desetak godina probiotici se mogu naći u matricama bez mlijeka kao što su voćni i bobičasti sokovi, čokolade i proizvodi na bazi žitarica.

Za različite sojeve bakterije *Lactocaseibacillus paracasei* također postoji veliki broj istraživanja u kojima je dokazana njihova probiotička aktivnost (Chondrou i sur., 2020). To su također Gram-pozitivne, nesporogene, fakultativno heterofermentativne bakterije koje su, između ostalog dio normalne mikrobiote humanog intestinalnog trakta. Jones (2017) je objavio veliku kliničku studiju u kojoj je dokazan pozitivan utjecaj sojeva *Lactocaseibacillus paracasei* kod pacijenata s različitim probavnim problemima, kod infektivnih bolesti, pretilosti i depresije.

Cilj ovog doktorskog rada bio je razviti nove nutraceutičke proizvode prerađene hrane na bazi žitarica namijenjene prehrani dojenčadi od 4 mjeseca starosti, koji će uključivati instant pahuljice od riže, instant pahuljice od riže s voćem i instant pahuljice od pšenice, uz dodatak probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> te proizvode za kliničku prehranu – hranu za posebne medicinske potrebe, namijenjenu za dijetalnu prehranu pothranjenih bolesnika (malnutricija povezana s bolešću) ili kada zbog medicinskih razloga nije moguće zadovoljiti prehrambene potrebe uobičajenom prehranom uz dodatak probiotičkog soja *Lactocaseibacillus paracasei* (ranije *Lactobacillus paracasei*) što će navedene proizvode činiti funkcionalnim pripravcima. Ispitan je utjecaj proizvoda na funkcionalna svojstva probiotičkih sojeva BB-12<sup>®</sup> i *Lb. paracasei* kroz niz eksperimenata u okviru probiotičkog koncepta koji uključuju osjetljivost odnosno rezistenciju na antibiotike, preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, dekonjugacijsku aktivnost prema žučnim solima, asimilaciju kolesterola, antagonističko djelovanje protiv nepoželjnih mikroorganizama i potencijalna bakteriocinska aktivnost te adhezijska svojstva na Caco-2 staničnoj liniji te proteinima ekstracelularnog matriksa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Probiotici

Povoljni zdravstveni učinci i rastuća svijest o probioticima privlače pažnju prehrambene industrije (Salminen i Gueimonde, 2004). Prehrambene tvrtke sve više proizvode hranu s dodanim probiotičkim bakterijama, čime stvaraju novu kategoriju hrane koja se naziva funkcionalna hrana odnosno nutraceutici. Probiotičke bakterije imaju brojne zdravstvene učinke na domaćina koje uključuju prevenciju zaraznih bolesti, smanjenje kolesterola u serumu, antikancerogeno djelovanje, ublažavanje simptoma intolerancije na laktozu itd. Osim toga, probiotičke bakterije također moduliraju imunološki odgovor domaćina (Gupta i sur., 2016).

Uz probiotike, često se hrani dodaju i prebiotici, a kada je riječ o njihovoj kombiniranoj primjeni koristi se izraz sinbiotici jer njihov zajednički, zdravstveno povoljni učinak premašuje pojedinačni učinak probiotika i prebiotika. Ako probiotički soj metabolizira prebiotički supstrat, njegov će se rast i razmnožavanje u crijevima selektivno promovirati (Bengmark, 2003).

#### 2.1.1. Identifikacija i karakterizacija probiotičkih sojeva

Niz je zahtjeva koje novi probiotički sojevi moraju zadovoljiti a prethodno ih je potrebno identificirati i karakterizirati (slika 1) (Plessas i sur., 2017; Papadimitriou i sur., 2015; Munoz-Quezada i sur., 2013). Do sada je detaljno okarakteriziran relativno mali broj probiotičkih bakterija. Prvo je potrebno provesti probir pa uzgoj te razviti robusni modelni sustav za proučavanje temeljnih probiotičkih funkcija pojedinog bakterijskog soja. Uz metodu „HIGH THROUGHPUT“ razvijena je i metoda koja koristi MALDI-TOF i 16S rRNA metodu sekvencioniranja (Sood i sur., 2019; Lagier i sur., 2016; Lagier i sur., 2012). Takav se pristup pokazao dovoljno kompetentnim za uzgoj potencijalno novih probiotičkih vrsta (Zou i sur., 2019). Sljedeći korak je procjena probiotičkih potencijala ovih mikroorganizama u *in vitro* i *in vivo* studijama. Uzgoj u bioreaktoru je koristan za razmnožavanje i uspostavljanje kompleksne populacije mikrobiote *in vitro* simulacijom fizioloških stanja koja su uobičajena u GIT-u (Guzman-Rodriguez i sur., 2018). Ovi bioreaktori koriste princip kontinuiranog praćenja kulture i proučavanje složenih mikrobnih interakcija i kontrolnih čimbenika kao što su anaerobnost, pH i dostupnost hranjivih tvari (Auchtung i sur., 2015). U bioreaktorima je moguće uzgojiti mješovitu kulturu mikroorganizama i proučavati dinamiku zajednice koristeći

proteomičke i metagenomičke metode sekvencioniranja. Jednom uspostavljena mikrobna zajednica u bioreaktoru može se dalje koristiti s ciljem provjere probiotičkog potencijala.

Za *in vivo* studije mogu se koristiti gnotobiotički modeli životinja bez mikroorganizama koji su kolonizirani poznatom mikrobiotom (Faith i sur., 2014). Ovi gnotobiotički životinjski modeli trebaju pomoću koloniziranih bakterija razviti normalan imunološki odgovor i gastrointestinalne funkcije. U modelu miševa, konzorcij od osam mikrobnih vrsta poznatih kao promijenjena Schaedlerova flora (ASF) manifestira uobičajen imunološki odgovor aktiviranjem regulatornih T-stanica i održavanje normalne homeostaze u crijevima. Ovi modeli miševa komercijalno su dostupni (Moghadamrad i sur., 2015; Shen i sur., 2015), kao i gnotobiotički modeli pilića s utvrđenom poznatom mikrobiotom (Thomas i sur., 2018). Svi ovi resursi omogućavaju proučavanje novih sojeva probiotika. Dobro okarakterizirani probiotički sojevi mogu se kombinirati s odgovarajućim prebioticima da bi se postigli pogodni učinci na zdravlje. Enzimski procesi u proizvodnji prebiotika za sada imaju nizak prinos, uz visoke troškove proizvodnje. Da bi se dobili jeftini i učinkoviti prirodni prebiotici, istražuju se oligosaharidi, podrijetlom iz biljnih izvora koji bi mogli biti ekonomski pristupačniji od prebiotika dobivenih, naprimjer, iz sirutke konverzijom laktoze primjenom  $\beta$ -galaktozidaze u oligosaharide sastavljene od glukoze i galaktoze.



**Slika 1.** Zahtjevi za probiotičke sojeve (prema Kumar i sur., 2020)

### 2.1.2. Utjecaj probiotika na obnavljanje intestinalne mikrobiote čovjeka

Intestinalna mikrobiota u ljudi pretežno je sastavljena od bakterija i ima ključnu ulogu u prehrani i zdravlju. Humana intestinalna mikrobiota razlikuje se na razini roda, vrsta i sojeva zbog izrazitih razlika u prehranbenim navikama, dobi, etničkoj pripadnosti i načinu života. Ovi čimbenici su također odgovorni za generiranje interindividualne varijabilnosti. Međutim, crijevna mikrobiota sadržana na razini crijevnih resica, uglavnom je zastupljena u četiri bakterijska koljena; Firmicutes, Bacteroides, Actinobacteria i Proteobacteria. Prehrana i način života su dva glavna čimbenika koji imaju središnju ulogu u održavanju ravnoteže crijevnog mikrobioma, a time i ljudskog zdravlja (Kumar i sur., 2020). Za stjecanje holističkog pogleda, integrirani genski katalog s kompletnim genskim setom mikroflore ljudskih crijeva ukazuje na najveću zastupljenost bakterija iz rodova *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, pa čak i *Helicobacter*, pretežno *H. winghamensis* (Li i sur., 2014).

Dvije su glavne skupine enterotipova. Vrste iz rodova *Bacteroides* ili *Clostridiales* uglavnom prevladavaju kod europskih i američkih pojedinaca i povezuju se s prehranom s visokim udjelom proteina i masti. *Prevotella* je glavni rod kod nezapadnih osoba i povezana je s vegetarijanskom i biljnom prehranom bogatom vlaknima (Gorvitovskaia i sur., 2016). U sastavu crijevne mikrobiote također su i patogene bakterije kao što su *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile* i *Escherichia coli* (Talebi, 2014; Conway i sur., 2015). Uobičajene simbiotske bakterije, na temelju mehanizma „kolonizacijske rezistencije“ mogu spriječiti rast patogenih bakterija i proizvoditi metabolite koje ljudski organizam ne može sam sintetizirati. Na primjer, pretpostavlja se da uobičajenu crijevnu mikrobiotu kod ljudi čini preko tri milijuna gena koji kodiraju za mikrobne metabolite s brojnim funkcijama kod domaćina koji ima samo 23 000 gena (Valdes i sur., 2018). Također je nedvojbeno utvrđeno da je nastanak mikrobioma tijekom ranih stadija života uglavnom stohastički i obično su prvi kolonizatori uglavnom fakultativni anaerobi (Ferretti i sur., 2018). Ti početni kolonizatori osiguravaju prijelaz prema anaerobnim uvjetima u crijevima te se zbog njih s protokom vremena povećava broj strogih anaeroba čiji je opstanak presudan za održavanje dobrog zdravlja probavnog sustava (Ferretti i sur., 2018).

Zbog anaerobnih uvjeta u debelom crijevu, većina mikroorganizama stvara energiju kroz proces saharolitičke fermentacije korištenjem dijetalnih vlakana i biosintezom kratkolančanih masnih kiselina (SCFA). SCFA su prisutne uglavnom u debelom crijevu, a sastoje se od acetata, propionata i butirata ( $\geq 95\%$ ) u molarnim omjerima 60:20:20. Uz ove metabolite proizvode se i drugi metaboliti kao što su laktat, sukcinat, piruvat, etanol kao i

plinovi H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> i H<sub>2</sub>S. Acetat je glavna SCFA koja se proizvodi u debelom crijevu i uglavnom je koriste mišići, bubrezi, stanice srca, jetre i mozga. Nakon apsorpcije, poznato je da acetat povećava sintezu kolesterola, dok propionat, koji se metabolizira u jetri, inhibira sintezu kolesterola (Wong i sur., 2006). S druge strane, butirat se u velikoj mjeri metabolizira u kolonocitima i služi kao glavni izvor energije (Roberfroid i sur., 2010). SCFA također pomažu u inhibiranju patogena u crijevima snižavanjem pH.

Iako sastav i funkcionalnu karakterizaciju zdrave mikrobiote i dalje preostaje preciznije definirati, pokazano je da poremećaj ravnoteže mikrobiote uzrokuje ozbiljne posljedice na ljudsko zdravlje. Nastala neravnoteža može se obnoviti pomoću suplementacije (obogaćivanja) hrane s korisnim probiotičkim bakterijama. Imajući na umu blagotvoran učinak ovih „dobrih bakterija“, pojavljuje se koncept liječenja različitih bolesti korištenjem probiotika sljedeće generacije nazvanih farmabiotici tj. „živi lijekovi“ (Abraham i sur., 2017). Zdrava mikrobiota crijeva ima vitalnu ulogu u zdravlju, a bilo koja promjena homeostaze mikrobiote crijeva naziva se disbioza crijeva. Do sada su uloženi veliki napor u području potencijalnog ublažavanja simptoma disbioze probavnog sustava korištenjem modernih probiotika. Većina trenutno korištenih sojeva probiotika u tu svrhu pripada rodovima *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus*. Uvođenje novijih, „omičkih“ tehnika u kombinaciji s primjenom gnotobiotičkih životinjskih modela omogućuju razvoj novih terapija probioticima. Međutim, kako komercijalno dostupni probiotici nisu klasificirani kao lijekovi, nedostaje adekvatna zakonska regulativa koja bi zaštitila krajnje korisnike od pseudo-probiotičkih proizvoda. U budućnosti su potrebni rigorozni propisi da bi se razvili probiotički proizvodi nove generacije (Kumar i sur., 2020).

Do sada određen omjer ljudskih ( $3,0 \cdot 10^{13}$ ) i bakterijskih ( $3,8 \cdot 10^{13}$ ) stanica je približno 1: 1,3, s maksimumom prisutnošću bakterija u debelom crijevu ( $10^{14}$ ) praćeno slinom i zubnim plakom ( $10^{12}$ ) (Timmis i sur., 2019). Crijevna mikrobiota održava ljudsko zdravlje prvenstveno pozitivnim učincima na crijevni epitel (Natividad i sur., 2013), povećavanjem učinkovitog iskorištavanja izvora energije (den Besten i sur., 2013), štiteći crijeva od patogena i regulirajući imunitet domaćina (Gensollen i sur., 2016). Na temelju dostupnih podataka o crijevnoj mikrobioti i disbiozi s obzirom na određene bolesti, crijevna mikrobiota može se obnoviti radi održavanja integriteta crijeva i zdravlja domaćina, korištenjem probiotika koji uključuju veliki broj dobro karakteriziranih živih mikroorganizama s dokazanim povoljnim učincima. Ti zdravstveno povoljni učinci uključuju ublažavanje gastrointestinalnih (GI) simptoma, zaštitu od bolesti i jačanje imunološkog sustava (McKean i sur., 2017).



U opsežne studije zasnovane na metagenomičkim istraživanjima zdravih i bolesnih ljudi, znanje o mikrobnom sastavu na razini vrsta i njihove specifične uloge u određenim nišama značajno se poboljšalo (Sood i sur., 2019; Lagier i sur., 2016; Lagier i sur., 2012). Usprkos tome, svako ljudsko biće je novi izvor u kojem se nalazi jedinstveni sklop mikrobiote. Zato je postojanje referentnih zbirki genoma ljudske crijevne mikrobiote često osporavano. Ukupno 1520 bakterijskih genoma sekvencioniranih u jednoj studiji, pokrivaju većinu do sada zabilježenih bakterijskih vrsta i rodova prisutnih u crijevnoj mikrobioti čovjeka (Zou i sur., 2019). Na temelju ovog istraživanja, trenutni referentni katalog je proširen s 264 novih bakterijskih vrsta koje do sada nisu bile zastupljene u postojećem referentnom katalogu genoma, sugerirajući potrebu za funkcionalnom karakterizacijom mikrobiote ljudskih crijeva u širim razmjerima.

### **2.1.3. Probiotici kao funkcionalni dodaci hrani**

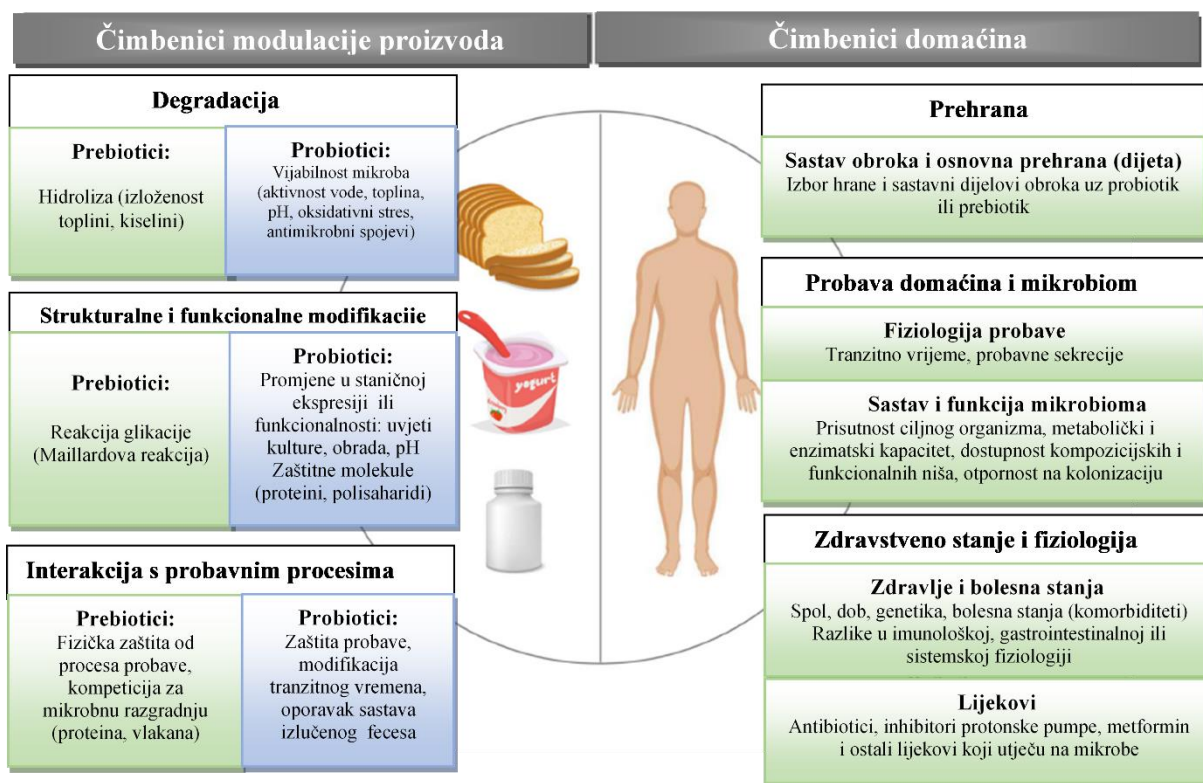
Koncept probiotika („za život“) predložio je nobelovac Elie Metchnikoff početkom 20. stoljeća, pretpostavljajući da će konzumacijom korisnih bakterija jogurta odgoditi senilnost i unaprijediti zdravlje. Sa željom za unaprjeđenjem načina života i kvalitete hrane, zahtjevi za probioticima kao dodacima prehrani progresivno rastu posljednjih godina. Probiotici se koriste kao obećavajući pojačivači kvalitete hrane i uglavnom su uključeni u optimirane kombinacije obroka (Markova i sur., 2014). Tijekom procesa proizvodnje, kulture korisnih bakterija se dodaju u hranu. Komercijalna proizvodnja ovih kultura podrazumijeva visoko koncentrirane prehrambene dodatke (*engl. DVS - dietary viable supplements*) bilo kao smrznutih ili liofiliziranih kultura (Kumar i sur., 2020).

Većina proizvođača preferira upotrebu DVS kultura. Za usporedbu, smrznute kulture sadrže više od  $10^{10}$  CFU  $g^{-1}$ , dok liofilizirane kulture obično sadrže više od  $10^{11}$  CFU  $g^{-1}$  (Berner i sur., 2006). Proizvodnja octene kiseline s vrstama iz roda *Bifidobacterium*, može promijeniti okus i aromu prehrambenog proizvoda tijekom vrenja ili skladištenja. Stoga se mora osigurati da inokulacija kulture ne utječe nepovoljno na hranu. Ambalažni materijali i uvjeti skladištenja presudni su koraci u pripremanju probiotičkih dodataka. DVS su posebno dizajnirani prehrambeni dodaci koji se konzumiraju u cilju ostvarivanja specifičnih rezultata, stoga se nazivaju i funkcionalna hrana. Uzimajući ih u obzir, više od 500 probiotika kao prehrambenih dodataka uvedeno je širom svijeta (Begum i sur., 2017). Te linije proizvoda uključuju fermentirane žitarice, voće, povrće i mesne prehrambene proizvode koji stječu sve veću

popularnost među potrošačima. Tipični uspješni primjeri proizvoda su sir i umaci, majoneza, jestivi namazi, sladoled, mlijeko, sokovi, itd. Međutim, nedavni napredak u istraživanju mikrobioma otkrio je da ovi dodaci s nedovoljnim brojem bakterijskih kultura nisu dovoljni za održavanje ljudskog zdravlja pa postoji daljnja potreba identifikacije i karakterizacije potencijalnih probiotičkih sojeva za postizanje cilja boljeg prehranbenog statusa zajedno s učincima protiv bolesti (Kumar i sur., 2020).

#### **2.1.4. Glavni izazovi u razvoju formulacija probiotika i njihovoj validaciji**

Za učinkovitu primjenu probiotika u suzbijanju bolesti i poboljšanju zdravlja domaćina potrebno je savladati nekoliko izazova. Ti izazovi uključuju izolaciju i karakterizaciju novih sojeva probiotika, pronalazak jeftinijih, ali učinkovitih izvora prebiotika, uključivanje obveznih anaeroba kao probiotika prevladavanjem stresnih uvjeta crijevnog tranzita, bolje preživljavanje i razuman trošak proizvodnje sinbiotika. Kada se razmatraju nutritivni i klinički dokazi o dobrobitima probiotika i prebiotika, ključno je pitanje može li pojedini potrošač razumno očekivati da će iskusiti zdravstvene dobrobiti dokazane u kliničkom ispitivanju. Dok matriks odabran za probiotike ili prebiotike igra važnu ulogu, čimbenici kao što su zdravstveno stanje, dob i spol, kao i osnovne prehranbene navike, genetika ili sastav mikrobioma domaćina također su nedvojbeno važni i moraju se uzeti u obzir u procjeni učinkovitosti funkcionalnih proizvoda (Cunningham i sur., 2021). Sve se više spoznaje da navedeni čimbenici utječu na fiziološki odgovor domaćina na ispitivani probiotik i prebiotik (slika 2).



**Slika 2.** Potencijalni čimbenici svojstveni formulaciji proizvoda i specifični za pojedinca koji ga konzumira utječu na učinak probiotičkih i prebiotičkih proizvoda (prema Cunningham i sur., 2021)

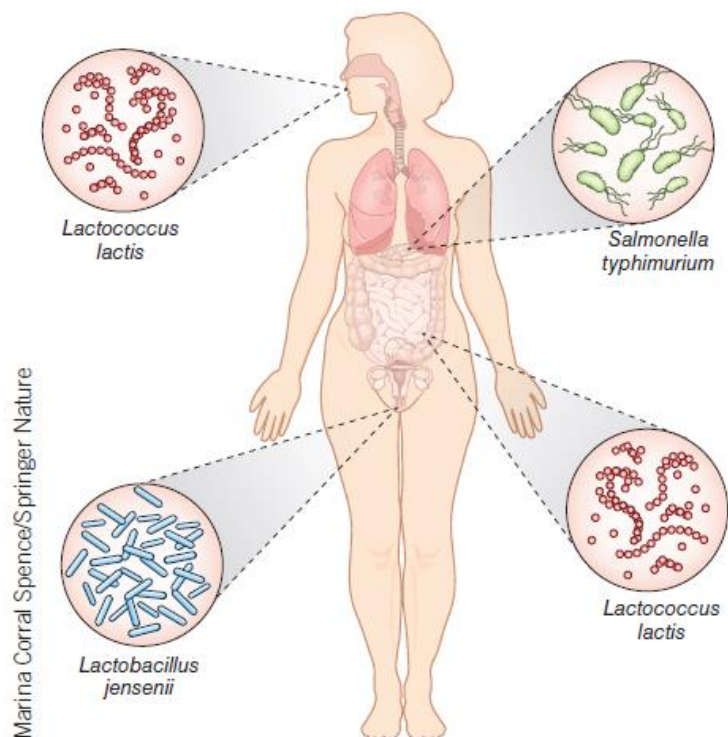
Izazovi također uključuju neprikladan marketing i ograničenja vezana uz propise za probiotičke proizvode jer se probiotici kao dodaci hrani i nutraceutici u mnogim zemljama ne smatraju medicinskim proizvodima. Trenutni stav Europske komisije je da dodaci prehrani koji sadrže probiotičke bakterije ne smiju na deklaraciji navoditi riječ „probiotik“ i navode koji bi upućivali na bilo kakvu zdravstvenu tvrdnju. Kako sama riječ „probiotik“ upućuje na tjelesne funkcije, prema vodičima EU navođenje te riječi smatra se zdravstvenom tvrdnjom. 2009. godine EFSA je objavila vodič („Guidance“) i znanstveno mišljenje („Scientific opinion“) o podnošenju zahtjeva za zdravstvenim tvrdnjama za nekarakterizirane mikroorganizme. Nakon toga je zaustavljena daljnja znanstvena evaluacija probiotika pri čemu se taj naziv više ne smije navoditi na deklaracijama dodataka prehrani, a dozvoljeno je samo korištenje prehrambene tvrdnje „sadrži kulturu mikroorganizama“ uz navođenje količine. No, neke države članice su donijele vlastite nacionalne smjernice s određenim specifičnim uvjetima. To su Bugarska, Češka, Grčka, Italija, Malta i Španjolska. Nedavno je Nizozemska agencija za hranu objavila dokument s prehrambenim i zdravstvenim tvrdnjama „Nutrition and Health Claims Handbook“

u kojem navodi da dokle god Europska komisija ne donese konačnu odluku o oznaci probiotici na dodacima prehrani, ova oznaka se može koristiti unutar Nizozemske, čime je navođenje riječi „probiotik” odnedavno dozvoljeno na tekstovima deklaracija dodataka prehrani u Nizozemskoj (<https://www.ipaeurope.org/legal-framework/european-legal-framework/>).

## **2.2. Probiotici druge generacije-živi bioterapeutici**

Za razliku od probiotika za koje se, unatoč tome što još uvijek nemaju odobrene zdravstvene tvrdnje, općenito smatra da postoji dovoljno znanstvenih dokaza o njihovom povoljnom učinku na zdravlje, veliki interes znanstvene zajednice pobuđuje područje genetičke modifikacije bakterijskih kultura tzv. rekombinantnih bakterija za koje se očekuje da će biti prepoznate kao lijek i da će se moći koristiti u terapiji ili ublažavaju bolesti. Te rekombinantne bakterije stvaraju specifične proteine, zahvaljujući genima koje su znanstvenici insertirali u mikrobne kulture pomoću metoda genetičkog inženjerstva. Humani inzulin je prvi lijek dobiven od rekombinantne bakterije *Escherichia coli* 1978. godine, a koji je dobio odobrenje 1982. godine. Ubrzo nakon toga, istraživači su počeli testirati različite mikrobe za proizvodnju terapijskih proteina (Maxmen, 2017).

Konvencionalno se rekombinantne bakterije uzgajaju u bioreaktorima, a njihovi produkti se dalje izoliraju i pročišćavaju, kako bi bili pogodni za tretman ljudi, a u novije vrijeme istraživači razmatraju primjenu rekombinantnih bakterija direktno na pacijentima. Jednom kada se bakterijske kulture nađu unutar organizma, producirajući terapijske proteine djelovale bi kao „male tvornice“. Proizvodi koji sadrže žive genetički modificirane bakterije u fazi su kliničkih istraživanja i za mnoge od mikroba koji se istražuju dokazano je da osiguravaju učinkovitiju isporuku lijeka u usporedbi s terapeutima koji se trenutno proizvode unutar ili se ekstrahiraju iz rekombinantnih bakterija (Maxmen, 2017).



**Slika 3.** Probiotički sojevi kao potencijalni „živi lijekovi“ (Maxmen, 2017)

Znanstvenici su genetički modificirali bakterije na način da produciraju terapijske proteine. Pacijenti bi ubrizgavanjem, gutanjem ili umetanjem supozitorija živih bakterija liječili razna stanja. Mikroorganizam *Lactococcus lactis*, koji se koristi u proizvodnji mliječnih proizvoda, genetski je dizajniran za lučenje trefolil faktora, proteina koji štiti tkivo usne šupljine oštećene kemoterapijom. Oslabljena *Salmonella Typhimurium*, koja je inače patogen, modificirana je tako da suzbija rast tumora. *Lactococcus lactis* je i genetički modificiran mikroorganizam za proizvodnju antitumorskih faktora nekroze koji djeluju na smirivanje upale kod upalnih bolesti crijeva. *Lactobacillus jensenii* dio je uobičajene vaginalne mikrobiote, a genetički je modificiran u svrhu proizvodnje cijanovirusa koji blokira HIV infekciju u vagini. FDA razmatra nekoliko proizvoda, nazivajući ih „živim mikrobnim vektorima“ ili „živim bioterapijskim proizvodima“, koji uključuju bakterijske sojeve namijenjene liječenju ili sprječavanju nastanka bolesti. Neformalno, istraživači nazivaju nove proizvode „dizajnerskim probioticima“ i probioticima 2.0. (Maxmen, 2017).

Genetičke modifikacije bakterijskih kultura mogu se vršiti na komensalnim bakterijama kao što su različiti sojevi *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus jensenii*. Kod nekih komensalnih

bakterija kao što je *Lb. crispatus*, izoliran iz vaginalne mikroflore, nije potrebna genetička modifikacija za dobivanje zdravstvenog učinka sprečavanja povratka bakterijske vaginoze i infekcije urinarnog trakta, ali i smanjenja rizika od HIV infekcije, već je samo potrebno dizajniranje prikladnog načina unosa bakterijske vrste u ljudski organizam, kao što je postupak dobivanja osušene kulture bakterijskih stanica. Osim komensalnih bakterija, genetičke modifikacije patogenih bakterija su interesantno područje kod kojih se znanstvenici suočavaju s brojnim izazovima. Prva dokumentirana upotreba patogenih bakterija u terapiji bolesti datira iz 1891. godine kada je kirurg William Coley bolesnike oboljele od karcinoma inficirao bakterijama roda *Streptococcus*. U nekim slučajevima je to dovelo do smanjenja tumora, međutim u nekima je došlo do opasne streptokokne infekcije zbog čega su zaustavljena daljnja ispitivanja na ljudima (Maxmen, 2017).

Buduća istraživanja provode se uglavnom u laboratorijskim uvjetima i pokusnim životinjama. Ciljano područje genetičke modifikacije patogenih bakterija je potencijalno antikancerogeno djelovanje. Otkriveno je da ove bakterije rastu u tumorima jer im za razmnožavanje pogoduje okruženje s malo kisika ili bez njega. Unutar tumora bakterije troše kancerozno tkivo, izglednijuju tumor i pokreću lokalni upalni odgovor. Veliki izazov znanstvenicima predstavlja otkrivanje mehanizma deaktivacije patogenog učinka bakterija. Tako je *Clostridium novyi*, bakteriju uključenu u potencijalno smrtonosne infekcije rana, tim Shibina Zhou, onkologa s Medicinskog fakulteta Sveučilišta Johns Hopkins iz Baltimorea učinio sigurnijom za ljude uklanjanjem gena koji kodira produkciju  $\alpha$ -toksina koji oštećuje stanice. Mehanizam djelovanja bakterijske kulture *Clostridium novyi* bazira se na činjenici da kultura unutar stanica tumora izaziva lokalni upalni odgovor koji stimulira napad T stanica na tumor. Ista grupa istraživača započela je razvoj genetički modificiranog soja *Clostridium novyi* s ugrađenim genom za pomoć organizmu u borbi protiv karcinoma (Maxmen, 2017).

Za suzbijanje patogenosti bakterije *Listeria monocytogenes*, mikroorganizma poznatog kao uzročnika trovanja hranom, znanstvenici su uklonili gen koji pomaže mikroorganizmu da napadne stanice jetre, a ugradili gene koji uzrokuju stvaranje tumorskog proteina mesotelina koji izazva snažan imunološki odgovor ljudskog organizma. U budućnosti se kod tretiranja karcinoma gušterače planira kombiniranje bakterijske kulture s inhibitorom. Problematika korištenja patogenih mikroorganizama u svrhu liječenja tumora je njihova patogenost i česta pojava sistemskih infekcija zbog čega su brojna klinička istraživanja morala biti obustavljena (Maxmen, 2017).

Znanstvenik Bermudes predviđa da će za dobivanje odobrenja za terapijsko davanje živih bakterijskih kultura trebati više vremena nego za neke druge terapijske modele te da će bakterijske kulture za liječenje bolesti crijeva, usne šupljine i vaginalne sluznice prve ući u kliničku praksu, a zatim za intravensko tretiranje karcinoma. Očekuje se razvoj soja iz roda *Lactococcus* koji bi trebao lučiti proinzulin kod pacijenata s dijabetesom te tako spriječiti stupanj bolesti koji zahtjeva svakodnevne doze inzulina i razvoj ciljane imunoterapije karcinoma (Maxmen, 2017).

Svakako je potencijalna primjena bakterijskih kultura kod karcinoma najinteresantnije područje primjene genetički modificiranih bakterija. Neke je vrste tumora teško liječiti kemoterapijom ili zračenjem. Jedan od razloga je taj što područja tumora nemaju puno krvnih žila, što lijekovima otežava pristup do tih područja. Jedan od načina na koji su istraživači nedavno pokušali prevladati ovaj problem je ubrizgavanje posebnih vrsta bakterija u tumore. Te su bakterije genetički izmijenjene tako da uzrokuju odumiranje tumorskih stanica. Ideja je da bi ove bakterije mogle biti od pomoći kemoterapijskim lijekovima u borbi protiv karcinoma. Neka od kliničkih istraživanja koja se provode istražuju najveću dozu tolerancije primjene bakterijske kulture *Clostridium novyi* NT u kombinaciji s imunoterapijskim lijekom, monoklonskim protutijelom pembrolizumabom za kontrolu bolesti kod uznapredovanih tumora (National Library of Medicine, 2021a).

Izazovi pri kreiranju genetičke modifikacije bakterijskih kultura, komensalnih ili patogenih, svakako je i pitanje sprječavanja neovisnog preživljavanja genetički modificiranih bakterija u ekosustavu (Maxmen, 2017). Tako je proizveden genetički modificiran soj *Lactococcus lactis* s nedostatkom gena koji kodira za timidin, aminokiselinu koja je neophodna za neovisno preživljavanje bakterija. Da bi preživjela, bakterijska kultura mora biti u okolišu gdje je prisutan timidin, a to je ljudski organizam ili laboratorijska hranjiva podloga. Timidin nije prisutan u neživom okolišu kao što je zrak, tako da u prirodnom okruženju nije moguće preživljavanje genetički modificiranog soja *Lc. lactis* što smanjuje rizik od prijenosa insertiranih gena u genome drugih bakterija koje mogu biti također prisutne u ekosustavu (Steidler i sur., 2003).

### 2.2.1. Budućnost probiotika: Ekobiotici

Na temelju epidemioloških podataka, dokazano je da smanjenje učestalosti infekcija u razvijenim i zemljama u razvoju dovodi do sve veće učestalosti pojave autoimunih i alergijskih bolesti (Okada i sur., 2010). Kod osoba s osiromašenom crijevnom mikrobiotom (uglavnom kroz upotrebu antibiotika širokog spektra), pojavljuje se patogena bakterija *Clostridium difficile*, koja uspješno kolonizira debelo crijevo što dovodi do pojave niza simptoma od blagog i ponavljajućeg proljeva do komplikacija opasnih po život poput pseudomembranskog kolitisa (PMC), toksičnog megakolona i perforacije debelog crijeva (Smits i sur., 2016). Infekcija s *C. difficile* jedna je od najčešćih zdravstvenih problema koji pogađa godišnje pola milijuna ljudi širom svijeta i stvara svake godine velike financijske troškove (Kumar i sur., 2020). Tradicionalno se za liječenje infekcije *C. difficile*, koriste antibiotici poput metronidazola, fidaksomicina i vankomicina (Bagdasarian i sur., 2016). Zbog ponovnog pojavljivanja bolesti, čak i nakon tretmana antibioticima, recentno se primjenjuje transplantacija fekalne mikrobiote (FMT) kao alternativno rješenje (van Nood i sur., 2013). Ova tehnika rehabilitacije normalne crijevne mikrobiote s ponovnim uvođenjem raznolikosti mikrobioma u debelo crijevo istiskuje patogene kompetitivnom ekskluzijom konkurentnim metaboličkim interakcijama i stimuliranjem domaćinovog imunološkog odgovora. Međutim, ukupna stopa neuspjeha FMT je približno 12 % i uvijek postoji rizik prijenosa neidentificiranih patogena (Meighani i sur., 2016). Da bi se ponovo uspostavila zdrava mikrobiota, neophodno je u crijeva unijeti uobičajenu mikrobiotu. Istraživači razvijaju ekobiotike kao alternativu FMT-u. Ekobiotika podrazumijeva znanost o dizajnu i formulaciji terapijskih doza mikroorganizama koji se unose oralno, a bazirani su na ekologiji crijeva. Klinička ispitivanja pokazala su djelotvornost ovog koncepta (Kumar i sur., 2020). Uspostavljen je kao alternativa FMT-u prema Seresovim zdravstvenim planovima (SER) ispitivanja za liječenje ponovljenih infekcija *C. difficile* (SER-109: bakterije koje tvore spore dobivene iz doniranih fekalija); ulceroznog kolitisa (SER-287: bakterijske spore iz bioloških izvora); i primarne infekcije *C. difficile* za sprečavanje recidiva (SER-262: anaerobne komensalne bakterijske spore proizvedene fermentacijom *in vitro*) (Vargason i sur., 2018). Pripravak SER-109, bio je uspješan u liječenju 29 od 30 pacijenata, a SER-109 se sastoji od 50 definiranih bakterijskih vrsta koje stvaraju spore, iz zdravih darivatelja FMT-a i pokazao se jednom od najboljih alternativa klasičnom FMT-u. (Kumar i sur., 2020).

Na sporama bazirana ciljana isporuka mikroorganizama u GIT osigurava stabilnost što je dokazano kliničkim ispitivanjima (Vargason i sur., 2018). Terapije temeljene na pripravcima



živih mikroorganizama mogu se koristiti za liječenje širokog spektra bolesti na temelju inhibicijskog učinka korisnih mikroorganizama na patogene (tablica 1). Kako bi se prevladala stopa neuspjeha, potrebno je dizajnirati i razviti personalizirane formulacije uključivanjem pomoćnih tvari za zaštitu spora koje se koriste za gastrointestinalni transport obligatnih anaeroba nakon njihove oralne primjene (Kumar i sur., 2020).

**Tablica 1.** Popis bakterijskih izolata s inhibicijskim učinkom na patogene u testnim kokulturama (Gibson i sur., 2017; Roytio i Ouwehand, 2014; Roberfroid i sur., 2010; Wong i sur., 2006)

<b>Bakterijska vrsta</b>	<b>Patogen</b>
<i>Bacteroides ovatus</i> SNUG 40239	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Bifidobacterium longum</i> IPLA20022, <i>B. breve</i> IPLA20006	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Clostridium butyricum</i> MIYAIRI 588	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B-30892	<i>Clostridium difficile</i>
<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> serovar enteritidis
<i>Enterococcus faecalis</i> EJ97	<i>Listeria monocytogenes</i>

### 2.3. Bifidobakterije

Bakterije roda *Bifidobacterium* jedne su od prvih mikroorganizama koji koloniziraju ljudski intestinalni trakt i vjeruje se da imaju pozitivne zdravstvene učinke za svog domaćina. Zbog svojih svojstava u promicanju zdravlja, bifidobakterije se dodaju u mnoge funkcionalne namirnice kao aktivni sastojci. Bifidobakterije se prirodno pojavljuju u nizu ekoloških niša koje su izravno ili neizravno povezane s gastrointestinalnim traktom, poput usne šupljine i otpadnih komunalnih voda. Da bi uspjele preživjeti u ovim ekološkim nišama, bifidobakterije se moraju posebno prilagoditi. Određivanjem sekvenci genoma otkrivena su svojstva koja mogu objasniti njihovu ekološku prilagodbu, poput specifičnih metaboličkih svojstava, izbjegavanje reakcije imunološkog sustava domaćina i kolonizacije domaćina kroz posebna adhezijska svojstva (O'Callaghan i van Sinderen, 2016).

Proteklih 30 godina istraživanja su fokusirana na one bakterijske vrste iz mikrobiote crijeva koje iskazuju zdravstvene ili probiotičke učinke, poput zaštite domaćina od patogena

(Hooper i sur., 1999), modulacije imunološkog sustava (O'Hara i Shanahan, 2007) i osiguravanje hranjivih sastojaka putem razgradnje neprobavljivih ugljikohidrata (Leahy i sur., 2005). Nadalje, promjene sastava mikrobiote GIT-a povezane su s određenim gastrointestinalnim bolestima kao što su upalne bolesti crijeva i nekrotizirajući enterokolitis (Ott i sur., 2004). Posebno je zanimanje usredotočeno na pripadnike roda *Bifidobacterium*, od kojih su neki uključeni kao žive komponente u različite, takozvane funkcionalne namirnice (Ventura i sur., 2004). Bifidobakterije je prvi put izolirao Tissier, 1899. godine iz stolice dojene djece i od tada su bifidobakterije izolirane iz niza različitih ekoloških niša kao što su usna šupljina, kanalizacija i crijeva insekata, GIT različitih sisavaca i u novije vrijeme iz vodenog kefira (Laureys i sur., 2016).

Iako je dobro utvrđeno da bifidobakterije daju pozitivne zdravstvene učinke ljudskom organizmu, postoji očigledan nedostatak znanja o molekularnim mehanizmima koji objašnjavaju ove probiotička svojstva bakterija iz roda *Bifidobacterium* (Cronin i sur., 2011). Dešifriranje čitavih sekvenci genoma može osvijetliti genetičku osnovu probiotičkog djelovanja bifidobakterija, ili molekularne prilagodbe koje im omogućuju kompetitivnu prednost u konkurentnoj ekološkoj niši kao što je GIT (Ventura i sur., 2014). Iako je sekvenciranje bifidobakterijskih genoma stvorilo vrlo opsežan skup genskih podataka, ipak se te genomske informacije teško istražuju na funkcionalnoj razini zbog nedostatka alata koji omogućuju dešifriranje funkcije pojedinih gena bifidobakterija (Serafini i sur., 2012).

Od objavljivanja prvog bifidobakterijskog genoma 2002. godine, bilježi se stalni porast broja javno dostupnih sekvenci bifidobakterijskih genoma. U bazi podataka NCBI (prosinac 2021) je ukupno objavljeno 95 kompletnih sekvenci genoma, a dostupno je 17 cjelovitih sekvenci genoma referentnih sojeva iz roda *Bifidobacterium* poput *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum* i *B. angulatum* (tablica 2).

**Tablica 2.** Sekvencionirani genomi referentnih sojeva *Bifidobacterium* spp. (National Library of Medicine (2021b))

Naziv mikroorganizma	Oznaka	Duljina sekvence	Datum podnošenja
<i>Bifidobacterium actinocoloniiforme</i> DSM 22766	GCF_001263395.1	1830060	2015-08-10
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	GCF_003030905.1	2192428	2018-04-03
<i>Bifidobacterium angulatum</i> DSM 20098 = JCM 7096	GCF_001025155.1	2021974	2015-03-24
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BLC1	GCF_000224965.2	1938583	2013-02-05
<i>Bifidobacterium asteroides</i> PRL2011	GCF_000304215.1	2167304	2012-10-09
<i>Bifidobacterium breve</i> JCM 7017	GCF_000568975.1	2288919	2014-02-14
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> DSM 16992 = JCM 1194 = LMG 11043	GCF_001025195.1	2079525	2015-03-24
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	GCF_002761235.1	2257294	2017-11-07
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	GCF_000737865.1	1755151	2014-08-05
<i>Bifidobacterium dentium</i> JCM 1195 = DSM 20436	GCF_001042595.1	2635669	2015-02-17
<i>Bifidobacterium eulemuris</i>	GCF_014898155.1	2920839	2020-10-20
<i>Bifidobacterium indicum</i> LMG 11587 = DSM 20214	GCF_000706765.1	1734546	2014-06-13
<i>Bifidobacterium lemorum</i>	GCF_014898175.1	2965103	2020-10-20
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> 157F	GCF_000196575.1	2408831	2011-01-28
<i>Bifidobacterium pseudocatenuatum</i>	GCF_003952825.1	2192395	2018-12-18
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	GCF_002282915.1	2008102	2017-08-31
<i>Bifidobacterium scardovii</i> JCM 12489 = DSM 13734	GCF_001042635.1	3158347	2015-02-17

Prosječna veličina bifidobakterijskog genoma je 2,2 Mb, iako postoje značajne varijacije u veličini, na primjer *B. indicum* LMG11587 sadrži genom veličine 1,73 Mb, dok *B. scardovii* JCM12489 sadrži genom duljine 3,16 Mb. Bifidobakterijski genomi obično kodiraju

52–58 tRNA gena po genomu, iako postoje iznimke, npr., genom *B. longum* subsp. *infantis* ATCC15697 obuhvaća 79 tRNA kodirajućih gena. Broj rRNA operona (klastera gena) unutar bifidobakterijskih genoma obično se kreće od dva do pet pa se sugerira da je broj operona rRNA prisutnih u genomu u korelaciji sa sposobnošću prilagođavanja određene vrste okolišnim uvjetima (Klappenbach i sur., 2000). Sadržaj G + C u kompletnim bifidobakterijskim genima kreće se od 59,2 % (*B. adolescentis*) do 64,6 % (*B. scardovii*), dok prosječni broj gena koji sadrži bifidobakterijski genom iznosi 1825 (tablica 2). Tri vrste, *B. indicum*, *B. coryneforme* i *B. animalis* posjeduju najmanji broj gena, u skladu s njihovom malom veličinom genoma (Ventura i sur., 2014).

### 2.3.1. Zdravstveni učinci bifidobakterija

Mikrobna zajednica GIT-a evoluirala je za prilagodbu i preživljavanje u ljudskom GIT-u i obično se naziva intestinalna mikrobiota. Debelo crijevo može sadržavati do  $10^{12}$  bakterijskih stanica / g luminalnog sadržaja što ga čini najgušće naseljenim područjem GIT-a. Članovi intestinalne mikrobiote komuniciraju sa svojim domaćinom na različite načine, a mogu biti komensali, oportunistički patogeni ili mikroorganizmi koji promiču zdravlje odnosno probiotici (Guarner i Malagelada, 2003).

Provedena su brojna *in vivo* ispitivanja s ciljem istraživanja učinkovitosti sinbiotika temeljenih na bifidobakterijama u liječenju gastrointestinalnih bolesti. Jedno od takvih istraživanja sinbiotičkog učinka *B. animalis* subsp. *lactis* B94 u kombinaciji s inulinom provedeno je kod djece s akutnom zaraznom dijarejom. Pacijentima je davan sinbiotički pripravak tijekom 5 dana, a stolica je ispitivana na infektivne agense kao što su rotavirus, *Salmonela*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Adenovirus*, *Entamoeba histolytica* i *Clostridium difficile*. Zabilježeno je značajno smanjenje broja stolica s dijarejom nakon 3 dana primjene sinbiotičke skupine u usporedbi s kontrolnom skupinom, posebice za bolesnike s rotavirusom. Kliničko ispitivanje učinaka konzumacije sinbiotika provedeno je na pacijentima koji su bolovali od Crohnove bolesti (Steed i sur., 2010). Sinbiotik, koji se sastojao od *B. longum*, inulina i oligofruktoze, pacijenti su konzumirali dva puta dnevno tijekom razdoblja od 6 mjeseci, a zabilježena su značajna poboljšanja u kliničkim ishodima, uključujući smanjenje nekih pokazatelja aktivnosti Crohnove bolesti. Kao treći primjer, blagotvorni učinak soja *B. breve* i galaktooligosaharida (GOS) ispitan je u odnosu na ulcerozni kolitis. Soj bifidobakterije uziman je tri puta na dan, a GOS jednom dnevno kroz 1 godinu. Klinički status liječene skupine

značajno se poboljšao, poput izrazitog poboljšanih nalaza kolonoskopije i značajnog smanjenja markera upale. Nadalje, iako nije primijećena značajna promjena u broju bifidobakterija kod onih koji su konzumirali sinbiotik, primijećeno je smanjenje fekalnog broja bakterija *Bacteroidaceae* i sniženi pH fekalija (Ishikawa i sur., 2011).

Utvrđeno da bifidobakterije svojim metaboličkim aktivnostima uzrokuju pozitivne zdravstvene koristi domaćinu. Dostupnost kompletnih bifidobakterijskih genoma i odgovarajuća komparativna analiza omogućuju prepoznavanje mehanizama na kojima se temelji metabolička aktivnost bifidobakterija. Studije korištenja ugljikohidrata i identifikacija metaboličkih putova također pružaju osnovne informacije koje omogućuju identifikaciju novih i učinkovitih prebiotičkih supstrata. Pokazalo se da ugljikohidrati dobiveni iz biljaka potiču rast nekih vrsta bifidobakterija. Za identifikaciju i stjecanje punog znanja o genima uključenim u razgradnju i korištenje ugljikohidrata potrebno je karakteriziranje i mutageneza bakterijskih gena. Međutim, bifidobakterije nisu sklone spontanim mutacijama. Stoga je ključan razvoj molekularnih alata, neophodan za otkrivanje osnovnih molekularnih mehanizama koji objašnjavaju kako bifidobakterije komuniciraju sa svojim domaćinom u GIT-u (O'Callaghan i van Sinderen, 2016).

U nekoliko studija istraživana je potencijal bifidobakterija za sprečavanje i / ili liječenje kolorektalnih karcinoma. Većina studija temelji se na rezultatima na modelima eksperimentalnih miševa, a rezultati sugeriraju da kombinacija prebiotika i bifidobakterija može smanjiti pojavu kancerogenih stanica izazvanih u miševa. Na primjer, pokazano je da *B. animalis* pokazuje antimutageno djelovanje tijekom rasta na MRS bujonu, čime se antagonizira djelovanje karcinogena 2-amino-3-metilimidazo [4, 5-f] kinolona (Tavan i sur., 2002). U *in vivo* i *in vitro* uvjetima je pokazano da vrste *B. longum* i *B. breve* pružaju zaštitu od DNA oštećenja izazvanih karcinogenima i inhibiraju genotoksični učinak dva različita kancerogena kada se testiraju na modelu štakora (Pool-Zobel i sur., 1996).

Zabilježena je upotreba bifidobakterija za liječenje različitih probavnih smetnji. Na primjer, uspješno liječenje dijareje nakon primjene *B. longum* subsp. *infantis* CECT 7210 i *B. breve* K-110 uzrokovano je inhibicijom rotavirusa, koji je glavni uzrok sporadične dijareje kod dojenčadi (Chenoll i sur., 2015). Drugi primjer uključuje dvostruko slijepo istraživanje da li bi oralno liječenje komercijalnom probiotičkom formulom koja sadrži termofile *B. bifidum* i *Streptococcus* smanjio dijareju povezanu s antibioticima u dojenčadi. Ova studija otkrila je da je došlo do značajnog smanjenja učestalosti dijareje za onu dojenčad koja su hranjena formulom s probioticima (Corrêa i sur., 2005).

Istraživanje Patole i sur. (2016) izvijestilo je o nižoj učestalosti nekrotizirajućih enterokolitisa u nedonoščadi nakon rutinske primjene *B. breve* M-16V. Primjena *B. breve* M-16V zajedno s dojenjem pokazuje manju učestalost pojave nekrotizirajućih enterokolitisa u novorođenčadi rođenih prije 34 tjedna trudnoće, a iako nije statistički značajna, zabilježena je manja učestalost ove bolesti kod novorođenčadi rođenoj u gestacijskoj dobi manjoj od 28 tjedana.

Iako se ne razumije točan mehanizam djelovanja, zabilježeno je smanjenje simptoma upalnih bolesti crijeva nakon liječenja probiotičkim sojevima. Pacijentima koji pate od ulceroznog kolitisa davan je probiotički pripravak koji uključuje tri soja iz roda *Bifidobacterium*, četiri soja iz roda *Lactobacillus* i jedan soj *S. thermophilus*. Petnaest od 20 pacijenata ostalo je u remisiji tijekom cijelog ispitivanja, što sugerira da je primjena ovog bakterijskog koktela korisna u održavanju remisije ulceroznog kolitisa (Gionchetti i sur., 2000).

Brojne studije izvijestile su o poboljšanjima regulacije rada debelog crijeva nakon uzimanja fermentiranih mliječnih proizvoda koji sadrže *B. animalis* (Meance i sur., 2011). Dvije studije povezane su s primjenom određenih sojeva bifidobakterija s ublažavanjem opstipacije. Međutim, potrebna su dalja istraživanja kako bi se utvrdio precizan mehanizam djelovanja bifidobakterija u prevenciji i liječenju opstipacije (Leahy i sur., 2005).

Smatra se da bifidobakterije također sprječavaju gastrointestinalne infekcije kompetitivnim isključivanjem patogena što se temelji na zajedničkim mjestima vezanja na epitelnim stanicama. Primjena velikog broja živih bifidobakterija smanjuje broj *Clostridium perfringens*, poznatog patogenog proizvođača nepoželjnih toksina (Gueimonde i sur., 2007).

#### **2.4. *Lacticaseibacillus paracasei***

*Lacticaseibacillus paracasei* je Gram-pozitivna, homofermentativna vrsta bakterija mliječne kiseline koja se obično koristi u fermentaciji mliječnih proizvoda i kao probiotička kultura. Sojevi *Lb. paracasei* izolirani su iz različitih okruženja, uključujući mliječne proizvode, biljke ili biljne fermentacije te iz GIT-a ljudi i životinja (Wuyts i sur., 2017; Smokvina i sur., 2013). Grupa *Lacticaseibacillus casei* (LCG), sastavljena je od najčešće istraživanih i najprimijenjenijih probiotičkih vrsta laktobacila: *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* i *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Ti su probiotički laktobacili opsežno istraženi, klasificirani i reklasificirani zbog svojih zdravstvenih učinaka (Hill i sur., 2018). Ipak, probiotička svojstva obično variraju i međusobno se razlikuju, stoga su točna

identifikacija i karakterizacija probiotičkih sojeva od visoke važnosti prije njihove primjene u prehrambenoj industriji (Chondrou i sur., 2020). Zdravstveni učinci ovih probiotičkih vrsta očituju se kroz nekoliko staničnih i molekularnih mehanizmama, kao što je adhezija na crijevni epitel (Monteagudo-Mera i sur., 2019), natjecanje s invazijom patogena (Lazar i sur., 2004), jačanje epitelne barijere i proizvodnju antimikrobnih molekula (Plaza-Díaz i sur., 2019).

Mnoštvo *in vitro* i *in vivo* studija pokazalo je da probiotičke bakterije mogu stimulirati različite vrste stanica imunološkog sustava i modulirati imunološke odgovore (Chondrou i sur., 2020; Galdeano i sur., 2019). Probiotici mogu komunicirati s crijevnom sluznicom i rezidentnim imunološkim stanicama, kao što su limfociti, makrofagi, ili dendritske stanice te pokrenuti proizvodnju citokina, kemokina ili imunoglobina (Fong i sur., 2016). Imunomodulatorne aktivnosti probiotičkih bakterija uglavnom su posredovane aktivacijom TLR-ovi (eng. *Toll-like receptor*). TLR-ovi su izraženi u mnoštvu stanica, uključujući crijevne epitelne stanice (IEC) GIT-a. TLR nakon stimulacije pokreću stanične kaskade, što dovodi do aktivacije ključnih signalnih molekula, kao što su nuklearni faktor-kapa B (NF-B) i protein aktiviran mitogenom p38 Kinaza (MAPK), koja upravlja upalnim i adaptivnim imunološkim odgovorima (Kawasaki i sur., 2014).

U više kliničkih studija ispitivana je primjena probiotičke kulture *Lb. paracasei* kod različitih vrsta oboljenja. Studije koje su ispitivale perioperativnu primjenu *Lb. paracasei* s prebiotcima u obliku sinbiotika kod pacijentima s opsežnim zahvatima abdominalne kirurgije pokazale su značajno smanjenje rizika od infektivnih komplikacija. Osim što su istraživanja pokazala da sinbiotici imaju pozitivan učinak na postoperativne infekcije, njihova se primjena povezuje i sa smanjenjem duljine hospitalizacije (Chowdhury i sur., 2020).

Istraživanje provedeno s ciljem otkrivanja mehanizma djelovanja soja *Lacticaseibacillus paracasei* K5 na stanice raka debelog crijeva dokazalo je istu razinu adhezije i antiproliferativnog djelovanja kao i kod referentnih sojeva *Lb. casei* ATCC 393 i *Lb. rhamnosus* GG te potvrdilo apoptotički učinak soja *Lacticaseibacillus paracasei* K5 (Chondrou i sur., 2020).

Nozari i sur. (2019), u svom su radu dokazali da frakcije proteina stanične stijenke iz *Lb. paracasei* ATCC 25598 iskazuju snažne antiproliferativne, inhibitorne i proapoptotičke učinke *in vitro*, što sugerira potencijalnu primjenu *Lb. paracasei* kao probiotika u nutritivnim intervencijama ili kao probiotičkog sastojka funkcionalne hrane u prevenciji raka debelog crijeva.

Nekoliko studija ispitivalo je primjenu i učinak kulture *Lb. paracasei* u kliničkoj prehrani odnosno hrani za posebne medicinske potrebe kod različitih vrsta pacijenata pa je tako dokazano da primjena ove probiotičke kulture može smanjiti bakterijsku translokaciju što rezultira smanjenjem postoperativnih infekcija kod resekcije želuca i gušterače (Rayes i sur., 2002).

## 2.5. Prebiotici

U debelom crijevu mikroorganizmi koriste hranjive tvari koje se uglavnom sastoje od neprobavljivih oligosaharida, prehrambenih vlakana i neprobavljivih proteina. Neprobavljive ugljikohidratne komponente nazivaju se prebioticima. Da bi se neki sastojak hrane mogao smatrati prebiotikom, mora neprobavljen doći do debelog crijeva i mora postojati mogućnost njegove fermentacije pomoću bakterija. Najčešći kandidati ugljikohidrata za prebiotike su inulin, sojini oligosaharidi, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, ksilooligosaharidi, pirodekstrin i izomaltooligosaharidi (Figuroa-Gonzalez i sur., 2011).

Definiciju prebiotika razvili su Gibson i Roberfroid (1995): „Prebiotici su definirani kao neprobavljivi sastojci hrane koji povoljno utječu na domaćina selektivnim poticanjem rasta i / ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crijevu, a time i poboljšavaju zdravlje“, a koju su redefinirali 2004. godine u „Prebiotik je selektivno fermentirajući sastojak hrane koji omogućuje određene promjene, kako u sastavu, tako i / ili metaboličkoj aktivnosti gastrointestinalne mikrobiote koja donosi dobrobit za zdravlje domaćina“ (Gibson i sur., 2004).

Većina komercijalnih prebiotika su ugljikohidrati, pretežno oligosaharidi i neki polisaharidi. Neprobavljivost prebiotika značajka je koju dijele s prehrambenim vlaknima, ali njihove su fiziološke funkcije često različite (Macfarlane i sur., 2006). Prebiotici su selektivni u poticanju rasta poželjnih, a istodobno suzbijaju rast patogenih bakterija prisutnih u gastrointestinalnom sustavu koje prebiotički supstrat mogu samo ograničeno koristiti za svoj rast ili nemaju enzime za njegovu razgradnju (Macfarlane i sur., 2006; Bengmark, 2003).

Prebiotici su selektivno fermentirani sastojci koji omogućuju specifične promjene u sastavu i / ili aktivnosti gastrointestinalne mikrobiote, što doprinosi dobrobiti i zdravlju domaćina (Hijova i sur., 2007). Prebiotici trebaju biti „specifični“ ili „selektivni“ (Rastall i Gibson, 2015; Roberfroid i sur., 2010). Prebiotik je neprobavljiva komponenta koja djelovanjem mikroorganizama u crijevima modulira sastav i / ili aktivnost intestinalne mikrobiote, stvarajući tako koristan fiziološki učinak na domaćina (Bindels i sur., 2015).



U prosincu 2016. Međunarodno znanstveno udruženje za probiotike i prebiotike (ISAPP) proširilo je koncept prebiotika i predložio uključivanje neugljikohidratnih komponenata s primjenom na mjestima tijela izvan GIT-a. Na temelju toga, prebiotik se može definirati kao „Supstrat koji selektivno koriste mikroorganizmi za zdravstvene koristi domaćina“ (Gibson i sur., 2017). Uvijek se preporuča poboljšanje zdravlja crijeva jačanjem mikroorganizama crijeva. Potencijalno, suplementacija prehrane prirodnim izvorima prebiotika može kroz prebiotički koncept stimulirati zdravlje mikrobioma probavnog trakta i redukciju potencijalno štetnih bakterija (Kumar i sur., 2020).

Novo predložena definicija udaljava se od zahtjeva „specifičnog učinka“ zbog sljedećih razloga: (i) naše znanje ne omogućava pouzdanu razliku između korisnih i štetnih članova mikrobiote; (ii) raznovrsna zajednica je neophodna za crijevnu homeostazu i fiziologiju domaćina, (iii) metabolički učinak ne zahtjeva „selektivnu“ fermentaciju i (iv) molekularni pristupi na razini cijele mikrobne zajednice otkrili su da uobičajeni prebiotici nisu toliko specifični kao što se ranije pretpostavljalo (Bindels i sur., 2015). Stoga se prebiotički koncept temelji na selektivnoj stimulaciji mikroorganizama koji su sposobni hidrolizirati prebiotike u ugljikohidratne monomere i koristiti ih za rast u GIT-u (Macfarlane i sur., 2006). Glavni razlog dodavanja prebiotika humanoj prehrani je blagotvorni učinak na poželjnu mikrobiotu crijeva, kao što je *Bifidobacterium* sp. najdominantnija i najvažnija mikrobna populacija intestinalnog trakta u zdrave dojenčadi hranjene majčinim mlijekom koje je bogato neprobavljivim oligosaharidima. Blagotvorni učinci prisutnosti bifidobakterija u GIT-u ovise o njihovoj održivosti i metaboličkoj aktivnosti. Njihov rast ovisi o prisutnosti složenih ugljikohidrata poznatih kao oligosaharidi. Neki oligosaharidi, zbog svoje kemijske strukture, otporni su na probavne enzime i prelaze u debelo crijevo. Stoga se prebiotici koriste kao bifidogeni čimbenici u prehrani, posebno zbog njihove sposobnosti da se ne razgrađuju u želucu i tankom crijevu (Crociani i sur., 1994). Prema Gibsonu i sur. (2004) prebiotik mora zadovoljavati najmanje tri zahtjeva; (1) ne smije se hidrolizirati ili apsorbirati u želucu ili tankom crijevu, (2) mora biti selektivan za korisne bakterije u debelom crijevu kao što su bifidobakterije i (3) njegovom fermentacijom postižu se blagotvorni luminalni / sistemski učinci na domaćina. Zdravstveni učinci prebiotika ispitanih na dobrovoljnim ispitanicima prikazani su u tablici 3 (Gibson i sur., 2017).

Ostali korisni učinci prebiotika su poboljšanje bioraspoloživosti kalcija i smanjenje rizika od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa koji nije ovisan o inzulinu, pretilosti, osteoporoze, karcinoma debelog crijeva, kao i smanjenje putničke dijareje (Macfarlane i sur.,

2006). Još od 1980.-ih raste svijest o nutritivno vrijednijim izborima hrane i pića odnosno o funkcionalnoj hrani. Mnogo je studija o zdravstvenim blagodatima prebiotika i probiotika, ali u većini studija istraživači nisu koristili dovoljno ispitanika ili su koristili mikroorganizme koji nisu detaljno okarakterizirani. Glavni ciljevi intervencije bili su:

- (i) povećavanje prirodne otpornosti na infektivne bolesti u GIT-u i prva linija obrane od bolesti
- (ii) sprječavanje opasnog prerastanja kvasaca u GIT-u i nekih alergijskih reakcija
- (iii) smanjivanje patogenog mikrobnog metabolizma u crijevima
- (iv) poticanje probavnih procesa, omogućujući maksimalnu hranjivu korist od hrane
- (v) poboljšanja kod pojava nadutosti crijeva i dijareja
- (vi) poticanje imunološkog sustava
- (vii) proizvodnja nutrijenata poput vitamina K, koje organizam ne može sintetizirati
- (viii) poboljšanja kod netolerancije na laktozu
- (ix) smanjenje razine kolesterola i antioksidativno djelovanje
- (x) suzbijanje bolesti kod kojih crijevna mikrobiota utječe na etiologiju (Crittenden i sur., 2005).

**Tablica 3.** Zdravstveni učinci prebiotika ispitanih na dobrovoljnim ispitanicima (FOS, fruktooligosaharidi; GOS, galaktooligosaharidi) (Gibson i sur., 2017)

Zdravstveni učinci	Korišteni prebiotici
Metaboličko zdravlje, prekomjerna tjelesna masa i pretilost, dijabetes tipa 2, metabolički sindrom i dislipidemija, upalni procesi	Inulin, GOS, FOS
Sitost	FOS
Stimulacija neurokemijske proizvodnje bakterija u crijevima	GOS
Poboljšana apsorpcija kalcija i drugih mineralnih tvari, zdravlje kostiju	Inulin, FOS
Zdravlje kože, poboljšanje zadržavanje vlažnosti i redukcija osipa	GOS
Alergije	FOS, GOS
IBD (Upalne bolesti crijeva)	Inulin, laktuloza
Urogenitalno zdravlje	GOS
Funkcija i zdravlje crijeva u djece	GOS, FOS,
Infekcije i odgovor na cjepivo	FOS, GOS, poidekstroza
Nekrotizirajući kolitis kod nedonoščadi	GOS, FOS
IBS (sindrom iritabilnih crijeva)	GOS
Putnička dijareja	GOS
Ostipacija	Inulin
Imunološka funkcija kod starije populacije	GOS

Jedan od rezultata fermentacije prebiotika intestinalnom mikrobiotom je proizvodnja SCFA, poput acetata, butirata i propionata (Broekaert i sur., 2011). Proizvodnja SCFA u GIT-u rezultira nižim pH, poboljšanom dostupnošću kalcija i magnezija i inhibicijom potencijalno patogenih bakterija (Wong i sur., 2006). I bifidobakterije i laktobacili proizvode acetat i laktat, čime doprinose zdravstvenim učincima prebiotika, iako ovi mikroorganizmi ne proizvode butirata i propionat. SCFA proizvode bakterije *Bacteroides phylum* i *Clostridium* klastera XIVa i IV (Bindels i sur., 2015). Nadalje, nedavna studija pokazala je da acetat proizveden od strane *B. longum* NCC2705 djeluje kao esencijalni kosupstrat za proizvodnju i rast butirata od strane *Eubacterium rectale* ATCC 33656 (Rivière i sur., 2015).

Neprobavljivi oligosaharidi dobiveni iz složenih ugljikohidrata ili enzimski proizvedeni iz disaharida, predstavljaju skupinu glikana koji uključuju razne prebiotike. Primjeri za to su FOS i GOS koji su među najbolje dokumentiranim i najčešće korištenim prebioticima na europskom i japanskom tržištu (Grootaert i sur., 2007). Prebiotički učinci FOS-a, GOS-a,

inulina i laktuloze temeljito su procijenjeni u kliničkim studijama na ljudima, a mnoga istraživanja sugeriraju da ti ugljikohidrati selektivno povećavaju broj bifidobakterija i smanjuju broj *E. coli* i enterokoka (Walton i sur., 2012).

Zbog iskazanih prebiotičkih učinaka arabinoksilana (AX) i njegovih derivata arabinoksilooligosaharida (AXOS) i ksilooligosaharida (XOS) ti ugljikohidrati u posljednje vrijeme uživaju sve veći znanstveni interes (Broekaert i sur., 2011). Bifidogeni učinak AX-a potvrđen je u brojnim *in vitro* istraživanjima dok je sposobnost bifidobakterija da metabolizira XOS i AXOS u čistoj kulturi također dokazana. Potrošnja AXOS-a s jedanaest različitih bifidobakterija sugerira da je metabolizam AXOS svojstvo bakterijskog soja i da je prilično složen (Rivière i sur., 2015).

Nekoliko *in vivo* studija potvrdilo je i bifidogeni učinak AX-a. *In vivo* istraživanja na štakorima s humaniziranim crijevnim mikrobiomom pokazala su da dugi lanac AX posebno potiče rast nekoliko različitih bakterijskih vrsta u debelom crijevu (relativna zahtjevnost bifidobakterija u debelom crijevu kontrolne skupine bilo je  $0,03 \pm 0,01$  % u usporedbi s  $2,81 \pm 1,46$  % u skupini koja je bila nahranjena s dugim lancem AX) (Van Den Abbeele i sur., 2011). Rezultati ove posljednje studije potvrđeni su nedavnom studijom koja je otkrila prisutnost dviju različitih vrsta *B. longum* tijekom fermentacije AX dugog lanca u *in vitro* modelu proksimalnog debelog crijeva (Truchado i sur., 2015). Drugo *in vivo* istraživanje otkrilo je da kad su pretili miševi bili hranjeni hranom s dodatkom AX-a, primijećeno značajno povećanje broja bifidobakterija u debelom crijevu. Uz ovo povećanje bifidobakterija u cekumu suplementacija AX-om obnovila je zastupljenost nekih mikrobni zajednica čiji se udio u mikrobioti smanjio zbog velikog udjela masti u prehrani (Neyrinck i sur., 2011).

Inulin koji se sastoji od ponavljajućih fruktozilnih jedinica povezanih  $\beta$  (2,1) vezama, vlakno je koje lako fermentiraju crijevne bakterije pri čemu se stvaraju velike količine SCFA. U osoba s opstipacijom, unos inulina povezuje se sa značajnim porastom učestalosti stolica, što sugerira potencijalni utjecaj inulina na sastav ljudske crijevne mikrobiote. Napredak u tehnologijama visoke propusnosti omogućuje procjenu raznolikosti i taksonomskog ili funkcionalnog sastava ljudskog mikrobioma te može identificirati promjene u mikrobiomu kao odgovor na specifičnu suplementaciju inulinom. Razumijevanje učinaka inulina na mikrobiom ljudskog crijeva od ključne je važnosti za stjecanje uvida u njihove mehanizme djelovanja (Le Bastard i sur., 2020).

Rezultati provedenih 9 kliničkih studija, uglavnom randomiziranih, dvostruko slijepih, placebo-kontroliranih (n=7), koje su se međusobno razlikovale u dizajnu (3 studije su

povezivale učinak inulina i oligofruktoze), suplementacijskom protokolu (5-20 g inulina na dan) i metodi procjene mikrobioma (16S sekvencioniranje, n=7) pokazale su da je najdosljednija promjena bila porast broja bakterija iz roda *Bifidobacterium*. Ostali rezultati uključivali su povećanje relativnog udjela *Anaerostipes*, *Faecalibacterium* i *Lactobacillus* te smanjenje relativnog udjela *Bacteroides* bakterijskih vrsta. Međutim, ova *in vivo* ispitivanja nisu potvrdila *in vitro* eksperimente jer taksonomske promjene sastava crijevne mikrobiote nisu bile povezane s povećanjem razine kratkolančanih masnih kiselina (Le Bastard i sur., 2020).

## 2.6. Sinbiotici

Sinbiotici su kombinacije jednog ili više probiotika u kombinaciji s jednim ili više prebiotika (Patel i Dupont, 2015). Kao terapijska strategija, koncept sinbiotika uspješniji je u usporedbi s korištenjem samih prebiotika i probiotika za razne bolesti uključujući simptome sindroma iritabilnog crijeva (IBS) (Basturk i sur., 2016), reumatoidni artritis (Zamami i sur., 2017), neonatalnu sepsu novorođenčadi i ishode trudnoće žena s gestacijskim dijabetesom (Kamali i sur., 2018). U kliničkim ispitivanjima dodatak sinbiotika dokazano je koristan u snižavanju razina glukoze u krvi natašte, a također može smanjiti i rizik od kroničnih bolesti kao što su dijabetes melitus, pretilost, bubrežne i kardiovaskularne bolesti (Nickbaht i sur., 2018). U budućnosti se očekuje da će provođenje sinbiotske terapije, ne samo svesti na najmanju moguću mjeru upotrebu antibiotika, već će također ponuditi potencijalna rješenja za terapiju sve većeg broja bolesti (Kumar i sur., 2020).

Sinbiotici se mogu formulirati korištenjem dva pristupa: komplementarnog i sinergijskog (slika 4). Komplementarni sinbiotik se sastoji od probiotika i prebiotika (može se koristiti više od jednog od svakoga), radeći neovisno kako bi se postigla jedna ili više zdravstvenih prednosti. Probiotičke i prebiotičke komponente komplementarnog sinbiotika moraju zadovoljiti minimalne kriterije odabira. Sinergijski sinbiotik se sastoji od živog mikroorganizma i selektivno iskorištenog supstrata, ali niti jedan ne mora zadovoljiti minimalne kriterije prethodno propisane za probiotike i prebiotike. Umjesto toga, ove komponente su dizajnirane da rade zajedno, pri čemu supstrat selektivno koristi mikroorganizam koji se istodobno primjenjuje (Swanson i sur., 2020).



**Slika 4.** Komplementarni i sinergijski pristup u formuliranju sinbiotika (Swanson i sur., 2020)

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu su ispitivana probiotička svojstva komercijalnih sojeva bakterija mliječne kiseline *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> i *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Obje bakterije rastu anaerobno u MRS bujnu pri 37 °C. U radu su također korištene srodne BMK (7-12) i test-mikroorganizmi (1-6) prikazani u tablici 4. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

**Tablica 4.** Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura koji su korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	K-144	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	FP1	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Bacillus cereus</i>	TM2	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Escherichia coli</i>	3014	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	LMG 9206	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	L3	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 9430	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LMG 9450	M17, 30 °C, anaerobno
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LMG 7954	MRS, 30 °C, anaerobno

##### 3.1.2. Stanične linije

Za ispitivanje sposobnosti adhezije odabranih bakterijskih sojeva korištene su Caco-2 stanice. To su kontinuirane stanične linije koje sadrže heterogene humane tumorske stanice kolorektalnog epitela, a priređene su u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

### 3.1.3. Hranjive podloge

U radu su korištene slijedeće podloge:

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
- MRS bujon („Biolife“, Italija) je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- M17 agar („Biolife“, Italija), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5; laktoza 5; natrijev glicerofosfat 19; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- M17 bujon („Biolife“, Italija) je istog sastava kao podloga M17 agar, ali bez dodatka agara

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test-mikroorganizama

- BHI (Brain Heart Infusion) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): infuzije telećeg mozga i govedeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- BHI bujon („Biolife“, Italija) istog je sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.

c) hranjiva podloga za određivanje broja bifidobakterija

- TOS-propionat agar („Biolife“, Italija), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): pepton iz kazeina 10, kvašćev ekstrakt 1, kalijev dihidrogenfosfat 3, kalijev hidrogenfosfat 4,8, amonijev sulfat 3, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,2, transgalaktooligosaharid 10, L-cistein hidroklorid monohidrat 0,5, natrijev propionat 15,0, agar 15. pH vrijednost podloge iznosi 6,7, a sterilizacija se provodi pri 115 °C tijekom 15 min. Nakon sterilizacije, u 190 mL podloge se dodaje 10 mL mupirocina koji osigurava selektivnost

d) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterija iz roda *Escherichia*

- Rapid *E. coli* 2 agar („Biovit“, Italija) sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): mesni pepton 5; želatin pepton 5; NaCl 5; kvašćev ekstrakt 3; selektivni kromogeni supstrat 6; agar 13.



e) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterija iz roda *Salmonella*

- XLD agar („Biovit“, Italija) sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): ksiloza 3,5; L-lizin 5; laktoza 7,5; saharoza 7,5; NaCl 5; kvašćev ekstrakt 3; natrij-dezoksikolat 2,5, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 6,8; amonij-željezo (III) citrat 0,8; fenol crveno 0,08; agar 13,5.

f) hranjive podloge za kultivaciju staničnih linija

- MEM (Reduced Serum Medium 1x) medij, „Gibco“, SAD
- DMEM/F12 medij, „Capricorn Scientific GmbH“, Njemačka

### 3.1.4. Matriksi

Funkcionalna svojstva komercijalne probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> su ispitana u tri različita prehrambena dehidrirana matriksa: instant pahuljice od riže, instant pahuljice od riže i voća te instant pahuljice od pšenice. Navedeni matriksi (koji će u daljnjem tekstu ukoliko se govori o sva tri proizvoda biti nazvani dječja hrana) su proizvedeni u proizvodnom postrojenju tvrtke Podravka d.d.

Dehidrirane instant pahuljice od riže sadrže rižino brašno, vitamine (tiamin-mononitrat, riboflavin, piridoksin hidroklorid, L-askorbinsku kiseline, DL-alpha-tokoferol acetat, folnu kiselinu i nikotinamid), željezo (III) pirofosfat i kulturu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>. Dehidrirane instant pahuljice od riže i voća sadrže prijelazno mlijeko, rižinu krupicu, inulin, voćne kaše (jabuka, breskva, kruška, marelica), kalcijev laktat, vitamine (β-karoten, tiamin-mononitrat, riboflavin, piridoksin hidroklorid, L-askorbinsku kiselinu, kolekalciferol, DL-alpha-tokoferol acetat, folnu kiselinu i nikotinamid) i kulturu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>. Dehidrirane instant pahuljice od pšenice sadrže prijelazno mlijeko, pšeničnu krupicu, maltodekstrin, pšenično brašno, škrob, vitamine (β-karoten, tiamin-mononitrat, riboflavin, piridoksin hidroklorid, L-askorbinsku kiselinu, kolekalciferol, DL-alpha-tokoferol acetat, folnu kiselinu i nikotinamid), aromu i kulturu *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>.

Funkcionalna svojstva komercijalne probiotičke kulture *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* su ispitana u jednom uzorku hrane za posebne medicinske potrebe. Navedeni matriks je proizveden u razvojnim laboratorijima Belupa d.d. i pilot postrojenju Podravke d.d.

Hrana za posebne medicinske potrebe sadrži maltodekstrin, suncokretovo ulje, mliječne bjelančevine, saharozu, vlakna (inulin), srednjelančane trigliceride (MCT) iz kokosovog ulja, minerale (kalcijev laktat, natrijev klorid, željezov laktat, cinkov sulfat,

manganov sulfat, bakrov sulfat, kromov (III) klorid, kalijev jodid, natrijev molibdat, natrijev selenat, natrijev fluorid, natrijev selenit, bakrov glukonat), vitamine (L-askorbinska kiselina, DL-alfa tokoferil acetat, nikotinamid, kalcijev D-pantotenat, retinil acetat, kolekalciferol, piridoksin hidroklorid, tiamin hidroklorid, fitomenadion, riboflavin, folna kiselina, D-biotin, cijanokobalamin, natrijev L-askorbat), emulgator (sojin lecitin), glukozni sirup u prahu, tvar za sprečavanje zgrudnjavanja (silicijev dioksid), regulatore kiselosti (limunska kiselina, dikalijev fosfat, dimagnezijev fosfat, dinatrijev fosfat, magnezijev hidrogen karbonat), sladilo (acesulfam K), zgušnjivače (ksantan guma, karagenan), antioksidans (natrijev askorbat), kulturu *Lactocaseibacillus paracasei*, aromu i kolin bitartrat.

### 3.1.5. Kemikalije

- agaroz, „Appligane“, Francuska
- amonijev persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- bromfenol plavo, „Sigma“, SAD
- BSA (Bovine Serum albumin), „Merck“, Njemačka
- CellBrite Fix Membrane boja za bojanje Caco-2 stanica, „Biotium“, SAD
- CFSE (5-(6)- karboksifouorescin diacetat sukcinimidil ester) Cell Divisoin Tracker kit, „Biolegend“, SAD
- Coomassie Brilliant Blue, „Sigma“, SAD
- DAPI boja (4',6-diamino-2-fenilindol), „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- DNA bakteriofaga  $\lambda$ , „New England Biolabs“, SAD
- dNTP mix, 10 mM, „Fermentas“, Kanada
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Njemačka
- etil-acetat, „Kemika“, Hrvatska
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- fetalni goveđi serum (FSC), „Gibco“, SAD
- fetalni goveđi serum (FSC), „Thermo Fisher Scientific“ SAD
- fibronektin, „Sigma“, Njemačka
- fosfatni pufer (PBS), „PBF“, Hrvatska
- furfuraldehid, „Kemika“, Hrvatska

- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- Incucyte Rapid Red boja, „PHI AB“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- kalijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- kalijeva lužina, „Kemika“, Hrvatska
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- kolagen, „Sigma“, Njemačka
- kolesterol, „Kemika“, Hrvatska
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat, EDTA), „Kemika“, Hrvatska
- laminin, „Sigma“, Njemačka
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- L-glutaminom, „Merck“, Njemačka
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- magnezijev klorid, 25 mM, „Fermentas“, Kanada
- metanol, „Kemika“, Hrvatska
- metilensko modriilo R-250, „Sigma“, SAD
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat (SDS), „Sigma“, SAD
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev taurokolat, „Sigma“, SAD
- n-heksan, „Riedel de Haen“, Njemačka
- octena kiselina, „Carlo Erba“, Italija
- $\sigma$ -ftalaldehid, „Fluka“, Švicarska
- pankreatin ( $165 \text{ U mg}^{-1}$ ) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- paraformaldehid, „Merck“, Njemačka
- PCR pufer 10x, „Fermentas“, Kanada

- penicilin G, streptomycin sulfat i amfotericin, „Gibco“, SAD
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- proteinaza K, „Fermentas“, Kanada
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- standard za elektroforezu proteina (molekulske mase 14-97 kDa), „Pharmacia“, SAD
- sulfatna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- Taq polimeraza, 1 U, „Fermentas“, Kanada
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilen), „Sigma“, SAD
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- Triton X-100, „Sigma“, SAD
- Tween 20, „Fisher Scientific“, SAD
- β-merkaptoetanol, „Sigma“, SAD

### 3.1.6. API 50 CHL

API 50 CHL Medium, namijenjen identifikaciji roda *Lactobacillus* i srodnih rodova, je medij u obliku spremnom za upotrebu i omogućuje fermentaciju 49 ugljikohidrata na API 50 CH stripu („BioMerieux“, Francuska). Medij je slijedećeg sastava (g L<sup>-1</sup> demineralizirane vode): polipepton 10; ekstrakt kvasca 5; Tween 80 1mL; dikalijev fosfat 2; natrijev acetat 5; diamonijev citrat 2; magnezijev sulfat 0,20; manganov sulfat 0,05; bromkrezol purpur 0,17. pH medija je 6,1-7,1.

### 3.1.7. Antibiotici

Za ispitivanje osjetljivosti bakterijskih sojeva na antibiotike metodom difuzije korišteni su filter diskovi s poznatim sadržajem određenog antibiotika („Oxoid“, UK). U radu su korišteni slijedeći antibiotici:

- ampicilin 10 µg
- eritromicin 15 µg
- gentamicin 120 µg
- kanamicin 30 µg
- klindamicin 2 µg
- kloramfenikol 30 µg
- tetraciklin 30 µg
- vankomicin 30 µg

- streptomycin 10 µg

Također je ispitana osjetljivost izoliranih bakterijskih sojeva na antibiotike primjenom E-testa očitavanjem minimalne inhibicijske aktivnosti na vrhu zone inhibicije oko vrpce koja sadrži antibiotik u gradijentu koncentracije („BioMerieux“, Francuska).

### 3.1.8. Aparature i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete (1000, 200, 20 i 2,5 µl), „Eppendorf“, SAD
- BioSpec-nano, „Shimatzu“, Japan
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- bušači čepova (d: 5-11,5 mm), „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- celulozna vata, „Lola Ribar“, Hrvatska
- centrifuga CENTAUR 2, „Sanyo“, UK
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- CO<sub>2</sub> inkubator za uzgoj stanica i tkiva u kulturi „Kambič“, Slovenija
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- denzitometar, „BioMerieux“, Francuska
- EVOS FLc Cell Imager „ThermoFisher Scientific“, SAD
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- kadica za elektroforezu, „Bio-Rad“, SAD
- kadice za elektroforezu, „Cleaver, Scientific“, UK
- membranski filteri Millex-GV, promjera pora 0,22 µ, „Merck“, Njemačka
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje (15 i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- komora za elektroforezu, „Sigma“, SAD
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrobiološke ušice, „Syntesys“, Italija
- mikrotitarske pločice (24 i 96 jažica), „Falcon“, Engleska
- napajanje za kadice za elektroforezu, „Bio-Rad“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- PCR uređaj 2720 Thermal Cycler, „Applied Biosystems“, SAD

- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pincete, „Isolab“, Njemačka
- plastične tubice od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- staklene epruvete (16 · 160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za tubice, „neoLab“, Njemačka
- stakalca i češljići za pripremu poliakrilamidnih gelova, „Bio-Rad“, SAD
- šprice, „Becton Dickinson“, SAD
- štapić po Drigalskom, „Syntesys“, Italija
- T-boca, Corning“, SAD
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNR Bio-Imaging Systems Ltd.“, Izrael
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vata, „Lola Ribar“, Hrvatska
- vibromješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

## **3.2. Metode rada**

### **3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama**

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani na -80 °C u MRS tekućoj podlozi s 15 % (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80 °C u BHI bujonu s 15 % (v/v) glicerola.

### **3.2.2. Priprema uzoraka dječje i hrane za posebne medicinske potrebe**

Svi proizvodi dječje hrane su pripremljeni u industrijskom mjerilu u tvrtki Podravka d.d. Instant pahuljice od riže su pripremljene tako da su pahuljice pomiješane s probiotičkom bakterijom nakon čega je proizvod pakiran u vrećice od „triplex“ folije po 150 g. Instant pahuljice od riže s četiri vrste voća i instant pahuljice od pšenice su pripremljene tako da je

pahuljicama nakon miješanja–dodano adaptirano mlijeko. S obzirom da dehidrirane instant pahuljice od riže i voća sadrže prebiotik inulin, on je dodan u fazi izrade instant pahuljice.

Uzorak hrane za posebne medicinske potrebe pripremljen je u laboratorijskom mjerilu u tvrtkama Belupo d.d. i Podravka d.d., na način da su u laboratoriju izvagane pojedinačne sirovine te su na miješalici Overhead stirrer EUROSTAR 200 control IKA pomiješane lipidne komponente i emulgator, ugljikohidratne komponente, probiotička kultura, vitaminske i mineralne komponente, vlakna, aromatske komponente, aditivi te su na kraju dodane proteinske komponente. Proizvod je ručno punjen u vrećice „triplex“ folije po 55 g koje su zavarene Kopp zavarivačicom.

### **3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama u uzrocima dječje hrane odnosno hrane za posebne medicinske potrebe indirektnom metodom**

Iz pojedinačnog pakiranja dječje hrane je izvagano 10 g uzorka i resuspendirano u 90 mL sterilne Ringerove otopine i dalje su rađena decimalna razrjeđenja (1:10; 1 mL ishodnog razrjeđenja u 9 mL sterilne Ringerove otopine) do 6. razrjeđenja. 1 mL pojedinog decimalnog razrjeđenja je nacijepljeno u praznu Petrijevu zdjelicu i preliveno s 12 mL TOS hranjive podloge kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Nakon 72 h anaerobne inkubacije pri 37 °C, izbrojane su izrasle kolonije i proračunat je broj živih stanica (CFU mL<sup>-1</sup>). S najvećeg razrjeđenja iz svakog uzorka dječje hrane su uzgojene pojedinačne kolonije koje su kasnije korištene u svim pokusima kao usporedba sa sojem uzgojenim iz liofilizirane komercijalne kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®.

Iz pojedinačnog pakiranja hrane za posebne medicinske potrebe je izvagano 10 g uzorka i resuspendirano u 90 mL sterilne fiziološke otopine i dalje su rađena decimalna razrjeđenja (1:10; 1 mL ishodnog razrjeđenja u 9 mL sterilne fiziološke otopine) do 6. razrjeđenja. 1 mL pojedinog decimalnog razrjeđenja je nacijepljeno na Petrijevu zdjelicu s MRS hranjivom podlogom i razmazano štapićem po Drigalskim. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37 °C, izbrojane su izrasle kolonije i proračunat je broj živih stanica (CFU mL<sup>-1</sup>). S najvećeg razrjeđenja je uzgojena pojedinačna kolonija koja je kasnije korištena u svim pokusima kao usporedba sa sojem uzgojenim iz liofilizirane komercijalne kulture *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

### 3.2.4. Metode identifikacije

#### 3.2.4.1. Fenotipska identifikacija

##### *API 50 CHL*

Ispitivana bakterijska kultura je uzgojena na MRS agaru u obliku kolonija anaerobno kroz 24 h pri 37 °C. U ampulu koja sadrži API 50 CHL medij za laktobacile je pomoću mikrobiološke ušice dodano nekoliko identičnih kolonija s MRS agara. Gustoća inokuluma, koja se mjeri u dezimatu, mora biti 2 McF. Pripremljena suspenzija je nakapana u cjevčice API 50 CH stripa koji sadrži 49 različitih ugljikohidrata. U sve cjevčice je nakapano mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Inkubacija traje tijekom 48 sati pri 37 °C kroz nakon čega su očitani rezultati. Pozitivnim se smatraju testovi kod kojih je uslijed acidifikacije i prisutnosti bromkrezol purpurnog indikatora došlo do promjene boje u žuto. Biokemijski profil je identificiran pomoću softvera s bazom podataka (V 5.0).

##### *SDS-PAGE staničnih proteina*

Prekonoćne bakterijske kulture su centrifugirane pri 9000 okr min<sup>-1</sup> tijekom 15 min. Stanice su ispirane sterilnom otopinom natrijeva klorida (0,9 %), ponovno centrifugirane i resuspendirane u 100 µl sterilne otopine natrijeva klorida kojoj je dodan 1 g staklenih kuglica (r = 2 mm). Suspenzija je izmiješana na vibromješaču kroz 4 min (30 s miješanja – 30 s hlađenja u ledu), a zatim tretirana s 1 mL otopine SDS-a (0,0625 Tris-HCl, pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) glicerola). Uzorci su prokuhani tijekom 10 minuta, ohlađeni u ledu (3-4 min), centrifugirani pri 9000 okr min<sup>-1</sup> tijekom 15 minuta, a u dobivenim supernatantima je provedena SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).

U 15 µl svakog od priređenih uzoraka je dodano 5 µL reducirajućeg reagensa i prokuhano 2-3 min. Nakon kuhanja je ukupni volumen uzorka nanesen na 10 %-tni poliakrilamidni gel. SDS-PAGE je provedena u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 190 V kroz 45 min. Nakon završene elektroforeze, gel je obojan u 0,1 % metilenskom modrilu R-250 s 50 % metanola i 7 % octene kiseline tijekom 2 h. Nakon bojenja, gel je inkubiran u 7 %-tnoj octenoj kiselini do obezbojenja pozadine.

#### 3.2.4.2. Genotipska identifikacija

##### *Izolacija DNA*

Svježa MRS podloga je inokulirana s 5 % prekonoćne kulture i inkubirana pri 37 °C tijekom 18 h. Volumen od 1,5 mL te kulture je centrifugiran i ispiran u GTE puferu (25 mM



TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice su resuspendirane u 500  $\mu\text{L}$  GTE pufera, uz dodatak lizozima (8 mg 500  $\mu\text{L}^{-1}$ ) i RNA-ze (50  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ) i inkubirane 30 min pri 37 °C. Zatim je dodano 250  $\mu\text{L}$  2 % SDS-a i vorteksirano 1 min. Nakon toga je dodano 100  $\mu\text{L}$  neutralne smjese fenola i kloroforma, vorteksirano 30 sekundi i centrifugirano pri 13 000 okr 5  $\text{min}^{-1}$ . Supernatant je bez interfaze pomiješan s 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8) i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) je smjesa centrifugirana pri 13000 okr 10  $\text{min}^{-1}$ . Talog je resuspendiran u 300  $\mu\text{L}$  0,3 M NaAc i 10 mM  $\text{MgCl}_2$  i vorteksiran. Nakon dodatka 700  $\mu\text{L}$  apsolutnog etanola (ohlađenog na -20 °C), uzorak je inkubiran preko noći pri -20°C. Nakon toga je smjesa centrifugirana pri 14000 okr 20  $\text{min}^{-1}$ . Talog je resuspendiran u 75 %-tnom etanolu (ohlađenom na -20 °C) i ponovno centrifugiran pri 13000 okretaja tijekom 5 minuta. Talog DNA je resuspendiran u 50  $\mu\text{L}$  TE pufera (10 mM Tris + 1 mM EDTA).

#### *Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction)*

Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze provedeno je u PCR uređaju prema sastavu reakcijske smjese opisanim u tablici 5 i uvjetima PCR reakcije navedenim u tablici 6. Kao DNA-kalup korištena je genomska DNA bakterijskih stanica izolirana kao što je to opisano u podpoglavlju *Izolacija DNA*. Korištene su početnice specifične za rod *Bifidobacterium* (Bb) (Im26 i Im3) za DNA uzorak izoliran iz bakterijskog soja koji je izolirani iz uzoraka dječje hrane te liofilizirane kulture (Kaufman i sur., 1997) i početnice specifične za *Lacticaseibacillus paracasei* vrstu (Lb) (para i Y2) (Ward i Timmins, 1999) za DNA uzorak izoliran iz bakterijskog soja koji je izoliran iz uzorka hrane za posebne medicinske potrebe te liofilizirane kulture, redosljedna nukleotidnih sekvenci koji je naveden u tablici 7. Reakcijske smjese volumena 50  $\mu\text{L}$  bile su sljedećeg sastava:

**Tablica 5.** Sastav PCR reakcijske smjese

	Lb	Bb
DNA-kalup	50 ng	50 ng
Početnice	0,5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$
Pufer	1 x	1 x
deoksiribonukleozid-trifosfati	0,2 mM	0,3 mM
$\text{MgCl}_2$	2,5 mM	2,5 mM
Taq polimeraza	2,5 U	2 U

**Tablica 6.** Uvjeti PCR za amplifikaciju ciljane sekvence

Uvjeti PCR reakcije	Temperatura		Trajanje	
	Lb	Bb	Lb	Bb
Početna denaturacija	94 °C	94 °C	5 min	5 min
30 ciklusa:				
Denaturacija	94 °C	94 °C	45 s	1 min
Sparivanje početnica	45 °C	57 °C	45 s	3 min
Produljivanje lanca DNA	72 °C	72 °C	1 min	4 min
Završno produljivanje lanca DNA	72 °C	72 °C	5 min	8 min

**Tablica 7.** Slijedovi nukleotida korištenih početnica

Počelnica	Nukleotidna sekvence (5'→3')
Im26	GATTCTGGCTCAGGATGAACG
Im3	CGGGTGCTACCCACTTTCATG
para	CACCGAGATTCAACATGG
Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

„DNA fingerprinting“ pomoću metode AFLP<sup>TM</sup> (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Identifikacija soja izoliranog iz uzorka dječje hrane je provedena u identifikacijskom centru belgijskog Laboratorija za mikrobiologiju Sveučilišta u Ghentu (Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms/Laboratory for Microbiology, BCCM/LMG) korištenjem AFLP<sup>TM</sup> metode (Polimorfizam dužine umnoženih fragmenata).

Izolacija DNA je provedena prema Gevers i sur. (2001). Purificirana ukupna DNA je pocijepana korištenjem restrikcijskih enzima *TaqI* i *EcoRI*. Adapter 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5' je korišten uz restrikcijski enzim *EcoRI*, a adapter 5'-GACGATGAGTCCTGAC-3' 3'-TACTCAGGACTGGA-5' uz restrikcijski enzim *TaqI*. PCR početnice EO1 (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3')/T11 (5'-GTTTCTTATGAGTCCTGACCGAA-3') su specifično hibridizirane na krajeve adaptera pocijepanih fragmenata. Nakon provedene PCR reakcije u ABI PRISM<sup>®</sup> 3130XL PCR uređaju („Applied Biosystems“, SAD). Dobiveni PCR produkti su vizualizirani korištenjem GeneMapper v. 4.0 software („Applied“, SAD). Normalizirane tablice s pikovima koji su sadržavali od 20 do 600 parova baza su obrađene u programu BioNumerics<sup>TM</sup> v. 4.61 („Applied Maths“, Belgija). Za numeričku analizu intervalni podaci su delinearizirani u rasponu od 40 do 580 parova baza od ukupne veličine standarda.

Dobiveni DNA profil je uspoređen s referentnim profilima sojeva vrste *Bifidobacterium animalis* i srodnih vrsta roda *Bifidobacterium* u bazi podataka BCCM kolekcije sojeva.

#### *Sekvenciranje 16S rRNA gena*

Identifikacija soja izoliranog iz uzorka hrane za posebne medicinske potrebe je provedena sekvenciranjem 16S rRNA gena. Sekvenciranje umnožene 16S rRNA provedeno je u servisu Macrogen (Nizozemska) korištenjem automatskog četverokapilarnog uređaja ABI 3730xl Genetic Analyser („Applied Biosystems“, SAD), koji radi na principu Sangerove dideoksi metodi zaustavljanja sinteze DNA ugradnjom 2', 3'- dideoksinukleotida (*engl.* Dideoxynucleoside Triphosphates, ddNTPs). Za provođenje reakcije je potrebno osigurati jednolančanu DNA (kalup), DNA polimerazu, DNA početnice, dNTP-e te ddNTP. Uzorak DNA se podijeli u 4 različite reakcijske smjese od kojih svaka sadrži DNA polimerazu i sve potrebne deoksinukleotide (dATP, dGTP, dCTP i dTTP). Dodatno, u svaku od četiri reakcije je dodan jedan od različito fluorescentno ili radioaktivno obilježenih 2', 3'-ddNTP-a (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP) u 100 puta manjoj koncentraciji od standardnog dNTP-a kako bi se omogućila transkripcija cijele sekvence, a u isto vrijeme i nastajanje dovoljno fragmenata. Budući da ddNTP ne sadrži 3'-OH skupinu potrebnu za stvaranje fosfodiesterске veze između dva nukleotida, njegovom ugradnjom u rastući lanac DNA, polimeraza ne može nastaviti elongaciju lanca pa dolazi do zaustavljanja sinteze DNA na različitim mjestima i nastaju fragmenti različitih duljina. Uzorci putuju kroz četiri kapilare, laser pobuđuje fluorescenciju, a detektor na osnovi različitih valnih duljina emitirane fluorescencije identificira boju tj. ddNTP koji se nalazi na kraju svakog DNA fragmenta. Na taj način se pomoću četiri odvojene reakcije i smjese 4 dNTP-a te jednog obilježenog ddNTP-a, dobije kompletna informacija o slijedu nukleotida u analiziranoj DNA. Dobiveni rezultati su uspoređeni s poznatim sekvencama u NCBI (*engl.* National Center for Biotechnology Information) bazi podataka primjenom BLASTn algoritma (*engl.* Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) dostupnog na poveznici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. Prikaz sličnosti soja izoliranog iz hrane za posebne medicinske potrebe sa sojem *Lactocaseibacillus paracasei* pohranjenim u NCBI banci gena napravljen je pomoću GraphPad Prism 9.0 softvera („GraphPad Software“, SAD).

### 3.2.5. Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike metodom difuzije na krutim hranjivim podlogama

Prekonoćna bakterijska kultura (100 µL) je nacijepljena u epruvetu koja sadrži 12 mL krute MRS hranjive podloge koja je prethodno otopljena i ohlađena na 50 °C. Tako inokulirana podloga je izlivena u Petrijeve zdjelice. Kad je hranjiva podloga skrutnuta, sterilnom pincetom su naneseni filter-diskovi s antibioticima. Pinceta je sterilizirana tako da je uronjena u etanol i provučena kroz plamen. Petrijeve ploče su inkubirane pri 37 °C preko noći, nakon čega je slijedilo mjerenje promjera zona inhibicije, uključujući i promjer diska. U slučaju E-testa, na skrutnutu hranjivu podlogu su sterilnom pincetom nanesene vrpce koje sadrži antibiotik u gradijentu koncentracije. Petrijeve ploče su inkubirane pri 37 °C preko noći nakon čega je slijedilo očitavanje minimalne inhibicijske aktivnosti na vrhu zone inhibicije oko vrpce.

### 3.2.6. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

#### 3.2.6.1. Metoda s dvostrukim slojem agara (*engl.* agar spot-test method)

Metodom s dvostrukim slojem agara se, prema Kos i sur. (2011), ispituje antimikrobno djelovanje odabranih BMK prema srodnim BMK (*Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* ATCC 9430, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954), a korištena je Gram-pozitivan potencijalno patogeni test-mikroorganizam *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1.

Bakterijska kultura čije se antimikrobno djelovanje ispituje je nacijepljena u obliku kapi od 5 µL na MRS krutu hranjivu podlogu. Nakon prekonoćne inkubacije pri 37 °C, preko poraslih kolonija je preliveno 10 mL „soft“ BHI agara, prethodno otopljenog, ohlađenog na 50 °C i inokuliranog sa 100 µL suspenzije test-mikroorganizma *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, odnosno 10 mL „soft“ MRS agara, prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 °C, inokuliranog sa 100 µL suspenzije *Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* ATCC 9430 ili *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954, odnosno 10 mL „soft“ M-17 agara, prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 °C, inokuliranog sa 100 µL suspenzije *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450. Ploče su stavljene na prekonoćnu inkubaciju pri optimalnim uvjetima (Šušković i Kos, 2007), nakon čega je slijedilo mjerenje bistrih zona inhibicije. Izmjereni su promjeri porasle kulture (*engl.* Culture Diameter, CD) i promjeri zone inhibicije (*engl.* Inhibition Diameter, ID) te je izračunat efektivni inhibicijski odnos (*engl.* Effective Inhibition Ratio, EIR) prema slijedećem izrazu:

$$\text{EIR} = \frac{(\text{ID} - \text{CD})}{\text{CD}}$$

Rezultati se interpretiraju prema Coeuret i sur. (2004):

$\text{EIR} < 0,5 \rightarrow$  slaba inhibicija

$0,5 < \text{EIR} < 1,5 \rightarrow$  srednja inhibicija

$\text{EIR} > 1,5 \rightarrow$  jaka inhibicija

3.2.6.2. Priprava supernatanta kultura za određivanje antimikrobne aktivnosti turbidimetrijskom metodom i metodom difuzije s rupama u agaru

Prekonočne kulture bakterija čija se antimikrobna aktivnosti ispituje, centrifugirane su 5 min pri  $4200 \text{ o min}^{-1}$  nakon čega je supernatant prikupljen centrifugiranjem filtriran kroz filter veličine pora  $0,22 \mu\text{m}$ .

3.2.6.3. Metoda difuzije s rupama u agaru (*engl.* agar well-diffusion method)

Antimikrobno djelovanje odabranih sojeva BMK prema patogenim test-mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus cereus* TM2, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111) i prema srodnim BMK (*Lactobacillus helveticus* M92, *Enterococcus faecium* ATCC 9430, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954) ispitano je metodom difuzije u agar na krutim hranjivim podlogama prema Šušković i Kos (2007). Prekonočne bakterijske kulture test-mikroorganizama ( $100 \mu\text{L}$ ) su nacijepljene u 12 mL odgovarajućeg agara koji je prethodno otopljen i ohlađen na  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Tako inokulirane podloge su izliveno u Petrijeve zdjelice. Nakon što su se hranjive podloge skrutnule, sterilnim bušačem čepova, promjera 7 mm, su izbušene „rupe“ u agaru te su sterilnom mikrobiološkom ušicom uklonjeni agarni diskovi, a u dobivene rupice je nanoseno  $50 \mu\text{L}$  supernatanta kulture ispitivane BMK (3.2.6.2.). Tako pripremljene Petrijeve zdjelice su stavljene u hladnjak na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 3 h, kako bi se omogućila difuzija supernatanta u agarnu podlogu prije početka rasta bakterijskih kultura. Nakon toga je uslijedila prekonočna inkubacija pri optimalnim temperaturama te mjerenje promjera zona inhibicije.

#### 3.2.6.4. Turbidimetrijska metoda određivanja antibakterijske aktivnosti

Turbidimetrijskom metodom je ispitano antimikrobno djelovanje supernatanata odabranih sojeva BMK prema patogenim test-mikroorganizmima i srodnim BMK. U jažice mikrotitarske pločice dodano je 190  $\mu\text{L}$  supernatanta ispitivanih bakterijskih kultura (3.2.6.2.) i 10  $\mu\text{L}$  patogenih test-mikroorganizama prethodno uzgojenih u BHI bujonu, odnosno 10  $\mu\text{L}$  srodnih BMK prethodno uzgojenih u MRS ili M17 bujonu. Antimikrobno djelovanje ispitivanih sojeva BMK tijekom 24 h uzgoja test-mikroorganizama i BMK pri optimalnim temperaturama određivano je spektrofotometrijski mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen BHI, MRS ili M17 bujon bez dodanog supernatanta BMK čije se antimikrobno djelovanje ispituje) i uzoraka s dodanim supernatantom mjera je inhibicije rasta test-mikroorganizama. Kao slijepa proba je korištena neinokulirana hranjiva podloga (Leboš i sur., 2008).

#### 3.2.7. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

##### 3.2.7.1. Priprava simuliranoga želučanog soka i simuliranoga soka tankog crijeva

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

Simulirani sok tankoga crijeva je pripremljen suspendiranjem pankreatina ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) i žučnih soli ( $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$  govede žuči) u 0,5 % otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom (Kos, 2001).

##### 3.2.7.2. Zajednički učinak simuliranog soka želuca i soka tankog crijeva na preživljavanje ispitivanih bakterija mliječne kiseline

Suspenzije stanica su prvo izložene djelovanju želučanog soka 2 sata, a zatim su centrifugirane pri  $10000 \text{ okr min}^{-1}$  i resuspendirane u simuliranom soku tankog crijeva tijekom 5 sata. Broj živih stanica je određen indirektnom metodom (3.2.3.).

#### 3.2.8. Metoda za ispitivanje autoagregacijskih i koagregacijskih svojstava odabranih bakterija mliječne kiseline

Bakterijske kulture su uzgojene u MRS bujonu pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 18 sati. Autoagregacijska i koagregacijska svojstva su ispitivane u fosfatnom puferu ( $\text{pH}=7,2$ ).

Suspencija bakterijskih stanica (4 mL) je izmiješana na vibromješaču, a zatim je određena bakterijska autoagregacija i koagregacija tijekom 5 h pri sobnoj temperaturi. 100 µL s vrha suspenzije je preneseno u mikrotitarsku pločicu te je izmjerena apsorbancija pri 620 nm. postupak je ponavljan svakih sat vremena. Postotak autoagregacije je izračunat prema formuli:

$$\% \text{ agregacije} = (1 - A_t/A_0) \cdot 100$$

$A_t$  – aposorbancija u vremenu t (1, 2, 3, 4 ili 5 h)

$A_0$  – apsorbancija u vremenu t=0

Koagregacija korištenih bakterijskih sojeva je ispitana s drugim sojevima BMK (*Lactobacillus helveticus* M92, *Lactiplantibacillus plantarum* L4, *Enterococcus faecium* L3) te s potencijalno patogenim mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Bacillus cereus* TM2). Po 2 mL svakog od para bakterijskih suspenzija je izmiješano na vibromješaču i ostavljeno stajati tijekom 5 h na sobnoj temperaturi. Uzorci su uzimani na isti način kao i za određivanje autoagregacije, očitana je apsorbancija pri 600 nm, a postotak koagregacije je izračunat prema formuli:

$$\% \text{ koagregacije} = [(OD_x + OD_y)/2 - OD_{(x+y)}] / [(OD_x + OD_y)/2] \cdot 100$$

gdje su x i y pojedinačne bakterijske suspenzije ispitivanog bakterijskog para, a (x + y) predstavlja suspenziju ispitivanog para bakterija (Kos, 2001).

### **3.2.9. In vitro ispitivanja adhezijskih svojstava probiotičkih sojeva na Caco-2 staničnoj liniji**

U svrhu ispitivanja adhezijskih svojstava probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na Caco-2 stanicama, stanice su prije naciepljivanja obojane u suspenziji sa CellBrite Fix Membrane bojom. Obojane Caco-2 stanice su zatim naciepljene na mikrotitarsku pločicu s 48 jažica u konačnom volumenu od 230 µL DMEM/F12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom. Nakon formiranja monosloja, Caco-2 stanice su inokulirane bakterijskom suspenzijom s podešenim multiplicitetom infekcije (eng. *multiplicity of infection*, MOI) od 100 bakterija po stanici, nazvanim MOI 100 i inkubirane tijekom 4 sata. Bakterijske stanice probiotičkih sojeva su dva puta isprane s fosfatnim puferom

centrifugiranjem pri 3000 · g tijekom 15 minuta na sobnoj temperature. Nakon uklanjanja supernatanta, talozi su suspendirani u 500 µL 5 µM CFSE i u fosfatnom puferu i inkubirani u termomikseru pri 37 °C tijekom 60 min. Obojane bakterijske stanice su zatim prebačene u polipropilenske kivete i isprane dva puta s fosfatnim puferom uz 0,5 % BSA. Preostali talozi su suspendirani u 1 mL DMEM/F12 + 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, a odgovarajući volumeni su dodani u svaku jažicu. Nakon inkubacije, neadhezirane bakterijske stanice su isprane dva puta s PBS puferom i fiksirane dodatkom 4 %-tnog paraformaldehida pri 37 °C tijekom 15 min. Nakon fiksiranja i ispiranja s fosfatnim puferom, stanice su obojane s, DAPI bojom, a detekcija adheziranih stanica je provedena na EVOS FLc Cell Imager uređaju.

U svrhu ispitivanja adhezijskih svojstava probiotičkog soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* na Caco-2 stanicama, stanice su nakon nacjepljivanja na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica, u konačnom volumenu od 100 µL DMEM/F12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, obojane u suspenziji s Incucyte Rapid Red bojom. Caco-2 stanice su zatim, nakon ispiranja sa 100 µL DMEM/F12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, inokulirane bakterijskom suspenzijom s MOI 50, MOI 10 i MOI 2. Bakterijske stanice probiotičkih sojeva su prethodno dva puta isprane s fosfatnim puferom centrifugiranjem pri 3000 · g tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja supernatanta, talozi su suspendirani u 200 µL fosfatnog pufera te je dodana ViaFluor 488 boja do konačne koncentracije od 5 µM, nakon čega su inkubirani pri 37 °C tijekom 15 min. Obojanim bakterijskim stanicama se dodalo 2 mL zagrijanog DMEM/F12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, nakon čega je slijedila inkubacija 5 min na sobnoj temperaturi. Suspenzije bakterijskih stanica su centrifugirane pri 3000 · g tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi, talozi su suspendirani u 80 µL DMEM/F12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom te su odgovarajući volumeni pripremljenih koncentracija probiotičkih sojeva dodani u svaku jažicu. Nakon inkubacije od 1, 4, i 12 sati, neadhezirane bakterijske stanice su isprane tri puta s fosfatnim puferom i fiksirane preko noći pri 37 °C dodatkom 4 %-tnog paraformaldehida. Nakon fiksiranja i ispiranja s fosfatnim puferom, stanice su obojane s DAPI bojom, a detekcija adheziranih stanica je provedena na EVOS FLc Cell Imager uređaju.



### 3.2.10. Ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogenih bakterija probiotičkim sojevima primjenom Caco-2 stanične linije

Provedeno je *in vitro* ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogenih bakterija *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 s probiotičkim sojevima *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> i *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* primjenom Caco-2 stanične linije.

Stanice Caco-2 stanične linije uzgojene se u minimalnom esencijalnom mediju (eng. MEM-*minimum essential medium*) u T-boci volumena 25 cm<sup>3</sup> i održavane pri 37 °C i 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub> u minimalnom esencijalnom mediju s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (56 °C tijekom 30 min). Stanice su čuvane u opisanim uvjetima i svaka 2 dana im je dodan svježi medij. Za ispitivanje kompetitivne ekskluzije stanica bakterija mliječne kiseline, Caco-2 crijevne epitelne stanice su inokulirane u plastične pločice s 24 jažice u koncentraciji od 1 · 10<sup>5</sup> stanica mL<sup>-1</sup> i inkubirane tjedan dana uz izmjenu medija svaka 2 dana. Prije primjene, Caco-2 stanice su isprane 3 puta fosfatnim puferom.

Prekonoćne kulture odabranih sojeva BMK uzgojene anaerobno pri 37 °C u MRS bujonu su centrifugirane pri 4200 o min<sup>-1</sup> tijekom 10 min s ciljem uklanjanja viška hranjive podloge da se spriječi mogući negativni učinak niskih pH vrijednosti ili izvanstaničnih proteina u supernatantu kulture. Patogene bakterije su uzgojene preko noći u BHI bujonu pri 37 °C u aerobnim uvjetima i centrifugirane na isti način kao BMK. Biomasa stanica patogenih bakterija i BMK je resuspendirana u fiziološkoj otopini i izmjerena je optička gustoća tako priređene suspenzije pri A<sub>620</sub> u mikrotitarskoj pločici. Talog stanica je zatim resuspendiran u odgovarajućim volumenima PBS-a kako bi se dobio OD=1. Uzorci su centrifugirani 5 min pri 4200 o min<sup>-1</sup>.

Ispitan je utjecaj predinkubacije BMK na adheziju *E. coli* 3014 i *S. Typhimurium* FP1 na Caco-2 stanice. Caco-2 epitelne stanice su isprane 3 puta u fosfatnom puferu (pH = 7,4) te je u jažicu dodano 1 mL suspenzije BMK i stanice su inkubirane 30 min pri 37 °C. Nakon inkubacije, Caco-2 stanice su ispirane fosfatnim puferom te je u jažice dodano po 1 mL suspenzije patogenih bakterija i nastavljena je inkubacija pri 37 °C kroz 30 min. Prije dodatka suspenzije bakterijskih stanica na Caco-2 stanice, provjeren je početan broj stanica (CFU mL<sup>-1</sup>) u suspenziji indirektnom metodom, tj. naciepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja u Petrijevim zdjelicama s optimalnim hranjivim podlogama. Jažice su nakon inkubacije isprane 3 puta s 1 mL PBS-a kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu adhezirale te su inkubirane 10 min u 0,05 % (v/v) u otopini Triton X-100. Sadržaj svake jažice je prebačen u

plastičnu tubicu i centrifugiran 5 min pri  $13000 \text{ o min}^{-1}$ . Potom je talog stanica resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera, a broj adheziranih stanica je određen indirektnom metodom nacjepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica na odgovarajuću podlogu u obliku kapi (10  $\mu\text{L}$ ) u dvije paralele. Za određivanje broja poraslih bakterijskih stanica *E. coli* 3014 i *S. Typhimurium* FP1 prije i nakon adhezije korištena je selektivna podloga Rapid agar odnosno XLD. Nakon 48 sati aerobne inkubacije pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  su izbrojane izrasle kolonije i rezultat je izražen kao  $\text{CFU mL}^{-1}$ .

### **3.2.11. *In vitro* adhezija na proteine ekstracelularnog matriksa**

Ekperimenti *in vitro* adhezije na proteine ekstracelularnog matriksa provedeni su s bakterijskim stanicama iz kasne eksponencijalne faze. Ispitivanje adhezije bakterijskih stanica se provodilo u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica koje na ravnom dnu sadrže imobilizirane proteine ekstracelularnog matriksa. Mikrotitarske ploče su presvučene s  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  fibronektina, odnosno laminina ili kolagena u karbonatnom/bikarbonatnom puferu  $50 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 9,6, nakon čega su jažice mikrotitarskih ploča isprane tri puta s fosfatnim puferom i inkubirane 1 h u 1 % otopini Tween 20 u fosfatnom puferu. Nakon što je gustoća bakterijskih stanica svakog pojedinog soja podešena na  $\text{OD}_{620\text{nm}} = 1,0$  u fosfatnom puferu,  $100 \mu\text{L}$  bakterijske suspenzije dodano je u jažice mikrotitarske pločice s imobiliziranim proteinom ekstracelularnog matriksa te je slijedila inkubacija bakterijskih stanica preko noći pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon toga je slijedilo trostruko ispiranje sadržaja mikrotitarskih pločica s  $200 \mu\text{L}$  fosfatnog pufera koji sadrži Tween 20, kako bi se uklonile nevezane bakterijske stanice te je mikrotitarska pločica do sušenja sadržaja inkubirana na sobnoj temperaturi (vrijeme inkubacije približno 1 h). Tako priređene adhezirane bakterijske stanice bojane su s kristal violetom ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  tijekom 45 min, pH 4,0). Nakon ponovnog ispiranja, suvišak boje je uklonjen dodatkom  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  citratnog pufera pH 4,0 ( $100 \mu\text{L}$  po jažici), nakon čega je očitana apsorbancija pri  $620 \text{ nm}$  u čitaču mikrotitarskih ploča.

### **3.2.12. Dekonjugacijska aktivnost prema žučnim solima**

Spektrofotometrijska metoda (Walker i Gilliland, 1993) je korištena za utvrđivanje koncentracije slobodne kolne kiseline, nastale zbog hidrolazne (dekonjugacijske) aktivnosti ispitivanih sojeva. Uzorci su uzimani svaka 2 sata tijekom 4 h uzgoja u MRS bujonu s dodanih  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  natrijeva taurokolata. U  $3 \text{ mL}$  uzorka dodano je  $0,6 \text{ mL}$   $4 \text{ M NaOH}$  i  $3,6 \text{ mL}$  etil-

acetata. Dobro izmiješana smjesa je odstajala 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se razdvojile faze. 2 mL gornjeg sloja etil-acetata je preneseno u novu epruvetu i otpareno u struji dušika. Suhi ostatak je otopljen u 1 mL 0,01 M NaOH i 6 mL 8 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 %-tnog furfuraldehida te ostavljen stajati 13 minuta u vodenoj kupelji pri 65 °C. Nakon hlađenja je uzorku dodano 5 mL ledene octene kiseline i očitana je apsorbancija pri 660 nm. Za izradu baždarne krivulje pripremljene su standardne otopine u koncentracijama: 0,05; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 i L mg (kolne kiseline) mL<sup>-1</sup> (0,01 M NaOH), a obrađene su slijedom opisanim za uzorke nakon uparavanja.

### 3.2.13. Asimilacija kolesterola

Koncentracija kolesterola određivana je u uzorcima uzimanim svaka 2 sata tijekom 24 sata uzgoja ispitivanih sojeva u MRS bujonima s dodatkom 3 mg mL<sup>-1</sup> govede žuči te 200 µg mL<sup>-1</sup> kolesterola. Koncentracija kolesterola je određivana spektrofotometrijski (Rudel i Morris, 1973). U 0,5 mL kulture je dodano 3 mL 96 %-tnog etanola i 2 mL 50 %-tnog kalijeva hidroksida i inkubirano pri 60 °C u vodenoj kupelji tijekom 10 minuta. Nakon hlađenja je uzorku dodano 5 mL heksana i 3 mL destilirane vode. Dobro izmiješana smjesa je ostavljena kroz 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se razdvojile faze. U drugu epruvetu je preneseno 2,5 mL gornjeg sloja heksana koji je zatim otparen pri 60 °C u struji dušika. Suhi ostatak je otopljen u 4 mL 0,05 %-tnog o-ftalaldehida i ostavljen tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je, uz lagano miješanje, dokapano 2 mL koncentrirane sumporne kiseline, a nakon 10 minuta je očitana apsorbancija pri 550 nm. Za izradu baždarne krivulje pripremljene su standardne otopine u koncentracijama: 10, 20, 30, 40 i 50 µg kolesterola mL<sup>-1</sup> propanola koje su obrađene na isti način kao i uzorci. Tom je metodom analiziran i neinkuliran MRS bujon sa žučnim solima i kolesterolom u navedenim koncentracijama da bi se utvrdilo spontano taloženje kolesterola sa žučnim solima. Rezultati dobiveni mjerenjem smanjenja koncentracije kolesterola u hranjivim podlogama tijekom uzgoja ispitivanih sojeva korigirani su rezultatima spontano istaloženog kolesterola. Asimilacija kolesterola s ispitivanim sojevima je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\text{asimilirani kolesterol (\%)} = [(c_0 - c_{24}) - c_{\text{ist}} / c_0] \cdot 100$$

$c_0 - c_{24}$  – ukupno uklonjeni kolesterol iz hranjive podloge

$c_0$  – koncentracija kolesterola u 0. satu

$c_{24}$  – koncentracija kolesterola u 24. satu

$c_{\text{ist}}$  – koncentracija istaloženog kolesterola

Tom je metodom određena koncentracija kolesterola u supernatantu i fosfatnom puferu (pH = 7,2) kojim su isprane stanice nakon 30 minuta i 24 sata uzgoja u MRS bujonu, uz dodatak 3 mg mL<sup>-1</sup> goveđe žuči te 200 µg mL<sup>-1</sup> kolesterola. Asimilirani kolesterol određivan je u ekstraktu stanica, dobivenom nakon liziranja stanica s 10 mL mg mL<sup>-1</sup> lizozima u 25 mM Tris-HCl tijekom 1 sata pri 37 °C. Nakon toga su stanice inkubirane pri 0 °C s NaOH / SDS otopinom (1,4 mL 0,2 M NaOH u 1 %-tnom SDS-u). Nakon toga je lizatu dodano 1,05 mL 5 M kalijeva acetata (pH = 4,8), a inkubacija pri 0 °C je još trajala 5 minuta (Klaenhammer, 1984).

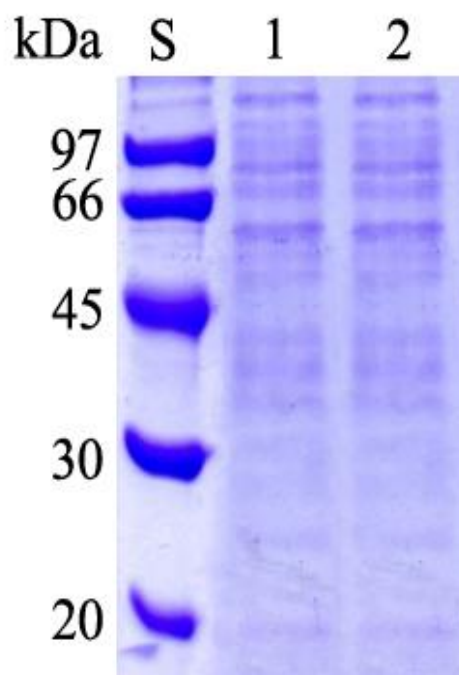
### **3.2.14. Statistička analiza i prikaz rezultata**

Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri nezavisna uzorka ± standardna devijacija (SD). Statistička značajnost je procijenjena jednosmjernom analizom varijance (*engl.* One-way analysis of variance, One-way ANOVA) i Tukey HSD (*engl.* Honestly significant difference) testom VassarStats računalnog programa (<http://vassarstats.net/test>). Statističke razlike između skupina se smatraju značajnim ako je  $P < 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

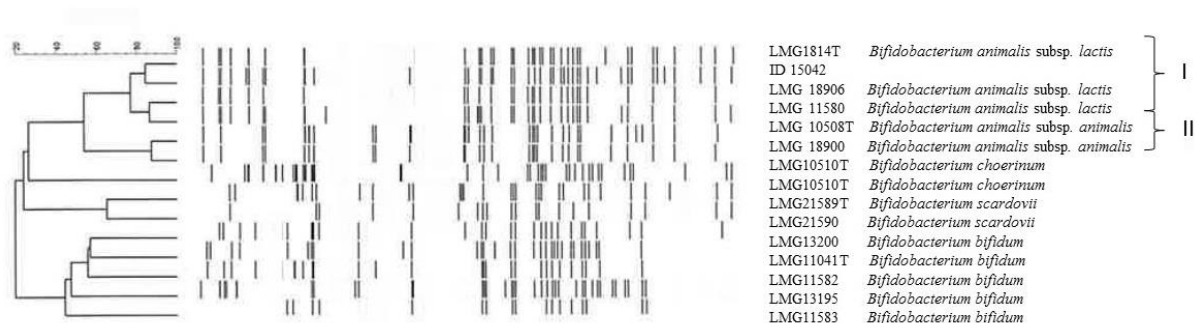
### 4.1. Fenotipska i genotipska karakterizacija probiotičkih sojeva

Kako bi ostvarili pozitivan učinak na zdravlje potrošača, probiotički pripravci trebaju sadržavati žive stanice odabranog probiotičkog soja u koncentracijama većim od  $10^6$ /g proizvoda. Zbog toga je jedan od glavnih tehnoloških parametara praćenje preživljavanja probiotičkih bakterija tijekom pripreme i čuvanja/skladištenja proizvoda u deklariranom roku uporabe. Početni broj *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> stanica u proizvodima dječje hrane, odnosno broj *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* stanica u hrani za posebne medicinske potrebe postavljen je na  $2,0 \cdot 10^7$  CFU g<sup>-1</sup>. Provedeno je ispitivanje preživljavanja i zadržavanja aktivnosti bakterija u proizvodima tijekom 24 mjeseca čuvanja na 25 °C pri čemu je broj živih probiotičkih stanica određen u 24. mjesecu bio iznad zahtijevanog minimalnog broja. U svrhu kontrole probiotičke kulture dodane u proizvode dječje hrane odnosno hrane za posebne medicinske potrebe, provedena je provjera prisutnosti i identifikacija bakterijskog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> i *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Pri tom su korištene različite fenotipske i genotipske metode. Provedena je izolacija bakterijskog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> iz instant pahuljica od riže na selektivnoj hranjivoj podlozi (TOS propionat agar podloga). Nakon uzgoja pojedinačnih kultura preko noći na TOS hranjivoj podlozi provedena je karakterizacija izolirane bakterije, odnosno identifikacija kako bi se provjerilo radi li se o bakterijskom soju *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>. Kao kontrola služila je čista liofilizirana kultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>. Nakon izolacije proteina i njihovog razdvajanja SDS-PAGE metodom (slika 5) ustanovljeno je da proteinski profil bakterijskog izolata odgovara proteinskom profilu liofilizirane kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>.



**Slika 5.** SDS-PAGE staničnih proteina *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®  
 S – standard, proteini male molekulske mase; 1 – liofilizirana kultura; 2 – kultura izolirana iz instant pahuljica od riže

Uz to, reidentifikacija bakterijskog soja izoliranog iz instant pahuljica s rižom je provedena korištenjem „DNA fingerprinting“ pomoću metode AFLP. Klaster analiza je dokazala da izolirani bakterijski soj (ID 15042) pripada vrsti *Bifidobacterium animalis*. S obzirom da ta vrsta sadrži dvije podgrupe; prvoj pripadaju sojevi *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, a drugoj *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, bilo je važno odrediti kojoj grupi pripada izolirani soj (slika 6). Dendrogram jasno pokazuje da soj izoliran iz instant pahuljica od riže pripada grupi I, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.



**Slika 6.** Dendrogram DNA fragmenata dobivenih AFLP metodom (Amplified Fragment Length Polymorphism) za soj ID 15042 izoliran iz instant pahuljica od riže, za referentne sojeve vrste *Bifidobacterium animalis* i filogenetički slične vrste roda *Bifidobacterium*

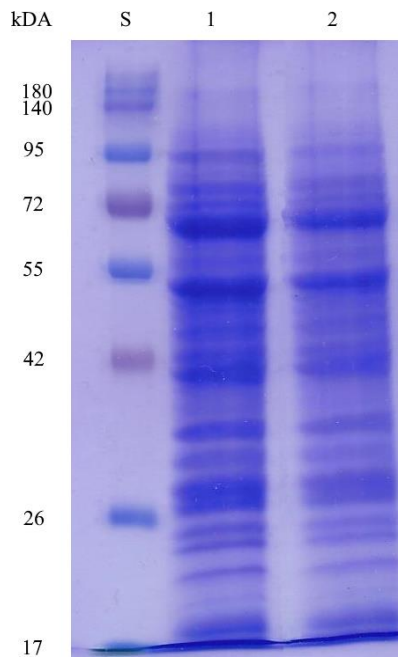
Genotipska karakterizacija bakterijskog izolata iz pahuljica od riže provedena je PCR metodom sa specifičnim početnicama za *Bifidobacterium* vrste. Nakon provedene PCR reakcije i gel-elektroforeze, vizualizirana je po jedna DNA vrpca za uzorak DNA bakterijskog izolata iz instant pahuljica od riže i za uzorak DNA liofilizirane kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> (slika 7). Dobiveni rezultat ukazuje da se u oba slučaja radi o bakterijama koje pripadaju *Bifidobacterium* vrsti.



**Slika 7.** PCR produkti dobiveni s početnicama specifičnim za bakterije iz roda *Bifidobacterium* S – standard  $\lambda$ -*Hind*III i Gene ruler 100 bp; 1 – liofilizirana kultura; 2 – kultura izolirana iz instant pahuljica od riže

Izolacija bakterijskog soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je provedena iz uzorka hrane za posebne medicinske potrebe na MRS hranjivoj podlozi. Nakon uzgoja pojedinačnih kultura preko noći na MRS hranjivoj podlozi provedena je karakterizacija izolirane bakterije, odnosno identifikacija kako bi se provjerilo radi li se o bakterijskom soju *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Kao kontrola korištena je čista liofilizirana kultura *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

SDS-PAGE metoda pokazuje da proteinski profil bakterijskog soja izoliranog iz hrane za posebne medicinske potrebe odgovara proteinskom profilu liofilizirane kulture *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* (slika 8).



**Slika 8.** SDS-PAGE staničnih proteina *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*

S – standard, proteini male molekulske mase; 1 – liofilizirana kultura; 2 – kultura izolirana iz proizvoda hrane za posebne medicinske potrebe

Genotipska karakterizacija bakterijskog izolata iz hrane za posebne medicinske potrebe provedena je PCR metodom sa specifičnim početnicama za bakterijsku vrstu *Lacticaseibacillus paracasei*. Nakon provedene PCR reakcije i gel-elektroforeze, vizualizirana je po jedna DNA vrpca za uzorak DNA bakterijskog izolata iz hrane za posebne medicinske potrebe i za uzorak DNA liofilizirane kulture *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* (slika 9). Dobiveni rezultat ukazuje da se u oba slučaja radi o bakterijama koje pripadaju *Lacticaseibacillus paracasei* vrsti.





**Slika 9.** PCR produkti dobiveni s početnicama specifičnim za bakterijsku vrstu *Lacticaseibacillus paracasei*

S – standard  $\lambda$ -*HindIII* i Gene ruler 100 bp; 1 – liofilizirana kultura; 2 – kultura izolirana iz proizvoda hrane za posebne medicinske potrebe

Uz to, provedena je genotipska identifikacija ovog soja Sangerovim sekvenciranjem produkata PCR-amplifikacije 16S rRNA gena. Rezultati sekvenciranja su uspoređeni s poznatim sekvencama pohranjenim u NCBI bazi podataka primjenom BLASTn algoritma (tablica 8).

**Tablica 8.** Rezultati sekvenciranja 16S rRNA gena

SOJ	Sličnosti sa sekvencama pohranjenim u NCBI banci gena			
	Rezultat identifikacije	% sličnosti	Pristupni broj u NCBI banci gena	E-vrijednost
K	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	91,57	MZ379452.1	0.0

Primjenom API<sup>®</sup>50 CH biokemijskog testa, koji sadrži 49 supstrata (ugljikohidrata) ispitani su fermentacijski profili bakterijskih izolata iz uzoraka dječje hrane i iz hrane za posebne medicinske potrebe te su uspoređeni s fermentacijskim profilom liofilizirane kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> odnosno *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* (tablica 9).

**Tablica 9.** Fermentacija različitih šećera s probiotičkim sojevima ispitana na API® 50 CH biokemijskim testovima nakon 48 h inkubacije pri 37 °C:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® uzgojenim iz liofilizirane kulture i izoliranim iz dječje hrane

b) *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* uzgojenim iz liofilizirane kulture i izoliranim iz hrane za posebne medicinske potrebe

a)

Šećeri	BB-12®	BB-12® ipr	BB-12® iprv	BB-12® ipp	Šećeri	BB-12®	BB-12® ipr	BB-12® iprv	BB-12® ipp
Kontrola	-	-	-	-	Arbutin	+	+	+	+
Glicerol	±	±	+	±	Eskulin	+	+	+	+
Eritriol	-	-	-	-	Salicin	+	+	+	+
D-arabinoza	-	-	-	-	Celobioza	+	+	+	+
L-arabinoza	+	+	+	+	Maltoza	+	+	+	+
Riboza	+	+	+	+	Laktoza	+	+	+	+
D-ksiloza	+	+	+	+	Melibioza	+	+	+	+
L-ksiloza	-	-	-	-	Saharoza	+	+	+	+
Adonitol	+	+	±	+	Trehaloza	-	-	-	-
β-metil-ksilozid	-	-	-	-	Inulin	-	-	-	-
Galaktoza	+	+	+	+	Melezitoza	+	+	+	+
D-glukoza	+	+	+	+	D-rafinoza	-	-	-	-
D-fruktoza	+	+	+	+	Amidon	-	-	-	-
D-manoza	+	+	+	+	Glikogen	-	-	-	-
L-sorboza	±	±	±	±	Ksilitol	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	β-gentobioza	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	D-turanoza	+	+	+	+
Inozitol	-	-	-	-	D-liksoza	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	D-tagatoza	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	D-fukoza	-	-	-	-
α-metil-D-manozid	+	+	+	+	L-fukoza	-	-	-	-
α-metil-D-glukozid	+	+	+	+	D-arabitol	+	+	+	±
N-acetilglukozamin	+	+	+	+	L-arabitol	-	-	-	-
Amigdalinaldin	+	+	+	+	Glukonat	±	±	±	+
2-ketoglukonat	+	+	+	+	5-ketoglukonat	-	-	-	-

ipr – instant pahuljice od riže; iprv – instant pahuljice od riže s voćem; ipp – instant pahuljice od pšenice

b)

Šećeri	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i> HPMP	Šećeri	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i> HPMP
Kontrola	-	-	Arbutin	+	+
Glicerol	-	-	Eskulin	+	+
Eritriol	-	-	Salicin	+	+
D-arabinoza	-	-	Celobioza	+	+
L-arabinoza	-	-	Maltoza	+	+
Riboza	+	+	Laktoza	-	-
D-ksiloza	-	-	Melibioza	+	+
L-ksiloza	-	-	Saharoza	+	+
Adonitol	-	-	Trehaloza	-	-
$\beta$ -metil-ksilozid	-	-	Inulin	+	+
Galaktoza	+	+	Melezitoza	-	-
D-glukoza	+	+	D-rafinoza	-	-
D-fruktoza	+	+	Amidon	-	-
D-manoza	+	+	Glikogen	-	-
L-sorboza	+	+	Ksilitol	-	-
Ramnoza	-	-	$\beta$ -gentobioza	+	+
Dulcitol	-	-	D-turanoza	-	-
Inozitol	-	-	D-liksoza	+	+
Manitol	+	+	D-tagatoza	-	-
Sorbitol	+	+	D-fukoza	-	-
$\alpha$ -metil-D-manozid	-	-	L-fukoza	-	-
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-	-	D-arabitol	-	-
N-acetilglukozamin	+	+	L-arabitol	+	+
Amigdalinalin	-	-	Glukonat	-	-
2-keto-glukonat	+	+	5-keto-glukonat	-	-

HPMP –hrana za posebne medicinske potrebe

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati;

$\pm$ , promjena boje između zelene i žute

Dobiveni rezultati, prikazani u tablici 9, pokazuju da bakterijski izolati iz dječje hrane imaju isti fermentacijski profil kao i liofilizirana kultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, a izolat iz uzorka hrane za posebne medicinske potrebe isti fermentacijski profil kao i liofilizirana kultura *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

## 4.2. Kontrola funkcionalnosti probiotičkih kultura u proizvodima

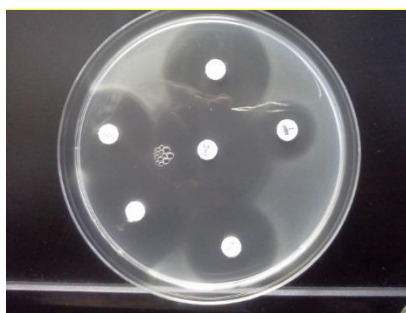
U svrhu ispitivanja utjecaja matriksa proizvoda dječje i hrane za posebne medicinske potrebe na funkcionalnost probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, odnosno *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, provedeno je niz eksperimenata u kojima su uspoređeni rezultati dobiveni za navedene bakterijske sojeve kao čiste liofilizirane probiotičke kulture i kulture u proizvodu dječje ili hrane za posebne medicinske potrebe.

Prema EFSA-inom znanstvenom mišljenju (EFSA, 2012) bakterijski sojevi koje se dodaju u prehranu ljudi ili životinja moraju biti osjetljivi prema određenim antibioticima. U slučaju bakterija iz roda *Bifidobacterium*, potrebno je odrediti minimalnu inhibicijsku koncentraciju za ampicilin, eritromicin, gentamicin, klindamicin, kloramfenikol, streptomycin, tetraciklin i vankomicin, a u slučaju vrste *Lactocaseibacillus paracasei* za ampicilin, eritromicin, gentamicin, kanamicin, klindamicin, kloramfenikol, streptomycin i tetraciklin. Razlog zašto kod bakterije iz roda *Lactobacillus* nije potrebno ispitivati rezistenciju na vankomicin je taj što imaju urođenu rezistenciju na vankomicin, ali ona nije prenosiva na druge bakterijske sojeve, za razliku od stečene rezistencije posredovane plazmidima i transpozonomima koja ima veliki potencijal za prenošenje, kao što to može biti slučaj kod nekih vankomicin – rezistentnih vrsta iz roda *Enterococcus*. Peptidoglikanske strukture kod većine su laktobacila odgovorne za visoku rezistenciju na glikopeptidne antibiotike (Coeuret i sur., 2004).

**Tablica 10.** Usporedba osjetljivosti probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane, na 8 različitih antibiotika; ispitano metodom difuzije pomoću filter diskova

Antibiotik	Koncentracija antibiotika (μg)	Promjer zone inhibicije (mm)			
		BB-12 <sup>®</sup>	BB-12 <sup>®</sup> ipr	BB-12 <sup>®</sup> iprv	BB-12 <sup>®</sup> ipp
Ampicilin	2	24	25	26	21
Eritromicin	15	40	43	46	44
Gentamicin	10	/	/	/	/
Klindamicin	2	40	40	48	50
Kloramfenikol	30	30	40	38	40
Streptomycin	10	/	/	/	/
Tetraciklin	10	15	12	12	16
Vankomicin	30	40	35	38	38

ipr – instant pahuljice od riže; iprv – instant pahuljice od riže s voćem; ipp – instant pahuljice od pšenice



**Slika 10.** Osjetljivost *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na antibiotike ampicilin, azitromicin, bacitracin, klaritromicin, kloramfenikol i klindamicin, ispitana metodom difuzije pomoću filter diskova

**Tablica 11.** Minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) pojedinih antibiotika za *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane, ispitane E-testom

Antibiotik	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	BB-12 <sup>®</sup> čista kultura	BB-12 <sup>®</sup> ipr	BB-12 <sup>®</sup> iprv	BB-12 <sup>®</sup> ipp
Ampicilin	0,015	0,03	0,03	0,03
Eritromicin	0,015	0,015	0,015	0,015
Gentamicin	64	64	64	64
Klindamicin	0,015	0,015	0,015	0,015
Kloramfenikol	0,008	0,008	0,008	0,008
Tetraciklin	1	8	8	8
Streptomycin	128	128	128	128
Vankomicin	0,25	0,25	0,25	0,25

ipr – instant pahuljice od riže; iprv – instant pahuljice od riže s voćem; ipp – instant pahuljice od pšenice



**Slika 11.** Osjetljivost *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na vankomicin ispitana E-testom

Ispitana je osjetljivost probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na antibiotike, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane. Ispitivani soj *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> pokazao je podjednaku osjetljivost na antibiotike i kao čista liofilizirana kultura i kao kultura u dječjoj hrani, primjenom metode difuzije u agar (tablica 10 i slika 10) i metodom E-testa (tablica 11 i slika 11). U slučaju metode s diskovima, rezultati su u skladu s EFSA-inim smjernicama osim u slučaju antibiotika koji pripadaju skupini aminoglikozidnih antibiotika (gentamicin i streptomycin). Izostanak zone inhibicije pri ispitivanju osjetljivosti na te antibiotike se može objasniti njihovom inaktivacijom u kiselom mediju uslijed proizvodnje octene i mliječne kiseline tijekom rasta soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na hranjivoj podlozi za ispitivanje osjetljivosti na antibiotike metodom difuzije pomoću filter diskova (Ashraf i Shah, 2011). Kod metode s E-testom, inhibicija rasta je ostvarena i u slučaju gentamicina te streptomicina pri maksimalnim koncentracijama od 64 odnosno 128  $\mu\text{g mL}^{-1}$  što odgovara EFSA-inim smjernicama.

**Tablica 12.** Usporedba osjetljivosti probiotičkog soja *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe, na 8 različitih antibiotika; ispitano metodom difuzije pomoću filter diskova

Antibiotik	Koncentracija antibiotika ( $\mu\text{g}$ )	Promjer zone inhibicije (mm)	
		<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i> HPMP
Ampilicin	2	50	50
Eritromicin	15	35	35
Gentamicin	10	12	12
Kanamicin	30	8	8
Klindamicin	2	42	4
Kloramfenikol	30	40	40
Streptomycin	10	8	8
Tetraciklin	10	31	31

HPMP – hrana za posebne medicinske potrebe

**Tablica 13.** Minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) pojedinih antibiotika za *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe, ispitane E-testom

Antibiotik	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i> HPMP
Ampicilin	0,19	0,19
Eritromicin	0,094	0,094
Gentamicin	64	64
Kanamicin	64	64
Klindamicin	0,047	0,047
Kloramfenikol	12	12
Tetraciklin	0,25	0,25
Streptomycin	32	32

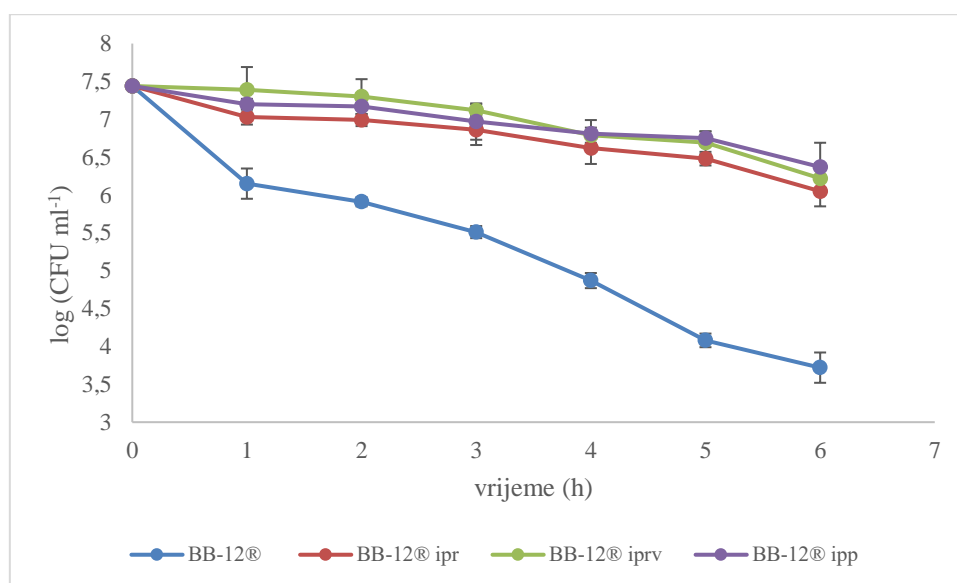
HPMP– hrana za posebne medicinske potrebe

U tablici 12 su prikazani rezultati ispitivanja osjetljivosti na antibiotike probiotičkog soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe metodom difuzije pomoću filter diskova, a u tablici 13 E-testom. Rezultati su pokazali osjetljivost ispitivanih sojeva prema svim antibioticima.

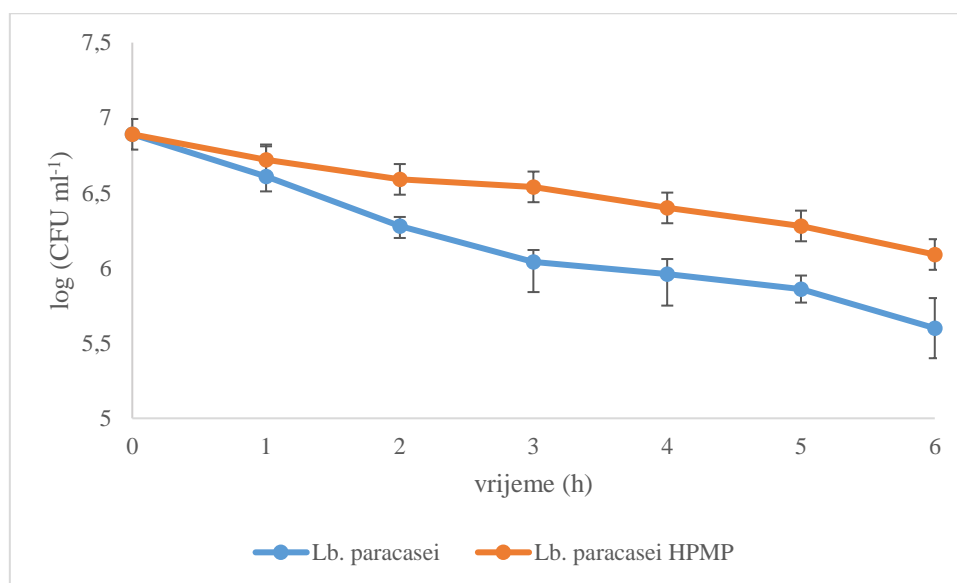
Kod oba probiotička soja, odnosno uzorka hrane, nije bilo razlika između liofiliziranih i kultura izoliranih iz proizvoda što upućuje na to da ne postoji utjecaj prehrambenog matriksa na osjetljivost sojeva na antibiotike.

Uspješno preživljavanje u GIT-u jedan je od glavnih kriterija pri izboru probiotičkih sojeva. Pritom, glavnu prepreku preživljavanju potencijalnih probiotičkih sojeva u GIT-u predstavljaju niski pH želuca, žučne soli i probavni enzimi, kao što su lizozim, pepsin i enzimi gušterače. Stoga je provedeno ispitivanje preživljavanja soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane te *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture te kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe, u simuliranim uvjetima GIT-a, odnosno utjecaj prehrambenih matriksa na mogućnost preživljavanja primijenjenih probiotičkih kultura u nepovoljnim uvjetima. Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijevog klorida kojoj je pH podešen na 2,0, dok je simulirani sok tankoga crijeva pripremljen suspendiranjem pankreatina ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) i žučnih soli ( $3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijeva klorida kojoj je pH podešen na 8,0. Preživljavanje ispitivanih sojeva kroz 2 sata u simuliranom želučanom soku te kroz 4 sata inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva, praćeno je indirektnom metodom. Rezultati su izraženi kao log (CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) te prikazani na slici 12.

a)



b)



**Slika 12.** Kumulativni utjecaj simuliranog soka želuca (pH=2,0; vrijeme inkubacije 2 h) i simuliranog soka tankog crijeva (pH=8,0; vrijeme inkubacije 4 h) na preživljavanje:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® kao čiste liofilizirane kulture te kulture iz dječje hrane

b) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture te kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe

Broj živih stanica probiotičke kulture *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® u dječjoj hrani je bio za 2,5 logaritamske jedinice veći od broja te čiste, liofilizirane kulture što



ukazuje na protektivni utjecaj korištenih matriksa tijekom izlaganja kultura nepovoljnim uvjetima no nije bilo značajne razlike između tri različita matriksa dječje hrane (slika 12a). Jungersen i sur. (2014) su svom radu sumirali istraživanja vezana uz izlaganje različitih *Bifidobacterium* sojeva niskom pH, želučanom soku i žučnim solima i dobiveni rezultati su pokazali da je soj *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> bolje preživio izlaganje želučanom soku i žučnim solima od drugih *Bifidobacterium* sojeva. Uz to, dos Santos i sur. (2019) su objavili istraživanje u kojem je probiotička bakterija *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> bolje preživjela u simuliranim uvjetima GIT-a kada je korištena u namazima kao prehranbenom matriksu nego u slučaju kada je izložena bez matriksa. Razlog visoke tolerancije na kisele uvjete je vjerojatno indukcija H<sup>+</sup>-ATP-aze, enzimskog kompleksa koji je uključen u proces održavanja unutarstanične pH homeostaze kod bakterija (Jungersen i sur., 2014).

U slučaju probiotičke kulture *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, razlika u preživljavanju tijekom izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta između čiste liofilizirane kulture te kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe je iznosila samo pola logaritamske jedinice što znači da su obje kulture vrlo uspješno preživjele nepovoljne uvjete, ali nije bilo značajnijeg utjecaja hrane za posebne medicinske potrebe na protektivni učinak (slika 12b). González-Vázquez i sur. (2015) su objavili istraživanje u kojem su izložili nepovoljnim uvjetima GIT-a dva *Lacticaseibacillus casei* soja, kontrolni soj Shirota i soj J57, izoliran iz pulke (tradicionalno meksičko fermentirano alkoholno piće). Soj *Lb. casei* J57 je zadržao istu stopu preživljavanja tijekom 4 sata izlaganja simuliranim uvjetima želučanog soka, dok je za soj *Lb. casei* Shirota već nakon sat vremena izlaganja bila ispod 40 %, a nakon 2 sata nije bilo živih stanica. Isti sojevi su bili izloženi tijekom 4 sata različitim žučnim solima (taurokolna, glikokolna i deoksikolna kiselina i goveđa žuč (oxgall)). Iako je kod oba soja hidrolazna aktivnost bila veća prema taurokolnoj kiselini u odnosu na druge, a najniža prema oxgall žučnim solima i iako je soj J57 pokazao nešto veću rezistenciju na djelovanje žučnih soli, oba soja su preživjela sve nepovoljne uvjete s barem 50 % preživljavanja.

S obzirom da je u ovom istraživanju korištena također goveđa žuč (oxgall) koja je proizvedena iz velike količine svježe žuči brzim isparavanjem vode i sastoji se od masnih kiselina, žučnih kiselina, anorganskih soli, sulfata, žučnih pigmenata, kolesterola, mucina, lecitina, glukuronske kiseline, porfirina i uree, dakle postoji negativan sinergistički efekt različitih komponenata na preživljavanje bakterija, preživljavanje *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* u vrlo visokom broju nakon 4 sata izlaganja simuliranim uvjetima tankog crijeva je vrlo obećavajući rezultat (slika 12b). Visoko preživljavanje u simuliranim uvjetima želučanog soka u kojem prevladavaju kiseli uvjeti, ukazuje na postojanje mehanizma unakrsne rezistencije

budući da većina obrambenih sustava koji se uključuju prilikom stresa izazvanog promjenom pH vrijednosti uključuju mehanizam za održavanje pH vrijednosti citoplazme, a mnogi od tih sustava omogućuju unakrsnu zaštitu i prilikom drugih stresova, na primjer izlaganja žučnim solima (Beales, 2004).

Glavnu prepreku kolonizaciji probiotičkih sojeva u završnom dijelu tankog crijeva (*ileum terminalis*) predstavlja visoka koncentracija žučnih soli, koje iskazuju antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim mikroorganizmima. Jedan od mehanizama rezistencije na žučne soli je mogućnost njihove dekonjugacije djelovanjem enzima hidrolaze žučnih soli. Stoga je istražen rast stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane te rast stanica *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe, u prisustvu žučnih soli te je ispitana dekonjugacijska aktivnost stanica prema žučnim solima kvalitativnom metodom (tablica 14). Pritom je korištena natrijeva sol taurokolne kiseline, kao najzastupljenija žučna sol u žuči čovjeka. Važno svojstvo probiotičkih sojeva je i asimilacija kolesterola, pri čemu je prisustvo žučnih soli preduvjet za uspješnu asimilaciju. Stoga je provedeno spektrofotometrijsko određivanje istaloženog, asimiliranog i otopljenog kolesterola nakon 24 h uzgoja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane te uzgoja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe, u prisutnosti žučnih soli (slika 13).

**Tablica 14.** Rast i hidrolazna aktivnost\*:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> sojeva, uzgojenih iz liofilizirane kulture i iz dječje hrane

b) *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* sojeva, uzgojenih iz liofilizirane kulture i iz hrane za posebne medicinske potrebe

\*nakon 24 sata inkubacije pri 37 °C u MRS podlozi uz dodatak 2 mg mL<sup>-1</sup> natrijevog taurokolata

a)

Uzorci	Rast (A <sub>620</sub> )	Kolna kiselina (g L <sup>-1</sup> )	Dekonjugacija taurokolata (%)
BB12 <sup>®</sup> čista kultura	0,40 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,02 <sup>b</sup>	13,0 ± 1,5 <sup>ab</sup>
BB12 <sup>®</sup> ipr	0,42 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>	13,5 ± 0,7 <sup>ab</sup>
BB12 <sup>®</sup> iprv	0,41 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>a</sup>	15,0 ± 1,3 <sup>a</sup>
BB12 <sup>®</sup> ipp	0,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,03 <sup>b</sup>	13,0 ± 0,5 <sup>b</sup>

ipr – instant pahuljice od riže; iprv – instant pahuljice od riže s voćem; ipp – instant pahuljice od pšenice

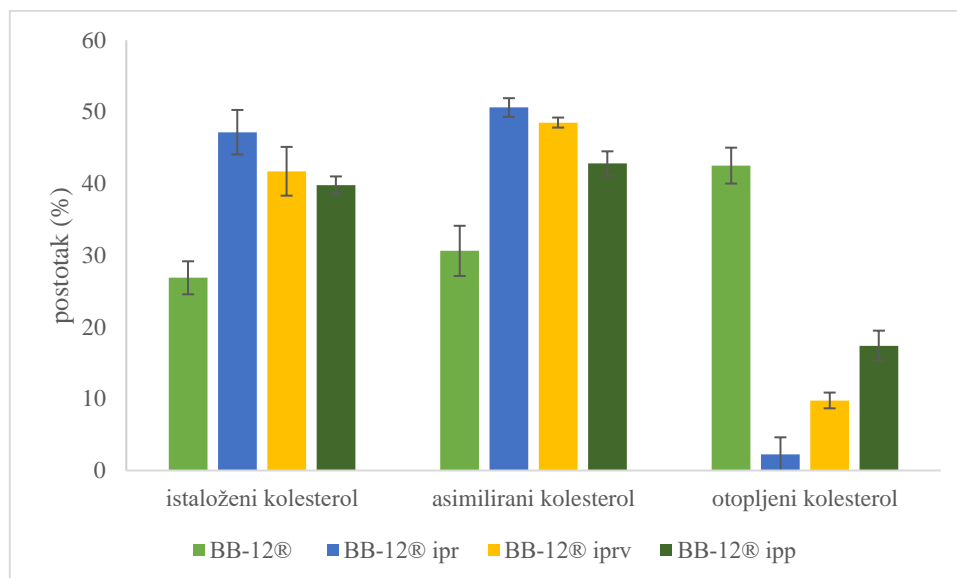
b)

Uzorci	Rast (A <sub>620</sub> )	Kolna kiselina (g L <sup>-1</sup> )	Dekonjugacija taurokolata (%)
<i>Lb. paracasei</i> čista kultura	0,38 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>b</sup>	13,0 ± 0,7 <sup>b</sup>
<i>Lb. paracasei</i> HPMP	0,42 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,02 <sup>a</sup>	14,5 ± 0,6 <sup>a</sup>

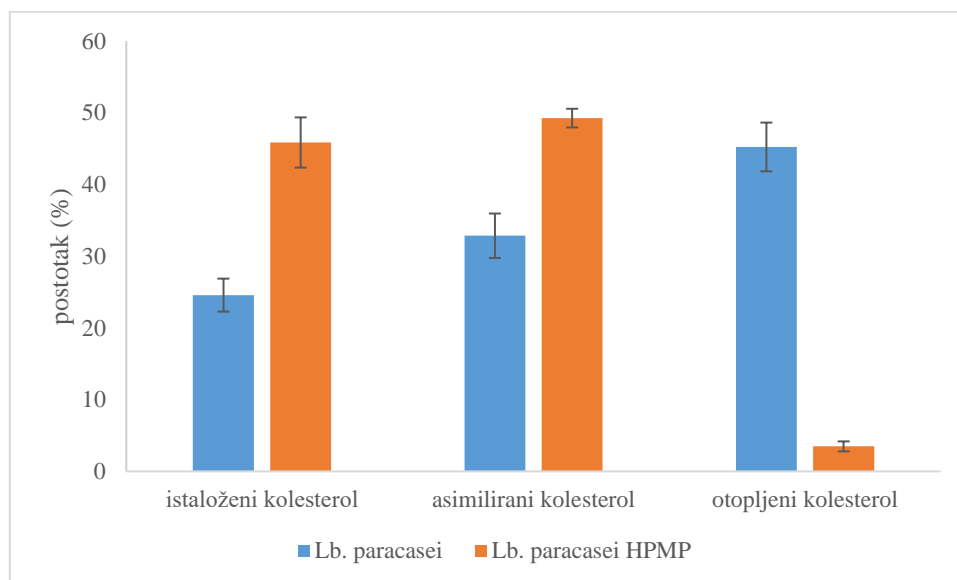
HPMP – hrana za posebne medicinske potrebe

<sup>ab</sup> Različito slovo označava statistički značajnu (P<0,05) razliku unutar istog stupca

a)



b)



**Slika 13.** Asimilacija kolesterola s:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane

b) *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe

(istaložen, asimilirani i otopljeni kolesterol nakon 24 h uzgoja u prisutnosti žučnih soli)

Rezultati su pokazali da probiotički soj BB-12® vjerojatno proizvodi hidrolazu žučnih soli jer je pokazao dekonjugacijsku aktivnost tijekom rasta u mediju uz dodatak  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  natrijevog taurokolata (tablica 14a). Ovaj mehanizam je djelomično odgovoran za zaštitu BB-

12<sup>®</sup> stanica od djelovanja žučnih soli. Jurgensen i sur. (2014) su obrazložili da BB-12<sup>®</sup> stanice proizvode hidrolazu žučnih soli, enzim koji katalizira dekonjugaciju žučnih soli i posljedično tome osigurava brzi odgovor na visoke koncentracije žučnih soli čime omogućava stanicama da prežive prolazak kroz tanko crijevo i dođu do debelog crijeva, odnosno svog mjesta djelovanja u što većem broju. Osim toga, nije primijećena značajna razlika među sojevima izoliranim iz tri proizvoda dječje hrane, iako su stanice BB-12<sup>®</sup> izolirane iz instant pahuljica od riže i voća pokazale nešto veću aktivnost hidrolaze žučne kiseline (tablica 14a). Nakon 24 sata rasta BB-12<sup>®</sup> stanica u prisutnosti kolesterola i žučnih soli, stanice iz čiste liofilizirane kulture uklonile su oko 55 % kolesterola iz hranjivog medija (slika 13a). U ekstraktu stanica je bilo prisutno oko 30 % kolesterola, što ukazuje, ne samo na koprecipitaciju kolesterola s dekonjugiranim žučnim solima (približno 25 %), već i na njegovu asimilaciju. Nasuprot tome, BB-12<sup>®</sup> stanice izolirane iz instant pahuljica od riže su asimilirale do 50 % ukupnog kolesterola, dok je tijekom rasta probiotika taloženo 45 % kolesterola u otopinu. BB-12<sup>®</sup> stanice izolirane iz instant pahuljica od riže i voća uklonile su oko 90 % kolesterola iz hranjivog medija. Kako je u ekstraktu stanica pronađeno 48 % kolesterola, to znači da je ovaj prehrambeni matriks povećao asimilaciju kolesterola za 18 %. BB-12<sup>®</sup> stanice izolirane iz instant pahuljica od pšenice uklonile su 82 % kolesterola iz hranjivog medija. S obzirom da je u ekstraktu stanica pronađeno 43 % kolesterola, znači da je ovaj matriks povećao asimilaciju kolesterola za 13 %. Bifidobakterije se mogu postupno prilagođavati prisutnosti žučnih soli i vjerojatno su razvile specifične obrambene mehanizme, koji uključuju različite proteine koji djeluju na efluks žučnih soli ili protona, kako bi modificirali metabolizam šećera ili spriječili pogrešno smatanje proteina. Ovdje je riječ o multifaktorijalnom fenomenu koji povezuje procese usmjerene na detoksifikaciju žuči i suzbijanje učinka na bakterijske strukture. Osim toga, zaštita od oksidativnog oštećenja i glikolitičke reorganizacije su ostali mehanizmi koji se mogu primijeniti za suzbijanje staničnog oštećenja uzrokovanog žučnim solima (Ruiz i sur., 2013).

Prilikom ispitivanja rasta *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* sojeva u mediju uz dodatak 2 mg mL<sup>-1</sup> natrijevog taurokolata, vidljivo je da postoji dekonjugacijska aktivnost i kod soja iz čiste liofilizirane kulture te iz hrane za posebne medicinske potrebe i iako je vrijednost nešto veća kod soja izoliranog iz hrane za posebne medicinske potrebe, ne može se tvrditi utjecaj matriksa na tu aktivnost i sposobnost rasta uz dodatak žučnih soli (tablica 14b). Nakon 24 sata rasta *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* stanica u prisutnosti kolesterola i žučnih soli, stanice iz čiste liofilizirane kulture su uklonile 54,77 % kolesterola iz hranjivog medija, a asimilirale 32,85 % kolesterola (slika 13b). Nasuprot tome, *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* stanice izolirane iz hrane za posebne medicinske

potrebe su asimilirale 49,25 % ukupnog kolesterola, dok je tijekom rasta stanica taloženo 45,85 % kolesterola u otopinu. Te stanice su uklonile 96,52 % kolesterola iz hranjivog medija. S obzirom da su stanice soja izoliranog iz čiste liofilizirane kulture asimilirale 32,85 % kolesterola, to znači da je hrana za posebne medicinske potrebe kao prehrambeni matriks povećala asimilaciju kolesterola za 16,4 %. Smatra se da laktobacili uklanjaju kolesterol zbog dekonjugacije žučne soli. Naime, kada se žučne soli dekonjugiraju i pH vrijednost medija pada jer kultura proizvodi kiseline, micide kolesterola se destabiliziraju i kolesterol se taloži sa slobodnim žučnim kiselinama. Žučne kiseline su manje topljive i veća je vjerojatnost da će se istaložiti pri pH vrijednosti nižoj od 6 (Brashears i sur., 1998). Hiperkolesterolemija je jedan od vodećih uzroka kardiovaskularnih bolesti (WHO, 2019). Probiotici mogu pomoći u snižavanju visoke razine lipida u krvi. U nekoliko istraživanja je utvrđen povoljan učinak bakterije *Lactocaseibacillus paracasei*. Naime, soj *Lb. paracasei* HII01 je značajno smanjio razinu ukupnog kolesterola, triglicerida, faktora tumorske nekroze i lipopolisaharida kod pacijenata s hiperkolesterolemijom te povećao razinu HDL (*engl. high-density lipoprotein*) kolesterola, ukupni antioksidativni kapacitet te propionsku i mliječnu kiselinu. Dakle, dodatak *Lb. paracasei* HII01 soja je poboljšao profil lipida u krvi te smanjio oksidativni stres (Chaiyasut i sur., 2021).

Mogućnost snižavanja razine kolesterola jedno je od najperspektivnijih svojstava bakterija mliječne kiseline s probiotičkim svojstvima. Albino i sur. (2018) su ispitali kod 58 BMK s potencijalno probiotičkim svojstvima njihovu sposobnost preživljavanja u *in vitro* uvjetima GIT-a te sposobnost snižavanja koncentracije kolesterola u mediju koji sadrži kolesterol i žučne kiseline. Između 7 sojeva koji su pokazali najbolji učinak, čak su dva *Lb. paracasei* soja, *Lactocaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* SE160 i VC213, snizila koncentraciju kolesterola u mediju za 55 odnosno 45 % pa su bili naknadno, uz druge sojeve ispitani u proizvodnji sira. Udio kolesterola se u svim sirevima smanjivao sazrijevanjem. Svi sojevi bili su prisutni u siru u koncentracijama višim od  $10^7$  CFU  $g^{-1}$  do 60 dana zrenja, a najveća smanjenja razine kolesterola u siru (do 23 %) su postignuta u sirevima u koje su tijekom proizvodnje dodani sojevi *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* VC213 i *E. lactis* BT161. Uz to, dodane kulture nisu imale negativan utjecaj na senzorske karakteristike sira. To otvara put njihovoj inkorporaciji u novu funkcionalnu hranu, hranu za posebne medicinske potrebe i ostale kategorije nutraceutike; na primjer, mogli bi se koristiti za proizvodnju probiotičkog sira i drugih mliječnih proizvoda kao što su fermentirano mlijeko ili mliječni deserti sa smanjenim udjelom kolesterola i važnih funkcionalnih svojstava, kao i za potencijalni razvoj formulacija dodataka prehrani namijenjenih prevenciji dislipidemije, koronarnih bolesti i metaboličkog

sindroma. Povećanje svijesti potrošača o odnosu između prehrane i zdravlja te proizvodnja najsvremenije hrane s pozitivnim zdravstvenim učincima ili probiotičkih dodataka prehrani otvara nove mogućnosti i za potrošače i za prehrambenu i farmaceutsku industriju.

### **4.3. Antagonističko djelovanje prema patogenim i nepoželjnim mikroorganizmima te potencijalna bakteriocinska aktivnost**

Probiotičke BMK u GIT-u ljudi blagotvorno djeluju na cjelokupni organizam, što uključuje i njihovo antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama. Ekskluzija patogena važan je aspekt djelovanja probiotika. To se ostvaruje proizvodnjom inhibitornih metabolita, razgradnjom toksina, kompeticijom za hranjive sastojke i mjestima vezanja te indukcijom imunoloških odgovora (Jungersen i sur., 2014). Kad se radi o inhibiciji Gram-negativnih mikroorganizama, to je uglavnom posljedica proizvodnje organskih kiselina, vodikovog peroksida, etanola, diacetila, acetaldehida, dok različiti peptidi i bakteriocini imaju glavnu ulogu u antimikrobnom djelovanju prema Gram-pozitivnim mikroorganizmima. Bakteriocini su ribosomalno sintetizirani peptidi ili proteini s antimikrobnom aktivnošću usmjerenom prema srodnim Gram-pozitivnim bakterijama, pri čemu su stanice koje ih proizvode imune na njihovo djelovanje. Stoga je istražena antimikrobna te posebno i bakteriocinska aktivnost stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane te prema predstavnicima BMK te *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe prema test-mikroorganizmima koji su potencijalni kontaminanti hrane i uzročnici različitih infekcija, koristeći metodu s dvostrukim slojem agara (tablica 15, slika 14), metodu difuzije u agar (tablica 16, slika 15) te turbidimetrijsku metodu (slike 16 i 17).

**Tablica 15.** Antagonističko djelovanje\*:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane

Test-mikroorganizmi	Efektivni inhibicijski omjer (EIR <sup>**</sup> )			
	BB12 <sup>®</sup> čista kultura	BB12 <sup>®</sup> ipr	BB12 <sup>®</sup> iprv	BB12 <sup>®</sup> ipp
<i>Salmonella</i> Typhimurium FP1	1,0 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LMG 9206	0,3 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 9450	0,63 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,83 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 9430	0,33 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,05 <sup>a</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954	0,22 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>

ipr – instant pahuljice od riže; iprv – instant pahuljice od riže s voćem; ipp – instant pahuljice od pšenice

b) *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe

Test-mikroorganizmi	Efektivni inhibicijski omjer (EIR <sup>**</sup> )	
	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i> HPMP
<i>Salmonella</i> Typhimurium FP1	0,8 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LMG 9206	0,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,09 <sup>a</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 9450	0,43 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,1 <sup>a</sup>
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 9430	0,58 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>a</sup>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LMG 7954	0,27 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,08 <sup>a</sup>

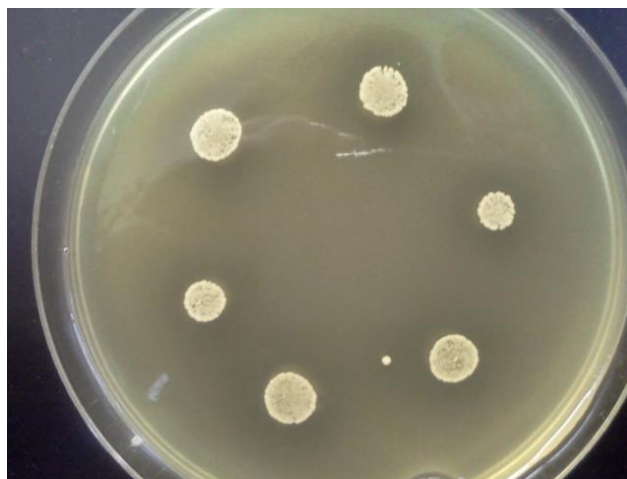
HPMP– hrana za posebne medicinske potrebe

\*prema Gram-pozitivnim mikroorganizmima, ispitano metodom s dvostrukim slojem agara

\*\*EIR = (ID-CD)/CD; CD = promjer porasle kulture; ID = promjer zone inhibicije; EIR<0,5 slaba inhibicija; 0,5<EIR>1,5 srednja inhibicija; EIR>1,5 jaka inhibicija.

<sup>abc</sup> Različito slovo označava statistički značajnu (P<0,05) razliku unutar istog stupca





**Slika 14.** Inhibicijski učinak *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> u instant pahuljicama od riže, prema bakterijskom soju *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450, ispitano metodom s dvostrukim slojem agara

U ispitivanju antagonističkog djelovanja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> prema test-mikroorganizmu *Salmonella* Typhimurium FP1 te predstavnicima BMK metodom s dvostrukim slojem agara (slika 14), uspoređeni su efektivni inhibicijski omjeri dobiveni za stanice navedenog soja kao čiste liofilizirane kulture i kao čiste liofilizirane kulture i kulture u dječjoj hrani. Pritom su stanice tog soja u dječjoj hrani iskazale srednji ili jaki inhibicijski učinak, što je posebno vidljivo prema sojevima *Lactiplantibacillus plantarum* LMG 9206 te *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954, za razliku od stanica soja iz liofilizirane kulture koje su uglavnom pokazale slabu ili srednju inhibiciju (tablica 15a). Prema tome, u ispitivanju antimikrobnog učinka metodom dvostrukog sloja agara, proizvodni matriksi dječje hrane pojačavaju inhibicijsko djelovanje soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, što ukazuje na povećanu koncentraciju antimikrobnih metabolita, posebno bakteriocina koji inhibiraju rast BMK koje nisu osjetljive na niske pH vrijednosti zbog prisutnosti organskih kiselina (octene i mliječne kiseline).

Kod bakterije *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* nije toliko značajan pozitivan utjecaj matriksa na antimikrobno djelovanje osim u slučaju srodne bakterije *Leuconostoc mesenteroides* LMG 795 (tablica 16b). Iako su stanice soja iz hrane za posebne medicinske potrebe pokazale srednju inhibiciju dok je u slučaju stanica soja iz liofilizirane kulture to bila slaba inhibicija te nije došlo do jake inhibicije kao što je to bio slučaj kod stanica soja BB-12<sup>®</sup>.

**Tablica 16.** Antagonističko djelovanje\*:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane

Test-mikroorganizmi	Promjer zone inhibicije (mm)			
	BB12 <sup>®</sup> čista kultura	BB12 <sup>®</sup> ipr	BB12 <sup>®</sup> iprv	BB12 <sup>®</sup> ipp
<i>Staphylococcus aureus</i> 3048	12 ± 1 <sup>a</sup>	10 ± 1,1 <sup>a</sup>	12 ± 1,2 <sup>a</sup>	12 ± 1 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> K-144	19 ± 1,5 <sup>a</sup>	16 ± 2 <sup>b</sup>	10 ± 1,5 <sup>c</sup>	12 ± 1,1 <sup>c</sup>
<i>Escherichia coli</i> 3014	16 ± 1,6 <sup>a</sup>	12 ± 1 <sup>b</sup>	12 ± 0,09 <sup>b</sup>	13 ± 1,1 <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium FP1	12 ± 1,5 <sup>a</sup>	10 ± 2 <sup>a</sup>	12 ± 1,1 <sup>a</sup>	12 ± 1 <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i> TM2	15 ± 1,2 <sup>a</sup>	11 ± 1,1 <sup>b</sup>	11 ± 1 <sup>b</sup>	13 ± 1 <sup>b</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	16 ± 1,8 <sup>a</sup>	13 ± 1,5 <sup>b</sup>	10 ± 1,1 <sup>c</sup>	12 ± 1 <sup>bc</sup>

ipr – instant pahuljice od riže; iprv – instant pahuljice od riže s voćem; ipp – instant pahuljice od pšenice

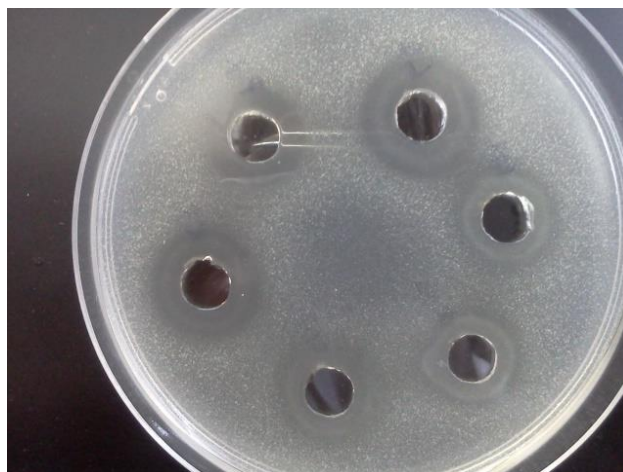
b) *Lactiseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao liofilizirane kulture i kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe

Test-mikroorganizmi	Promjer zone inhibicije (mm)	
	<i>Lb. paracasei</i> čista kultura	<i>Lb. paracasei</i> HPMP
<i>Staphylococcus aureus</i> 3048	3 ± 0,05 <sup>b</sup>	8,67 ± 0,09 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> K-144	10 ± 0,09 <sup>b</sup>	13,67 ± 1 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> 3014	11 ± 1,1 <sup>b</sup>	14,33 ± 1,2 <sup>a</sup>
<i>Salmonella</i> Typhimurium FP1	9,33 ± 1 <sup>b</sup>	14 ± 1,5 <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i> TM2	12,33 ± 0,09 <sup>b</sup>	16 ± 1,3 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	9 ± 1 <sup>b</sup>	13,33 ± 1,8 <sup>a</sup>

HPMP– hrana za posebne medicinske potrebe

\*prema test-mikroorganizmima, ispitano metodom difuzije u agar te izraženo kao promjer zone inhibicije

<sup>abc</sup> Različito slovo označava statistički značajnu ( $P < 0,05$ ) razliku unutar istog stupca

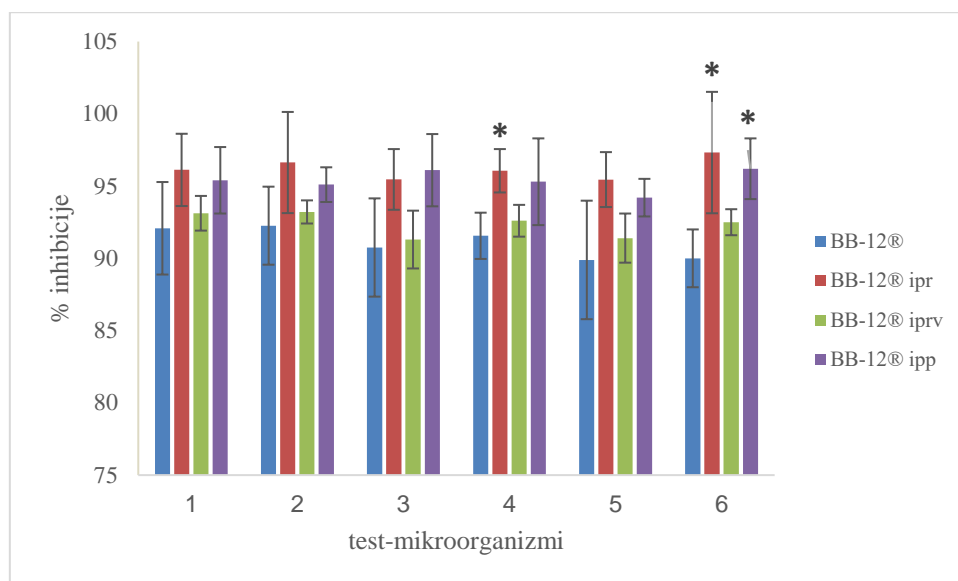


**Slika 15.** Inhibicijski učinak *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na test-mikroorganizam *Staphylococcus aureus* K-144, ispitano metodom difuzije u agar

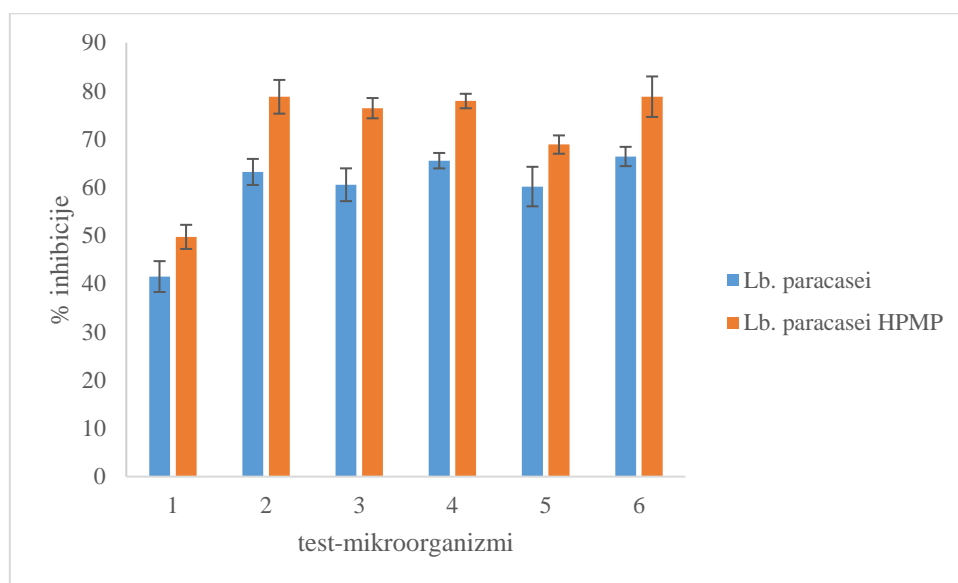
Antagonističko djelovanje *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane, prema test-mikroorganizmima, ispitano je i metodom difuzije u agar (slika 15) te izraženo kao promjer zone inhibicije (tablica 16a). U ovom su ispitivanju veći promjeri inhibicije postignuti za stanice u čistoj liofiliziranoj kulturi, što može biti posljedica otežane difuzije antimikrobnih metabolita uslijed prisutnosti određenih komponenata proizvodnog matriksa u supernatantu stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> u dječjoj hrani.

U slučaju stanica bakterije *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je postignut obrnuti rezultat. Naime, stanice kulture iz hrane za posebne medicinske potrebe su pokazale značajno veći inhibicijski učinak na rast test-mikroorganizama što znači da je taj matriks pojačao inhibicijsko djelovanje soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, vjerojatno povećavajući koncentraciju proizvedenih antimikrobnih metabolita, a s druge strane očito komponente tog matriksa nisu otežale difuziju antimikrobnih metabolita u hranjivu podlogu (tablica 16b).

a)



b)



**Slika 16.** Inhibicija rasta test-mikroorganizama djelovanjem supernatanata bakterija\*:

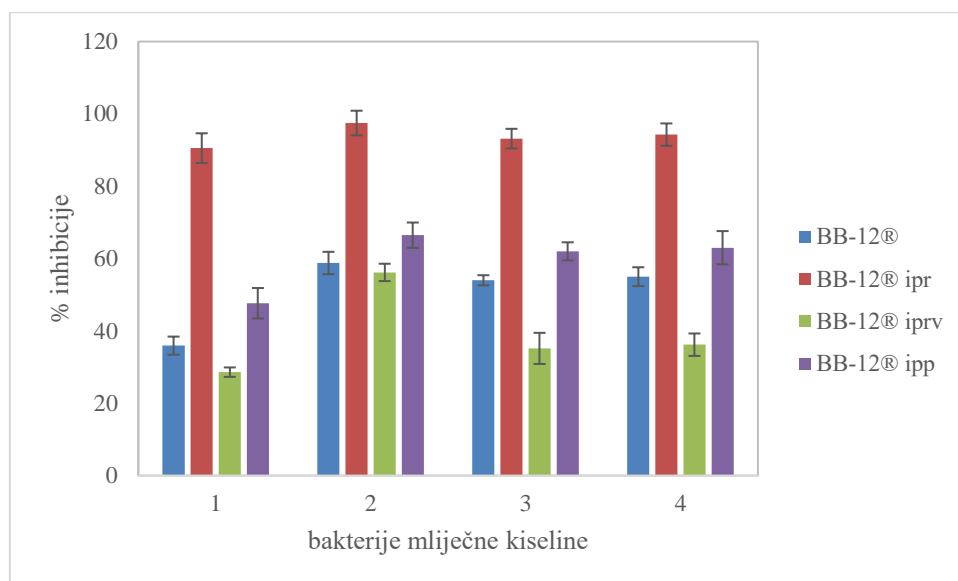
a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, uzgojene iz liofilizirane kulture i iz dječje hrane

b) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, uzgojene iz liofilizirane kulture i iz hrane za posebne medicinske potrebe

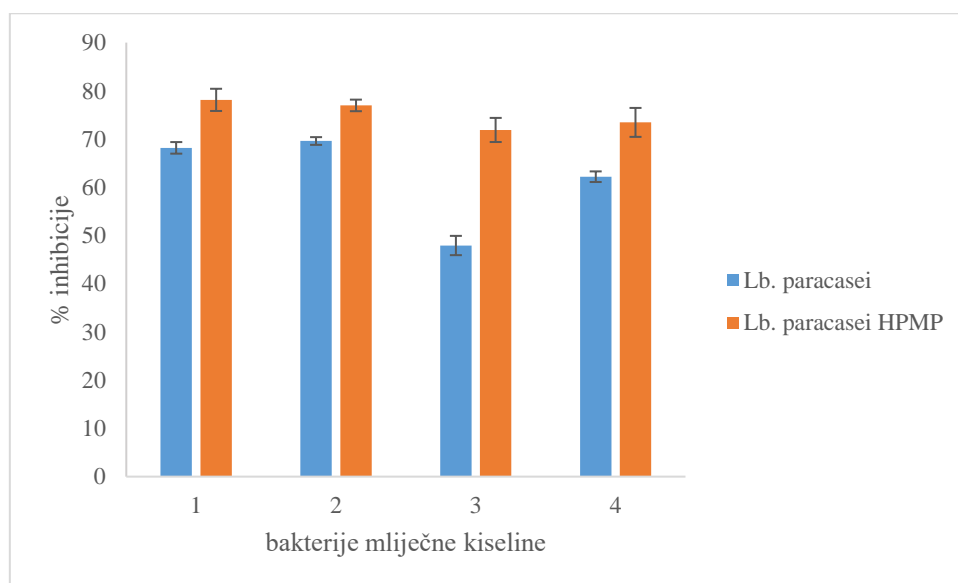
\*ispitano turbidimetrijskom metodom te izraženo kao postotak inhibicije

Test-mikroorganizmi: 1 – *Staphylococcus aureus* 3048; 2 – *S. aureus* K-144; 3 – *Escherichia coli* 3014; 4 – *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1; 5 – *Bacillus cereus* TM2; 6 – *Bacillus subtilis* ATCC 6633

a)



b)



**Slika 17.** Inhibicija rasta predstavnika BMK djelovanjem supernatanata bakterija\*:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, uzgojene iz liofilizirane kulture i iz dječje hrane

b) *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, uzgojene iz liofilizirane kulture i iz hrane za posebne medicinske potrebe

\*ispitano turbidimetrijskom metodom te izraženo kao postotak inhibicije

BMK: 1 - *Lactiplantibacillus plantarum* LMG 9206; 2 – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450; 3 – *Enterococcus faecium* ATCC 9430; 4 – *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954

U ispitivanju inhibicije rasta test-mikroorganizama djelovanjem supernatanata bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, uzgojene iz liofilizirane kulture i iz dječje hrane, turbidimetrijskom metodom, probiotičke stanice iz dječje hrane su iskazale jači inhibicijski učinak prema 6 ispitanih test-mikroorganizama za oko 5 % (slika 16a). Signifikantna razlika je vidljiva kod ispitane antimikrobne aktivnosti supernatanata iz instant pahuljica od riže i instant pahuljica od pšenice prema test-mikroorganizmu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i supernatanta iz instant pahuljica od riže prema test-mikroorganizmu *S. Typhimurium* FP1. Prednost u inhibicijskom učinku stanica iz instant pahuljica od riže bila je još više izražena kod ispitivanja inhibicije rasta 4 predstavnika BMK, gdje je iznosila do oko 20 %, dok je za stanice iz instant pahuljica od riže i voća i instant pahuljica od pšenica iznosila oko 15 % (slika 17a). Prema tome, proizvodni matriksi dječje hrane pojačavaju antimikrobni učinak soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> u ispitivanju inhibicije rasta test-mikroorganizama i predstavnika BMK turbidimetrijskom metodom što može biti posljedica poticanja metaboličke aktivnosti i proizvodnje antimikrobnih metabolita u prisutnosti dječje hrane.

Prilikom ispitivanja inhibicije rasta test-mikroorganizama i srodnih BMK djelovanjem supernatanata bakterije *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, uzgojene iz liofilizirane kulture i iz hrane za posebne medicinske potrebe, turbidimetrijskom metodom, stanice iz hrane su iskazale signifikantno jači inhibicijski učinak prema svim ispitanim mikroorganizmima (slike 16b i 17b). U slučaju test-mikroorganizama, stanice iz hrane za posebne medicinske potrebe su pokazale jači inhibicijski učinak za prosječno 12 %, dok je to kod srodnih bakterija mliječne kiseline iznosilo prosječno 10 %, uz iznimku od 24 % u slučaju srodne bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450.

Pretpostavlja se da je nekoliko mehanizama odgovorno za inhibicijsko djelovanje bifidobakterija prema patogenima, uključujući bakterije iz rodova *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus* i *Listeria*, a to su snižavanje pH zbog proizvodnje organskih kiselina, inhibicijsko djelovanje nedisociranih molekula organskih kiselina, natjecanje za hranjive tvari ili mjesta vezanja te stimulacija imunostava i proizvodnja bakteriocina (Laforest-Lapointe i sur., 2017; Fukuda i sur., 2014). Prema Cheikhoussefu i sur. (2009), soj BB-12<sup>®</sup> proizvodi bakteriocin Bifilact BB-12<sup>®</sup> s antimikrobnim djelovanjem prema vrstama *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium i *Listeria* sp. Bifidobakterije su pokazale visoku stopu rasta u bogatim sintetičkim medijima, ali su također rasle u jednostavnim medijima koji su sadržavali samo laktozu, slobodne aminokiseline i neke nukleotide, vitamine i minerale jer je kontrola razine magnezija, mangana i željeza bitna za optimalan rast bifidobakterija ili proizvodnju

bakteriocina kao rezultat nutritivnog stresa ili indukcije. Osim toga, mnogi sojevi bifidobakterija mogu koristiti složene biopolimere za poboljšanje rasta stanica i proizvodnju antimikrobnih metabolita. To su uglavnom ugljikohidrati koje mogu razgraditi bifidobakterije, ali ne i domaćin ili druge bakterije i često se koriste kao prebiotici (Castillo Martinez i sur., 2013). Konačno, prehrambena vlakna su također učinkovita u poticanju rasta bifidobakterija u intestinalnom traktu i utječu na njihovu proizvodnju antimikrobnih metabolita pa matriksi hrane za dojenčad, koji su ovdje korišteni mogu imati potencijal poticanja proizvodnje bakteriocina. Ipak, neki bakteriocini mogu utjecati na probiotičke kulture pa se to mora uzeti u obzir pri odabiru soja koji proizvodi bakteriocin za uključivanje u funkcionalnu hranu (O'Bryan i sur., 2018; Smigic i sur., 2018). Nadalje, osim bakteriocina, neki drugi proteini, kodirani genima prisutnima u genomu bakterije *B. animalis* ssp. *lactis*, koji su uključeni u adaptaciju i preživljavanje BB-12<sup>®</sup> u humanom GIT-u, također bi se mogli povezati s antimikrobnim potencijalom. Konkretno, dva paraloga koji kodiraju pretpostavljene N-acetilmuramidaze, koji su vjerojatno uključeni u razgradnju komponenti stanične stijenke enteropatogene bakterije, prisutni su u genomu BB-12<sup>®</sup>, kao i geni koji kodiraju pretpostavljene proteine stanične površine koji bi mogli biti uključeni u interakcije s ljudskim epitelnim stanicama i posljedično u kompetitivnu ekskluziju nepoželjnih bakterija. Štoviše, *Bifidobacterium* vrste osim proizvodnje laktata, također sintetiziraju acetat, jednu od glavnih kratkolančanih masnih kiselina, važnu za rast i diferencijaciju kolonocita, koja čini više od 80 % proizvedenih kratkolančanih masnih kiselina u crijevima dojenčadi i ključni je metabolit u ranom uspostavljanju rezistencije na kolonizaciju sprječavanjem infekcija enteropatogenima (Ruiz i sur., 2013). Putem metaboličkog unakrsnog hranjenja, gdje metabolički proizvodi vrste ili skupine vrsta daju supstrate za rast drugim populacijama, proizvodnja acetata bifidobakterijom održava rast drugih povoljnih vrsta koje imaju potencijal inhibirati enteropatogene.

Islam i sur. (2012) su pokazali snažno antibakterijsko djelovanje soja *Lacticaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei*-1, izoliranog iz tradicionalnog jogurta, prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama. Radulović i sur. (2010) su u svom istraživanju pokazali kako su sojevi *Lacticaseibacillus paracasei* 08, 564 i 05 snažno inhibirali rast, između ostalih, test-mikroorganizama *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* dok soj *Lacticaseibacillus paracasei* 02 nije uopće inhibirao rast navedenih sojeva. Mnoga istraživanja su *in vitro* testovima pokazala različite mehanizme antimikrobnog djelovanja laktobacila. Uobičajeno je antimikrobna aktivnost puno jača kada se ispituje u tekućim medijima zbog olakšane difuzije antimikrobnih metabolita. Najčešće je snažno antagonističko djelovanje laktobacila povezano s proizvodnjom organskih kiselina što dovodi do smanjenja pH

(Ouwehand i Vesterlund, 2004). Laktobacili često predstavljaju primarnu mikrobnu barijeru u suzbijanju gastrointestinalnih i urogenitalnih infekcija. Kao što je već navedeno, njihova inhibicijsko djelovanje potječe od proizvedenih organskih kiselina (u prvom redu mliječne kiseline), bakteriocina i drugih metabolita. S obzirom da bakteriocini djeluju prvenstveno prema srodnim vrstama, a supernatant soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je turbidimetrijskom metodom pokazao snažno djelovanje prema srodnim BMK, može se pretpostaviti da postoji potencijalno bakteriocinsko djelovanje koje je potrebno dodatno istražiti, a kao prvi korak potrebno je ponovno ispitati antimikrobno djelovanje neutraliziranog supernatanta kako bi se uklonio inhibicijski učinak proizvedene kiseline.

#### **4.4. Adhezijska svojstva i kompetitivna ekskluzija**

Adhezija na epitelne stanice je važan preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu jer sprječava njihovo uklanjanje uslijed peristaltike crijeva i pruža im kompetitivnu prednost pred drugim bakterijama za zadržavanje u tom ekosustavu. Pritom, neophodan preduvjet za adheziju probiotičkih sojeva na intestinalne epitelne stanice jest agregacija njihovih bakterijskih stanica.

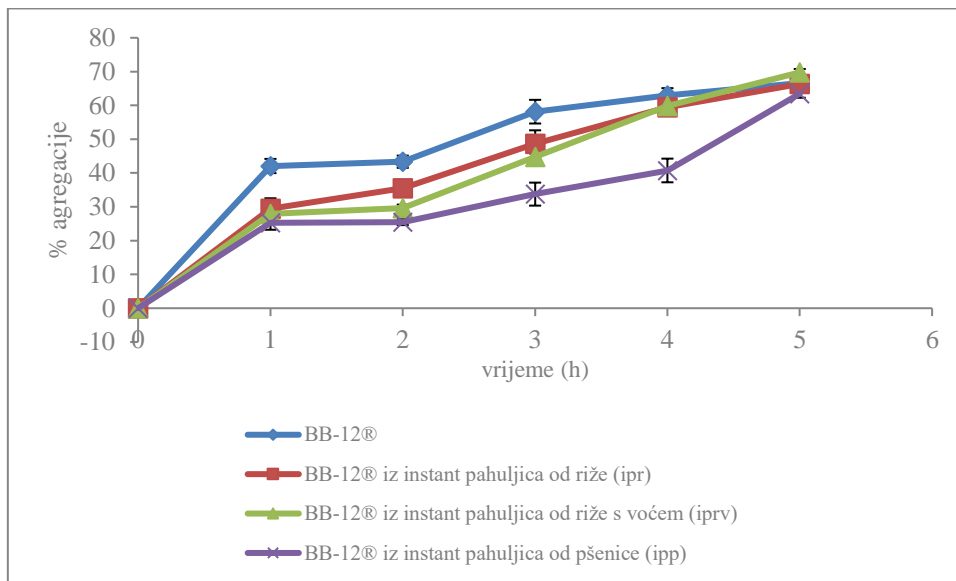
Agregacija bakterijskih stanica je definirana kao sposobnost taloženja stanica tijekom rasta pri čemu autoagregacija uključuje stanice istog bakterijskog soja, dok genetički različite stanice koagregiraju. Fenomen agregacije prvenstveno je povezan s velikom učestalošću razmjene genetičkog materijala putem uspostavljene međustanične komunikacije („quorum sensing“). Kod laktobacila su dvije vrste proteina odgovorne za agregaciju, a to su topljivi proteini i površinski proteini (Miljkovic i sur., 2015; Nikolic i sur., 2010). Čimbenici koji potiču koagregaciju laktobacila se međusobno razlikuju po molekularnoj težini i primarnoj strukturi. Najmanji opisani protein (2 kDa), koji posreduje pri autoagregaciji, je nađen u vaginalnom izolatu *Lactobacillus gasseri* 2459. Ovaj protein vjerojatno djeluje kao faktor sličan feromonu koji inducira ekspresiju površinskih proteina odgovornih za adheziju (Boris i sur., 1997). S druge strane, vrlo veliki protein (> 200 kDa) izravno uključen u agregaciju pronađen je u soju *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 (Lozo i sur., 2007). Osim proteinske komponente i razni ioni su povezani s agregacijom u nekim sojevima laktobacila izoliranim iz sira.

U ovom radu je ispitana autoagregacija bakterijskih stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>, kao čiste liofilizirane kulture i kulture iz dječje hrane te autoagregacija stanica *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kao čiste liofilizirane kulture te kulture

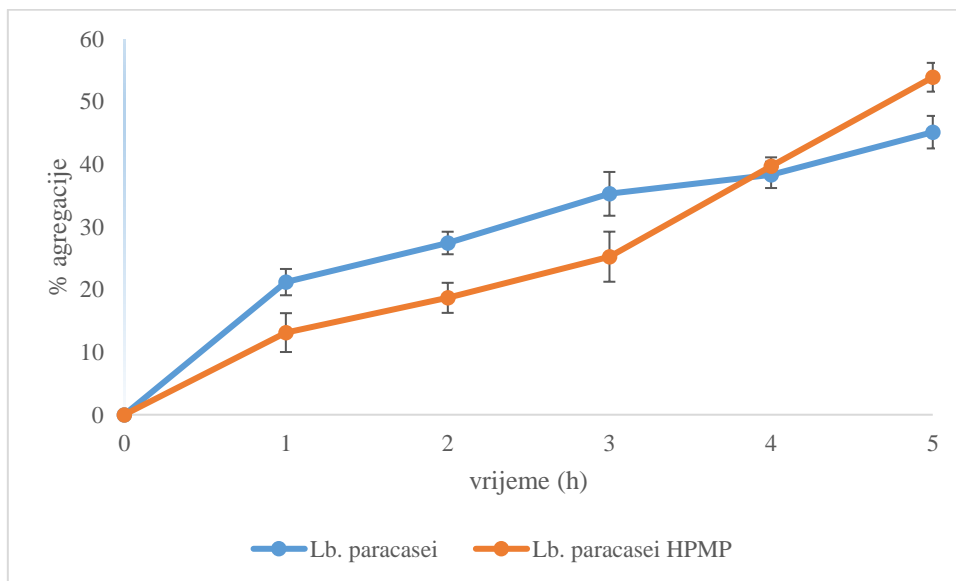


iz hrane za posebne medicinske potrebe (slika 18). S druge strane, probiotičke bakterije koje pokazuju uspješnost u koagregaciji, zajedno s antimikrobnim djelovanjem, mogu stvoriti prepreku koja sprječava kolonizaciju patogenih mikroorganizama. Dodatno, koagregacija s drugim BMK koje dobro podnose nisku pH vrijednost potiče kolonizaciju bifidobakterija u intestinalnom sustavu. Zbog toga je ispitana i koagregacija stanica istih sojeva s predstavnicima BMK, *Lactobacillus helveticus* M92 i *Enterococcus faecium* L3 te s test-mikroorganizmima *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 i *Escherichia coli* 3014 (tablica 17). Uspješnost autoagregacije i koagregacije mjerena je kroz 5 sati u fosfatnom puferu (pH=7,2) te su dobiveni rezultati izraženi kao postotak agregiranih stanica.

a)



b)



**Slika 18.** Autoagregacija stanica\*

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12® sojeva uzgojenih iz liofilizirane kulture i iz dječje hrane

b) *Lactiseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* sojeva uzgojenih iz liofilizirane kulture i iz hrane za posebne medicinske potrebe

\*u fosfatnom puferu (pH=7,2)

**Tablica 17.** Koagregacija parova bakterijskih sojeva *Lb. helveticus* M92, *Ec. faecium* L3 i *S. Typhimurium* FP1 s:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> sojeva uzgojenih iz liofilizirane kulture i iz dječje hrane

b) *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* sojeva uzgojenih iz liofilizirane kulture i iz hrane za posebne medicinske potrebe

nakon 5 sati inkubacije na sobnoj temperaturi u fosfatnom puferu (pH=7,2)

a)

Mikroorganizmi	Koagregacija (%)			
	BB-12 <sup>®</sup> čista kultura	BB-12 <sup>®</sup> ipr	BB-12 <sup>®</sup> iprv	BB-12 <sup>®</sup> ipp
<i>Lb. helveticus</i> M92	53,70 ± 1,3 <sup>a</sup>	50,51 ± 0,8 <sup>b</sup>	55,32 ± 2,2 <sup>a</sup>	49,56 ± 0,5 <sup>b</sup>
<i>Ec. faecium</i> L3	41,45 ± 0,5 <sup>b</sup>	42,50 ± 0,7 <sup>b</sup>	45,87 ± 0,8 <sup>a</sup>	37,84 ± 1,2 <sup>c</sup>
<i>S. Typhimurium</i> FP1	34,50 ± 1,1 <sup>a</sup>	30,58 ± 0,9 <sup>b</sup>	25,67 ± 1,3 <sup>c</sup>	35,72 ± 0,8 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> 3014	23,51 ± 1,3 <sup>c</sup>	25,63 ± 0,7 <sup>b</sup>	27,45 ± 0,8 <sup>a</sup>	23,43 ± 1,1 <sup>c</sup>

ipr – instant pahuljice od riže; iprv – instant pahuljice od riže s voćem; ipp – instant pahuljice od pšenice

b)

Mikroorganizmi	Koagregacija (%)	
	<i>Lb. paracasei</i> čista kultura	<i>Lb. paracasei</i> HPMP
<i>Lb. helveticus</i> M92	43,18 ± 0,6 <sup>b</sup>	57,72 ± 1,1 <sup>a</sup>
<i>Ec. faecium</i> L3	35,13 ± 0,8 <sup>b</sup>	44,82 ± 0,9 <sup>a</sup>
<i>S. Typhimurium</i> FP1	18,43 ± 0,9 <sup>b</sup>	25,71 ± 1,3 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> 3014	23,68 ± 1,1 <sup>b</sup>	37,19 ± 0,7 <sup>a</sup>

HPMP– hrana za posebne medicinske potrebe

<sup>abc</sup> Različito slovo označava statistički značajnu (P<0,05) razliku unutar istog stupca

Iako je autoagregacija čiste liofilizirane BB-12<sup>®</sup> kulture bila veća u prva 4 sata inkubacije od autoagregacije kultura BB-12<sup>®</sup> izoliranih iz proizvoda dječje hrane, u 5. satu, što je bio posljednji sat eksperimenta, postotak autoagregacija (> 60 %) se nije značajno razlikovao među svim ispitivanim uzorcima (slika 18a). Koagregacija čiste liofilizirane BB-12<sup>®</sup> kulture i

kultura izoliranih iz instant pahuljica od riže i instant pahuljica od pšenice je bila podjednako učinkovita i s *Lactobacillus helveticus* M92 i *Enterococcus faecium* L3 te primijenjenim test-mikroorganizmima. Razlika je uočena kod test mikroorganizma *Salmonella* Typhimurium FP1, gdje je koagregacija s čistom liofiliziranom kulturom BB-12<sup>®</sup> bila oko 10 % veća nego kod BB-12<sup>®</sup> kulture izolirane iz instant pahuljica od riže s voćem. Sposobnost koagregacije BB-12<sup>®</sup> kulture iz svih uzoraka s obje BMK (M92 i L3) bila je veća za otprilike 20 % u usporedbi s test-mikroorganizmima.

Autoagregacija čiste liofilizirane *Lb. paracasei* kulture je bila veća za otprilike 10 % od autoagregacije kultura *Lb. paracasei* izolirane iz hrane za posebne medicinske potrebe u prva tri sata inkubacije, ali je u posljednjem satu eksperimenta, postotak autoagregacija čiste kulture bio manji (i iznosio je 45,13 %) u odnosu na kulturu izoliranu iz hrane koji je iznosio 53,90 % (slika 18b). Kao i u slučaju kod BB-12<sup>®</sup> kulture, koagregacija sa srodnim BMK je bila veća u odnosu na test-mikroorganizme pri čemu je koagregacija s bakterijom *Lactobacillus helveticus* M92 bila za cca 10 % veća u odnosu na bakteriju *Enterococcus faecium* L3 (tablica 17b). Kod svih parova je koagregacija bila veća sa sojem *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* izoliranim iz hrane za posebne medicinske potrebe što ukazuje utjecaj matriksa na sposobnost koagregacije.

Autoagregacija i koagregacija sprečavaju kolonizaciju patogena na površinama, jer su uključeni u drugu fazu stvaranja biofilma. Sposobnost stvaranja višestaničnih agregata uočena je kod brojnih bakterijskih vrsta, uključujući laktobacile. Autoagregacija i koagregacija su vrlo važni fenomeni u nekoliko ekoloških niša. Autoagregacija laktobacila je neophodna za njihovu adheziju na epitelne stanice i površine sluznice, a to je poželjno svojstvo probiotičkih bakterija. Sposobnost autoagregacije jedan je od mehanizama kojima se objašnjava zaštitna uloga laktobacila u humanoj rodnicu. Autoagregacija zajedno s adhezijom na epitelne stanice, olakšava laktobacilima stvaranje biofilma na epitelu rodnice, sprječavajući pristup patogenima. Na isti način, koagregacija između laktobacila i patogenih mikroorganizama doprinosi stvaranju barijere koja sprječava njihovu adheziju patogena na epitel i naknadni pristup tkivima, stvarajući tako važan obrambeni mehanizam domaćina od infekcija u urogenitalnom i GIT-u (Gudiña i sur., 2010). Brojna istraživanja su potvrdila povoljan učinak probiotičkih sojeva u stvaranju biofilma, uključujući na primjer povećanu otpornost na temperaturu ili nisku pH vrijednost (Salas-Jara i sur., 2016). Gómez i sur. (2016) su u svom istraživanju potvrdili potencijal biofilmova probiotičkih BMK za kontrolu stvaranja biofilmova *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* i *E. coli* O157: H. Falagas i Makris (2009) su predložili korištenje probiotičkih

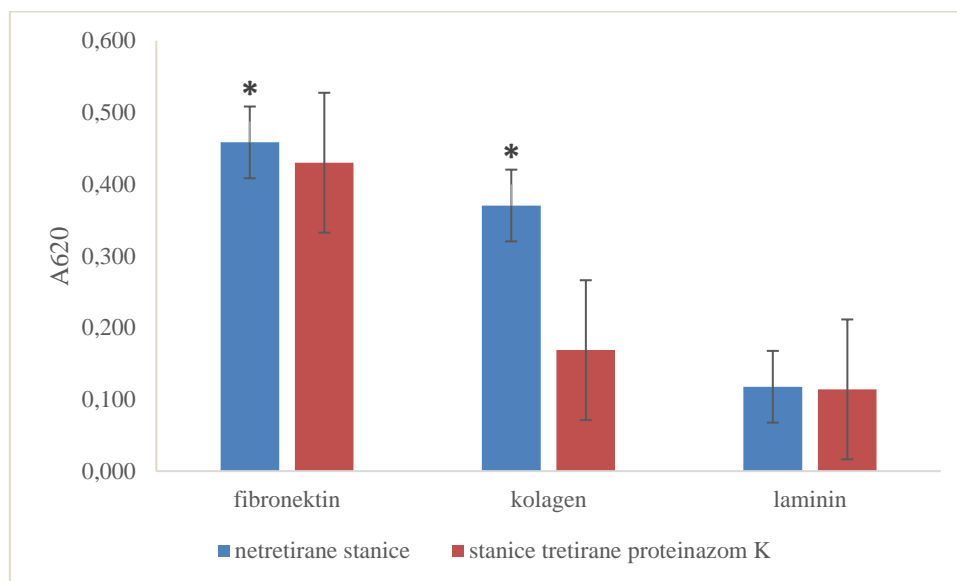
sojeva BMK za stvaranje zaštitnih biofilmova te njihovu implementaciju u proizvode za svakodnevno čišćenje kako bi se smanjila učestalost pojavljivanja patogenih mikroorganizama.

Del Re i sur. (2000) su, kako bi identificirale bakterijske sojeve sa sposobnošću adhezije, ispitivali 13 *Bifidobacterium longum* sojeva izoliranih iz humanog GIT-a. Sojevi su testirani na njihovu sposobnost adhezije na Caco-2 stanice te su klasificirani kao adhezivni ili neadhezivni. Zatim je ispitana sposobnost autoagregacije i površinska hidrofobnost tih sojeva. Uspoređujući svojstva adhezivnih i neadhezivnih sojeva, uočeno je da se bakterije mogu adhezirati na stanične monoslojeve ukoliko imaju sposobnost autoagregacije. Dakle, svojstva stanične površine, tj. hidrofobnost stanične površine i autoagregacija su važni za vezivanje bakterija na crijevnu sluznicu i kolonizaciju u GIT-u. Sposobnost autoagregacije i površinska hidrofobnost povezani su sa staničnom adhezijom, što potiče vezanje probiotika na crijevnu sluznicu. Rezultat ovog vezanja djeluje kao barijera koja onemogućava kolonizaciju patogena (Yasmin i sur., 2020). Ipak, *in vitro* ispitivanja svojstva stanične površine nisu dovoljno pouzdan pristup za procjenu njihove interakcije unutar stanice domaćina. Još uvijek postoji potreba za *in vivo* istraživanjem, zbog boljeg razumijevanja ove interakcije.

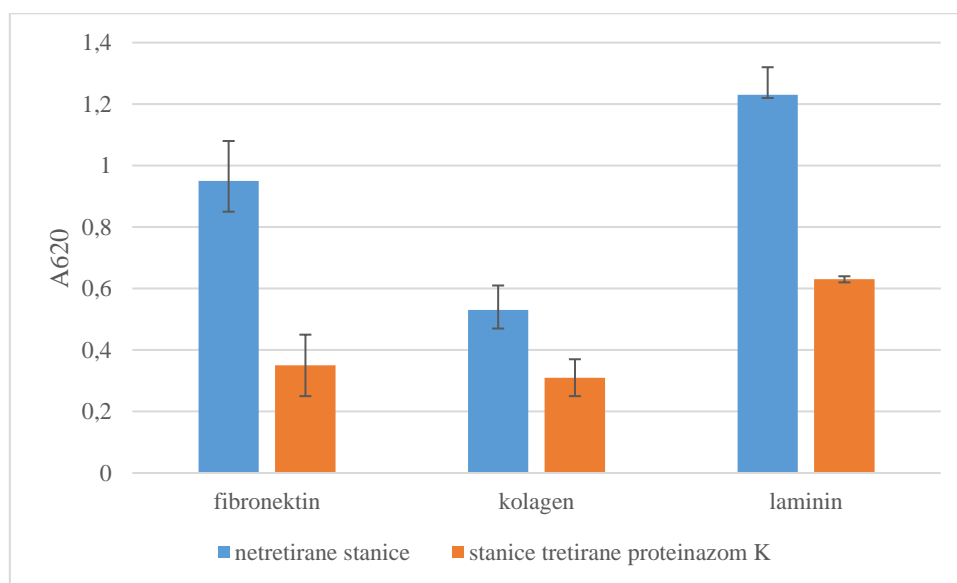
Uspješno zadržavanje probiotičkih sojeva u debelom crijevu, gdje iskazuju svoj pozitivan učinak na zdravlje domaćina, ovisi o njihovoj adheziji na epitelne stanice, stanice intestinalne i želučane sluznice te komponente ekstracelularnog matriksa. Ekstracelularni matriks (ECM) je složena struktura koja okružuje intestinalne epitelne stanice, a sastoji se od različitih proteina, kao što su laminin, fibronektin i kolagen (Lea, 2015). Probiotičke bakterije ekspresiraju adhezine na staničnoj površini koji posreduju pri njihovoj adheziji na komponente izvanstaničnog matriksa tkiva domaćina. S druge strane, različite patogene bakterije također pokazuju specifičnu sposobnost adhezije na kolagen. Ta je interakcija kritična u ranoj fazi infekcije pa je stoga snažno povezana s virulencijom patogena. Djelovanjem adhezina na površini stanice, patogeni uspješno stupaju u interakciju s proteinima ECM-a, čuvajući peristaltiku i omogućujući kolonizaciju tkiva i infekcija. Primjer je protein koji veže kolagen i omogućuje stanicama mikroorganizma *Staphylococcus aureus* da se *in vitro* adheziraju na hrskavicu te je poznat kao glavni faktor virulencije (Miljkovic i sur., 2015; Switalski i sur., 1993).

Stoga je provedena adhezija *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> stanica i *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* stanica, na humani kolagen, fibronektin i laminin (slika 19). Proteinska priroda adhezina ispitana je prethodnim tretmanom ispitivanih stanica proteinazom K.

a)



b)



**Slika 19.** Utjecaj proteinaze K na vezanje stanica\*:

a) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>

b) *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*

\*na proteine ekstracelularanog matriksa, fibronektina, kolagena i laminina

Adhezija stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na fibronektin i kolagen je bila učinkovitija od adhezije na laminin, dok nije bilo značajnije razlike između adhezija na fibronektin i kolagen. Proteinska priroda adhezivnih receptora na površini bakterijskih stanica ispitana je prethodnim tretiranjem ispitivanih stanica s proteinazom K.

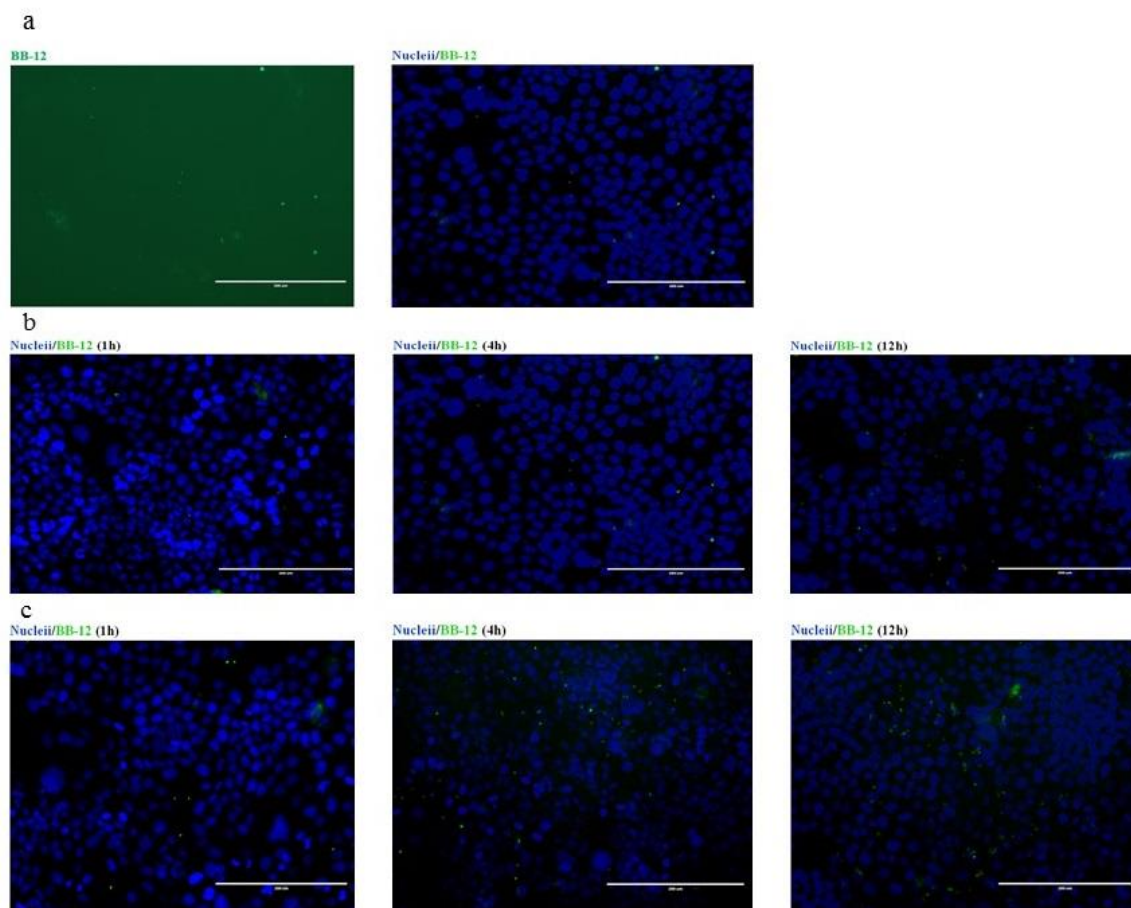
Rezultati su pokazali da su medijatori adhezije na ECM vjerojatno neproteinske prirode, što implicira da su druge površinske molekule uključene u adheziju, osim u slučaju adhezije na kolagen, gdje je adhezijski kapacitet BB-12<sup>®</sup> stanica značajno smanjen nakon tretmana stanica s proteinazom K. Naime, pretpostavljene funkcije kodirane sekvencama genoma bifidobakterija pružaju genetski dokaz da su bifidobakterije vrlo dobro prilagođene za kolonizaciju (humanog) GIT-a (Pokusaeva i sur., 2011). Rezultati bi se stoga mogli povezati s prisutnošću *capA* i *capB* gena u genomu BB-12<sup>®</sup> koji kodiraju za proteine odgovorne za vezanje na kolagen. Uz to, iako je zabilježeno blago smanjenje adhezije nakon tretmana proteinazom K u eksperimentu vezanja na fibronektin, *fbp* gen koji kodira za protein koji veže fibronektin je također prisutan u genomu BB-12<sup>®</sup> soja. I proteini koji se vežu na kolagen i oni koje se vežu na fibronektin su uključeni u interakcije s humanim epitelnim stanicama (Gilad i sur., 2011; Barrangou i sur., 2009). *Bifidobacterium* vrste posjeduju važne strategije koje osiguravaju njihovu kolonizaciju u visokom broju u crijevima dojenčadi, sprječavaju rast konkurentskih vrsta koje narušavaju ravnotežu mikrobiote domaćina i potiču razvoj imunološkog sustava (Laforest-Lapointe i Arrieta, 2017).

Kod ispitivanja adhezijskih svojstava na proteine ekstracelularnog matriksa u slučaju bakterijskih stanica soja *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kod svih proteina je došlo do smanjenja adhezije nakon tretmana proteinazom K (slika 8b). To ukazuje da su kod ovog bakterijskog soja medijatori adhezije na ECM proteinske prirode. Najveća adhezija je zabilježena na protein laminin. Proteini na staničnoj površini su vjerojatno odgovorni za učinkovitu interakciju probiotičkih bakterija s proteinima ECM-a. Moguće je da ova interakcija pomaže stvaranju barijere koja inhibira adheziju patogena na crijevnu sluznicu, čime se sprječava kolonizacija patogena što na kraju utječe na uklanjanje patogena iz crijevnog okoliša. Prisutnost zajedničkih receptora u različitim vrstama bakterija, npr. bakteriji iz roda *Lactobacillus* i određenog patogena, moglo bi omogućiti isključivanje patogena iz gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta izravnom konkurencijom za mjesta vezanja na proteinima epitelne stanice (Viletta i sur., 2013). Protein AggLb (*engl. auto-aggregation-promoting protein*), koji se nalazi na površini bakterijskih stanica, je uključen u interakciju soja *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* i komponenti izvanstaničnog matriksa poput kolagena i fibronektina (Miljković i sur., 2016; Miljković i sur., 2015). AggLb pripada porodici proteina koji se vežu na kolagen, a njegov C-terminalni kraj sadrži 20 uzastopnih ponavljanja koja su identična čak i na razini nukleotida. Delecija *aggLb* gena uzrokuje gubitak sposobnosti stvaranja staničnih agregata, dok prekomjerna ekspresija povećava staničnu agregaciju, hidrofobnost i potencijal vezanja kolagena. PCR „screening“ proveden s tri seta početnica

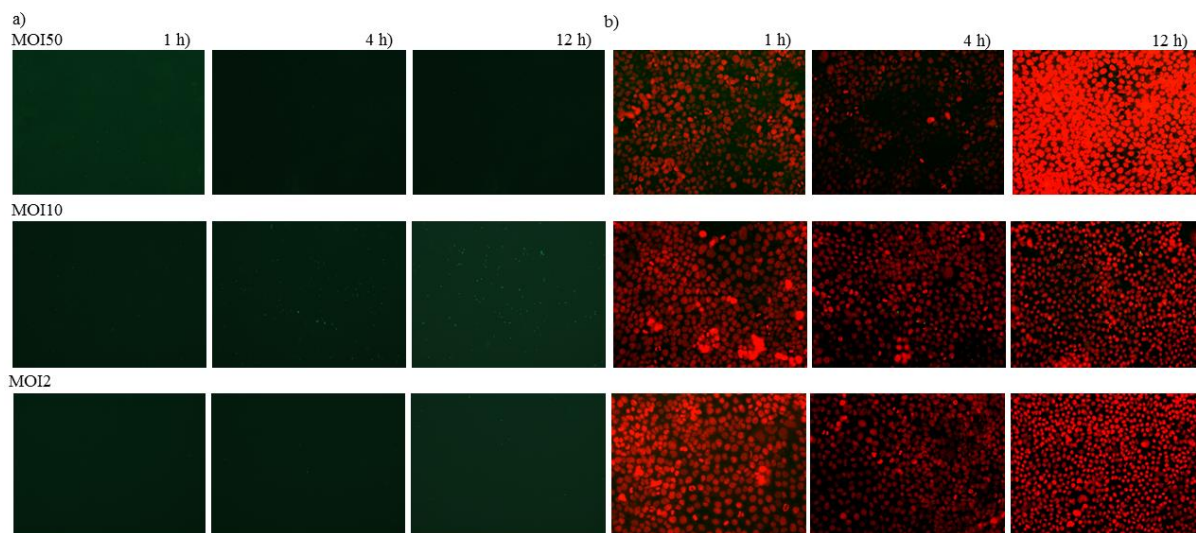
konstruiranih na temelju gena *aggLb* soja *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64, omogućio je detekciju iste vrste gena *aggLb* u pet od jedanaest odabranih *Lactobacillus* sojeva koji imaju sposobnost agregacije. Heterologna ekspresija *aggLb* gena je potvrdila ključnu ulogu proteina AggLb u agregaciji stanica i specifičnom vezanje na kolagen, što ukazuje da AggLb ima korisnu probiotičku funkciju u učinkovitoj kolonizaciji domaćina i sprječavanju kolonizacije patogena (Miljković i sur., 2015).

Jedan od principa za odabir potencijalnog probiotičkog soja je njegova sposobnost adhezije na sluznicu GIT-a domaćina (Lahtinen i Ouwehand, 2009). Adhezija predstavlja višestupanjski proces koji uključuje međusobni kontakt stanične membrane bakterija i međusobnih površina koji je u početku temeljen na nespecifičnim fizičkim interakcijama između ove dvije površine (Kos i sur., 2003). Adhezija na crijevnu sluznicu sprječava ispiranje probiotičkih stanica i omogućuje privremenu kolonizaciju, imunološku modulaciju i kompetitivnu ekskluziju patogena (Lahtinen i Ouwehand, 2009). *In vivo* ispitivanje mogućnosti bakterijske adhezije je vrlo zahtjevno pa se sposobnost adhezije na crijevni epitel uglavnom istražuje *in vitro* eksperimentima korištenjem humanih intestinalnih kultura staničnih linija (Tuomola i Salminen, 1998). Drugi dio ovog istraživanja bio je ispitati sposobnost probiotičkog soja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> kompetitivne ekskluzije Gram-negativnih patogena *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 i *Escherichia coli* 3014, koristeći staničnu liniju humanog adenokarcinoma Caco-2 kao *in vitro* modele za crijevni epitel.





**Slika 20.** Fluorescentna mikroskopija adhezije stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na stanice Caco-2 stanične linije: a) BB-12<sup>®</sup> = bakterijske stanice BB-12<sup>®</sup> (zelena fluorescencija), jezgre/BB-12<sup>®</sup> = dvostruki fluorescentni slojevi jezgri Caco-2 stanica (plava fluorescencija) i bakterijske stanice BB-12<sup>®</sup> (zelena fluorescencija). Fluorescentni slojevi jezgri Caco-2 stanica (plava fluorescencija) s adheziranim stanicama bakterija BB-12<sup>®</sup> (zelena fluorescencija) prikazani su za različite gustoće nacjepljivanja: b) višestruka infekcija 10 (MOI 10) i c) višestruka infekcija 100 (MOI 100), nakon 1, 4 i 12 h inkubacije pri uvećanju 20 ×



**Slika 21.** Fluorescentna mikroskopija adhezije stanica *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* na stanice Caco-2 stanične linije: dvostruki fluorescentni slojevi jezgri Caco-2 stanica (crvena fluorescencija) i bakterijske stanice *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* (zelena fluorescencija) te samo bakterijske stanice *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* (zelena fluorescencija) prikazani su za različite gustoće nacjepljivanja (MOI 2, MOI 10 i MOI 50) nakon 1, 4 i 12 h inkubacije (overlay and only green fluorescence) pri uvećanju  $20\times$

Imobilizirani mucin i jednoslojna kultura Caco-2 stanica su modelni sustavi koji se obično koriste za ispitivanje adhezije probiotičkih sojeva (Banić i sur., 2018). Stoga je sposobnost probiotičkog soja BB-12<sup>®</sup> da se adhezira i kolonizira jednoslojni stanični sloj epitelnih stanica ljudskog epitela ispitana pomoću Caco-2 stanične linije. Slika 20a prikazuje reprezentativno bojenje jezgri Caco-2 (plavo) zajedno s adheziranim stanicama BB-12<sup>®</sup> (zeleno) korištenjem EVOS FLc Cell Imager mikroskopa. Prikazana je adhezija BB-12<sup>®</sup> stanica na jednoslojni sloj Caco-2 stanica pri MOI 10 (slika 20b) i MOI 100 (slika 20c) nakon 1, 4 i 12 h inkubacije. Veći broj stanica BB-12<sup>®</sup> se adhezirao na monosloj Caco-2 stanica s povećanjem MOI pri duljem vremenu inkubacije. Sukladno tome, najveći adhezivni kapacitet BB-12<sup>®</sup> postignut je pri MOI 100 i nakon 12 sati inkubacije, kada su uočeni autoagregati stanica BB-12<sup>®</sup>, a omjer adheziranih probiotičkih bakterijskih stanica prema Caco-2 stanicama bio je 35:100 (slika 20c). To je u skladu s visokom sposobnošću agregacije BB-12<sup>®</sup> stanica što je prikazano na slici 4. Caco-2 stanice se uspješno koriste za ispitivanje sposobnosti adhezije

bifidobakterija. Yasmin i sur. (2020) su svom radu dokazali da svi ispitani izolati iz roda *Bifidobacterium* imaju dobru antikancerogenu aktivnost ispitivanjem inhibicijskih učinaka bakterija na proliferaciju nekoliko staničnih linija raka debelog crijeva.

*In vitro* ispitivanje adhezije *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* soja je također provedeno primjenom fluorescentnog bojanja živih stanica, adheziranih na Caco-2 staničnu liniju. Adhezija je ispitana pri MOI 2, 10 i 50 tijekom 1, 4 i 12 sati inkubacije (slika 21). Rezultati pokazuju da se broj adheziranih stanica povećavao tijekom vremena inkubacije pri čemu su najbolji rezultati dobiveni za MOI 10, dok je pri 2 nacijspljeno premalo probiotičke kulture, odnosno za MOI 50 previše. Prijašnja istraživanja su pokazala visoke postotke adhezije *Lacticaseibacillus paracasei* sojeva na Caco-2 staničnu liniju (Damodharan i sur., 2019; Bengoa i sur., 2018). Soj *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* KNI9 je inhibirao adheziju *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* na Caco-2 stanice. Kako što je već spomenuto, protein AggLb, koji se nalazi na površini bakterijskih stanica, je uključen u interakciju *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* i komponenti izvanstaničnog matriksa poput kolagena i fibronektina. Ovaj protein je također uključen u kompetitivnu ekskluziju patogena od strane *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* sojeva (Miljković i sur., 2015). Dodatno, za egzopolisaharid kojeg proizvodi *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* soj se također pokazalo da je uključen u adheziju na intestinalne epitelne stanice čime smanjuje adheziju patogene bakterije *E. coli* na Caco-2 stanice (Živković i sur., 2016).

**Tablica 18.** Kompetitivna ekskluzija patogena *Salmonella enterica* Typhimurium FP1 i *Escherichia coli* 3014 cells \*

a) probiotičkim sojem *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup>

b) probiotičkim sojem *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*

\*korištenjem Caco-2 stanične linije

a)

Test-mikroorganizmi	Broj stanica test-mikroorganizama adheziranih na Caco-2 staničnu liniju (CFU mL <sup>-1</sup> )	
	Bez prethodne inkubacije BB-12 <sup>®</sup> soja	Uz prethodnu inkubaciju BB-12 <sup>®</sup> soja
<i>Salmonella</i> Typhimurium FP1	$(3,62 \pm 2,32) \cdot 10^{6a}$	$(9,78 \pm 1,06) \cdot 10^{4b}$
<i>Escherichia coli</i> 3014	$(6,02 \pm 1,2) \cdot 10^{6a}$	$(1,16 \pm 0,21) \cdot 10^{6a}$

b)

Test-mikroorganizmi	Broj stanica test-mikroorganizama adheziranih na Caco-2 staničnu liniju (CFU mL <sup>-1</sup> )	
	Bez prethodne inkubacije <i>Lb. paracasei</i> soja	Uz prethodnu inkubaciju <i>Lb. paracasei</i> soja
<i>Salmonella</i> Typhimurium FP1	$(7,27 \pm 1,43) \cdot 10^{5a}$	$(1,31 \pm 6,67) \cdot 10^{4b}$
<i>Escherichia coli</i> 3014	$(3,01 \pm 1,43) \cdot 10^{8a}$	$(4,67 \pm 0,29) \cdot 10^{6b}$

<sup>ab</sup> Različito slovo označava statistički značajnu ( $P < 0,05$ ) razliku unutar istog stupca

Sposobnost probiotičkih bakterija da se adheziraju na humane epitelne stanice ili sluznicu posljedica je njihove sposobnosti da blokiraju mjesta vezanja za patogene (Garcia-Gonzales i sur., 2018). Učinak je povezan sa svojstvima probiotičkog soja i sposobnošću adhezije patogena. Koristeći Caco-2 staničnu liniju, ispitivan je broj adheziranih stanica BB-12<sup>®</sup> prije dodavanja patogena i sposobnost kompetitivne ekskluzije patogena. Približno se  $5 \cdot 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> stanica BB-12<sup>®</sup> adheziralo na stanice Caco-2 stanice od  $3 \cdot 10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> dodanih. Ispitivanje ekskluzije je provedeno kako bi se procijenilo da li je prethodno inkubiran probiotički soj sposoban spriječiti adheziju patogena na epitelne stanice. Rezultati pokazuju da adhezija soja BB-12<sup>®</sup> na Caco-2 staničnu liniju smanjuje vezivanje *S. Typhimurium* FP1 za otprilike  $1,5 \log$  CFU mL<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ), dok ekskluzija stanica *E. coli* 3014 nije bila statistički značajna (otprilike  $0,71 \log$  CFU mL<sup>-1</sup>) (tablica 18a). Uzimajući u obzir dobivene rezultate

adhezije, koji su dokazani elektronskom mikroskopijom s kapacitetom ekskluzije te koagregaciju s ispitivanim patogenima, probiotički soj BB-12<sup>®</sup> ima utjecaj na sposobnost adhezije i mogao bi smanjiti negativne učinke oba patogena soja, *S. Typhimurium* FP1 i *E. coli* 3014.

U slučaju ispitivanja sposobnosti kompetitivne ekskluzije patogena probiotičkog soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, rezultati su pokazali da adhezija soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* na Caco-2 staničnu liniju smanjuje vezivanje *E. coli* 3014 za 1,81 log CFU mL<sup>-1</sup>, a vezanje stanica *S. Typhimurium* FP1 za 1,85 log CFU mL<sup>-1</sup> (p < 0,05) (tablica 18b).

Jankowska i sur. (2008) su objavili rezultate u kojima *Lacticaseibacillus paracasei* IBB2588 soj inhibira vezanje test-mikroorganizma *Salmonella enterica* na Caco-2 staničnu liniju. Njihovo istraživanje je pokazalo da se kolonizacija laktobacila odvija uglavnom u intestinalnim kriptama, dok se patogene bakterije susreću uglavnom s gornjim dijelom crijevnih resica i zbog toga se adheziraju na diferencirane enterocite stvarajući takozvani obrub četke.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Fenotipskim i genotipskim metodama je potvrđena prisutnost dodanih probiotičkih kultura *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*® odnosno *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* u dječjoj hrani i hrani za posebne medicinske potrebe.
2. Ispitivanjem osjetljivosti na antibiotike korištenih i izoliranih probiotičkih kultura, dobiveni su rezultati koji su u skladu s EFSA-inim smjernicama.
3. Sva tri matriksa dječje hrane su imala podjednako dobar zaštitni utjecaj tijekom izlaganja BB-12® probiotičkog soja simuliranim uvjetima GIT-a pri čemu je preživljavanje stanica bilo za 2,5 log jedinice veće nego kod čiste kulture. U slučaju probiotičke bakterije *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, obje kulture (čista liofilizirana i izolirana iz hrane za posebne medicinske potrebe) su vrlo uspješno preživjele nepovoljne uvjete, ali nije bilo značajnijeg utjecaja hrane za posebne medicinske potrebe na protektivni učinak.
4. Stanice BB-12® su pokazale dekonjugacijsku aktivnost tijekom rasta u mediju uz dodatak natrijevog taurokolata, a minimalno veća aktivnost je uočena kod kulture izolirane iz instant pahuljica od riže i voća. Isti matriks je povećao i asimilaciju kolesterola za 18 %, a instant pahuljice od pšenice za 13 %. Kod kulture *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* također postoji minimalan utjecaj hrane za posebne medicinske potrebe na dekonjugacijsku aktivnost, ali je asimilacija kolesterola povećana za 16,4 %.
5. U ispitivanju antagonističkog djelovanja stanica BB-12® prema Gram-pozitivnim bakterijama metodom s dvostrukim slojem, stanice tog soja u dječjoj hrani su iskazale srednji ili jaki inhibicijski učinak dok su stanica soja iz liofilizirane kulture uglavnom pokazale slabu ili srednju inhibiciju što znači da proizvodni matriksi dječje hrane pojačavaju inhibicijsko djelovanje. Kod bakterije *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* koja je pokazala slabu inhibiciju, nije uočen niti značajan utjecaj matriksa na antimikrobno djelovanje.
6. Prilikom ispitivanja antagonističkog djelovanja stanica BB-12® prema test-mikroorganizmima metodom difuzije u agar, veći promjeri inhibicije su postignuti za stanice u čistoj liofiliziranoj kulturi nego iz dječje hrane zbog otežane difuzije antimikrobnih metabolita. U slučaju stanica *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je postignut obrnuti rezultat što znači da je hrana za posebne medicinske potrebe pojačala inhibicijsko djelovanje soja.

7. I matriks dječje hrane i hrane za posebne medicinske potrebe su pojačali antimikrobni učinak soja BB-12<sup>®</sup> odnosno *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* prilikom ispitivanja inhibicije rasta test-mikroorganizama i BMK turbidimetrijskom metodom što može biti posljedica poticanja metaboličke aktivnosti i proizvodnje antimikrobnih metabolita u prisutnosti matriksa.
8. Proizvodni matriksi nisu imali signifikantni utjecaj na stupanj autoagregacije kultura BB-12<sup>®</sup> i *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Instant pahuljice od riže i instant pahuljice od riže s voćem te hrane za posebne medicinske potrebe su utjecali na značajnije veći postotak koagregacije probiotičkih kultura sa srodnim BMK te primijenjenim test-mikroorganizmima.
9. Adhezija stanica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>®</sup> na fibronektin i kolagen je učinkovitija od adhezije na laminin, dok nije bilo značajnije razlike između adhezija na fibronektin i kolagen, a medijatori adhezije na ECM su neproteinske prirode. U slučaju kulture *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, kod svih proteina je došlo do smanjenja adhezije nakon tretmana proteinazom K, a najveća adhezija je zabilježena na laminin.
10. Dokazano je da se Caco-2 stanične linije mogu uspješno koristiti za ispitivanje sposobnosti adhezije korištenih bakterija pri čemu je najveći adhezivni kapacitet BB-12<sup>®</sup> postignut pri MOI 100 i nakon 12 sati inkubacije, a u slučaju stanica *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je najveći kapacitet postignut pri MOI 10.
11. Ista stanična linija je korištena za ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogena pri čemu je adhezija soja BB-12<sup>®</sup> na Caco-2 staničnu liniju smanjila vezivanje *S. Typhimurium* FP1 za otprilike 1,5 log jedinicu, dok ekskluzija stanica *E. coli* 3014 nije bila statistički značajna. Adhezija soja *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* je smanjila vezivanje *E. coli* 3014 za 1,81 log jedinicu, a vezanje *S. Typhimurium* FP1 za 1,85 log jedinicu.

## 6. LITERATURA

- Abraham, B. P., Quigley, E. M. M. (2017) Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **46**, 769–782.
- Albano, C., Morandi, S., Silvetti, T., Casiraghi, M. C., Manini, F., Brasca, M. (2018) Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: *In vitro* and *in situ* activity. *J. Dairy Sci.* **101**, 10807-10818.
- Ashraf, R., Shah, N. P. (2011) Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *Int. Food Res. J.* **18**, 837-853.
- Auchtung, J. M., Robinson, C. D., Britton, R. A. (2015) Cultivation of stable, reproducible microbial communities from different fecal donors using minibioreactor arrays (MBRAs). *Microbiome* **3**, 42.
- Bagdasarian, N., Rao, K., Malani, P. N. (2015) Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. *JAMA* **313**, 398–408.
- Banić M., Uroić K., Leboš Pavunc A., Novak J., Zorić K., Durgo K., i sur. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT – Food Sci. Technol.* **93**, 257–267.
- Barrangou, R., Briczinski, E. P., Traeger, L. L., Loquasto, J. R., Richards, M., Horvath, P. i sur. (2009) Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04. *J. Bacteriol.* **191**, 4144-4151.
- Basturk, A., Artan, R., Yilmaz, A. (2016) Efficacy of synbiotic, probiotic, and prebiotic treatments for irritable bowel syndrome in children: a randomized controlled trial. *Turk. J. Gastroenterol.* **27**, 439–443.
- Beales, N. (2004) Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservations, low pH and osmotic stress: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **3**, 1-20.
- Begum, P., Madhavi, G., Rajagopal, S., Viswanath, B., Razak, M., Venkataratnamma, V. (2017) Probiotics as functional foods: potential effects on human health and its impact on neurological diseases. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* **7**, 23–33.
- Bengmark S. (2003) Use of some pre-, pro- and synbiotics in critically ill patients. Best Practice and Research. *J. Clin. Gastroenterol.* **17**, 833-48.
- Bengoa, A. A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S. A., Bronsoms, S., Serradell, M. L. A. i sur. (2018) Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Res. Int.* **103**, 462-467.
- Berner, D., Viernstein, H. (2006) Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Sci. Pharm.* **74**, 137.



Bindels, L. B., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Walter, J. (2015) Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 303–310.

Boris, S., Suárez, J. E., Barbés, C. (1997) Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 413–20.

Brashears, M. M., Gilliland, S. E., Buck, L. M. (1998) Bile Salt Deconjugation and Cholesterol Removal from Media by *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* **81**, 2103-2110.

Brestoff, J. R., Artis, D. (2013) Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nat. Immunol.* **14**, 676–684.

Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, A., de Souza, R. P. (2013) Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol. Adv.* **31**, 482-488.

Chatterjee, S., Kar, P., Das, T., Ray, S., Ganguly, S., Rajendran, C., i sur. (2013) Randomised placebo-controlled double blind multicentric trial on efficacy and safety of *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>®</sup> and *Bifidobacterium* BB-12<sup>®</sup> for prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *JAPI* **61**, 708–712.

Chaiyasut, C., Tiranat, Y., Sivamaruthi, B., Kesika, P., Thangaleela, S., Khongtan, S. i sur. (2021) Effect of *Lactobacillus paracasei* HII01 Supplementation on Total Cholesterol, and on the Parameters of Lipid and Carbohydrate Metabolism, Oxidative Stress, Inflammation and Digestion in Thai Hypercholesterolemic Subjects. *Appl. Sci.* **11**, 4333.

Cheikhoussef, A., Pogori, N., Chen, H., Tian, F., Chen, W., Tang, J., Zhang, H. (2009) Antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. *Food Control* **20**, 553-559.

Chenoll, E., Rivero, M., Codoñer, F. M., Martínez-Blanch, J. F., Ramón, D., Genovés, S., i sur. (2015) Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* Strain CECT 7210, a probiotic strain active against rotavirus infections. *Genome Announc.* **3**, e00105-15.

Chondrou, P., Karapetsas, A., Kiouisi, D. E., Vasileiadis, S., Ypsilantis, P., Botaitis, S., i sur. (2020) Assessment of the Immunomodulatory Properties of the Probiotic Strain *Lactobacillus paracasei* K5 *in vitro* and *in vivo*. *Microorganisms* **8**, 709.

Chowdhury, A. H., Adiamah, A., Kushairi, A., Varadhan, K. K., Krznaric, Z., Kulkarni, A. D., Neal, K. R., Lobo, D. N. (2020) Perioperative Probiotics or Synbiotics in Adults Undergoing Elective Abdominal Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Ann. Surg.* **271**, 1036-1047.

Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J. P. (2004) *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J. Dairy Res.* **71**, 451-460.

- Conway, T., Cohen, P. S. (2015) Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *Microbiol. Spectr.* **3**, 10.1128.
- Corrêa, N. B. O., Péret Filho, L. A., Penna, F. J., Lima, F. M. L. S., Nicoli, J. R. (2005) A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, 385–389.
- Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S., Tenkanen, M., Fagerström, R., Mättö, J., i sur. (2002) *In vitro* fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *J. Sci. Food Agric.* **82**, 781–789.
- Crociani F, Alessandrini A, Mucci MM, Biavati B. (1994). Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *International journal of Food Microbiology.* 24(1): 199-210.
- Cronin, M., Ventura, M., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2011) Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **149**, 4–18.
- Cunningham, M., Vinderola, G., Charalampopoulos, D., Lebeer, S., Sanders, M. E., Grimaldi, R. (2021) Applying probiotics and prebiotics in new delivery formats–Is the clinical evidence transferable? *Trends Food Sci. Technol.* **112**, 495–506.
- Damoharan, K., Palaniyandi, S. A., Suh J.-W., Yang, S. H. (2019) Probiotic Characterization of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* KNI9 Inhibiting Adherence of *Yersinia enterocolitica* on Caco-2 Cells In Vitro. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **12**, 600-607.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 438-442.
- den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., Bakker, B. M. (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* **54**, 2325–2340.
- Dos Santos, C. S., Hoch Batistade Souza, C., Padilha, M., Gioielli, L. A., Neves Rodrigues Ract, J., Isay Sadd, S. M. (2019) Milk fat protects *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 from *in vitro* gastrointestinal stress in potentially synbioitic table spreads. *Food Funct.* **9**, 4274-4781.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances in Animal Feed (FEEDAP) (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* **10**, 2740.
- El Hage, R., Hernandez-Sanabria, E., Van de Wiele, T. (2017) Emerging Trends in “Smart Probiotics”: Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. *Front. Microbiol.* **8**, 1889.

- Faith, J. J., Ahern, P. P., Ridaura, V.K., Cheng, J., Gordon, J. I. (2014) Identifying gut microbe-host phenotype relationships using combinatorial communities in gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* **6**, 220ra21171.
- Falagas, M. E., Makris, G. C. (2009) Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infect control: hypothesis. *J. Hosp. Infect.* **71**, 301-306.
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., Ouwehand, A. C. (2019) The production and delivery of probiotics: a review of a practical approach. *Microorganisms* **7**, 83.
- Ferretti, P., Pasolli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., i sur. (2018) Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell Host Microbe* **24**, 133–145.
- Figueroa-Gonzalez I, Quijano G, Ramirez G, Cruz-Guerrero A (2011) Probiotics and prebiotics—perspectives and challenges. *J Sci Food Agric* 91:1341–1348.
- Fong, F. L., Shah, N. P. Kirjavainen, P., El-Nezami, H. (2016) Mechanism of Action of Probiotic Bacteria on Intestinal and Systemic Immunities and Antigen-Presenting Cells. *Int. Rev. Immunol.* **35**, 179–188.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., i sur. (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543-547.
- Galdeano, M. C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E., Perdigon, G. (2019) Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Ann. Nutr. Metab.* **74**, 115–124.
- Garcia-Gonzales N., Prete R., Battista N., Corsetti A. (2018) Adhesion properties of food-associated *Lactobacillus plantarum* strains on human intestinal epithelial cells and modulation of IL-8 release. *Front. Microbiol.* **9**, 2392.
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D., Reid G. (2002) Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but Not *L. rhamnosus* GG in the Human Vagina as Demonstrated by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 92–96.
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., Blumberg, R. S. (2016) How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science* **352**, 539–544.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, i sur. (2017) Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 491–502.

- Gibson, G. R. (2004) From probiotics to prebiotics and a healthy digestive system. *J. Food Sci.* **69**, 141-143.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**, 1401-1412.
- Gilad, O., Svensson, B., Viborg, A. H., Stuer-Lauridsen, B., Jacobsen, S. (2011) The extracellular proteome of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reveals proteins with putative role in probiotics effects. *Proteomics* **11**, 2503-2514.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Campieri, M. (2000) Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 489–493.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M. P., Quecan B. X. V., de Melo Franco, B. D. G. (2016) Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* 0157:h7 biofilms formation. *Front. Microbiol.* **7**, 863.
- González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L. A., Shah, N. P., Rivera-Espinoza, Y. (2015) Isolation, identification and partial characterisation of a *Labillus casei* strain with bile salt hydrolase activity from pulque. *Probiotics Antimicro. Prot.* **7**, 242-248.
- Gorvitovskaia, A., Holmes, S. P., Huse, S. M. (2016) Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome* **4**, 15.
- Grootaert, C., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Verstraete, W., Van De Wiele, T. (2007) Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 64–71.
- Guarner, F., Malagelada, J. R. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet* **361**, 512–519.
- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. R. (2010) Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **76**, 298-304.
- Gueimonde, M., Margolles, A., G., De Los Reyes-Gavilán, C., Salminen, S. (2007) Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile — A preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 228–232.
- Gupta, M., Sharma, S., & Sharma, S. (2016). ‘Probiotics’ A New Generation Functional Food- A Review.
- Guzman-Rodriguez, M., McDonald, J. A. K., Hyde, R., Allen-Vercoe, E., Claud, E. C., Sheth, P. M., Petrof, E. O. (2018) Using bioreactors to study the effects of drugs on the human microbiota. *Methods* **149**, 31–41.

- Hijova, E., Chmelarova, A. (2007) Short chain fatty acids and colonic health. *Bratisl. Lek. Listy*. **108**, 354–358.
- Hill D., Sugrue I., Tobin C., Hill C., Stanton C., Ross R. P. (2018) The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. *Front. Microbiol.* **9**, 2107.
- Hooper, L. V., Xu, J., Falk, P. G., Midtvedt, T., Gordon, J. I. (1999) A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9833–9838.
- Ishikawa, H., Matsumoto, S., Ohashi, Y., Imaoka, A., Setoyama, H., Umesaki, Y., i sur. (2011) Beneficial effects of probiotic bifidobacterium and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis a randomized controlled study. *Digestion* **84**, 128–133.
- Islam, T., Sabrin, F., Islam, E., Billah, M., Islam, D. (2012) Analysis of Antimicrobial activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*-1 isolated from regional yogurt. *IRJALS* **1**, 80-89.
- Jankowska, A., Laubitz, D., Antushevish, H., Zabielski, R., Grzesiuk, E. (2008) Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for Adhesion to Caco-2 Cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 357964.
- Jones R. M. (2017) The use of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* in clinical trials for the improvement of human health. U: The Microbiota in pathophysiology, Martin H. Floch, Yehuda Ringel, W. Allan Walker (ured.), Academic Press, str. 99-108.
- Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., Eskesen D. (2014) The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. *Microorganisms* **2**, 92-110.
- Karamali, M., Nasiri, N., Taghavi Shavazi, N., Jamilian, M., Bahmani, F., Tajabadi-Ebrahimi, M., Asemi, Z (2018) The effects of synbiotic supplementation on pregnancy outcomes in gestational diabetes. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **10**, 496–503.
- Kaufmann P., Pfefferkorn A., Teuber M., Miele L. (1997) Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus specific 16S r RNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1268–1273.
- Kawasaki, T., Kawai, T. (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **5**, 461.
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., Schmidt, T. M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1328–1333.
- Kos, B., Beganović, J., Jurašić, L., Švađumović, M., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Šušković, J. (2011) Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. *Mljekarstvo* **61**, 273-282.

- Kos, B., Šusković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981–987.
- Kos, B. (2001) Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Kumar, R., Sood, U., Gupta, V., Singh, M., Scaria, J., Lal, R. (2020) Recent advancements in the development of modern probiotics for restoring human gut microbiome dysbiosis. *Indian J. Microbiol.* **60**, 12–25.
- Laforest-Lapointe, I., Arrieta, M. C. (2017) Patterns of early-life gut microbial colonization during human immune development: An ecological perspective. *Front. Immunol.* **8**, 788.
- Lagier, J.-C., Khelafia, S., Alou, M. T., Ndongo, S., Dione, N., Hugon, P. i sur. (2016) Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. *Nat. Microbiol.* **1**, 16203.
- Lagier, J. C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C. i sur. (2012) Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 1185–1193.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. (2009) Mechanisms of probiotics. U: Handbook of Probiotics and Prebiotics, 2 izdanje, (Lee, Y. K., Salminen, S., ur.), Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, str. 377–440.
- Laureys, D., Cnockaert, M., De Vuyst, L., Vandamme, P. (2016) *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 1281–1286.
- Lazar, V., Bezirtzoglou, E., Balotescu, C., Cernat, R., Ilina, L., Bulai, D., Vadineanu, E., Tache, E. (2004) Study of adhesive and invasion capacity of some opportunistic enterobacterial strains and interaction with probiotics. *Roum. Biotechnol. Lett.* **9**, 1705–1711.
- Lea, T. (2015) Caco-2 Cell Line. U: The impact of food bioactives on health (Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Raquena, T., ur.), Springer, Cham, Švicarska, str. 103-111.
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2005) Getting better with bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 1303–1315.
- Le Bastard, Q., Chapelet, G., Javaudin, F., Lepelletier, D., Batard, E., Montassier, E. (2020) The effects of inulin on gut microbial composition: a systematic review of evidence from human studies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **39**, 403–413.

- Leboš, A., Habjanič, K., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Šušković, J. (2008) The use of *Lactobacillus plantarum* L4 for the production of probiotic drink with cabbage juice, Proceedings of the 4<sup>th</sup> Central European Congress on Food, Cavtat, Croatia.
- Lee, J.H., O`Sullivan, D.J. (2010) Genomic Insights into Bifidobacteria. *Microbiol. Mol. Rev.* **74**, 378-416.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., i sur. (2014) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* **32**, 834–841.
- Lozo, J., Jovicic, B., Kojic, M., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., Haertlé, T. i sur. (2007) Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. *Curr. Microbiol.* **55**, 266–271.
- Macfarlane, S. M., Macfarlane, G. T., Cummings, J. T. (2006) Review article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **24**, 701-714.
- Markova, I., Sheveleva, S. A. (2014) Probiotics as functional food products: manufacture and approaches to evaluating of the effectiveness. *Vopr. Pitan.* **83**, 4–14.
- Martín, R., Langella, P. (2019) Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. *Front. Microbiol.* **10**, 1047.
- Maxmen, A. (2017) Living therapeutics: Scientists genetically modify bacteria to deliver drugs. *Nat. Med.* **23**, 5-7.
- McKean, J., Naug, H., Nikbakht, E., Amiet, B., Colson, N. (2017) Probiotics and subclinical psychological symptoms in healthy participants: a systematic review and meta-analysis. *J. Altern. Complement. Med.* **23**, 249–258.
- Meance, S., Cayuela, C., Turchet, P., Raimondi, A., Lucas, C., Antoine, J.-M. (2011) A fermented milk with a *Bifidobacterium* probiotic strain DN-173 010 shortened oro-fecal gut transit time in elderly. *Microb. Ecol. Health Dis.* **13**, 217–222.
- Meighani, A., Hart, B. R., Mittal, C., Miller, N., John, A., Ramesh, M. (2016) Predictors of fecal transplant failure. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **28**, 826-30.
- Michail, S. (2009) The role of probiotics in allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol.* **5**, 5.
- Miljkovic, M., Bertani, I., Fira, D., Jovicic, B., Novovic, K., Venturi, V., Kojic, M. (2016) Shortening of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 AggLb protein switches its activity from auto-aggregation to biofilm formation. *Front. Microbiol.* **7**, 1422.
- Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., Kojic, S., Golic, N., Kojic, M. (2015) AggLb is the largest cell-aggregation factor from *Lactobacillus*

*paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64, functions in collagen adhesion, and pathogen exclusion *In Vitro*. *PLoS One* 10(5):e0126387.

Moghadamrad, S., McCoy, K. D., Geuking, M. B., Sagesser, H., Kirundi, J., Macpherson, A. J., De Gottardi, A. (2015) Attenuated portalhypertension in germ-free mice: function of bacterial flora onthe development of mesenteric lymphatic and blood vessels. *Hepatology* **61**, 1685–1695.

Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., Chatzifragkou, A. (2019) Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 6463–6472.

Munoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J. M., Genoves, S., Maldonado, J., Bermudez-Brito, M., i sur. (2013) Isolation,identification and characterisation of three novel probioticstrains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fedinfants. *Br. J. Nutr.* **109**, S51–S62.

National Library of Medicine (2021a) Pembrolizumab With Intratumoral Injection of Clostridium Novyi-NT <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03435952> Pristupljeno: 15. prosinca 2021.

National Library of Medicine (2021b) Genomes - NCBI datasets [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genomes/?taxon=1678&utm\\_source=gquery&utm\\_medium=referral&utm\\_campaign=KnownItemSensor:taxname](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genomes/?taxon=1678&utm_source=gquery&utm_medium=referral&utm_campaign=KnownItemSensor:taxname). Pristupljeno: 15. prosinca 2021.

Natividad, J. M., Verdu, E. F. (2013) Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* **69**, 42–51.

Neyrinck, A. M., Possemiers, S., Druart, C., Van De Wiele, T., De Backer, F., Cani, P. D., i sur. (2011) Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice. *PLoS ONE* **6**, e20944.

Nikolic, M., Jovicic, B., Kojic, M., Topisirovic, L. (2010) Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 925– 931.

Nocerino, R., Paparo, L., Terrin, G., Pezzella, V., Amoroso, A., Cosenza, L., i sur. (2017) Cow's milk and rice fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 prevent infectious diseases in children: A randomized controlled trial. *Clin. Nutr.* **36**, 118-125.

Nozari, S., Faridvand, Y., Etesami, A., Ahmad Khan Beiki, M., Miresmaeili Mazrakhondi, S. A., Abdolalizadeh, J. (2019) Potential anticancer effects of cell wall protein fractions from



*Lactobacillus paracasei* on human intestinal Caco-2 cell line. *Lett. Appl. Microbiol.* **69**, 148-154.

O'Bryan C. A., Koo O. K., Sostrin M. L., Ricke S. C., Crandall P. G., Johnson M. G. (2018) Characteristics of bacteriocins and use as food antimicrobials in the United States. U: Food and feed safety systems and analysis (Ricke S. C., Atungulu G. G., Rainwater C. E., Park S. H., ured.). Academic Press-Elsevier, Cambridge, MA, SAD, str. 273–86.

O'Callaghan A and van Sinderen D (2016) Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* **7**:925.

O'Hara, A. M., Shanahan, F. (2007) Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *Sci. World J.* **7**, 31–46.

Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., Bach, J. F. (2010) The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin. Exp. Immunol.* **160**, 1–9.

Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Folsch, U. R., i sur. (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* **53**, 685–693.

Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M., Belzer C. (2012) The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Inf Microbiol.* **2**, 104.

Ouwehand, A. C., Vesterlund, S. (2004) 11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria. U: Lactic acid bacteria: Microbial and Functional Aspects (Salminen, S., Ouwehand, A. C., ured.). Marcel Dekker, New York, SAD, str. 375-395.

Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou, E. (2015) Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Front. Microbiol.* **6**, 58.

Patel, R., Dupont, H. L. (2015) New Approaches for Bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clin. Infect. Dis.* **60**, 108–121.

Patole, S. K., Rao, S. C., Keil, A. D., Nathan, E. A., Doherty, D. A., Simmer, K. N. (2016) Benefits of Bifidobacterium breve M-16V supplementation in preterm neonates - a retrospective cohort study. *PLoS ONE* **11**, e0150775.

Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., Gil, A. (2019) Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv. Nutr.* **10**, 49–66.

Plessas, S., Nouska, C., Karapetsas, A., Kazakos, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., i sur. (2017) Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from feta-type cheese. *Food Chem.* **226**, 102–108.

- Pokusaeva, K., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D. (2011) Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr.* **6**, 285-306.
- Pravilnik o hrani za posebne medicinske potrebe (NN 100/08).
- Radulović, Z., Pterović, T., Nedović, V., Dimitrijević, S., Mikrović, N., Ptreušić, M., Paunović, D. (2010) Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains as potential probiotic activity. *Mljekarstvo* **80**, 86-93.
- Rastall, R. A., Gibson, G. R. (2015) Recent developments in prebiotics to selectively impact beneficial microbes and promote intestinal health. *Curr. Opin. Biotechnol.* **32**, 42–46.
- Rayes, N., Hansen, S., Seehofer, D., Müller, A. R., Serke, S., Bengmark, S., Neuhaus, P. (2002) Early enteral supply of fiber and Lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition* **18**, 609-615.
- Rivière, A., Gagnon, M., Weckx, S., Roy, D., De Vuyst, L. (2015) Mutual cross-feeding interactions between *Bifidobacterium longum* NCC2705 and *Eubacterium rectale* ATCC 33656 explain the bifidogenic and butyrogenic effects of arabinoxylan-oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **22**, 7767–7781.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., i sur. (2010) Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* **104**, S1–S63.
- Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L., Mccartney, A. L. (2010) Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology* **156**, 3329–3341.
- Roytio, H., Ouwehand, A. C. (2014) The fermentation of polydextrose in the large intestine and its beneficial effects. *Benef. Microbes* **5**, 305–313.
- Ruiz, L. Margolles, A., Sánchez, B. (2013) Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front. Microbiol.* **4**, 396.
- Salas-Jara, M. J., Ilabaca, A., Vega, M., Garcia, A. (2016) Biofilm formig *Lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics. *Microorganisms* **4**, 1-14.
- Salminen S, Gueimonde M. (2004) Human studies on probiotics: what is scientifically proven. *J. Food Sci.* **69**, 137-140.
- Schaedler, R. W., Dubs, R., Costello, R. (1965) Association of germfree mice with bacteria isolated from normal mice. *J. Exp. Med.* **122**, 77–82.
- Serafini, F., Turrone, F., Guglielmetti, S., Gioiosa, L., Foroni, E., Sanghez, V., i sur. (2012) An efficient and reproducible method for transformation of genetically recalcitrant bifidobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **333**, 146–152.

Shen, T. C., Albenberg, L., Bittinger, K., Chehoud, C., Chen, Y. Y., Judge, C. A., i sur. (2015) Engineering the gut microbiota to treat hyperammonemia. *J. Clin. Invest.* **125**, 2841–2850.

Sleator, R. D., Hill, C. (2008) New frontiers in probiotic research. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**, 143-147.

Smigic N., Miocinovic J., Tomic J., Tomasevic I., Rajkovic A., Djekic I. (2018) The effect of nisin and storage temperature on the quality parameters of processed cheese. *Mljekarstvo* **68**, 182–191.

Smits, W., Lyras, D., Lacy, D., Wilcox, M. H., Kuijper, E. J. (2016) *Clostridium difficile* infection. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2**, 16020.

Smokvina, T., Wels, M., Polka, J., Chervaux, C., Brisse, S., Boekhorst, J., i sur. (2013) *Lactobacillus paracasei* Comparative Genomics: Towards Species Pan-Genome Definition and Exploitation of Diversity. *PLOS ONE* **8**, e68731.

Sood, U., Gupta, V., Kumar, R., Lal, S., Fawcett, D., Rattan, S., Poinern, G. E. J., Lal, R. (2019) Chicken gut microbiome and human health: past scenarios, current perspectives, and futuristic applications. *Indian J. Microbiol.* **60**, 2-11.

Steed, H., Macfarlane, G. T., Blackett, K. L., Bahrami, B., Reynolds, N., Walsh, S. V. i sur. (2010) Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **32**, 872–883.

Steidler, L., Neiryneck, S., Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Goddeeris, B., i sur. (2003) Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat. Biotechnol.* **21**, 785–789.

Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K i sur. (2020) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 687-701.

Switalski, L. M., Patti, J. M., Butcher, W., Gristina, A. G., Speziale, P., Höök, M. (1993) A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol. Microbiol.* **7**, 99–107.

Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehranbenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**, 77-84.

Šušković, J., Kos, B. (2007) Mikrobiološke metode i antibiotici. U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović Ristov A. i sur. (ur.), Institut “Ruđer Bošković”, Zagreb, str. 949-963.

- Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline, *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Talebi Bezmin Abadi, A. (2014) *Helicobacter pylori*: a beneficialgastric pathogen? *Front. Med. (Lausanne)* **1**, 26.
- Tavan, E., Cayuela, C., Antoine, J. M., Cassand, P. (2002) Antimutagenic activities of various lactic acid bacteria against food mutagens: heterocyclic amines. *J. Dairy Res.* **69**, 335–341.
- Thomas, M., Wongkuna, S., Ghimire, S., Kumar, R., Antony, L., Doerner, K.C., i sur. (2018) Gut microbial dynamics during conventionalization of germfree chicken. *mSphere* **4**, e00035-19.
- Timmis, K., Cavicchioli, R., Garcia, J. L., Nogales, B., Chavarria, M, Stein, L., i sur. (2019) The urgent need for microbiology literacy in society. *Environ Microbiol.* **21**, 1513-1528.
- Truchado, P., Van Den Abbeele, P., Riviere, A., Possemiers, S., De Vuyst, L., Van De Wiele, T. (2015) *Bifidobacterium longum* D2 enhances microbial degradation of long-chain arabinoxylans in an in vitro model of the proximal colon. *Benef. Microbes* **6**, 1–12.
- Tuomola, E. M., Salminen, S. J. (1998) Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **41**, 45–51.
- Valdes, A. Mm, Walter, J., Segal, E., Spector, T. D. (2018) Role of thegut microbiota in nutrition and health. *BMJ* **361**, k2179.
- Van Den Abbeele, P., Gerard, P., Rabot, S., Bruneau, A., El Aidy, S., Derrien, M., i sur. (2011) Arabinoxylans and inulin differentially modulate the mucosal and luminal gut microbiota and mucin-degradation in humanized rats. *Environ. Microbiol.* **13**, 2667–2680.
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W.M., i sur. (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N. Engl. J. Med.* **368**, 407–415.
- Vargason, A. M., Anselmo, A.C. (2018) Clinical translation of microbe-based therapies: Current clinical landscape and preclinical outlook. *Bioeng. Transl. Med.* **3**, 124-137.
- Ventura, M., Turrone, F., Lugli, G. A., Van Sinderen, D. (2014) Bifidobacteria and humans: our special friends, from ecological to genomics perspectives. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 163–168.
- Ventura, M., Van Sinderen, D., Fitzgerald, G. F., Zink, R. (2004) Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**, 205–223.
- Vinderola, G., Binetti, A., Burus, P., Reinheiner, J. (2011) Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Front. Microbiol.* **2**, 1-6.
- Vitetta, L., Coulson, S., Linnane, A. W., Butt, H. (2013) The gastrointestinal microbiome and musculoskeletal diseases: a beneficial role for probiotics and prebiotics. *Pathogens* **2**, 606–626.

- Walton, G. E., Lu, C., Trogh, I., Arnaut, F., Gibson, G. R. (2012) A randomised, double-blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan-oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers. *Nutr. J.* **11**, 36.
- Ward, L. J. H., Timmins, M. J. (1999) Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 90-92.
- WHO CVD Risk Chart Working Group. World Health Organization cardiovascular disease risk charts: revised models to estimate risk in 21 global regions. *Lancet Glob Health.* 2019 Oct;7(10):e1332-e1345.
- Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., Jenkins, D. J. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **40**, 235–243.
- Wuyts, S., Wittouck, S., De Boeck, I. Allonsius, C. N., Pasolli, E., Segata, N., Lebeer, S. (2017) Large-Scale Phylogenomics of the *Lactobacillus casei* Group Highlights Taxonomic Inconsistencies and Reveals Novel Clade-Associated Features. *mSystems* **2**, e00061-17.
- Wymore Brand, M., Wannemuehler, M. J., Phillips, G. J., Proctor, A., Overstreet, A. M., Jergens, A. E., Orcutt, R. P., Fox, J. G. (2015) The altered Schaedler flora: continued applications of a defined murine microbial community. *ILAR J.* **56**, 169–178.
- Yasmin, I., Saeed, M., Al Khan, W., Khaliq, A., Jahongir Chughta, M. F., Iqbal, R. i sur. (2020) *In Vitro* Probiotic Potential and Safety Evaluation (Hemolytic, Cytotoxic Activity) of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Raw Camel Milk. *Microorganisms*, **8**, 354.
- Zamani, B., Farshbaf, S., Golkar, H. R., Bahmani, F., Asemi, Z. (2017) Synbiotic supplementation and the effects on clinical and metabolic responses in patients with rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Br. J. Nutr.* **117**, 1095–1102.
- Zou, Y., Xue, W., Luo, G., Deng, Z., Qin, P., Guo, R. i sur. (2019) 1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses. *Nat. Biotechnol.* **37**, 179–185.
- Živković M, Miljković MS, Ruas-Madiedo P, Markelić MB, Veljović K, Tolinački M, Soković S, Korać A, Golić N. EPS-SJ Exopolisaccharide Produced by the Strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 Is Involved in Adhesion to Epithelial Intestinal Cells and Decrease on *E. coli* Association to Caco-2 Cells. *Front Microbiol.* 2016 Mar 9;7:286

## 7. ŽIVOTOPIS

Lenkica Penava rođena je 3. listopada 1972. godine u Frankfurtu, Njemačka. Nakon završenog Zdravstveno-obrazovnog centra upisuje Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je 1998. godine stekla zvanje diplomiranog inženjera prehrambene tehnologije, smjer nutricionizam. Nakon toga, radila je na radnom mjestu inženjera za analize u Ledo d.d. i Bobita d.o.o. te na radnom mjestu tehnologa organizatora u Sljeme d.d. Od 2003.godine zaposlena je u Podravci d.d. gdje radi na poslovima tehnologa u Razvoju pića, a od 2006. do 2012. godine kao direktorica Službe razvoja pića. Od 2012. do 2016. godine radi na poslovima pomoćnice direktora sektora Istraživanja i razvoja, nakon čega vodi cjelinu Nutraceutike u Podravci, a od 2017. godine direktorica je Nutraceutike u Belupu.

2005. godine upisuje Poslijediplomski znanstveni magistarski studij na Ekonomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Znanstveni magistarski rad s temom „Spajanja i akvizicije u prehrambenoj industriji“ izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Tončija Lazibata i 2009. godine stekla naziv magistra društvenih znanosti, znanstveno polje ekonomija, grana Organizacija i menadžment. 2017. godine upisuje doktorski studij Nutricionizma na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu i izrađuje doktorski rad pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, kojeg je pročelnica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

Sudjeluje u aktivnostima više međunarodnih i hrvatskih radnih skupina za donošenje propisa i programa te u radu strukovnih i gospodarskih udruženja: Tematsko inovacijsko vijeće za zdravlje i kvalitetu života, Referentna skupina za konfiguraciju Okvirnog programa Europske unije za istraživanje i inovacije Obzor 2020 za područje Sigurnost hrane, održivu poljoprivredu i šumarstvo, istraživanje mora, pomorstva i unutarnjih voda i bioekonomiju, Povjerenstvo za izradu Zakona o prehrambeno tehnološkoj, biotehnološkoj i nutricionističkoj djelatnosti, Technical and Regulatory Group of European Federation of Bottled Water work group Highly mineralised natural mineral water, Zajednica proizvođača dodataka prehrani pri HGK, Koordinacija proizvođača medicinske prehrane pri HUP-u i Upravni odbor PBN-a.

Koordinatorica je aktivnosti Belupa u provođenju dva istraživačko-razvojna projekta sufinancirana bespovratnim EU sredstvima iz Fonda za regionalni razvoj: Projekt Instituta Ruđer Bošković i Belupa „Razvoj inovativnih formulacija kliničke prehrane“ i projekt Dječje bolnice Srebrnjak, Belupa i Podravke „Razvoj personaliziranog koncepta redukcije prekomjerne i održavanje zdrave tjelesne mase kod kroničnih bolesti djece i odraslih“.

**Popis znanstvenih radova objavljenih u časopisu indeksiranom u CC ili SCI:**

1. Leboš Pavunc, A., Penava, L., Ranilović, J., Novak, J., Banić, M., Butorac, K., Petrović, E., Mihaljević-Herman, V., Bendelja, Savić Mlakar, A., Durgo, K., Kos, B., Šušković, J. (2019) Influence of dehydrated wheat/rice cereal matrices on probiotic activity of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12®. *Food Technol. Biotech.* **57**(2), 147-158.