

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Lana Novković i Valentina Tušek

**Biomodulacijski učinak sinbiotika na sastav
intestinalne mikrobiote**

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Jasne Novak, dok su pokusi hranjenja miševa provedeni u Laboratoriju za metabolizam i starenje Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2021./2022.

POPIS KRATICA

ACE – angiotenzin-I-konvertirajući enzim

BMK – bakterije mliječne kiseline

CFU – eng. *Colony Forming Units*, broj poraslih kolonija bakterija

EPS – egzopolisaharidi

FODMAP – fermentirani oligosaharidi, disaharidi, monosaharidi i polioli

FOS – fruktooligosaharidi

GABA – gama-aminomaslačna kiselina

GIT – gastrointestinalni trakt

GOS – galaktooligosaharidi

GRAS status – eng. *Generally Regarded As Safe*, status općenito priznatog kao sigurnog

HePS – heteropolisaharidi

HoPS – homopolisaharidi

HTS – eng. *High Throughput Sequencing*, sekvenciranje visoke propusnosti

LP – lipoproteini

Mub – mukus vezujući protein

OD – eng. *Optical density*, optička gustoća

OTU – eng. *Operational taxonomic unit*, operativne taksonomske jedinice

PCR – lančana reakcija polimerizacije

QPS – eng. *Qualified Presumption of Safety*, kvalificirana pretpostavka sigurnosti

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

TG – trigliceridi

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	3
3. TEORIJSKI DIO	4
3.1. Intestinalni mikrobiom čovjeka	4
3.2. Bakterije mliječne kiseline i intestinalni mikrobiom	6
3.3. Tradicionalni vs. probiotici nove generacije	9
3.3.1. Kriteriji za karakterizaciju probiotičkih sojeva i njihov mehanizam djelovanja.....	11
3.3.2. Precizni probiotici	14
3.4. Prebiotici kao specifični supstrati za probiotičke sojeve	16
3.4.1. Mehanizam djelovanja prebiotika	18
3.5. Sinbiotici i njihova uloga u modulaciji sastava intestinalne mikrobiote	20
4. EKSPERIMENTALNI DIO	23
4.1. MATERIJALI	23
4.1.1. Radni mikroorganizmi.....	23
4.1.2. Kemikalije.....	23
4.1.3. Aparatura i pribor.....	23
4.1.4. Priprema otopina i hranjivih podloga	24
4.2. METODE	26
4.2.1. Inokulacija bakterijskih sojeva	26
4.2.2. Antimikrobna aktivnost <i>L. paracasei</i> 431® na rast patogena u suspenziji.....	26
4.2.3. Antimikrobna aktivnost EPS i inulina na rast patogena u suspenziji.....	27
4.2.4. <i>In vivo</i> analize na eksperimentalnim modelima miševa	27
4.2.5. Mikrobiološke analize ciljnih bakterijskih populacija intestinalne mikrobiote.....	32
4.2.6. Metagenomička analiza intestinalnog mikrobioma	33
5. REZULTATI I RASPRAVA	36
5.1. Antimikrobni učinak <i>L. paracasei</i> 431® i prebiotičkih supstrata.....	36
5.2. Analiza ciljnih bakterijskih populacija primjenom klasičnih mikrobioloških metoda.....	41
5.3. Metagenomička analiza.....	45
5.3.1. Metagenomička analiza na razini koljena.....	46
5.3.2. Metagenomička analiza na razini porodica i rodova.....	50
6. ZAKLJUČCI.....	57
7. ZAHVALE.....	58
8. LITERATURA.....	59
9. SAŽETAK.....	66
10. SUMMARY.....	67

1. UVOD

Mikrobiota domaćina složen je ekosustav mikrobnih zajednica, po svojoj specifičnosti usporedivih s otiskom prsta, koje su najzastupljenije u intestinalnom sustavu i imaju brojne uloge u probavi, metabolizmu, imunološkim reakcijama, sintezi biološki važnih spojeva, eliminaciji toksina te patogenezi bolesti. Karakteristike mikrobioma zdrave odrasle osobe su otpornost na poremećaje sastava i sposobnost ponovne uspostave ravnotežnog stanja. Pojava disbioze, odnosno nepoželjnih promjena u sastavu i funkciji mikrobioma, povezana je s raznim poremećajima poput upalnih bolesti crijeva, sindroma iritabilnog crijeva, metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa 2, pretilosti, kardiovaskularnih bolesti i karcinoma, a povezuje se i s neurodegenerativnim poremećajima (Kvakova i sur., 2021; Jones, 2017).

Suvremeni pristupi u biomodulaciji sastava intestinalne mikrobiote, utemeljeni na primjeni mikrobnih strategija, prvenstveno probiotika i prebiotika, koji se u znanstveno definiranim koncentracijama i odgovarajućoj formulaciji primjenjuju pojedinačno ili kombinirano kao sinbiotički pripravak, intenzivno se proučavaju. Brojnim kliničkim studijama dokazani su bioterapijski učinci probiotičkih, prebiotičkih i sinbiotičkih pripravaka kod ciljane populacije pacijenata, iako zaštitni mehanizmi djelovanja nisu još do kraja razjašnjeni.

Jedan od najbolje istraženih i opisanih probiotičkih sojeva je upravo *Lactocaseibacillus paracasei* 431[®]. Uz antimikrobno djelovanje, zdravstveni učinci *L. paracasei* sojeva obuhvaćaju i inhibiciju stvaranja patogenih biofilmova, stimulaciju imunskog sustava, antioksidativnu i protuupalnu aktivnost, učinak na smanjenje kolesterola u serumu, poboljšanje metabolizma lipida, modulatorne učinke na stres i pretilost te konačno, poboljšanje sastava intestinalne mikrobiote u kontekstu povećanja poželjnih, a smanjenja nepoželjnih bakterijskih vrsta (Bengoa i sur., 2021). Spomenuti zdravstveni učinci, s naglaskom na antimikrobno djelovanje, vjerojatno su posljedica združenih djelovanja sintetiziranih metabolita *L. paracasei* sojeva, odnosno postbiotika.

Pojedina neprobavljiva prehrambena vlakna iz hrane, zbog svojih dokazanih funkcionalnih svojstava, često se primjenjuju kao supstrati, odnosno prebiotici, čija dostupnost u intestinalnom mikrobiomu selektivno stimulira rast korisnih bakterijskih vrsta. Kratkolančane masne kiseline, nastale metaboličkom aktivnošću prisutne mikrobiote, imaju niz definiranih izravnih i neizravnih korisnih učinaka na zdravlje domaćina. Jedan od najintenzivnije istraživanih prehrambenih vlakana je inulin. Dobrobiti njegove suplementacije očituju se kroz zaštitu od slobodnih radikala posredovanu povećanom sintezom kratkolančanih masnih kiselina (Sanders i sur., 2019).

Kako bi se postigli biomodulacijski učinci u intestinalnom mikrobiomu s mogućim značajnim terapijskim utjecajem na specifične poremećaje, kontinuirano se istražuje primjena probiotika

i prebiotika u združenom obliku kao sinbiotika. Primjenom sinbiotika istovremeno se potiču korisni mehanizmi djelovanja i probiotika i prebiotika, odnosno prebiotički supstrati promoviraju rast probiotika čime se pojačavaju učinci unutar domaćina (Swanson i sur., 2020).

S obzirom na povezanost intestinalnog mikrobioma s brojnim poremećajima i bolestima, raste interes u industrijskoj proizvodnji hrane namijenjene posebnim medicinskim potrebama za uključivanje probiotičkih sojeva, prebiotika ili sinbiotika kao funkcionalnih dodataka u enteralnu prehranu ciljnih skupina bolesnika, primjerice oboljelih od dijabetesa, karcinoma ili s rizikom od pojave malnutricije. Prema podacima CroDiab Registra osoba sa šećernom bolešću, u Hrvatskoj je u 2021. godini bilo 327.785 osoba sa šećernom bolesti, a broj oboljelih povećava se iz godine u godinu (HZJZ, 2022). Porast u posljednjih 20 godina bilježi i pothranjenost uzrokovana nepravodobnom i neadekvatnom nutritivnom terapijom hospitaliziranih pacijenata, koja je prisutna u 20-60% slučajeva (Klek i sur., 2015), a produženi boravak u bolnici može dovesti do pogoršanja. Brojne studije pokazuju kako je pravovremenom primjenom odgovarajuće nutritivne terapije moguće smanjiti broj dana provedenih u bolnici i broj ponovljenih hospitalizacija što doprinosi smanjenju troškova zdravstvenog sustava. Upravo zato je hrana za posebne medicinske potrebe, odnosno enteralna hrana koja sadrži probiotike i prebiotike, ključna u prehrani bolesnika s rizikom od malnutricije, poteškoćama u konzumiranju hrane kod bolesnika koji imaju indikacije za medicinsku prehranu, odnosno poremećaje sastava intestinalnog mikrobioma.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Specifično funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija, ali i prebiotika, odnosno ključan mehanizam djelovanja, je inhibicija rasta nepoželjnih bakterijskih vrsta, stoga je jedan od ciljeva ovog rada definirati spektar antimikrobnog djelovanja *L. paracasei* 431[®], ali i prebiotičkih supstrata, inulina i egzopolisaharida (EPS) probiotičkih bakterija, prema učestalim gram-pozitivnim, odnosno gram-negativnim patogenim bakterijama, što može doprinijeti biomodulacijskom djelovanju na intestinalni mikrobiom.

Sljedeći cilj je ispitati imaju li odabrani prebiotički supstrati, odnosno osmišljena inovativna mješavina vlakana i inulin te probiotički soj *L. paracasei* 431[®] i sinbiotički pripravak, temeljem učinka na sastav intestinalne mikrobiote, u konačnici potencijal primjene kao funkcionalni dodaci u inovativnim proizvodima za posebnu medicinsku namjenu. U tu svrhu, provest će se *in vivo* mikrobiološka i metagenomička analiza sastava intestinalne mikrobiote eksperimentalnih modela zdravih miševa, prije nego što su u njima inducirani poremećaji, i to dijabetes, odnosno karcinom, te procijeniti biomodulacijski potencijal prebiotika, *L. paracasei* 431[®] i njihove združene primjene kao sinbiotika.

Generalno je cilj doprinijeti karakterizaciji probiotičkih sojeva kao preciznih probiotika za ciljano usmjerenu primjenu kod disbioze, odnosno narušene ravnoteže sastava intestinalne mikrobiote koja je svojstvena za specifične intestinalne i metaboličke poremećaje ili oboljenja.

Istraživački cilj je da rezultati ovog rada doprinesu i istraživanjima inovativnog koncepta kliničke prehrane za razvoj hrane namijenjene posebnim medicinskim potrebama za enteralnu primjenu.

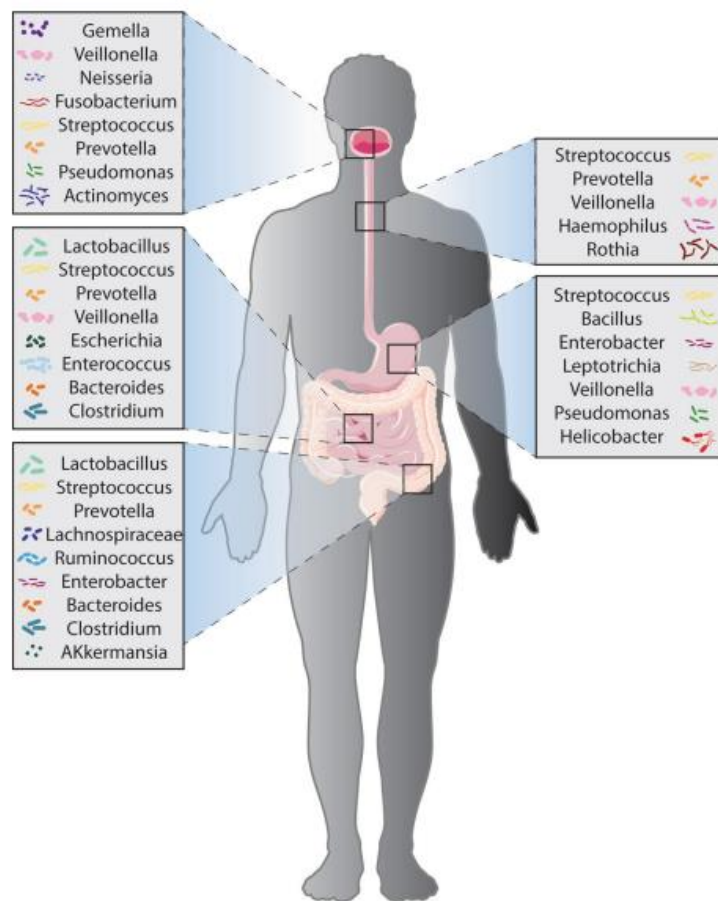
Pretpostavka je da će *L. paracasei* 431[®] i inulin iskazati antimikrobno djelovanje prema predstavnicima odabranih gram-pozitivnih, odnosno gram-negativnih patogenih bakterija te da će, uz inovativnu mješavinu vlakana i sinbiotički pripravak inovativnih vlakana i *L. paracasei* 431[®], pokazati bifidogeni i laktogeni učinak koji može doprinijeti biomodulacijskom kapacitetu s ciljem uspostavljanja ponovne ravnoteže sastava intestinalnog mikrobioma.

3. TEORIJSKI DIO

3.1. Intestinalni mikrobiom čovjeka

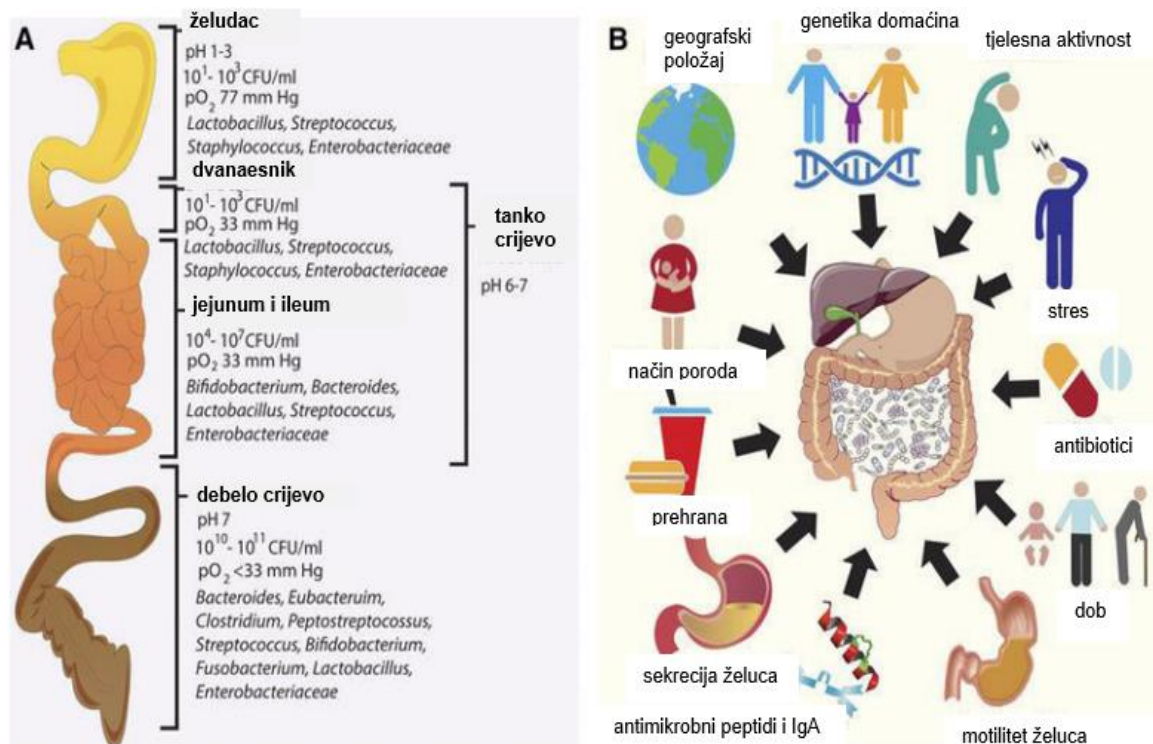
Intestinalni mikrobiom čovjeka jedna je od najkompleksnijih postojećih mikrobnih zajednica kojima pripadaju mnogobrojni sojevi bakterija, arhea, funga i virusa. Interakcije prisutne mikrobne zajednice značajno ovise o domaćinu. Genom mikrobioma u gastrointestinalnom traktu (GIT) čovjeka sadrži 100 puta više gena od genoma čovjeka. Bioraznolikost, dinamika i kompleksnost mikrobioma, kao i metabolička aktivnost, posljedično utječu na ulogu intestinalne mikrobiote u regulaciji i održavanju ravnoteže sastava mikrobne zajednice. Smatra se da pojava disbioze, odnosno promjena u sastavu intestinalnog mikrobioma ima učinak na zdravlje ljudi i povezane su s pojavom različitih oboljenja, a najčešće poremećajima GIT-a (Gomaa i sur., 2020).

Uspostavljanje ravnoteže intestinalnog mikrobioma domaćina temelji se na formiranju otpornosti u usnoj šupljini i raznolikosti bakterija. Otpornost u usnoj šupljini postiže se nekoliko mjeseci nakon rođenja, supresijom specifičnog staničnog i humoralnog imunskog odgovora, čime se povećava otpornost organizma na proteine iz hrane i prisutne bakterijske antigene u crijevima. Stečena otpornost u usnoj šupljini, omogućuje prilagodbu organizma čovjeka i imunskog sustava na vlastiti mikrobiom. Raznolikost bakterija intestinalnog mikrobioma podrazumijeva adaptaciju na promjene fizioloških uvjeta prilikom oboljenja i raznih poremećaja, pojavu preferencije organizma prema sudionicima sa specifičnim funkcionalnim i/ili dominantnim ulogama u bakterijskoj zajednici, različite afinitete i sposobnost iskorištavanja specifičnih supstrata. Spoznaje o sastavu uravnoteženog intestinalnog mikrobioma zdrave osobe doprinijela su razlikovanju mikroorganizama s obzirom na prisutnost unutar GIT-a (Slika 1.). Razlikuju se autohtone vrste koje su stabilne i prisutne od rođenja, potom oportunističke vrste koje su povremeno prisutne i alohtone vrste poput probiotičkih sojeva unesenih oralnim putem ili iz okoliša čija je kolonizacija privremena (Ruan i sur., 2020).



Slika 1. Dominirajući bakterijski rodovi u usnoj šupljini, jednjaku, želucu, tankom i debelom crijevu (Ruan i sur., 2020).

Sastav mikrobioma čovjeka unutar specifičnih regija GIT-a je promjenjiv (Slika 2. a). Najzastupljenije bakterije su iz phyla *Firmicutes* koji uključuje rodove *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* i *Lactobacillus*. Prema relativnoj zastupljenosti predstavnici *Bacteroidetes* su sljedeći i među njima su važne vrste roda *Bacteroides*. Nadalje, u značajno manjem udjelu prisutne su vrste iz phyla *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* (Clarke i sur., 2019). Važno je istaknuti da je sastav mikrobioma svakog pojedinca specifičan. To proizlazi iz spoznaje da na bioraznolikost mikrobioma mogu utjecati različiti čimbenici (Slika 2. b), stoga je i broj bakterijskih stanica izražen kao CFU/mL u pojedinim regijama varijabilan. Bez obzira na uniformnost sastava intestinalnog mikrobioma, svaka osoba ima stotinu otpornih vrsta i sojeva mikroorganizama, što brojnim bakterijama mliječne kiseline (BMK), odnosno probioticima s pozitivnim učincima na zdravlje, predstavlja prepreku prilikom adhezije i kolonizacije (De Filippis i sur., 2020).



Slika 2. Sastav intestinalnog mikrobioma po pojedinim regijama GIT-a (a). Čimbenici koji utječu na sastav intestinalnog mikrobioma domaćina (b) (prema Clarke i sur., 2019).

3.2. Bakterije mliječne kiseline i intestinalni mikrobiom

BMK nemaju štetan utjecaj na zdravlje čovjeka i dodijeljen im je GRAS (eng. *Generally Regarded as Safe*) status prema US FDA (eng. *The United States Food and Drug Administration*), odnosno QPS (eng. *Qualified Presumption of Safety*) status prema legislativi Europske Unije (Šušković i sur., 2009).

Više od 60 vrsta BMK, točnije vrste roda *Lactobacillus sensu lato*, grupirano je povezivanjem filogenetskih podataka s podacima o metabolizmu i literaturnim podacima. Prema tome, generalno sojeve BMK dijelimo na one koje su dio populacije biljnog materijala ili drugog mikrookoliša i ne ovise o ekosustavu kojeg su dio, one koje su adaptirane na specifične uvjete u određenom eukariotskom domaćinu te BMK koje žive nomadskim načinom života. Međutim, ovaj način raspodjele prema životnom stilu, preklapa se s filogenetskom podjelom na razini vrste i podvrste, što ukazuje na pojavu prilagodbe tijekom genomske evolucije u različitim kategorijama. U nomadskim skupinama, od posebnog interesa su vrste koje, iako nisu bile strogo autohtone, posjeduju mogućnost prilagodbe u kolonu čovjeka ili životinje i zadržavaju se barem na ograničeno vrijeme (De Filippis i sur., 2020). Vrste i sojevi koji su prilagođeni domaćinu, zbog svoje iznimne ekološke učinkovitosti, mogu biti vrlo konkurentni te neprikladni kada se daju kao probiotici. Pretpostavlja se da vrste koje nisu

autohtone i koje nisu evoluirale s domaćinom mogu biti učinkovitije u stimulaciji imunskog sustava čovjeka (De Filippis i sur., 2020).

Mikroorganizmi koji su dio autohtone mikrobne populacija hrane, nakon konzumacije, smatraju se prolaznim mikrobiomom. Značajna mikrobna raznovrsnost BMK i njihovih interakcija prilikom fermentacije hrane, rezultirali su osmišljavanjem brojnih fermentiranih proizvoda. BMK u fermentiranim namirnicama predstavljaju najveći udio bakterijske populacije prolaznog mikrobioma BMK iz hrane te bi tijekom prolaska kroz crijeva i u prisutnosti autohtone mikrobne zajednice GIT-a trebale iskazivati poželjne aktivnosti. Međutim, do sada još uvijek nije razjašnjeno koje mikrobne vrste iz mikrobiote hrane dostižu do kolona i mogu li biti metabolički aktivne u prisutnosti složenog ekosustava GIT-a. Fermentirana hrana dijeli se na industrijski proizvedenu i autohtonu (obrtnička/domaća) fermentiranu hranu. Tijekom proizvodnje industrijskih, ali i autohtonih proizvoda, ključna je metabolička aktivnost BMK, provođenje homolaktične i heterolaktične fermentacije mliječne kiseline, prilikom kojih se piruvat, nastao glikolizom, prevodi u laktat, acetat, etanol i CO₂. Aktivnost BMK tijekom fermentacije sirovina može rezultirati otpuštanjem bioaktivnih komponenata u prehranbeni matriks, što posredno doprinosi funkcionalnim svojstvima takve hrane i čini ju vrijednom za zdravlje ljudi (De Filippis i sur., 2020). Fermentirana hrana je preteča funkcionalnih proizvoda i inovativnih hranjivih sastojaka s ciljem modulacije sastava intestinalnog mikrobioma i poboljšanja zdravlja ljudi. Istraživanjem sastava BMK prirodno prisutnih u fermentiranim namirnicama, identificirano je niz korisnih bakterijskih rodova i sojeva, posebice vrsta rodova *Lactobacillus* i *Lactococcus lactis*, što je doprinijelo njihovoj izolaciji i nastanku funkcionalnih hranjivih mješavina živih mikroorganizama – probiotika (De Filippis i sur., 2020). Utjecaj BMK i fermentirane hrane na zdravlje ljudi direktno se povezuje sa zdravljem GIT-a, budući da BMK primarno koloniziraju i konkuriraju s intestinalnom mikrobiotom, a njihovi metaboliti iz fermentirane hrane u neposrednoj su interakciji sa stanicama i enzimima GIT-a (Mathur i sur., 2020; Novak i sur., 2021). Dokazano je da redovita konzumacija fermentiranog mlijeka, jogurta ili kefira povećava udio BMK, posebno laktobacila i bifidobakterija (Gomaa, 2020). Fermentirani mliječni proizvodi, poput kefira s visokim sadržajem BMK i roda *Bifidobacterium* koji mogu proizvesti enzim β-galaktozidazu, odnosno laktazu i doprinijeti razgradnji laktoze u njima, ali i u intestinalnom sustavu, ublažavaju simptome laktoza intolerancije (Mathur i sur., 2020).

Nedostatak precizne karakterizacije molekularnih mehanizama djelovanja u domaćinu i kontradiktorni rezultati iz znanstvenih istraživanja otežavaju istraživanja zdravstvenih učinaka na čovjeka. Niz je znanstvenih istraživanja u kojima je bio cilj definirati udio laktobacila u intestinalnom mikrobiomu, a koja su rezultirala oprečnim podacima, što je posljedica nedostatka preciznosti u daljnjim istraživanjima funkcionalnih svojstava i interakcija s

domaćinom (Tarrach i sur., 2021). Uz izazovnu kvantifikaciju sojeva BMK u GIT-u, dodatna prepreka je razlikovanje autohtonih i alohtonih mikroorganizama. Kontinuirani unos alohtonih vrsta doprinosi varijabilnosti u kolonu i moguće ih je posljedično identificirati kao autohtone vrste. Ipak, prema većini znanstvenih istraživanja utvrđeno je da su BMK identificirane u kolonu, uglavnom alohtone i nisu dio stalne mikrobne populacije. Nasuprot tome, Rossi i sur. (2016) kvantificirali su udio BMK u intestinalnom mikrobiomu tijekom perioda od nekoliko godina i ustanovili da udio autohtonih vrsta BMK može biti značajno viši u usporedbi s objavljenim vrijednostima u literaturi što ukazuje na važnost detaljnijih analiza.

Kako bi se prilagodile nepovoljnim uvjetima u GIT-u, BMK razvile su različite stanične mehanizme adaptacije. Primjerice, pretpostavlja se da sinteza egzopolisaharida (EPS), polimera šećera visoke molekulske mase, može doprinijeti preživljavanju mikroorganizama u GIT-u. BMK sintetiziraju dvije vrste EPS-a: homopolisaharide (HoPS-e) i heteropolisaharide (HePS-e) (Butorac i sur., 2021). EPS pojedinih probiotičkih bakterija, prilikom stresnih uvjeta niskih pH vrijednosti i visokih koncentracija žuči, imaju zaštitnu funkciju za stanice BMK te iskazuju imunomodulacijska i protuupalna svojstva. Jedan od mehanizama koji omogućuje zaštitu BMK u prisutnosti želučane kiseline, uključuje poticanje aktivnosti enzima ureaze. Ureaza katalizira reakciju razgradnje uree i proizvodnju amonijaka, što utječe na povećanje pH vrijednosti mikrookoliša mikrobne stanice. Osim aktivnosti ureaze, aktivnost hidrolaze žučnih soli također je značajan mehanizam, jer štiti probiotičke sojeve od nepovoljnih učinaka konjugiranih žučnih soli. Nakon što BMK uspješno savladaju stresne uvjete GIT-a, za ostvarivanje probiotičke aktivnosti, ključna je adhezija na intestinalne epitelne stanice. Iako pojedine BMK mogu imati pozitivan zdravstveni učinak, a da ne koloniziraju GIT, većina BMK mora konkurirati s patogenima i drugim autohtonim mikroorganizmima intestinalnog mikrobioma kako bi osigurale mjesta vezanja, iskoristile nutrijente i iskazale svoje funkcionalne učinke. Da bi se uopće mogle natjecati s mikrobiotom u debelom crijevu, BMK moraju se prethodno vezati za zaštitni sloj mucina, odnosno mukusa, koji prekriva intestinalne epitelne stanice. Adhezija bakterijskih stanica na mucin može se ostvariti putem mukus vezujućih proteina Mub. Prilikom adhezije značajan je i kapacitet autoagregacije bakterijskih stanica, odnosno formiranje biofilma koji utječe na adheziju epitela. I druge površinske makromolekularne strukture poput fimbrija i pila koji olakšavaju adheziju BMK na epitel, mogu biti presudni čimbenici vezanja BMK. Značajna je i proizvodnja antimikrobnih spojeva poput kiselina, vodikovog peroksida ili bakteriocina, koji su značajni prilikom koagregacije BMK s patogenima i mogu potencijalno inhibirati njihov rast (Butorac i sur., 2021).

Promjene relativne zastupljenosti BMK u intestinalnom mikrobiomu mogu biti negativno ili pozitivno povezane s bolestima i drugim kroničnim poremećajima. Ustanovljeno je smanjenje udjela vrsta iz roda *Lactobacillus* u intestinalnom mikrobiomu kod dijabetesa tipa 1, sindroma

iritabilnog crijeva, multiple skleroze i infekcije uzrokovane virusom humane imunodeficijencije (HIV) u usporedbi s intestinalnim mikrobiomom zdrave osobe. Prema pojedinim istraživanjima, intestinalni mikrobiom u pacijenata s Crohnovom bolesti i reumatoidnim artritisom često se povezuje s povećanim sadržajem *Lactobacillus* vrsta, dok su rezultati vezani za dijabetes tipa 2 i pretilost kontradiktorni. Nedostatak ovih istraživanja jest što obuhvaćaju jedino analizu populacije *Lactobacillus* vrsta, a ne i karakterizaciju uloge preostalih rodova BMK (Mathur i sur., 2020).

3.3. Tradicionalni vs. probiotici nove generacije

Interes kako istraživača tako i potrošača, za probiotike i njihove pripravke je značajan. Povećan broj kliničkih istraživanja doprinosi definiranju pretpostavljenih zdravstvenih učinaka probiotičkih sojeva, osobito u terapiji bolesti povezanih s dijarejom.

Riječ probiotik dolazi od latinskog *pro* i grčkog *bios* što u doslovnom prijevodu znači za život, a njegova definicija tijekom godina poprima različita značenja. Djelovanje probiotika je značajno različito od djelovanja antibiotika, a samom primjenom probiotika može se smanjiti potreba za antibioticima što posljedično može reducirati i pojavnost antibiotske rezistencije. Konačno, probiotik se može definirati kao pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi ili životinja, blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikrobiote (Šušković i sur., 1997).

Prvi probiotički sojevi na tržištu sadržavali su samo jednu vrstu mikroorganizama, iz roda *Saccharomyces* ili *Lactobacillus*, a zatim su uslijedili pripravci veće bioraznolikosti s nekoliko vrsta mikroorganizama. Većina sojeva probiotika je otporna na niski želučani pH što je posljedično utjecalo na dostupnost brojnih pripravaka s neopisanim fiziološkim svojstvima (Wieërs i sur., 2020). Upravo tako velika raznolikost združenih mikroorganizama u pripravcima opstruira usporedbe učinaka bioterapije te rezultira neadekvatnim propisivanjima probiotika. Probiotici nove generacije imaju potencijal učinkovito definiranih svojstva i upućuju na moguće kliničke indikacije (Satokari, 2019). Osim upotrebe preciznih probiotika, zajednička evolucija čovjeka sa specifičnim bakterijama doprinijela je razvoju povoljnih učinaka na zdravlje (Wieërs i sur., 2020).

Iako je „probiotik“ relativno noviji izraz, blagotvorno djelovanje fermentirane hrane koja sadrži raznovrsne bakterijske vrste prepoznato je stoljećima. Istraživanja početkom 20. stoljeća su prvi temelji za znanstvene spoznaje o mogućnostima modulacije sastava intestinalne mikrobiote djelovanjem korisnih bakterija koje bi isključile štetne mikroorganizme, a to su ujedno i počeci razvoja koncepta probiotika (Williams, 2010). Napredak u mikrobiološkim metodama za kultivaciju mikroorganizama, pristupačnije sekvenciranje genoma i metagenoma te sofisticirani bioinformatički alati za analizu podataka omogućili su

razvoj preciznih probiotika kod ciljane populacije. Nova era u istraživanju probiotika obuhvaća širi dijapazon mikroorganizama s potencijalnim zdravstvenim učincima, iako su većinom tek u vrlo ranoj fazi istraživanja. Radi se o mikroorganizmima koje nazivamo probioticima nove generacije, a za razliku od tradicionalnih probiotika, koji imaju dugu povijest sigurne primjene, ovi mikrobnj sojevi primjenjuju se za poboljšanje zdravlja i imaju bioterapijski potencijal da se, s obzirom na mehanizam djelovanja, reguliraju kao lijekovi. U kontekstu legislative US FDA smatraju se živim bioterapeutcima, proizvodima biološkog porijekla koji:

- 1) sadrži žive mikroorganizme, primjerice bakterije,
- 2) mogu se primijeniti u prevenciji, terapiji ili liječenju poremećaja ili bolesti pacijenata,
- 3) a nisu cjepivo (O'Toole i sur., 2017).

Među tradicionalnim probioticima su mikroorganizmi iz roda *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* i *Escherichia coli*, dok u probiotike nove generacije ubrajamo mikroorganizme iz rodova *Akkermansia*, *Bacteroides* i *Faecalibacterium* (O'Toole i sur., 2017). U Tablici 1. su navedeni mikroorganizmi koji imaju probiotički primjenu prema Kerry i sur. (2018).

Tablica 1. Bakterijske vrste koji se koriste kao probiotici prema Kerry i sur. (2018).

ROD	VRSTA
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i> , <i>P. jensenii</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. productus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. subtilis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. longum</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>B. uniformis</i>
<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

3.3.1. Kriteriji za karakterizaciju probiotičkih sojeva i njihov mehanizam djelovanja

Spoznaje o sastavu intestinalne mikrobiote i povezanosti sa zdravstvenim statusom čovjeka znanstveni su temelji za istraživanja s ciljem identificiranja mikroorganizama koji bi se mogli definirati kao probiotici. Da bi se neki mikroorganizam mogao koristiti u probiotičke svrhe, mora ispuniti strogu i složenu izbornu strategiju. Potrebna je točna taksonomska identifikacija i potpuna karakterizacija soja. Generalno, kriteriji za odabir probiotičkih sojeva mogu se klasificirati kao opći, tehnološki i funkcionalni, a njihova detaljnija podjela prikazana je u Tablici 2.

Probiotičke bakterije moraju preživjeti nepovoljne uvjete u GIT-u što se odnosi na niski pH želuca (< 3), lizozim, žučne soli i probavne enzime. Ako peristaltikom dostignu debelo crijevo, mogu postati dio kompleksne intestinalne mikrobiote. U kolonu su probiotičke bakterije u kompeticiji s kompleksnom intestinalnom mikrobiotom što uvelike smanjuje mogućnost daljnjeg razmnožavanje i time korisno djelovanje na zdravlje domaćina.

Korisni učinci probiotičkih bakterija na zdravlje domaćina proizlaze iz na antimikrobnog djelovanja, promjene mikrobnog metabolizma u intestinalnom traktu, adheziji na crijevni epitel i poticanju imunološkog odgovora. Antimikrobno djelovanje probiotičkih bakterija prema patogenim mikroorganizmima važno je funkcionalno svojstvo koje im osigurava kompetitivnu prednost u natjecanju za mjesta vezanja i hranjive tvari u intestinalnom sustavu (Šušković i sur., 2001). Poseban interes usmjeren je upravo na bakteriocinsko djelovanje BMK. Iz inhibicije rasta pojedinih sudionika intestinalne mikrobiote, koji proizvode enzime odgovorne za mnoge kancerogene procese, proizlazi još jedno važno funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija, a to je promjena mikrobnog metabolizma u intestinalnom traktu. Probiotičke bakterije imaju sposobnost povećanja aktivnosti enzima β -galaktozidaze u crijevima čime omogućuju razgradnju laktoze prilikom fiziološke deficijencije tog enzima, te doprinose poboljšanju metabolizma laktoze kod laktoza-intolerantnih osoba. Uz to, prema *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, probiotičke bakterije mogu iskazivati i dekonjugacijske aktivnosti što je vezano uz snižavanje koncentracije kolesterola (Šušković i sur., 2001). Važna funkcionalna svojstva probiotičkih sojeva su i adhezija na crijevni epitel te poticanje imunološkog odgovora domaćina.

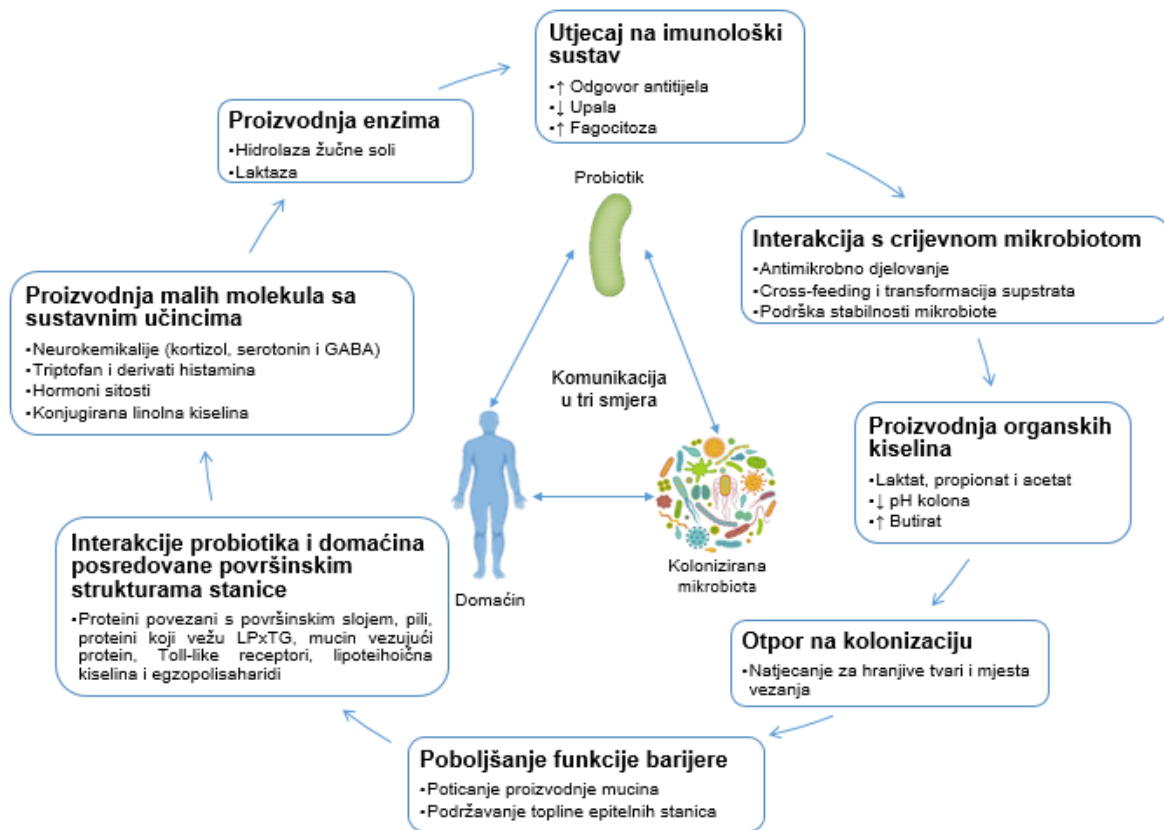
Tablica 2. Kriteriji za izbor probiotičkih sojeva (Šušković i sur. 2001).

1.	točna taksonomska identifikacija	Opći kriteriji
2.	humano podrijetlo za humane probiotike	
3.	netoksičnost i nepatogenost	
4.	genetička stabilnost (nema prijenosa plazmida)	
5.	otpornost prema žučnim solima	
6.	otpornost prema niskim pH vrijednostima	
7.	stabilnost poželjnih karakteristika tijekom priprave kulture, skladištenja i isporuke	Tehnološki kriteriji
8.	visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu (10^6 - 10^8 ml ⁻¹ ili g ⁻¹)	
9.	brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa priprave probiotičkih kultura te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije	
10.	dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese	
11.	spособnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u „ciljanom“ području primjene u organizmu	Funkcionalni kriteriji
12.	spособnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela	
13.	sinteza antimikrobnih komponenata, uključujući bakteriocine, vodikov peroksid i organske kiseline	
14.	antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama	
15.	mogućnost kompeticije sa sudionicima mikrobiote, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancama koje proizvodi autohtona mikroflora	
16.	imunomodulacijski učinak	
17.	spособnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje	

Većina znanstvenih spoznaja o probiotičkim mehanizmima djelovanja temelji se na istraživanjima *in vitro*, korištenju životinjskih i staničnih kultura ili *ex vivo* humanih modela. Na Slici 3. su sažeto prikazani predloženi mehanizmi djelovanja probiotičkih sojeva. Važno je napomenuti da svi navedeni mehanizmi nisu potvrđeni kod ljudi, niti su opisani za svaki probiotički soj, a njihovi učinci ovise o nekoliko čimbenika. Primjerice, kod upalnih bolesti crijeva sposobnosti smanjenja upalnih medijatora i povećanja funkcije epitelne barijere mogle bi biti najvažnije, dok bi sposobnost povećanja koncentracije kratkolančanih masnih kiselina i hidratacije u kolonu mogla biti važnija za uspostavljanje normalne peristaltike crijeva (Sanders i sur., 2019).

Natjecanje za hranjive tvari i mjesta vezanja na crijevni epitel je mehanizam kompetitivne ekskluzije koji doprinosi suzbijanju rasta patogena i zbog toga je poželjna karakteristika probiotika. Smanjenje upale može se smatrati i čimbenikom koji poboljšava funkciju crijevne barijere uz povećanje ekspresije gena za izlučivanje mukusa, čime se smanjuje vezanje patogena za epitelne stanice (Yan i sur., 2013). Probiotički sojevi proizvode mikrobne enzime poput β -galaktozidaza i hidrolaza žučnih soli koje imaju ulogu u probavi laktoze i poboljšanju profila lipida u krvi.

Ipak potrebno je precizno definirati molekularne mehanizme djelovanja probiotika. Karakterizaciji doprinosi napredak u tehnologijama sekvenciranja genoma i analizama mikrobioma te kirurgiji, koji omogućuje uzorkovanje u stvarnom vremenu *in vivo* (Sanders i sur., 2019).



Slika 3. Mehanizmi djelovanja probiotika (prema Sanders i sur., 2019).

3.3.2. Precizni probiotici

Bioterapijski potencijal probiotika potaknuo je komercijalizaciju niza probiotičkih formulacija na tržištu, bez znanstvenih dokaza o njihovoj učinkovitosti. Podaci o funkcionalnim učincima nisu usklađeni, a raskorak je i u industrijskoj proizvodnji te među medicinskim i znanstvenim zajednicama. Kako bi se prevladao ovaj problem i riješio izazov odabira probiotičkih sojeva za pojedine osobe sa specifičnim poremećajima ili oboljenjima narušenog sastava mikrobioma, potreban je precizan pristup probioticima.

Karakterizacija probiotika utemeljena je na pristupu odozgo prema dolje, odnosno top-down pristupu, kojim se predlaže primjena probiotičkih mikroorganizama u zdravih osoba za profilaksu što korelira s korisnim učincima na zdravlje (Veiga i sur., 2020). Iako ovaj empirijski pristup doprinosi razvoju probiotika, zbog nedovoljnih informacija o mehanizmu potrebno je postići ponovljivost istraživanja da bi se definirali zdravstveni učinci probiotičkih sojeva. U literaturi je dostupno mnoštvo znanstvenih radova čiji su rezultati kontradiktorni što otežava postavljanje kliničkih smjernica utemeljenih na znanstvenim dokazima za primjenu probiotika. Heterogenosti rezultata o ishodima primjene probiotičkih dodataka pridonose i čimbenici koji su specifični za pojedinca poput prehrambenih navika, dobi i sastava mikrobioma. Kapacitet probiotičkih mikroorganizama za kolonizaciju GIT-a, bilo trajno ili prolazno tijekom suplementacije, razlikuje se među pojedincima ovisno o otpornosti mikrobioma na kolonizaciju

unesenih probiotičkih sojeva (Veiga i sur., 2020). Naime, recentna istraživanja pokazuju da su mikrobiomi otporniji na kolonizaciju egzogenih sojeva manje podložni probiotičkim intervencijama u usporedbi s pojedinim sojevima (Suez i sur., 2019; Zmora i sur., 2018; Zhang i sur., 2016). Potrebno je dalje istražiti povezanost ovog varijabilnog učinka s ograničenim odgovorom domaćina, ali podaci sugeriraju da je trenutni empirijski probiotički pristup ograničen nemogućnošću predviđanja kolonizacije i definiranja sojeva za primjenu kod pacijenata s određenim poremećajima.

Osim pristupa odozgo prema dolje, predlažu se i strategije karakterizacije probiotika pristupom odozdo prema gore kao rezultat znanstvenih dostignuća u području istraživanja intestinalnog mikrobioma (Cunningham i sur., 2021). Slično pristupima u istraživanju lijekova, ove strategije obuhvaćaju dva razvojna puta: fenotipsku i ciljanu karakterizaciju. Fenotipski pristup temelji se na probiru probiotičkih učinaka korištenjem *in vitro* i *ex vivo* staničnih kultura, kao i eksperimentalnih modela životinja sa specifičnim imunološkim, neuronskim ili metaboličkim svojstvima te specifičnog sastava mikrobioma (Veiga i sur., 2020). S druge strane, ciljano usmjerena karakterizacija podrazumijeva odabir probiotičkih kandidata prvenstveno na temelju *in silico* predviđanja mogućnosti da odabrani sojevi proizvode molekularne efektore, koji su posrednici u interakcijama između domaćina ili mikroorganizama, s presudnom ulogom u zdravlju ili bolesti (Lucas i sur., 2019).

Probiotici istraživani pristupom odozgo prema dolje imaju potencijal primjene kao „precizni probiotici“ zbog svoje hipotetske primjene za specifična stanja. Sojevi kandidati za precizne probiotike istražuju se unutar koncepta personalizirane medicine i prehrane s obzirom na to da imaju obećavajuću primjenu u ciljanj skupini pojedinaca, odnosno oboljelih za koje se, prema dosadašnjim istraživanjima, predviđa da će bioterapijski učinak biti ustanovljen temeljem karakterizacije fenotipova domaćina ili ciljnih mjesta djelovanja prema kojem su probiotici bili odabrani (Veiga i sur., 2020). Primjena preciznih probiotika usmjerena je na ciljanu manipulaciju intestinalnog mikrobioma kako bi se potaknula sinteza korisnih mikrobnih metabolita, inhibirala proizvodnja štetnih spojeva i u konačnici uspostavila ravnoteža intestinalne mikrobiote s ciljem postizanja pozitivnog utjecaja na zdravlje (Cunningham i sur., 2021).

Iako se ograničenja empirijskog pristupa preciznim pristupom primjene probiotika zaobilaze, postoje određeni izazovi. Prvo, zbog heterogenosti probiotičkih sojeva, mogućnost striktnog definiranja specifičnih zdravstvenih smjernica o učinkovitosti određenih sojeva i/ili kombinacije za specifični zdravstveni poremećaj još uvijek je ograničena nedostatkom istraživanja gdje se ispituje učinak više od jednog probiotičkog soja, odnosno ispitivanjima koja su provedena u ciljanj populaciji, te je upitna reproducibilnost rezultata s obzirom na provedeni eksperimentalni protokol i eksperimentalni model životinja (Veiga i sur., 2020).

Dodatan izazov je provođenje individualnog pristupa s ciljem predviđanja učinkovitosti probiotika zbog važnosti prikupljanja osobnih podataka o domaćinu poput genetike, antropometrije i imunološkog profila te metagenomičke analize mikrobioma, uključujući analize transkriptomike i metabolomike. Nadalje, potrebno je osmisliti neinvazivna sredstva kojima bi bilo moguće identificirati kompatibilnost probiotika i domaćina s obzirom na to da uzorci fecesa ne daju točnu informaciju o kolonizaciji i utjecaju na intestinalnu mikrobiotu u svim regijama GIT-a tijekom uzimanja probiotičkih dodataka. Dostignuća u neinvazivnom *in situ* profiliranju humanog GIT-a potencijalno bi mogla doprinijeti mogućnosti primjene probavljivih inženjerskih osmotskih mikroformulacija, koje se mogu dostaviti do ciljnih mjesta djelovanja unutar crijeva koristeći egzogenu primjenu magnetske sile, a trenutno se testiraju na pretkliničkim modelima (Kvakova i sur., 2021).

Ključno je razumijevanje staničnih mehanizama i mehanizama djelovanja prilikom interakcije egzogenih, odnosno unesenih mikroorganizama, s domaćinom i mikrobiomom. Potrebno je što bolje okarakterizirati fiziološke i moguće patološke puteve, koji se mogu modulirati probioticima, s fokusom na pristup odozdo prema gore te unaprijediti, odnosno prvenstveno digitalizirati, alate za prikupljanje i obradu podataka specifičnih za pojedinca.

3.4. Prebiotici kao specifični supstrati za probiotičke sojeve

Prebiotik je definiran kao „neprobavljiv sastojak hrane koji blagotvorno utječe na domaćina selektivnim stimuliranjem rasta i/ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja bakterija u kolonu, te tako poboljšava zdravlje domaćina“ (Hutkins i sur., 2016). Pojednostavljeno, prebiotik je supstrat za korisne bakterije koje su dio intestinalne mikrobiote domaćina. Prebiotici selektivno promoviraju rast jednog ili više bakterijskih rodova u GIT-u s pozitivnim učincima na zdravlje domaćina. GIT domaćina ne može probaviti prebiotike, ali određeni mikrobi mogu pa iz njih sintetiziraju korisne spojeve poput kratkolančanih masnih kiselina. Često se pojam prebiotik poistovjećuje s prehrambenim vlaknima, no važno je naglasiti da samo neka prehrambena vlakna spadaju u prebiotike. Pojedini sojevi bakterija selektivno koriste prebiotike što je upravo i jedan od uvjeta za status probiotika. Prebiotici potiču metaboličku aktivnosti pojedinih vrsta u mikrobioti s korisnim funkcijama i učincima na zdravlje, poput rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* koji su okarakterizirani kao probiotici.

Mnogo je vrsta prebiotika. Pojedina prehrambena vlakna su prebiotici i lako su fermentirajuća. Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane, prehrambena vlakna su neprobavljivi ugljikohidrati i lignin, uključujući neškrobne polisaharide celulozu, pektine, hidrokoloide, neprobavljive oligosaharide i otporni škrob (Hijova i sur., 2019). Oligosaharidi iz majčinog mlijeka, koji u osnovnoj strukturi sadrže laktozu na reducirajućem kraju, konjugirana linolna kiselina i višestruko nezasićene masne kiseline, također imaju status prebiotika. Brojni

fermentabilni ugljikohidrati imaju prebiotički učinak, ali prebiotici iz hrane s najopsežnije dokumentiranim zdravstvenim učincima su neprobavljivi oligosaharidi koje prvenstveno metaboliziraju bifidobakterije (Gibson i sur., 2017). U neprobavljive oligosaharide ubrajamo fruktooligosaharide (fruktane, FOS), inulin, galaktooligosaharide (galaktane, GOS), ksilooligosaharide i manan-oligosaharide (Wilson i Whelan, 2017). Klasifikacija prehrambenih vlakana također proizlazi iz topljivosti u vodi. Općenito, razlikujemo topiva i netopiva prehrambena vlakna. Glavni prehrambeni izvori topivih vlakana su voće i povrće, dok žitarice i proizvodi od cjelovitog zrna sadrže uglavnom netopiva vlakana (Barber i sur., 2020). Ipak, većina prirodno dostupne hrane bogate vlaknima sadrži različite količine topivih i netopivih vlakana (Weickert i Pfeiffer, 2008). U literaturi se navode brojne zdravstvene dobrobiti prehrambenih vlakana koje proizlaze iz poznate povezanosti njihova unosa sa zdravim intestinalnim mikrobiomom, poželjnom tjelesnom masom i ukupnim metaboličkim zdravljem. Prebiotički supstrati ugljikohidratne strukture mogu biti još i šećerni alkoholi poput ksilitola i sorbitola, zatim disaharidi laktuloza i laktitol te polisaharid rezistentni škrob.

Tablica 3. Prebiotički supstrati i mikroorganizmi koji ih iskorištavaju kao supstrate (Enam i Masel, 2019).

Prebiotici	Bakterije
Oligosaharidi humanog mlijeka	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> , <i>Bacteroides</i>
FOS	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Bacteroidetes</i>
Inulin	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroidetes</i>
GOS	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
Manan-oligosaharidi	<i>Lactobacillus</i>
Ksilooligosaharidi	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>

Prebiotičko djelovanje mogu imati i pojedini biljni polifenoli te fitokemikalije. Procjenjuje se da se 90-95% polifenola iz hrane ne apsorbira u tankom crijevu, nego dopijeva u kolon gdje se provodi biotransformacija djelovanjem mikrobiote kolona (Clifford, 2004; Gibson i sur., 2017). Ovi podaci upućuju da koncept prebiotika nužno ne podrazumijeva samo neprobavljive oligosaharide. Međutim, potrebna su detaljna istraživanja o zdravstvenim učincima za status polifenola i fitokemikalija kao prebiotika.

Iako unos supstrata poput antibiotika, minerala, vitamina i bakteriofaga može promijeniti mikrobiotu i metabolički sastav, zbog nedostatka mehanizama koji uključuju selektivnu upotrebu od strane mikroorganizama domaćina, ne smatraju se prebioticima (Gibson i sur., 2017).

Kako bi određeni sastojak klasificirali kao prebiotik, mora ispuniti kriterije navedene u Tablici 4. Prebiotici se mogu konzumirati kao sastojak hrane ili priređeni kao dodaci prehrani, uz uvjet da nisu probavljivi. Prema tome, prebiotici su otporni na kisele uvjete u želucu i djelovanje probavnih enzima u GIT-u te im se sama struktura ne mijenja dok ne dospiju u kolon. Nemogućnost razgradnje molekula prebiotika do kolona je ključna da bi mogli biti supstrati već prisutnim korisnim bakterijama u našim crijevima. Tako će prebiotici ujedno poticati i proliferaciju, odnosno selektivan rast, i metaboličke aktivnosti korisnih bakterija koje će posljedično iskazati pozitivne učinke na zdravlje domaćina.

Prema recentnim spoznajama prebiotički učinci mogući su ne samo prema rodovima bifidobakterija i laktobacila, već i prema određenim korisnim komensalnim bakterijama intestinalne mikrobiote (Gibson i sur., 2017). U kontekstu primjene prebiotika neophodno je poznavanje metabolizma prebiotika i isključiti pojačanu fluktuaciju kod pojedinaca.

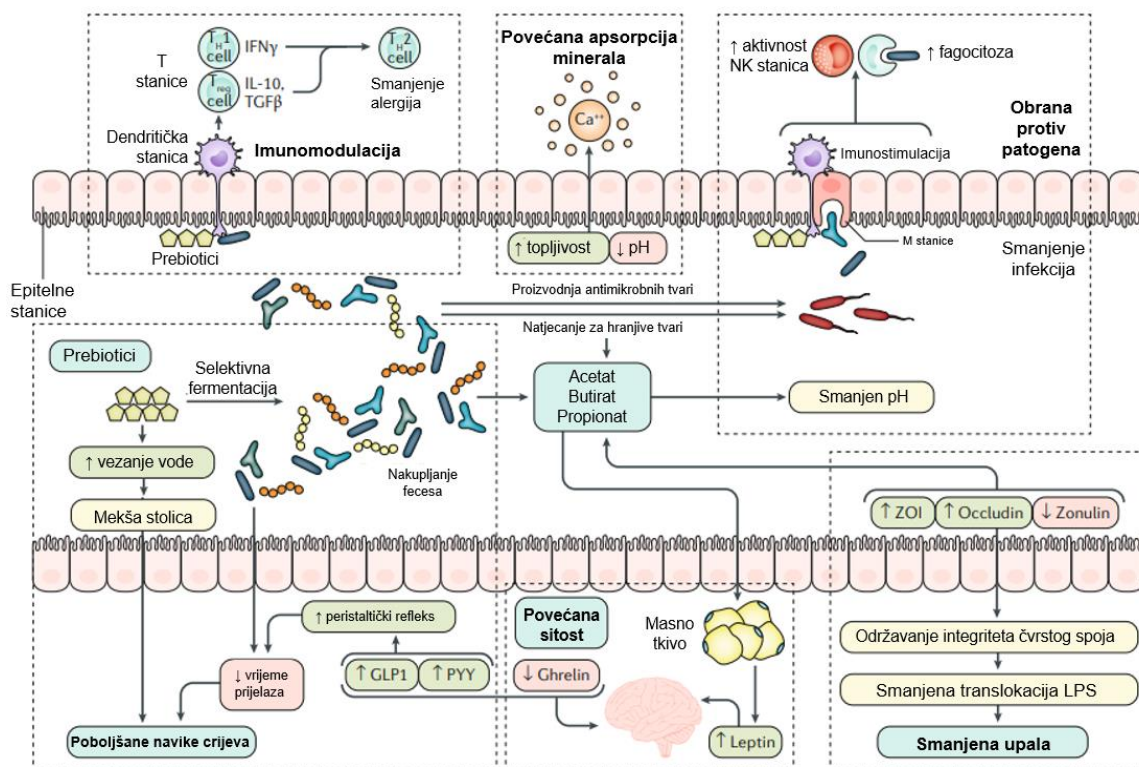
Tablica 4. Kriteriji za procjenu statusa prebiotika (Roberfroid, 2008).

1.	Prebiotici su otporni na želučane sokove.
2.	Prebiotici se ne mogu hidrolizirati probavnim enzimima.
3.	Prebiotici se ne mogu probaviti u gornjem dijelu GIT-a.
4.	Intestinalna mikrobiota može fermentirati prebiotike.
5.	Prebiotici selektivno potiču rast ili aktivnost ograničenog broja za zdravlje korisnih bakterija u intestinalnoj mikrobioti.

3.4.1. Mehanizam djelovanja prebiotika

Mikrobne zajednice ekosustava, poput intestinalne mikrobiote, u složenim su interakcijama unutar kojih imaju mnoštvo uloga. Pojedine uloge obuhvaćaju konverziju unesenih ugljikohidrata, proteina i određenih masti do metabolita s pozitivnim ili negativnim učincima na zdravlje domaćina. S obzirom na to da je razumijevanje funkcionalne ekologije intestinalne mikrobiote još uvijek nepotpuno, precizno definiranje mehanizama kojim prebiotici dovode do zdravstvenih koristi je izazov. Pretpostavljeni mehanizmi, prikazani na Slici 4., utemeljeni su na rezultatima *in vitro* ili istraživanja na animalnim modelima, iako je često otežano ustanoviti

moгу li se dobiveni ishodi ekstrapolirati na uvjete intestinalne mikrobiote čovjeka (Sanders i sur., 2019).



GLP1: glukagonu sličan peptid 1; LPS: lipopolisaharidi; M stanice: stanice mikronabora; NK stanice: prirodnoćubilačke stanice; PYY: peptid YY; TGF β : transformirajući čimbenik rasta β ; TH1 cell: pomoćnička stanica tip 1; TH2 cell: pomoćnička stanica tip 2; Treg cell: regulatorna T stanica; ZO1: zonula okludini 1.

Slika 4. Mehanizmi djelovanja prebiotika (prema Sanders i sur., 2019).

Prebiotici uz mogućnost moduliranja bakterijske populacije imaju i mogućnost interakcija s potencijalnim patogenima i/ili imunološkim sustavom domaćina. Imunomodulacijski učinak prebiotika ostvaruje se izravno ili neizravno putem metabolita nastalih fermentacijom ili modulacijom ekspresije gena posredovanom probiotičkim sojevima (Enam i Mansell, 2019). U kompeticiji s patogenima, uslijed iskorištenja prebiotičkih supstrata, potaknuta je selektivna kolonizacija probiotičkih bakterija.

pH vrijednost se u lumenu crijeva smanjuje sintezom kratkolančanih masnih kiselina nastalih fermentacijom prebiotika što je dokazani probiotički mehanizam djelovanja koji inhibira rast patogena. Uspostavljanjem stabilne populacije komensalnih mikroorganizama smanjuje se dostupnost hranjivih tvari za invazivne mikroorganizme i inhibira kolonizacija (Sanders i sur., 2019).

Poboljšanja u peristaltici crijeva često se pripisuju jednostavnom povećanju volumena fecesa uslijed povećane konzumacije prehrambenih vlakana. Uz to, kapacitet prebiotičkih

ugljikohidrata da vežu vodu kao sredstvo za vlaženje također utječe na omekšavanje stolice, olakšavajući probavu (Yu i sur., 2017).

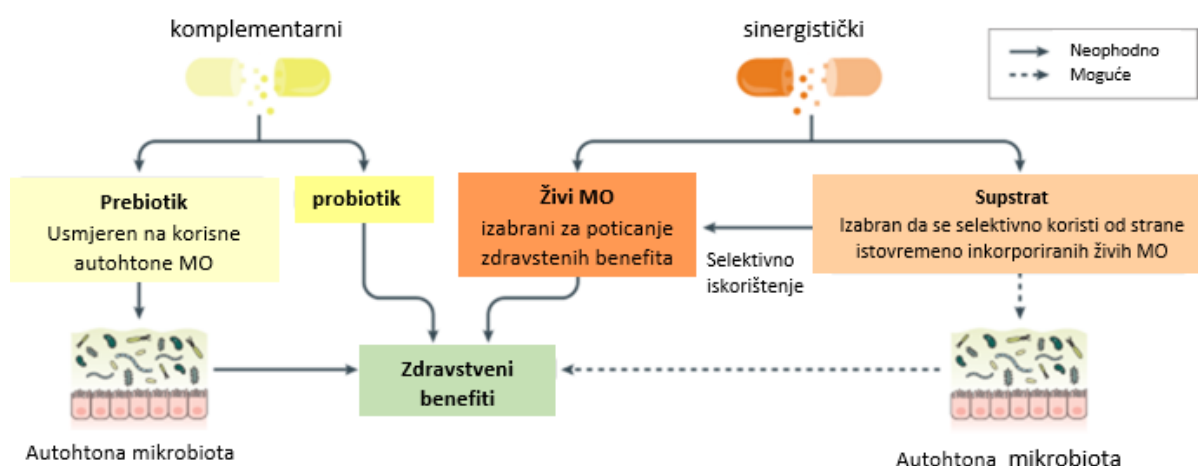
3.5. Sinbiotici i njihova uloga u modulaciji sastava intestinalne mikrobiote

Međunarodna znanstvena organizacija za probiotike i prebiotike (ISAPP, 2019), definirala je pojam sinbiotika kao „mješavinu koja se sastoji od živih mikroorganizama i supstrata, koje autohtoni mikroorganizmi selektivno iskorištavaju za rast i koji imaju zdravstvenu korist za domaćina“.

Da bi se određeni pripravak smatrao sinbiotikom, mora biti utvrđen njegov povoljan učinak na zdravlje domaćina. Domaćini mogu biti ljudi, kućni ljubimci, poljoprivredne vrste ili njihova subpopulacija, odnosno ciljane skupine populacije koje su definirane s obzirom na starosnu dob, razvoj, zdravstveni status, spol ili ekonomski status (Swanson i sur., 2020).

Općenito, sinbiotici se mogu podijeliti na komplementarne i sinergističke. Komplementarni sinbiotik je sastavljen od probiotika u kombinaciji s prebiotikom, pri čemu obje komponente djeluju neovisno jedna o drugoj. U sinergističkom sinbiotiku je molekularna struktura supstrata takva da je mikroorganizam, s kojim se istodobno primjenjuje, može selektivno iskorištavati za rast (Kvakova i sur., 2021; Swanson i sur., 2020). Objе podskupine imaju značajan utjecaj na modulaciju intestinalnog mikrobioma, a njihov mehanizam djelovanja prikazan je na Slici 5. Primjena sinergističkog sinbiotika sa sposobnošću selektivnog iskorištavanja supstrata za mikrobni rast mora biti dokazana u istoj studiji kojom se utvrđuje i zdravstvena korist. Cilj je pokazati da kombinirani učinak može biti bolji od procijenjenih zdravstvenih učinaka svake komponente zasebno. Ovaj korak nije potreban za komplementarni sinbiotik jer sadrži prebiotik za koji je već utvrđena selektivna uporaba (Swanson i sur., 2020).

Brojna istraživanja, potvrdila su niz korisnih učinaka sinbiotika nakon njihove primjene poput poboljšanja omjera phyla *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, inhibicije rasta patogenih mikroorganizama, primjerice *Klebsiella*, *E. coli* i *C. difficile*, pomoću mehanizma izravnog antagonizma te ubrzanja oporavka intestinalnog mikrobioma mehanizmom kompetitivnog isključenja kojim se održavaju uvjeti intestinalnog pH, stvaraju važni metaboliti i potiče oporavak crijevne sluznice (Swanson i sur., 2020).



Slika 5. Sastav i mehanizam djelovanja komplementarnih i sinergističkih sinbiotika (prema Swanson i sur., 2020).

U kliničkoj intervenciji utjecaja suplementacije sinbiotika na intestinalnu mikrobiotu čovjeka, sastav tijela i smanjenje tjelesne mase u pretilih, primijenjena je kombinacija probiotičkih bakterija *L. acidophilus*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. bifidum* te prebiotička mješavina galaktooligosaharida (Sergeev i sur., 2020). Ovakva kombinacija probiotičkih sojeva i specifičnih prebiotika, odnosno sinbiotičkih pripravaka, utjecala je na modulaciju intestinalne mikrobiote što je ustanovljeno temeljem povećane brojnosti mikrobnih vrsta za koje se može smatrati da imaju poželjne zdravstvene učinke za domaćina. Nakon tromjesečnog suplementiranja, povećala se brojnost rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, čije su se vrste nalazile u samom sinbiotiku. *Bifidobacterium* je prepoznat kao koristan član mikrobne zajednice s učincima povezanim sa sprječavanjem pojave pretilosti, dok povećan sadržaj roda *Lactobacillus* ima potencijalnu ulogu na smanjenje koncentracije glukoze u krvi. S druge strane, dodatak sinbiotika značajno je rezultirao smanjenjem brojnosti rodova *Prevotella* i *Gardnerella* koji su potencijalno povezani s kroničnim upalnim stanjima te u pozitivnoj korelaciji s pretilošću (Sergeev i sur., 2020).

Zbog sposobnosti reguliranja rasta specifičnih mikroorganizama u GIT-u, a time i održavanja ravnoteže intestinalne mikrobiote, sinbiotici se uključuju u osmišljavanje i razvoj novih funkcionalnih proizvoda s većom preciznošću od dodataka prehrani (Kvakova i sur., 2021; Jones, 2017). Inovativni funkcionalni proizvodi, koji su optimalni matriksi koinkapsuliranih sinbiotika, a omogućuju doziranje potrebnog dnevnog unosa probiotika i prebiotika za održavanje zdrave mikrobiote, mentalnog zdravlja i jačanje imuniteta, su nutritivne pločice, jogurt, čokolada, voćni sokovi, sladoled, sir ili kobasice, no i nutraceutički proizvodi poput hrane za posebne medicinske potrebe (Penava, 2022). Konzumacija

sinbiotički obogaćenog funkcionalnog jogurta tijekom deset tjedana rezultirala je značajnom redukcijom tjelesne masne mase, poboljšanim antropometrijskim karakteristikama, poboljšanjem krvnog tlaka, osjetljivosti na inzulin i poboljšanim lipidnim profilom kod pretilih pacijenata s metaboličkim sindromom. Funkcionalni jogurt proizveden je uz dodatak probiotika *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 uz proteine sirutke, inulin, kalcij i vitamin D3 (Kvakova i sur., 2021).

Kako bi se osigurala konzumacija sinbiotika bez gubitaka funkcionalnih svojstava probiotika, koji nastaju uslijed nepovoljnih uvjeta u GIT-u, razvio se specijaliziran oblik mikrokapsula za njihovu inkorporaciju. Općenito, mikrokapsulacija je proces u kojem se osim probiotičkih stanica, u matriks ili membranu za kapsuliranje ugrađuju i enzimi, prirodne bioaktivne tvari, plinoviti materijali, itd. Mikrokapsule štite od degradirajućih uvjeta tijekom prolaska kroz GIT i potiču kontrolirano oslobađanje sadržaja u određenim uvjetima, obično u debelom crijevu. Također, štite sadržaj tijekom procesa stabilizacije i skladištenja pri širokom temperaturnom rasponu i mogu značajno produljiti rok trajanja. Inkapsulacijom prebiotika, odnosno nosača probiotika, poput inulina, prehrambenih vlakana kukuruza, trehaloze, rezistentnog škroba i drugih u stijenku mikrokapsule, nastaje kokapsula sa sinbiotikom koja dodatno povećava otpornost te bioaktivnost i biodostupnost probiotika u GIT-u (Kvakova i sur., 2021).

Bitno je spomenuti kako učinkovitost i funkcionalnost sinbiotika nije slučajna. Ona uvelike ovisi o odgovarajućoj kombinaciji određenog soja probiotika s prikladnim supstratom prebiotika (Kvakova i sur., 2021; Sergeev i sur., 2020; Swanson i sur. 2020). Stoga je potrebno posvetiti posebnu pažnju prilikom mikrokapsulacije i dizajniranja sinbiotika uz detaljnu analizu specifičnih kemijskih, fizikalnih i fizioloških svojstva određenog soja te strukture, sastava i specifičnih karakteristika supstrata prebiotika s kojim će se soj(evi) kombinirati (Kvakova i sur., 2021).

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korišten je soj *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* 431[®] (Collins i sur., 1989; Bengoa i sur., 2021) i patogeni mikroorganizmi navedeni u Tablici 5. 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 5. Bakterijski sojevi i uvjeti rasta korišteni u ovom istraživanju.

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	431 [®]	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Salmonella enterica</i> s. Typhimurium	FP1	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	BHI, 37°C, anaerobno

4.1.2. Kemikalije

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- Destilirana voda, PBF, Hrvatska
- Etanol 70 %, „Kemika“, Hrvatska
- Fiziološka otopina 0,9% NaCl, PBF, Hrvatska
- Glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- Klorovodična kiselina, (HCL, 0,01 M), „Sigma-Aldrich“, SAD
- Otopina lizozima (25 mg/mL), „EuroBio“, Francuska
- Pufer za eluciju (Elution Buffer), „Promega“, SAD
- TE pufer, „Sigma-Aldrich“, SAD

4.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura i pribor korišteni za provedbu eksperimenata u ovom radu su:

- Automatske pipete (2-20 µL, 20-200 µL, 100 µL, 200-1000 µL), „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- Epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka

- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- Kivete za centrifugiranje (15 mL), „Falcon“, Engleska
- Menzura
- Metalna špatula
- Mikroeprovete „Eppendorf“, SAD
- Mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, Engleska
- Nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- Pipete (10 mL, 1 mL), „TLOS“, Hrvatska
- Stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- Stalci za kivete, „NeoLab“, Njemačka
- Stalci za mikroeprovete, „NeoLab“, Njemačka
- Analitička vaga, AS220.R2 PLUS, „Radwag“, Poljska
- Autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- Čitač mikrotitarskih ploča Infinite F plex, „Tecan“, Švicarska
- Hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit, „Promega“, SAD
- Mikrocentrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- Mikrovalna pećnica, „Electrolux“, Švedska
- Spektrofotometar Biospec Nano, „Shimadzu Biotech“, Japan
- Termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- Uređaj Maxwell® 16 za automatiziranu ekstrakciju DNA, „Promega“, SAD
- Uređaj za sonikaciju Sonoplus mini20, „Bandelin“, Njemačka
- Vibro-mješač V-1plus, „bioSan“, Latvija
- Zamrzivač (-80°C), CryoCube F101h, „Eppendorf“, SAD

4.1.4. Priprema otopina i hranjivih podloga

Otopina oksitetraciklina

Otopina oksitetraciklina priređena je kao 0,0006 g oksitetraciklina u 20 mL 0,01 M kloridne kiseline.

Otopine egzopolisaharida

- Egzopolisaharid *L. fermentum* D12 (EPS-D12)

Otopina EPS-D12 koncentracije 200 µg/mL priređena je kao 0,0008 g EPS-D12 u 4 mL hranjivog bujona; otopina EPS-D12 koncentracije 100 µg/mL priređena je pipetiranjem 0,5 mL otopine od 800 µg po 4 mL i razrijeđena s 3,5 mL hranjivog bujona; otopina EPS-D12

koncentracije 50 µg/mL priređena je pipetiranjem 0,25 mL otopine od 800 µg po 4 mL i razrijeđena s 3,75 mL hranjivog bujona.

- Egzopolisaharid *L. fermentum* MC1 (EPS-MC1)

Otopina EPS-MC1 koncentracije 200 µg/mL priređena je kao 0,0008 g EPS-MC1 u 4 mL hranjivog bujona; otopina EPS-MC1 koncentracije 100 µg/mL priređena je pipetiranjem 0,5 mL otopine od 800 µg po 4 mL i razrijeđena s 3,5 mL hranjivog bujona; otopina EPS-MC1 koncentracije 50 µg/mL priređena je pipetiranjem 0,25 mL otopine od 800 µg po 4 mL i razrijeđena s 3,75 mL hranjivog bujona.

Otopine inulina

Otopina inulina koncentracije 200 µg/mL priređena je kao 0,0008 g inulina u 4 mL hranjivog bujona; otopina inulina koncentracije 100 µg/mL priređena je pipetiranjem 0,5 mL otopine od 800 µg po 4 mL i razrijeđena s 3,5 mL hranjivog bujona; otopina inulina koncentracije 50 µg/mL priređena je pipetiranjem 0,25 mL otopine od 800 µg po 4 mL i razrijeđena s 3,75 mL hranjivog bujona.

Otopina lizozima

680 µL otopine lizozima koncentracije 25 mg/mL dodano je u 2720 µL TE pufera za dobivanje otopine u koncentraciji od 5 mg/mL.

Hranjive podloge

U mikrobiološkim analizama korištene su sljedeće hranjive podloge za selektivni rast bakterija:

- TOS

32,89 g TOS-propionat agara („Merck“, Njemačka) dodano je u 500 mL destilirane vode nakon čega je uslijedilo zagrijavanje do vrenja uz često miješanje. Kada se otopina homogenizirala stavljena je na autoklaviranje 15 minuta na temperaturu od 121 °C. Potom je otopina prelivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se hladi.

- VRBA

20,75 g Violet red bile agara („Difco“, SAD) dodano je u 500 mL destilirane vode nakon čega je otopina zagrijavana do vrenja uz često miješanje. Homogena otopina je zatim prelivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se hladi.

- MRS

31,5 g MRS agara („Biolife“, Italija) dodano je u 500 mL destilirane vode uz 5 mL MRS suplementa, nakon čega je uslijedilo zagrijavanje do vrenja uz često miješanje. Kada se otopina homogenizirala stavljena je na autoklaviranje 15 minuta na temperaturu od 121 °C. Potom je otopina prelivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se hladi.

- M-17

27,6 g M-17 agara („Biolife“, Italija) dodano je u 500 mL destilirane vode nakon čega je uslijedilo zagrijavanje do vrenja uz često miješanje. Kada se otopina homogenizirala stavljena je na autoklaviranje 15 minuta na temperaturu od 121 °C. Potom je otopina prelivena u Petrijeve zdjelice i ostavljena da se hladi.

4.2. METODE

4.2.1. Inokulacija bakterijskih sojeva

Dan prije izvođenja eksperimenta inokulirana je biomasa stanica *L. paracasei* 431[®] u 10 mL svježe tekuće MRS podloge i potom inkubirana preko noći pri 37°C. Soj se čuva pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola. Patogeni mikroorganizmi čuvani kao smrznute kulture na -80 °C u hranjivoj podlozi, inokulirani su u svježe tekuće MRS hranjive podloge, izuzev *L. monocytogenes* ATCC 19111 koja je inokulirana u BHI hranjivu podlogu, te stavljeni na inkubaciju preko noći pri 37°C.

4.2.2. Antimikrobna aktivnost *L. paracasei* 431[®] na rast patogena u suspenziji

Periodična analiza antimikrobne aktivnosti *L. paracasei* 431[®] provedena je prema postupku prethodno opisanom u radu Allonsius i sur. (2017) uz manje preinake. U mikrotitarsku pločicu od 96 jažica („Falcon“, Engleska) u prva dva stupca (dvije paralele) otpipetirano je 190 µL supernatanta prekonocne kulture *L. paracasei* 431[®] i 10 µL prekonocne kulture patogenih sojeva *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella enterica* s. Typhimurium FP1, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Kao kontrolni uzorak, odnosno pozitivna kontrola, ispitano je inhibicijsko djelovanje otopine oksitetraciklina, antibiotika širokog spektra djelovanja, u 0,01 M kloridnom puferu prema svim patogenim sojevima. Za kontrolu rasta patogenih sojeva inokulirano je 10 µL prekonocne kulture u 190 µL hranjivog bujona, odnosno BHI za soj *L. monocytogenes* ATCC 19111.

OD₆₂₀ vrijednosti uzoraka u mikrotitarskim pločicama određene su u uređaju za očitavanje mikroploča Infinite F plex („Tecan“, Švicarska) na 620 nm 0. sat. Potom je mikrotitarska ploča inkubirana u termostatu pri 37 °C, a postupak očitavanja ponovljen je svakih 30 minuta tijekom 2 sata.

4.2.3. Antimikrobna aktivnost EPS i inulina na rast patogena u suspenziji

Periodična analiza antimikrobne aktivnosti EPS-D12, EPS-MC1 i inulina provedena je prema postupku prethodno opisanom u radu Allonsius i sur. (2017) uz manje preinake. Priređene su otopine EPS-D12, EPS-MC1 i inulina u koncentracijama 50 µg/mL, 100 µg/mL i 200 µg/mL. U jažice mikrotitarske ploče redom je otpipetirano 190 µL otopine EPS-D12 (50 µg/mL, 100 µg/mL i 200 µg/mL), otopine EPS-MC1 (50 µg/mL, 100 µg/mL i 200 µg/mL), otopine inulina (50 µg/mL, 100 µg/mL i 200 µg/mL) i 10 µL prekonoćne kulture patogenih sojeva *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella enterica* s. Typhimurium FP1, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Listeria monocytogenes* ATCC 1911. Isti postupak je ponovljen i na drugoj mikrotitarskoj ploči.

OD₆₂₀ vrijednosti uzoraka određen je u čitaču mikrotitarskih pločica Infinite F plex („Tecan“, Švicarska) pri 620 nm 0. sat. Potom su mikrotitarske ploče inkubirane u termostatu pri 37 °C, a postupak očitavanja ponovljen je svakih 30 minuta tijekom 2 sata inkubacije.

4.2.4. *In vivo* analize na eksperimentalnim modelima miševa

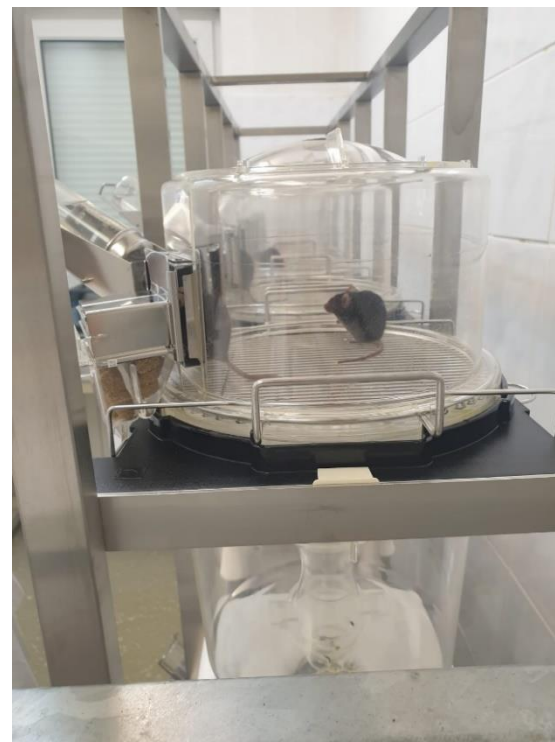
Za analizu sastava intestinalnog mikrobioma provedeni su *in vivo* eksperimenti na modelu eksperimentalnih miševa soja C57BL/6 starih 3 mjeseca. Miševi su svakodnevno hranjeni *ad libitum* standardnom mišjom hranom, od odvajanja od majke u trećem tjednu života. Hranjenje miševa sa standardom mišjom hranom uz dodatak inovativne mješavine vlakana, inulina, odnosno probiotičkog soja *L. paracasei* 431[®], sinbiotičkog pripravka *L. paracasei* 431[®] i inovativne mješavine vlakana te prikupljanje uzoraka fecesa provedeno je u Laboratoriju za metabolizam i starenje Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković (istraživačka grupa dr. sc. Tihomira Baloga).

Eksperiment je uključivao ukupno 16 miševa, 8 ženskih i 8 muških, a testiranje se odvijalo odvojeno po spolu, tako da su po 2 muška i 2 ženska miša konzumirala isti priređeni uzorka hrane. Prije intervencije s prebioticima, odnosno probiotikom ili sinbiotičkim pripravkom, miševi su hranjeni standardnom mišjom hranom u konvencionalnim kavezima gdje su po 2 miša istog spola u svakom kavezu (Slika 6. a i b). Sastav standardne mišje hrane naveden je u Tablici 6.



Slika 6. Miševi u konvencionalnim kavezima: a) (gore) i b) (dolje) (izvor: vlastite fotografije).

Nakon 3 mjeseca, miševi hranjeni standardnom mišjom hranom su premješteni iz konvencionalnih kaveza u metaboličke kaveze na 24 sata (Slika 7. a i b). Metabolički kavezi služe za prikupljanje fecesa i urina miševa u posude obložene stiroporom, čija temperatura se nastoji održati na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 7. a) Metabolički kavez (lijevo) i b) Miševi u metaboličkom kavezu (desno) (izvor: vlastite fotografije).

Tablica 6. Sastav standardne mišje hrane.

Sastav: pšenica, kukuruz, prepečena ekstrahirana sojina sačma, kukuruzni gluten, pšenična slama, riblje brašno, brašno od lucerne, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sirutka u prahu, sojino ulje, kvasci.		
Aditivi (po kg):		
3a672a	Vitamin A	14400 I.U.
3a671	Vitamin D3	1260 I.U.
3b103	Željezo (Fe)	180 mg
3b503	Mangan (Mn)	54 mg
3b605	Cink (Zn)	67,5 mg
3b405	Bakar (Cu)	11,7 mg
3b202	Jod (I)	0,9 mg
E562	Sepiolit	880 mg

Nakon prikupljenih 8 uzoraka fecesa parova miševa hranjenih standardnom mišjom hranom 0. dan, započinje hranjenje s 4 različita pripravka koja uz standardnu mišju hranu sadrže:

1. inovativne mješavina vlakna,
2. inulina,
3. *L. paracasei* 431[®],
4. *L. paracasei* 431[®] i inovativne mješavine vlakna.

Miševi su hranjeni s prva dva pripravka standardne mišje hrane tijekom 5 dana, odnosno s *L. paracasei* 431[®] i *L. paracasei* 431[®] s inovativnom mješavinom vlakana tijekom 6 dana. Po završetku hranjenja, miševi se vraćaju u metaboličke kaveze tijekom 24 sata kako bi se prikupio feces te se zatim ponovno premještaju u konvencionalne kaveze na standardnu mišju hranu.

Na kraju eksperimenta prikupljeno je 16 uzoraka fecesa, 8 uzoraka od 4 ženskih i 4 muških parova koji su hranjeni sa standardnom mišjom hranom te 8 uzoraka od istih parova miševa hranjenih s 4 vrste hrane koju je potrebno ispitati. Uzorci su čuvani u zamrzivaču CryoCube F101h („Eppendorf“, SAD) pri -80 °C.



Slika 8. Prikupljeni uzorci fecesa (izvor: vlastita fotografija).

Tablica 7. Masa prikupljenih uzoraka fecesa iz svake skupine eksperimentalnih miševa.

Uzorci hrane	Spol svakog para	Masa fecesa parova miševa hranjenih standardnom mišjom hranom (g)	Masa fecesa parova miševa hranjenih hranom za ispitivanje (g)
standardna mišja hrana + inovativna vlakna	♀	0,438	1,129
	♂	1,167	3,420
standardna mišja hrana + inulin	♀	0,539	1,830
	♂	1,570	2,122
standardna mišja hrana + probiotik <i>L. paracasei</i> 431®	♀	0,724	0,727
	♂	1,215	1,338
standardna mišja hrana + probiotik <i>L. paracasei</i> 431® + inovativna vlakna	♀	0,949	1,078
	♂	1,180	1,440

Zbog lakšeg rukovanja s uzorcima u provođenju eksperimenata i jednostavnosti kasnijih analiza dobivenih podataka, svakom od prikupljenih uzoraka dodijeljena je specifična oznaka (Tablica 8.).

Tablica 8. Oznake uzoraka uz detaljna objašnjenja.

M1	Fecesi dva ženska miša iz istog metaboličkog kaveza koji su hranjeni samo sa standardnom hranom, prikupljeni 0. dan, tj. prije početka hranjenja standardnom hranom pomiješanom s inovativnim vlaknima
M2	Fecesi dva muška miša iz istog metaboličkog kaveza koji su hranjeni samo sa standardnom hranom, prikupljeni 0. dan, tj. prije početka hranjenja standardnom hranom pomiješanom s inovativnim vlaknima
M3	Fecesi dva ženska miša iz istog metaboličkog kaveza koji su hranjeni samo sa standardnom hranom, prikupljeni 0. dan, tj. prije početka hranjenja standardnom hranom pomiješanom s inulinom
M4	Fecesi dva muška miša iz istog metaboličkog kaveza koji su hranjeni samo sa standardnom hranom, prikupljeni 0. dan, tj. prije početka hranjenja standardnom hranom pomiješanom s inulinom
M5	Fecesi dva ženska miša iz istog metaboličkog kaveza koji su hranjeni samo sa standardnom hranom, prikupljeni 0. dan, tj. prije početka hranjenja standardnom hranom pomiješanom s probiotikom <i>L. paracasei</i> 431 [®]
M6	Fecesi dva muška miša iz istog metaboličkog kaveza koji su hranjeni samo sa standardnom hranom, prikupljeni 0. dan, tj. prije početka hranjenja standardnom hranom pomiješanom s probiotikom <i>L. paracasei</i> 431 [®]
M7	Fecesi dva ženska miša iz istog metaboličkog kaveza koji su hranjeni samo sa standardnom hranom, prikupljeni 0. dan, tj. prije početka hranjenja standardnom hranom pomiješanom s probiotikom <i>L. paracasei</i> 431 [®] i inovativnim vlaknima
M8	Fecesi dva muška miša iz istog metaboličkog kaveza koji su hranjeni samo sa standardnom hranom, prikupljeni 0. dan, tj. prije početka hranjenja standardnom hranom pomiješanom s probiotikom <i>L. paracasei</i> 431 [®] i inovativnim vlaknima
M9	Fecesi dva ženska miša iz istog metaboličkog kaveza prikupljeni 5. dan nakon hranjenja standardnom hranom pomiješanom s inovativnim vlaknima
M10	Fecesi dva muška miša iz istog metaboličkog kaveza prikupljeni 5. dan nakon hranjenja standardnom hranom pomiješanom s inovativnim vlaknima
M11	Fecesi dva ženska miša iz istog metaboličkog kaveza prikupljeni 5. dan nakon hranjenja standardnom hranom pomiješanom s inulinom

M12	Fecesi dva muška miša iz istog metaboličkog kaveza prikupljeni 5. dan nakon hranjenja standardnom hranom pomiješanom s inulinom
M13	Fecesi dva ženska miša iz istog metaboličkog kaveza prikupljeni 6. dan nakon hranjenja standardnom hranom pomiješanom s probiotikom <i>L. paracasei</i> 431®
M14	Fecesi dva muška miša iz istog metaboličkog kaveza prikupljeni 6. dan nakon hranjenja standardnom hranom pomiješanom s probiotikom <i>L. paracasei</i> 431®
M15	Fecesi dva ženska miša iz istog metaboličkog kaveza prikupljeni 6. dan nakon hranjenja standardnom hranom pomiješanom s probiotikom <i>L. paracasei</i> 431® i inovativnim vlaknima
M16	Fecesi dva muška miša iz istog metaboličkog kaveza prikupljeni 6. dan nakon hranjenja standardnom hranom pomiješanom s probiotikom <i>L. paracasei</i> 431® i inovativnim vlaknima

4.2.5. Mikrobiološke analize ciljnih bakterijskih populacija intestinalne mikrobiote



Kako bi se provele mikrobiološke analize ciljnih bakterijskih populacija, koje su prepoznate kao korisne bakterijske vrste, u intestinalnom mikrobiomu miševa hranjenih novim vrstama hrane korištene su sljedeće selektivne hranjive podloge: MRS za određivanje broja poraslih bakterijskih kolonija *Lactobacillus* vrsta, TOS propionat hranjiva podloga za *Bifidobacterium*, M17 agar za *Lactococcus* vrste, te Violet red bile agar za određivanje broja poraslih fermentirajućih koliformnih mikroorganizama (Tablica 9.).

Odvagano je 100 mg svakog uzorka u mikroepruvetu za mikroanalizu na spomenutim selektivnim hranjivim podlogama za rast bakterija. Priređena su decimalna razrjeđenja u fiziološkoj otopini tako da je u odvagu uzorka fecesa (100 mg) dodano 900 µL sterilne fiziološke otopine za pripremu prvog razrjeđenja. Nakon vorteksiranja iz prvog razrjeđenja (100 mg fecesa i 900 µL fiziološke otopine) otpipetirano je 100 µL suspenzije u sljedećih 900 µL sterilne fiziološke otopine za pripremu drugog razrjeđenja i tako redom do desetog razrjeđenja za svih 16 uzoraka.

Na označene Petrijeve zdjelice s određenom selektivnom hranjivom podlogom nacijepnjeno je po 10 µL suspenzije od desetog do trećeg decimalnog razrjeđenja u dvije paralele. Ukupno je u jednoj paraleli nacijepnjeno 128 hranjivih podloga: 16 uzoraka * 2 Petrijeve zdjelice s istom hranjivom podlogom za svaki uzorak * 4 vrste hranjivih podloga TOS, VRBA, MRS, M-17. Tako inokulirane hranjive podloge stavljene su na inkubaciju pri 37 °C u termostat. Anaerobni uvjeti osigurani su za TOS, M-17 i MRS, a aerobni za VRBA. Nakon 3 dana inkubacije hranjivih

podloga pri 37 °C, porasle bakterijske populacije su izbrojane za svih 16 uzoraka na MRS, M-17 i TOS selektivnim hranjivim podlogama.

Tablica 9. Prikaz hranjivih podloga i bakterijskih populacija kojima su namijenjene.

Slika hranjivih podloga	Naziv hranjive podloga	Bakterijska populacija
	MRS	<i>Lactobacillus</i>
	M17	<i>Lactococcus</i>
	TOS propionat	<i>Bifidobacterium</i>
	VRBA	Laktoza-fermentirajući koliformni mikroorganizmi

4.2.6. Metagenomička analiza intestinalnog mikrobioma

4.2.6.1. Izolacija mikrobne DNA iz fecesa pomoću Maxwella

Odvagano je 100 mg svakog uzorka fecesa u mikroepruvetu. Potom je dodan 1 mL fiziološke otopine. Sadržaj je vorteksiran i centrifugiran 10 minuta na 13000 o/min. Dobiveni talog svakog uzorka je resuspendiran u 200 µL pripremljene otopine lizozima. Uzorci su inkubirani 2 sata pri 37 °C.

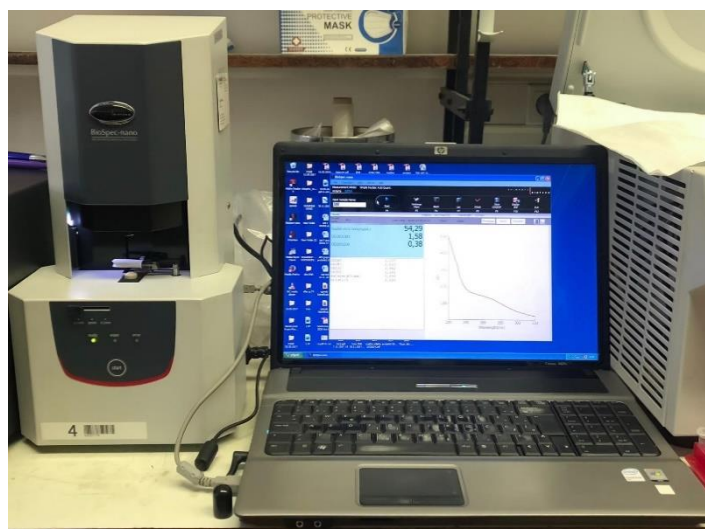
Nakon inkubacije provedena je sonikacija uzoraka u 3 ciklusa, po 30 sekundi sonikacije i 15 sekundi stanke. Iz tako pripremljenih uzoraka provodi se izolacija DNA pomoću Maxwell DNA Tissue kita u uređaju Maxwell® 16 prikazanom na Slici 9. Izolacija Maxwell kitom podrazumijeva pročišćavanje genomske DNA iz uzoraka tkiva na automatiziran, učinkovit i jednostavan način. Nakon uključivanja uređaja pritiskom na Run/Stop odabire se program ovisno o korištenom kitu za izolaciju DNA i slijede se upute na ekranu. Kada postolje za nosače s uzorcima (eng. *catridge*) izađe, oni se namjeste u utore tako da etiketa na prvoj jažici gleda prema unutra, a koljeno na sredini nosača zadnje jažice prema nama. Odljepi se pokrov s nosača i uzorci se stavljaju u prvu jažicu, a klipovi (eng. *plunger*) u zadnju. Tubice za eluciju

se poslože na predviđeno mjesto ispred klipova te se u svaku doda 300 μL pufera za eluciju (eng. *Elution Buffer*). Uređaj se pokreće zatvaranjem vrata i automatski počinje postupak izolacije, koji traje oko 45 minuta. Po završetku izolacije, 150 μL sadržaja izoliranje DNA prebačeno je u mikroeprovete.



Slika 9. Maxwell $\text{\textcircled{R}}$ 16 uređaj za automatiziranu izolaciju DNA iz intestinalne mikrobiote (izvor: Promega iSlides).

Određena je koncentracija izolirane genomske DNA ukupne mikrobne populacije na spektrofotometru Biospec Nano („Shimadzu Biotech“, Japan) pri valnoj duljini 0,7 nm (Slika 10.). Slijepa proba je 2 μL pufera za eluciju, a dalje je redom uzorkovano 2 μL svakog uzorka ekstrahirane DNA. Nakon očitanih koncentracija, iz preostalog sadržaja u mikroeproveta za svaki uzorak otpipetirano je 30 μL u nove mikroeprovete koje su poslane na Illumina MiSeq sekvenciranje u certificirani laboratorij Molecular Research Lab, MR DNA, (Shallowater, Texas, SAD). Ostatak uzoraka s izoliranom DNA pohranjen je na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za daljnje analize.



Slika 10. Spektrofotometar Biospec Nano za određivanje koncentracije DNA u uzorcima ekstrahirane genomske DNA (izvor: vlastita fotografija).

4.2.6.2. Metode za sustav sekvenciranja MiSeq

Na Illumina MiSeq uređaju odrađeno je pair-end sekvenciranje V4 varijabilne regije 16S rRNA prema uputama proizvođača. Varijabilne regije umnožene su u 30-35 ciklusa metodom lančane reakcije polimerizacije (PCR) pomoću početnica 515/806, s barkodom na prednjoj početnici, korištenjem HotStarTaq Plus Master Mix kita („Qiagen“, SAD). Početna denaturacija DNA provodila se pri 94 °C tijekom 3 minute. Nastavila se pri 94 °C tijekom 30 sekundi u 30-35 ciklusa. Za komplementarno sparivanje početnica temperatura je spuštena na 53 °C tijekom 40 sekundi. Slijedio je zagrijavanje do optimalne temperature, 72 °C tijekom 5 minuta u 30-35 ciklusa, potrebne da bi DNA polimeraza provodila umnažanje DNA. Uzorci su spojeni u jednakim omjerima na temelju njihove molekularne mase i koncentracije DNA.

Provjera uspješnosti amplifikacije provedena je na 2 %-om agaroznom gelu nakon čega su produkti pročišćeni primjenom kalibriranih kuglica Ampure XP i analizirani primjenom Illumina DNA platforme.

Sekvenciranje je provedeno u laboratoriju MR DNA i sirovi podaci sekvenci obrađeni su primjenom MR DNA sustava za analizu. Kod sparivanja sekvenci, uklonjene su sekvence veličine manje od 150 parova baza i sekvence s dvosmislenim bazama (eng. *ambiguous base*). Sekvence su zatim kvalitativno filtrirane s maksimalno pogreškom od 1,0 i dereplicirane. Dereplicirane ili jedinstvene sekvence su pročišćene od grešaka i šumova (eng. *denoised*) tako da su eliminirane sekvence s pogreškom sekvenciranja ili pogreškom nastalom prilikom PCR-a. Uslijedilo je uklanjanje himera (eng. *chimera*), odnosno dvije ili više bioloških sekvenci koje su pogrešno spojene, čime je generirana denoisirana (eng. *denoised*) sekvenca ili zOTU. Konačne zOTU sekvence taksonomski su klasificirane pomoću BLASTn programa poravnavanjem s bazom podataka dostupnom na NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

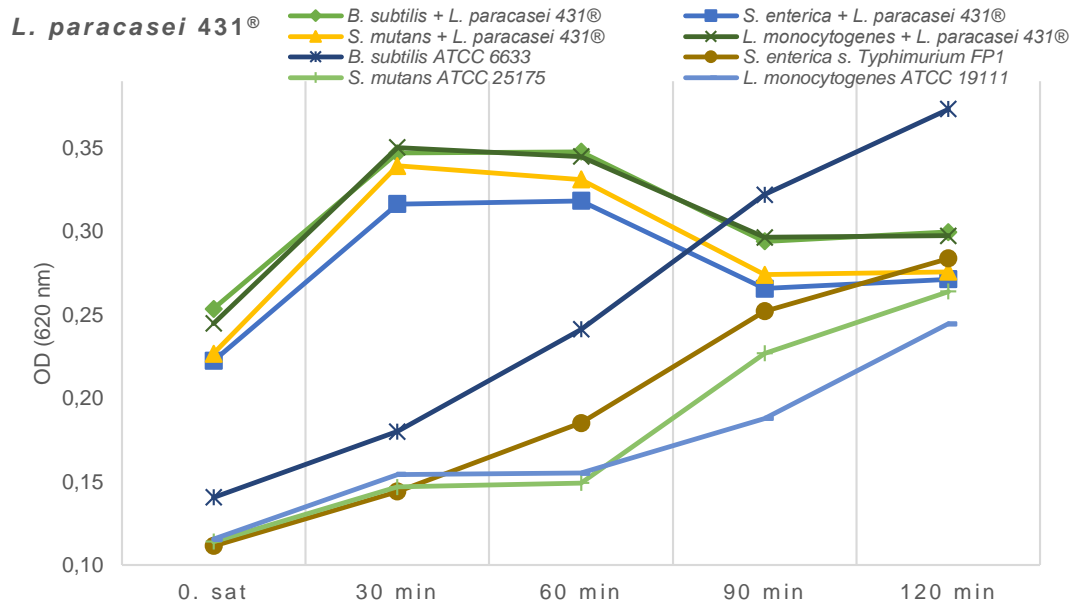
5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Antimikrobni učinak *L. paracasei* 431[®] i prebiotičkih supstrata

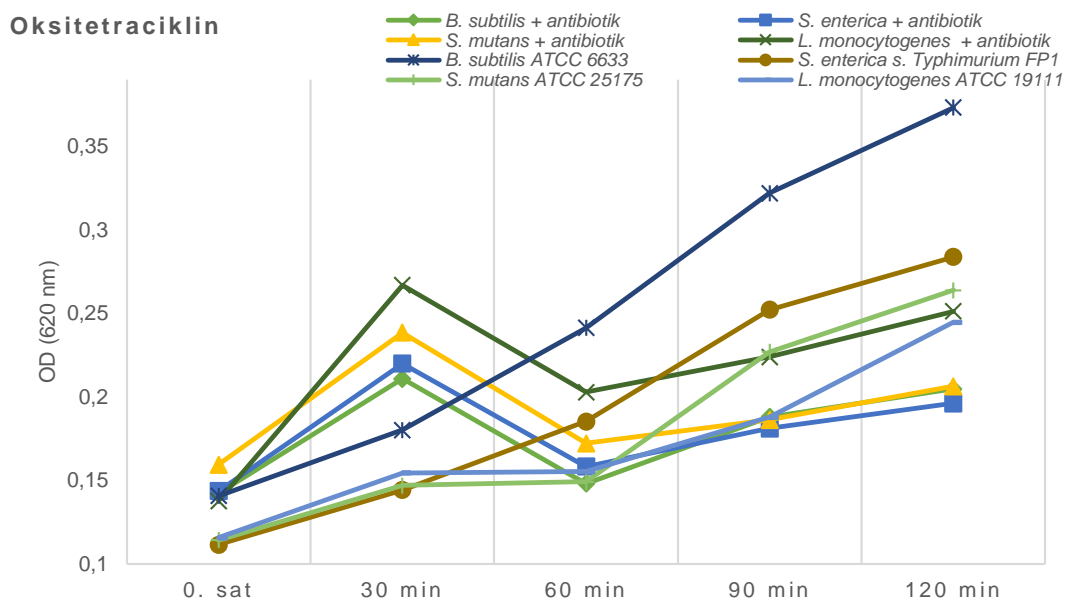
Bakterijski sojevi intestinalne mikrobiote iskazuju različite specifičnosti za prebiotičke supstrate. To je posljedica prisutnosti specifičnih klastera gena unutar bakterijskog genoma koji kodiraju za saharolitičke enzime i ovisno o tome mogu metabolizirati prebiotički supstrat (Wilson i Whelan, 2017). S obzirom na to da je antimikrobno djelovanje jedan od mehanizama probiotičkog djelovanja i važan čimbenik modulacije sastava intestinalnog mikrobioma, prvotno smo ispitali inhibicijski učinak modelne probiotičke bakterija *L. paracasei* 431[®]. Osim toga, dostupnost specifičnih prebiotičkih supstrata u mikrookolišu GIT-a može utjecati na sastav intestinalnog mikrobioma selektivnom stimulacijom rasta korisnih bakterijskih vrsta pa smo ujedno ispitali i inhibicijski potencijal specifičnih potencijalnih kandidata prema nepoželjnim bakterijskim vrstama. Stoga, jedan od ciljeva ovog rada je definirati antimikrobno djelovanje dobro okarakteriziranog prebiotika inulina te ga usporediti s prebiotičkim potencijalom egzopolisaharida EPS-D12 i EPS-MC1, sintetiziranih sojevima *Lactobacillus fermentum* D12, odnosno *Lactobacillus fermentum* MC1, koji se intenzivno istražuju kao probiotički sojevi u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura.

Inhibicijski učinak probiotičkog soja *L. paracasei* 431[®], koji se prema prijašnjoj taksonomskoj klasifikaciji naziva *Lactobacillus paracasei*, a sada prema novoj nomenklaturi pripada rodu *Lacticaseibacillus*, nekadašnja *Lactobacillus casei* grupa (Bengoa i sur., 2021), ispitan je prema istim test-mikroorganizmima kao i inhibicijski učinak odabranih prebiotika i EPS. *L. paracasei* se primjenjuje u obliku probiotičkih ili sinbiotičkih bioterapijskih pripravaka u kliničkoj praksi (Jones, 2017). Osim GRAS statusa, *L. paracasei* dokazano može preživjeti nepovoljne uvjete GIT-a, odnosno niske pH vrijednosti i visoke koncentracije žučne kiseline, adhezirati na HT-29 staničnu liniju, kolonizirati crijevni epitel i specifično inhibirati rast potencijalnih patogenih mikroorganizama (Verdenelli i sur., 2009).

Turbidimetrijskom metodom ispitano je inhibicijsko djelovanje *L. paracasei* 431[®] prema gram-pozitivnim vrstama *S. mutans* ATCC 25175, *L. monocytogenes* ATCC 19111 i sporogenoj *B. subtilis* ATCC 6633 te gram-negativnoj *S. enterica* s. Typhimurium FP1 (Slika 11.).



Slika 11. Inhibicijsko djelovanje probiotičkog soja *L. paracasei* 431® prema *S. enterica* s. Typhimurium FP1, kariogenoj bakteriji *S. mutans* ATCC 25175, sporogenoj *B. subtilis* ATCC 6633 i *L. monocytogenes* ATCC 19111.



Slika 12. Inhibicijsko djelovanje antibiotika oksitetraciklina prema *S. enterica* s. Typhimurium FP1, kariogenoj bakteriji *S. mutans* ATCC 25175, sporogenoj *B. subtilis* ATCC 6633 i *L. monocytogenes* ATCC 19111.

Ustanovljeno je da supernatant probiotičkoj soja *L. paracasei* 431[®] iskazuje inhibicijsko djelovanje već tijekom prvog sata inkubacije sa *S. enterica* s. Typhimurium FP1, kariogenom bakterijom *S. mutans* ATCC 25175, sporogenom bakterijom *B. subtilis* ATCC 6633. Također, inhibicijski učinak supernatanta kulture *L. paracasei* 431[®] prema *S. enterica* s. Typhimurium FP1 i *B. subtilis* ATCC 6633 prisutan je i nakon 25 sati inkubacije pri 37 °C (rezultati nisu prikazani). U periodu provođenja *in vitro* ispitivanja antimikrobne aktivnosti, inhibicijski učinak prema *L. monocytogenes* ATCC 19111 nije ustanovljen. Za usporedbu, ispitano je i inhibicijsko djelovanje antibiotika širokog spektra djelovanja oksitetraciklina, i kao što je očekivano prisutna je značajna inhibiciji rasta patogena u usporedbi s *L. paracasei* 431[®] (Slika 12.). Kako je širenje antibiotske rezistencije jedan od gorućih problema svjetske populacije, te zdravstvene i znanstvene zajednice, intenzivno se istražuju alternativne antibakterijske strategije, a jedan od pristupa upravo je primjena probiotičkih sojeva ili njihovih antimikrobnih komponenti.

Brojna su znanstvena istraživanja o inhibicijskom djelovanju probiotičkih *Lactobacillus* sojeva prema različitim patogenim vrstama i to prema gram negativnoj bakteriji *S. enterica* s. Typhimurium FP1, koja je uz *E. coli*, *Shigella* i *Campylobacter* jedan od niza enteropatogena uzročnika dijareje, najčešće unesenih putem kontaminirane hrane, vode ili direktnim fizičkim kontaktom. Unutar domaćina, ovi patogeni mogu uzrokovati smrtnost, a povezuju se i s malnutricijom (González i sur., 1993). Prema *in vivo* mikrobiološkoj analizi kod antagonističkog učinka soja *L. casei* Shirota prema *S. mutans* izoliranog iz mikrobiote usne šupljine, ustanovljeno je da dnevna konzumacija fermentiranog mlijeka, koje sadrži ovaj probiotički soj, može pridonijeti smanjenju broja bakterija *S. mutans*. Ovakvi rezultati upućuju na mogućnost istraživanja njegove primjene za prevenciju zubnog karijesa (Jones, 2017).

Mehanizam antimikrobnog djelovanja *L. paracasei* sojeva obuhvaća i inhibiciju stvaranja patogenih biofilmova. Dodatni zdravstveni učinci ovog soja uključuju stimulaciju imunskog sustava, antioksidativnu i protuupalnu aktivnost, učinak na smanjenje koncentracije kolesterola u serumu, poboljšanje metabolizma lipida, modulatorne učinke na stres i pretilost te konačno, poboljšanje svojstava intestinalne mikrobiote (Bengoa i sur., 2021). Pretpostavlja se da spomenuti zdravstveni učinci, a osobito antimikrobno djelovanje, proizlaze iz združenih učinaka sintetiziranih metabolita soja *L. paracasei*.

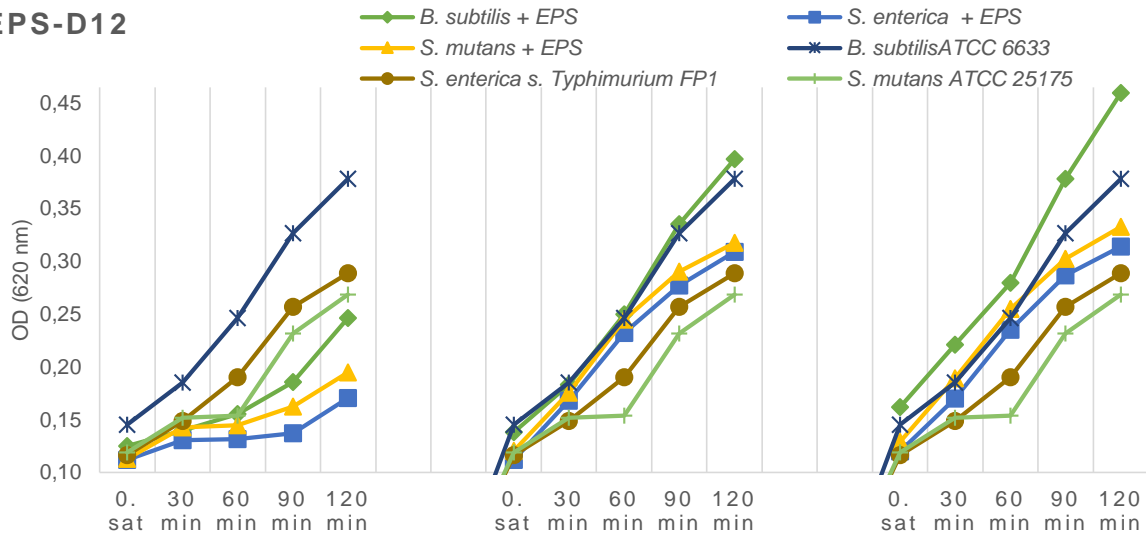
Fizikalno-kemijska svojstva EPS-a značajno utječu na bioaktivnost ovih molekula (Zhou i sur., 2019). Prema istraživanjima, EPS molekule, odnosno EPS sloj koji je u interakciji sa specifičnim mikrookolišem, posreduje u smanjenju adhezijskog kapaciteta patogena, tzv. kompetitivnoj ekskluziji. Strukturna analiza EPS-D12 je definirana i ustanovljen je zaštitni učinak ovog ekstracelularnog EPS-a tijekom adaptacije stanica producenta *in vitro* na ekstremne uvjete okoliša, primjerice, tijekom prolaska kroz GIT (Butorac i sur., 2021). Za

razliku od EPS-D12 koji je ekstracelularan, EPS-MC1 je vezan za staničnu stijenku bakterije producenta (neobjavljeni rezultati istraživanja Laboratorija). Iako, prema literaturi, EPS-i većinom imaju zaštitnu ulogu prilikom eksponiranja bakterijske stanice različitim uvjetima mikrookoliša, istraživanja upućuju i na druge funkcionalne uloge ovih staničnih struktura, a posebice nakon primjene u kombinaciji s određenim probiotičkim sojevima. Swanson i sur. (2020) okupljeni kao panel stručnjaka donose mišljenje o definiciji pojma sinbiotika, čiji je komponentni sastojak i prebiotik, te navode korisne učinke sinbiotika koji se, mehanizmima izravnog antagonizma, očituju kroz učinak na omjer zastupljenosti phyla *Firmicutes* i *Bacteroidetes* i inhibiciju rasta patogenih mikroorganizama, primjerice *Klebsiella*, *E. coli* i *C. difficile*. Upravo su zato provedeni pokusi određivanja antimikrobnog djelovanja EPS-D12 i EPS-MC1, koji kao ugljikohidratne strukture imaju potencijalni bifidogeni učinak, te inulina, prema predstavnicima učestalih gram-negativnih, odnosno gram-pozitivnih patogenih bakterija (Slika 13.). Antimikrobno djelovanje probiotički sojeva može doprinijeti u konačnici biomodulacijskim učincima na intestinalnu mikrobiotu.

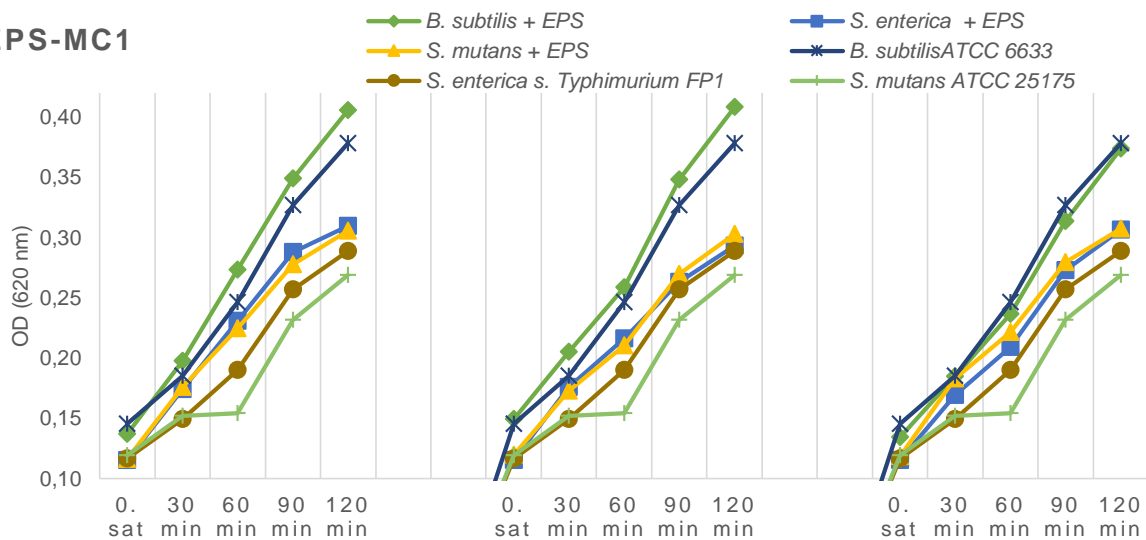
Inhibicijsko djelovanje EPS ispitano je u tri različite koncentracije. Pri tome, ustanovljena je prisutnost inhibicije rasta u usporedbi s kontrolnim rastom *B. subtilis* ATCC 6633 kada je dodana koncentracija EPS-D12 od 50 µg/mL, dok efekt nije prisutan kod povećanih koncentracija, od 100 µg/mL i 200 µg/mL (Slika 13.). Prema rezultatima, inhibicijski učinak EPS-D12 u istoj koncentraciji prisutan je i prema *S. enterica* s. Typhimurium te *S. mutans* ATCC 6633. Butorac i sur. (2021) ustanovili su sličan trend, ali prilikom ispitivanja učinka EPS-D12 na također značajno funkcionalno svojstvo, adheziju *in vitro*. Postoji mogućnost da bi se EPS mogao izravno prilijepiti na crijevnu površinu i tako ometati prianjanje bakterija ili bi se mogao zalijepiti za staničnu površinu pa time zakloniti čimbenike adhezije.

EPS-MC1 nije pokazao inhibicijski učinak prema odabranim patogenim sojevima niti u jednoj od tri ispitivane koncentracije, dok je inulin pokazao inhibicijski učinak samo na *B. subtilis* ATCC 6633 u koncentraciji od 100 µg/mL (Slika 13.). Niti jedan ispitivani prebiotik nije pokazao inhibicijski učinak prema *L. monocytogenes* ATCC 19111 (rezultati nisu prikazani).

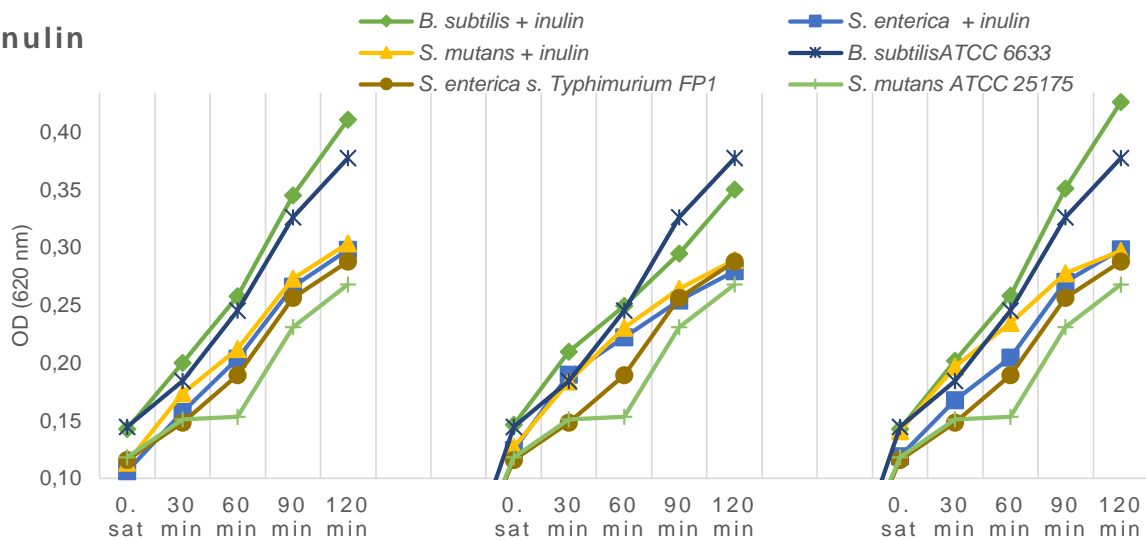
EPS-D12



EPS-MC1



Inulin



Slika 13. Inhibicijski učinak EPS-D12, EPS-MC1 i prebiotika inulina u tri različite koncentracije, 50 µg/mL (lijevo), 100 µg/mL (sredina) i 200 µg/mL (desno), na patogene.

U prijašnjim istraživanjima, Allonsius i sur. (2017) ustanovili su da EPS proizveden od *L. casei* NA-2 inhibira stvaranje biofilma *B. cereus* u postotku višem od 95,5%, zatim *S. aureus* 30,2%, *S. Typhimurium* 12,1%, *E. coli* 16,9%. EPS probiotičkog soja *L. rhamnosus* GG reducira stvaranje i rast hifa i ima bioterapijski učinak prilikom virulentnosti *Candida albicans*. Radi se o antifungalnim učincima, a primjerice jedan drugi soj EPS *L. rhamnosus*, izoliran iz mikrobiote majčinog mlijeka ima značajno antibakterijsko djelovanje prema *S. enterica* s. *Typhimurium* i *E. coli* (Riaz Rajoka i sur., 2018). EPS-i roda *Lactobacillus* sadrže nekoliko funkcionalnih skupina, na primjer, karbonilne, fosfatne i hidroksilne, za koje se smatra da imaju bitnu ulogu u ispoljavanju antimikrobnih i antioksidativnih učinaka EPS-a (Riaz Rajoka i sur., 2020).

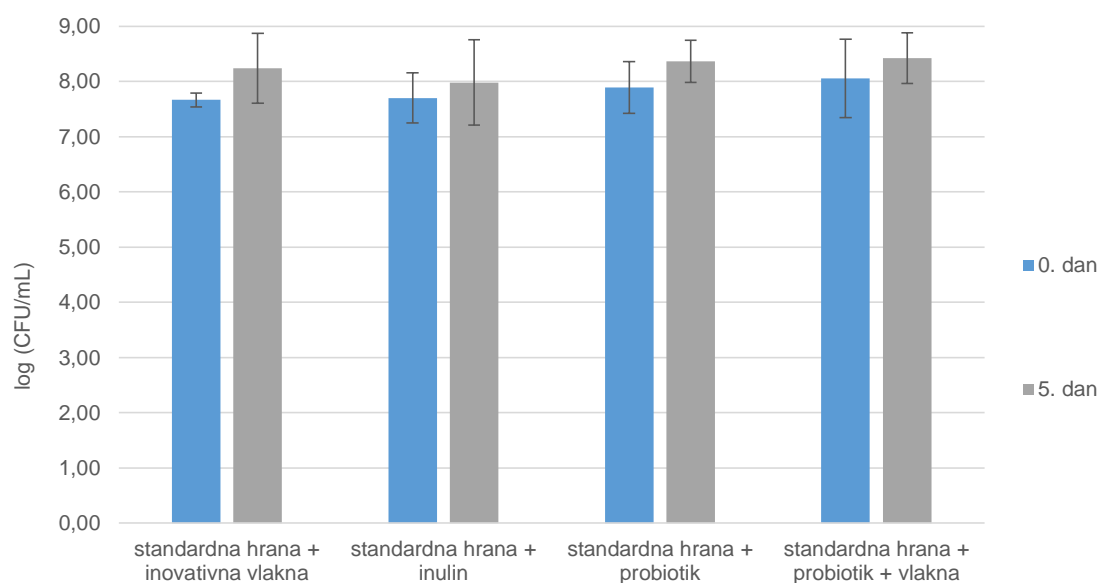
Molekularni mehanizmi antibakterijskog učinka EPS-a BMK nisu još uvijek detaljno razjašnjeni. Pretpostavlja se da EPS BMK ometaju staničnu komunikaciju interakcijama sa signalnim molekulama ili s receptorima glikokaliksa na površini bakterijske stanice patogena čime posljedično interferiraju sa stvaranjem biofilma i to rezultira antimikrobnim učincima. Osim toga, pojedina istraživanja su potvrdila da se antimikrobni učinak može postići narušavanjem integriteta stanične membrane, što povećava protok sadržaja topivih proteina. Vjerojatno je i da funkcionalne skupine u strukturi EPS-a međusobno djeluju s ovojnica bakterijskih stanica kako bi postigle antimikrobno djelovanje (Zhou i sur., 2019). Ipak, mehanizam antimikrobnog djelovanja *in vivo* je vrlo kompleksan i, između ostalog, uz učinak na formiranje biofilma, povezan s imunomodulacijskim djelovanjem te izbjegavanjem imunoloških odgovora. Mehanizam antimikrobnog djelovanja posredovan EPS BMK može doprinijeti kolonizaciji GIT-a, zaštiti komensalne probiotičke sojeve uslijed izlaganja adaptivnom imunološkom odgovoru u domaćinu i pojačati njihovu kompeticiju s patogenima (Abdalla i sur., 2021). Sposobnost bakterijskih EPS-a, kao što je kefiran, da stupe u interakciju s bakterijskim ili eukariotskim stanicama dovela je do pretpostavke da kefiran djeluje kao maska ili mamac (Medrano i sur., 2009). Dakle, može se pretpostaviti da ovo djelovanje blokira receptore ili kanale na vanjskoj membrani gram-negativnih bakterija. EPS-i potencijalno mogu olakšati nakupljanje sekundarnih metabolita u mediju za rast i tako negativno utjecati na gram-pozitivne i gram-negativne patogene.

5.2. Analiza ciljnih bakterijskih populacija primjenom klasičnih mikrobioloških metoda

Suplementacijom prehrane obogaćene prebiotičkim supstratima u ljudi, stimulira se rast specifičnih bakterijskih vrsta intestinalne mikrobiote (npr. bifidobakterija), modulira se imunost sustav te se, ovisno o poraslom broju specifičnih bakterija, povećava i udio kratkolančanih masnih kiselina (Sanders i sur., 2019).

Za mikrobiološku analizu ciljnih bakterijskih populacija iz intestinalnog mikrobioma primjenom klasičnih mikrobioloških metoda korištene su četiri različite selektivne hranjive podloge. Indirektnom metodom određen je broj poraslih kolonija na selektivnim hranjivim podlogama iz uzoraka fecesa, označenih M1-M16. Prema rezultatima mikrobiološke analize u uzorcima fecesa broj poraslih kolonija na selektivnoj podlozi za BMK, odnosno *Bifidobacterium* i *Lactococcus* vrste iznosi iznad 10^6 CFU/mL.

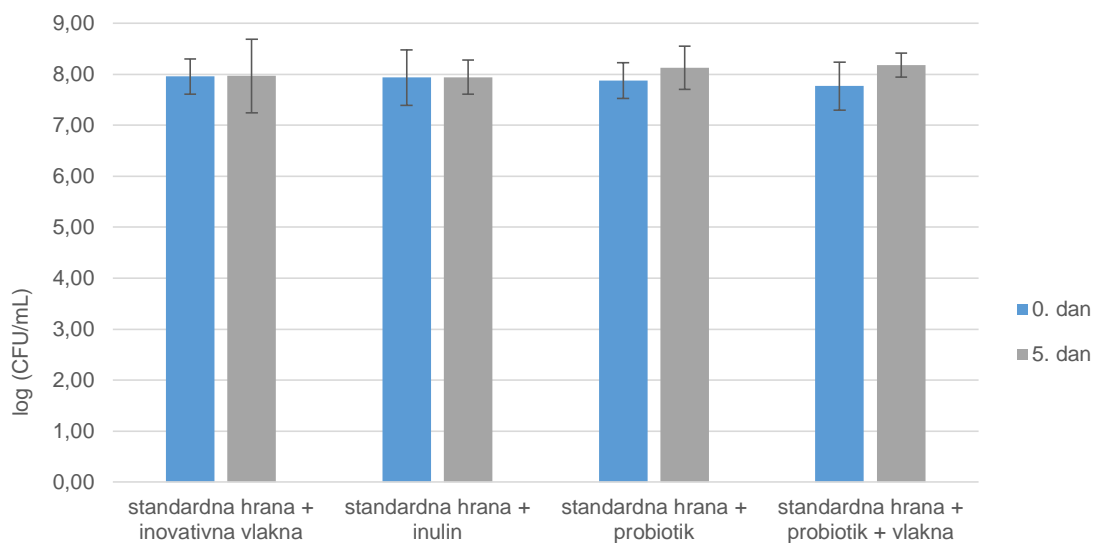
Rezultati analize broja poraslih kolonija BMK vrsta na selektivnoj MRS hranjivoj podlozi prikazani su na Slici 14. Prema rezultatima, primjena inovativne hrane, inulina, probiotika *L. paracasei* 431® i sinbiotičkog pripravka, u odnosu na standardnu mišju hranu, rezultirala je povećanjem broja poraslih bakterijskih kolonija BMK, odnosno zastupljenosti *Lactobacillus* vrsta u mikrobnjoj populaciji fecesa. Rast bakterijskih kolonija na VRBA selektivnoj hranjivoj podlozi za laktoza-fermentirajuće koliformne mikroorganizme nije ustanovljen.



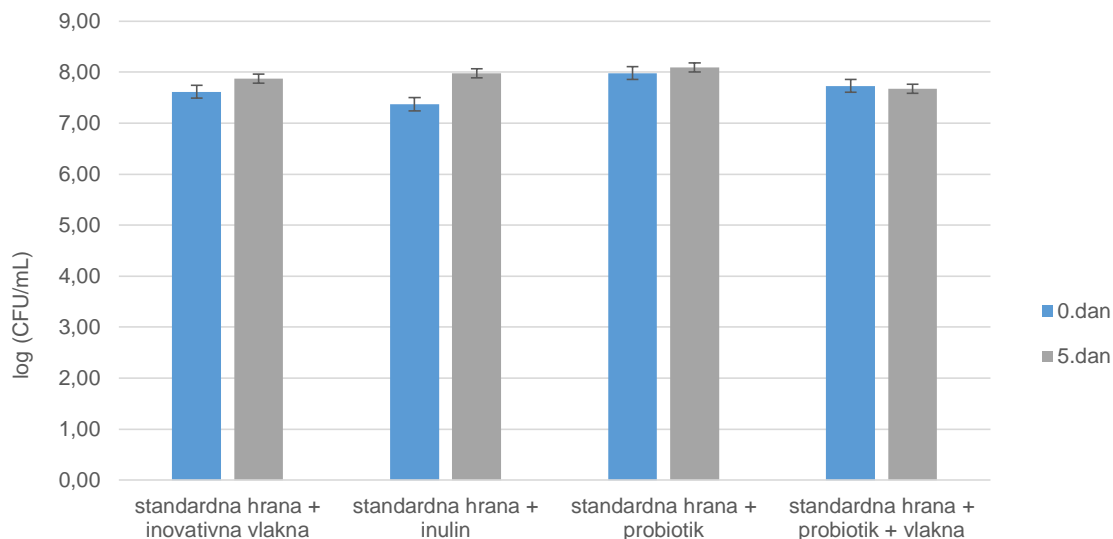
Slika 14. Broj poraslih bakterijskih populacija (log (CFU/mL)) intestinalne mikrobiote miševa 0. i 5. dan na MRS hranjivoj podlozi, s obzirom na sastojak dodan u standardnu mišju hranu.

Rezultat broja *Lactococcus* vrsta na M-17 selektivnoj hranjivoj podlozi ne upućuje na povećan broj poraslih bakterijskih kolonija (CFU/mL) u slučajevima primjene inovativne hrane u odnosu na standardnu mišju hranu (Slika 15.), za razliku od broja *Bifidobacterium* vrsta na TOS selektivnoj hranjivoj podlozi (Slika 16.). Na ove dvije selektivne hranjive podloge vidljiv je bifidogeni učinak inulina te laktogeni učinak probiotika *L. paracasei* 431® i sinbiotičkog pripravka standardne mišje hrane s probiotikom *L. paracasei* 431® i inovativnim vlaknima. Ipak, uočeno je blago odstupanje na TOS selektivnoj hranjivoj podlozi kod miševa koji su hranjeni standardnom mišjom hranom pomiješanom s inovativnim vlaknima i probiotikom *L. paracasei* 431®. Odstupanje nije statistički značajno ($p > 0,01$), ali do njega je moglo doći zbog

mogućih razlika u strukturi i sastavu dodanih inovativnih vlakana. S obzirom na strukturu i sastav inulina, egzoinulinaze iz *L. paracasei* 431® mogle su poticati rast vlastitog, odnosno drugih sojeva u GIT-u miševa, što je moguće rezultiralo odstupanjem u rastu na selektivnim hranjivim podlogama.



Slika 15. Broj poraslih bakterijskih populacija (log (CFU/mL)) intestinalne mikrobiote miševa 0. i 5. dan na M-17 hranjivoj podlozi, s obzirom na sastojak dodan u standardnu mišju hranu.



Slika 16. Broj poraslih bakterijskih populacija (log (CFU/mL)) intestinalne mikrobiote miševa 0. i 5. dan na TOS hranjivoj podlozi, s obzirom na sastojak dodan u standardnu mišju hranu.

Tablica 10. Promjena log (CFU/mL) nultog i petog dana hranjenja miševa.

ΔLOG (CFU/ML)	MRS	M-17	TOS
Standardna mišja hrana + inovativna vlakna	0,57	0,01	0,26
Standardna mišja hrana + inulin	0,28	0,00	0,61
Standardna mišja hrana + <i>L.</i> <i>paracasei</i> 431 [®]	0,47	0,25	0,11
Standardna mišja hrana + <i>L.</i> <i>paracasei</i> 431 [®] + inovativna vlakna	0,36	0,41	-0,06

Rezultati ovog rada idu u prilog hipotezi o biomodulacijskim učincima prebiotika i probiotika jer je temeljem mikrobiološke analize sastav intestinalne mikrobiote u slučajevima kada su miševi hranjeni inovativnim sastojcima promijenjen. Ustanovljen je povećan broj poraslih kolonija korisnih bakterijskih vrsta BMK iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* nakon 5. dana u usporedbi s fekalnim sastavom mikrobiote u istih miševa hranjenih standardnom mišjom hranom (fecesi miševa uzorkovani 0. dan). Rezultati su u skladu s mnogim istraživanjima koja su ispitivala probiotičko djelovanje sojeva vrste *L. paracasei*, a koja su potvrdila modulaciju intestinalne mikrobiote i pozitivne učinke na zdravlje (Bengoa i sur., 2021; Hor i sur. 2019; Larsen i sur., 2019; Tarrah i sur., 2021).

Mnogi složeni biljni polisaharidi, prisutni u prehrani čovjeka, ne mogu se razgraditi probavnim enzimima u GIT-u uslijed nedovoljne količine hidrolitičkih enzima ili zbog netopivosti u probavnom sustavu. Ipak, pojedine bakterije intestinalne mikrobiote ih razgrađuju, a za njihov rast su značajni polisaharidi. Dva prebiotika koja se najčešće spominju u literaturi su fruktani inulin-tipa i GOS. Inulin pripada fruktanima inulin-tipa s dugačkim lancima fruktoze (stupanj polimerizacije 2-60) povezanih s β-2,1 vezama s terminalno alfa povezanom glukozom, a najčešće se dobiva biljnom ekstrakcijom (Wilson i Whelan, 2017). Njegovo najpoznatije prebiotičko djelovanje jest selektivno poticanje rasta bakterija roda *Bifidobacterium* (Vandeputte i sur., 2017; Wilson i Whelan., 2017), što se može uočiti i u dobivenim rezultatima u broju poraslih kolonija između 0. i 5. dana na hranjivoj podlozi TOS (Slika 16.), na kojoj je ujedno i najveća razlika promjene tog broja (Tablica 10.).

U prethodnim istraživanjima Laboratorija procjene laktogenog učinka pojedinih prehrambenih vlakana, definirana je inovativna mješavina prehrambenih vlakana koja ima

potencijal prebiotičkog supstrata te se istražuje kao specifičan sastojak proizvoda za enteralnu primjenu kod oboljelih od dijabetesa, malnutricije i kod onkoloških pacijenata. Prema dobivenim rezultatima, najveća razlika između broja porasta bakterija 0. i 5. dan nakon hranjenja miševa inovativnim vlaknima je upravo na MRS hranjivoj podlozi (Tablica 10.), što ukazuje na potencijalni laktogeni učinak inovativne formulacije.

Pripravak s kombinacijom probiotika i prebiotika (sinbiotik) dodatno stimulira i osigurava rast određenih intestinalnih mikroorganizama na razini soja i potiče metaboličku aktivnost koja može utjecati na zdravlje domaćina (Boger i sur., 2018). U slučaju kad bakterijske stanice imaju ograničenu sposobnost za iskorištavanje prebiotičkih spojeva FOS/inulina, prisutnost izvanstaničnog enzima, β -fruktozidaze može potaknuti daljnju razgradnju i tako poboljšati rast određenog probiotika na danom prebiotiku. Primjer istraživanja takve kombinacije probiotika i prebiotika koja je poboljšala rast drugog probiotika je rad Boger i sur. (2018) Najveći porast bakterijskog rasta primjenom sinbiotičkog pripravka standardne mišje hrane s probiotikom *L. paracasei* 431® i inovativnim vlaknima je na M-17 selektivnoj hranjivoj podlozi (Tablica 10.) što ukazuje na mogući potencijal za povećanje *Lactococcus* bakterijskih vrsta.

5.3. Metagenomička analiza

Mikrobiološke analize utemeljene na kultivaciji na selektivnim hranjivim podlogama su lako izvedive metode za rutinsku analizu ciljnih bakterijskih populacija. Iako mikrobiološke analize omogućuju uvid u zastupljenost pojedinih bakterijskih populacija u mikrobioti, sveobuhvatna karakterizacija uravnoteženog sastava intestinalne mikrobiote, primjenom novih tehnologija sekvenciranja dostupnih putem platforme Illumina MiSeq, HiSeq ili NovaSeq 6000 omogućuje nove spoznaje i predviđanje promjena u relativnoj zastupljenosti mikrobnih zajednica koje su povezane s poremećajima ili oboljenjima GIT-a. Prema najnovijim spoznajama ističe se i mogućnost predviđanja i bolesti izvan intestinalnog sustava, primjerice crijevno-mozgovne osi (eng. *gut-brain axis*) (Li i sur., 2017). U ovom radu primijenjen je pristup Illumina MiSeq sekvenciranja V4 varijabilnih 16S rRNA regija za određivanje sastava mikrobioma. Ova izrazito precizna metodologija uz optimiranje protokola omogućuje smanjenje pogreške na manje od jedan na tisuću sekvenciranih nukleotida.

Istraživanje prevalencije bakterijskih vrsta u fecesu miševa može pomoći u proučavanju intestinalnog mikrobioma ljudi. Intestinalni mikrobiom miša i čovjeka posjeduju sličnosti na taksonomskoj razini roda, ali su omjeri različiti. Unatoč tome, saznanja iz literature utvrdila su da je mikrobiom miševa funkcionalno sličan ljudskom. Prednost istraživanja biomodulacijskih učinaka na sastav mikrobioma na modelima miševa je stroga kontrola utjecaja vanjskih čimbenika na sastav mikrobioma poput genotipa, prehrane, lijekova, načina života što pojednostavljuje precizno promatranje interakcija između skupina intestinalnih bakterijskih

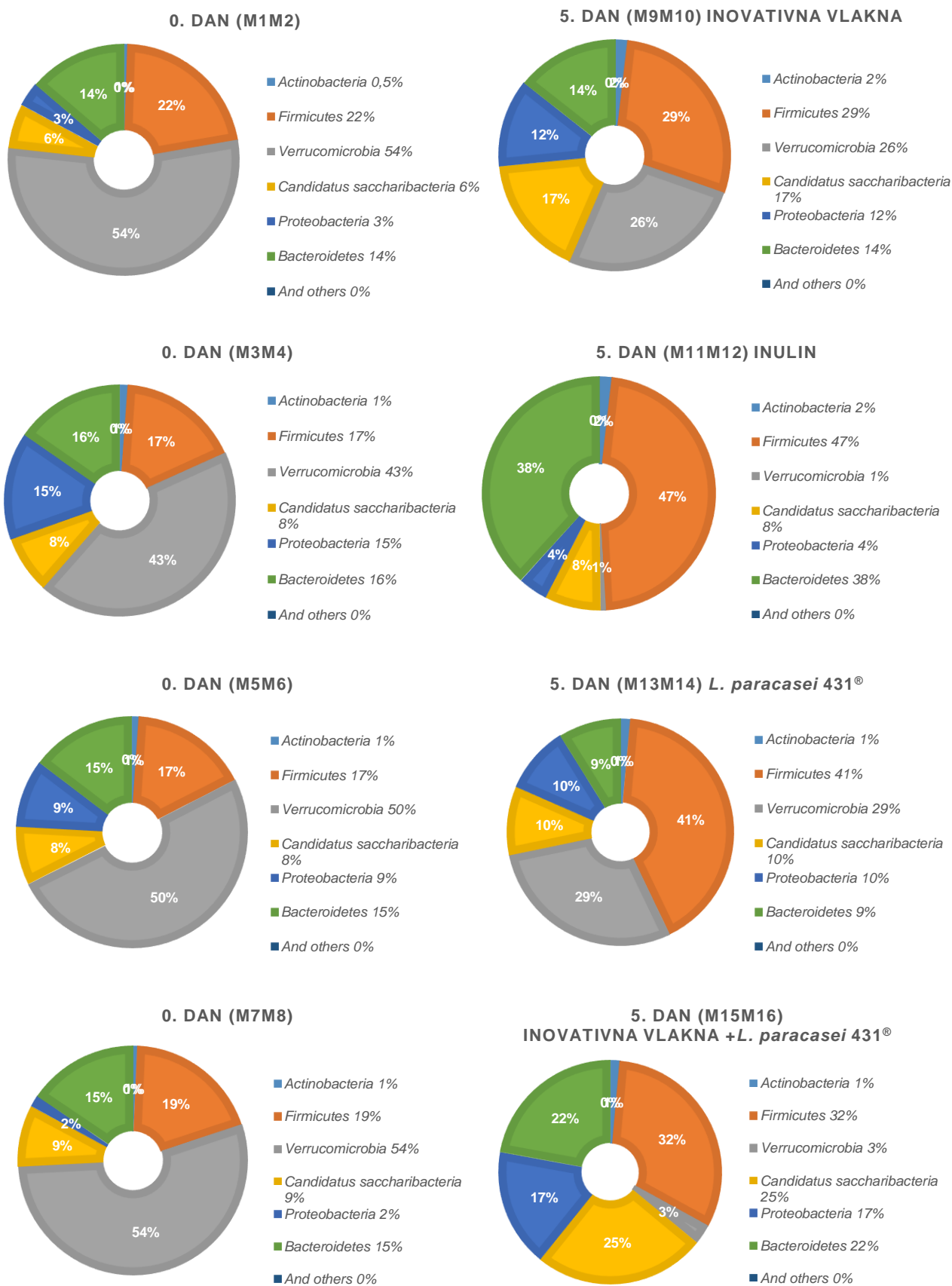
vrsta i njihove biomodulacije. Uz ovu prednost ističu se i mnogi zaključci proizašli iz istraživanja na miševima koji su potvrđeni u kasnijim kliničkim studijama (Wang i sur., 2019).

Prilikom istraživanja biomodulacijskih učinaka funkcionalnih dodataka na sastav intestinalne mikrobiote na animalnim modelima treba uzeti u obzir razlike u specifičnosti sastava mikrobnih populacija u usporedbi s intestinalnom mikrobiotom čovjeka s aspekta interpolacije rezultata. U ovom radu provedeno je preliminarno istraživanje u kojem su testirani miševi bili zdravi, a dobiveni rezultati služe kao polazište biomodulacijskih učinaka funkcionalnih hranjivih sastojaka za daljnja istraživanja specifičnih učinaka funkcionalnih dodataka, odnosno probiotika, prebiotika i sinbiotika te njihove povezanosti s pozitivnim utjecajima na zdravstveni status.

5.3.1. Metagenomička analiza na razini koljena

Usporedbom sastava intestinalnog mikrobioma pojedine skupine miševa prije samog hranjenja s jednim od četiri pripravka (0. dan), koji sadrže standardnu mišju hranu uz dodatak inovativne mješavine vlakana, inulina, probiotičkog soja *L. paracasei* 431[®], te sinbiotičkog pripravka *L. paracasei* 431[®] i inovativne mješavine vlakana, ustanovljene su statistički značajne promjene u relativnoj zastupljenosti pojedinih koljena (lat. *phylum*) (Slika 17.).

Dominantne bakterijske zajednice u intestinalnom mikrobiomu miševa identificirane visokopropusnim sekvenciranjem su *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* (Zhang i sur., 2015). Rezultati ovog rada su u skladu s istraživanjem Zhang i sur. (2015) jer prema metagenomičkoj analizi relativna zastupljenost *Verrucomicrobia* u intestinalnoj mikrobioti miševa iznosi 43%-54%, *Firmicutes* 17%-22%, te *Bacteroidetes* 14%-16%. Općenito, može se zaključiti da intervencija dodatkom prebiotika, probiotičkog soja ili sinbiotičkog pripravka na razini koljena ima biomodulacijski kapacitet jer se nakon intervencije pojedinim pripravkom mijenja sastav intestinalnog mikrobioma. Naime, unutar svih eksperimentalnih skupina miševa, prema rezultatima metagenomičke analize, ustanovljen je učinak povećanja relativne zastupljenosti na taksonomskoj razini koljena ***Firmicutes*** 5 dana nakon hranjenja s određenim pripravkom. Razlika u relativnoj zastupljenosti OTU za *Firmicutes* izražena kao postotak u skupini miševa hranjenoj uz dodatak inulina iznosila je +30%, uz dodatak *L. paracasei* 431[®] +24%, uz dodatak sinbiotičkog pripravka, odnosno kombinirane primjene *L. paracasei* 431[®] i inovativne mješavine vlakana +13%, te uz dodatak inovativne mješavine vlakana +7% u odnosu na iste miševe hranjene standardnom mišjom hranom (Slika 17.).



Slika 17. Prosječna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica (OTU) na razini koljena 0.dan (M1-M8) i 5 dana nakon hranjenja miševa s određenim pripravkom (M9-M16).

Oprečan učinak proizlazi iz analize rezultata relativne zastupljenosti bakterija iz koljena *Verrucomicrobia*. U radu Preidis i sur. (2015) koji su istraživali sastav intestinalnog mikrobioma neonatalnih miševa s proteinsko-energetskom malnutricijom, ustanovljeno je povećanje udjela koljena *Verrucomicrobia* u mikrobiomu pothranjenih miševa u odnosu na zdrave miševe uz specifično povećanje vrste *Akkermansia muciniphila*. Nadalje, SARS-CoV-2 infekcija, ili pojedine druge virusne infekcije inducirane u miševima, rezultirale su promjenama u sastavu intestinalne mikrobiote i posljedično povećanoj rasprostranjenosti koljena *Verrucomicrobia* i pripadajućeg roda *Akkermansia* (Seibert i sur., 2021). S druge strane, niz je istraživanja intestinalnog mikrobioma čovjeka koja upravo povećanje zastupljenosti roda *Akkermansia* povezuju s vitalnim osobama u usporedbi s pretilim pacijentima i osjetljivošću na inzulin. Naime, bakterije roda *Akkermansia* sintetiziraju kratkolančane masne kiseline, acetat i propionat, s protuupalnim učincima i utjecajem na oporavak crijevne barijere (Chen i sur., 2020). Iz uočenog smanjenja zastupljenosti koljena *Verrucomicrobia*, te povećane zastupljenosti *Firmicutes*, postignutog dodatkom svakog funkcionalnog hranjivog sastojka u ovom istraživanju, proizlazi mogući koristan učinak na sastav intestinalnog mikrobioma koji se treba dalje istražiti analizom kontrolne skupine i usporedbom s eksperimentalnim modelima u kojima su inducirane bolesti, odnosno metabolički poremećaji. Učinak je najočitiiji u skupini koja je hranjena standardnom mišjom hranom suplementiranom inulinom i sinbiotičkom mješavinom s udjelima *Verrucomicrobia* nakon petog dana od 1% za inulin, odnosno 3% za sinbiotik. Primjenom mješavine inovativnih vlakana udio *Verrucomicrobia* iznosi 26%, odnosno u slučaju *L. paracasei* 431® 29%.

Istraživanja provedena u eksperimentalnim modelima pothranjenih miševa, u usporedbi s mikrobiotom zdrave skupine miševa, ustanovila su smanjenu zastupljenost *Bacteroidetes*, što izravno proizlazi iz smanjenog rasta rodova *Bacteroides* i *Alistipes*, a objašnjava se smanjenjem iskorištenja neprobavljivih supstrata, poput glikana i fitata iz prehrane (Preidis i sur., 2015). Prema dobivenim rezultatima, biomodulacijski učinci prvenstveno očitani kroz promjene udjela bakterija iz koljena *Bacteroidetes* najviše variraju s obzirom na dodani funkcionalni hranjivi sastojak. Najznačajniji koristan učinak postignut je suplementacijom inulina, što je očekivano, jer proizlazi iz prebiotičkog učinka inulina koji je specifičan supstrat za fermentirajuće bakterijske vrste koljena *Bacteroidetes* (Kvakova i sur., 2021). Udio ovog koljena povećan je za približno 22% nakon 5 dana u odnosu na 0. dan, dok se udio nakon suplementacije sinbiotikom *L. paracasei* 431® i inovativnih vlakana povećao za 7%. Učinak dodatka inovativne mješavine vlakana ostao je nepromijenjen (14%), a dodatak probiotika *L. paracasei* 431® rezultirao je relativnim smanjenjem brojnosti za 6%, što upućuje na značaj združene primjene u formulaciji sinbiotika.

Bakterijske porodice koje pripadaju **Bacteroidetes** i **Firmicutes** ključne su u metabolizmu neprobavljenih hranjivih sastojaka. *Firmicutes* značajno doprinose hidrolizi ugljikohidrata i proteina u crijevima, dok *Bacteroidetes* većinom djeluju na steroidne polisaharide i žučne kiseline, što potpomaže apsorpciju polisaharida i sintezu proteina (Song i sur., 2019). Metagenomičkim analizama intestinalne mikrobiote pretilih osoba i oboljelih od dijabetesa ustanovljeno je da je omjer koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* veći u usporedbi sa zdravim osobama (Magne i sur., 2020). Niz istraživanja provedenih na životinjama ili s ljudima potvrdio je korelaciju između povećanog udjela *Bacteroidetes* u fecesu s gubitkom tjelesne mase i *Firmicutes* s razvojem pretilosti. Međutim, rezultati pojedinih istraživanja su oprečni, stoga učinak povećane zastupljenosti *Bacteroidetes* koljena u mikrobioti i dalje treba razjasniti. Magne i sur. (2020) ustanovili su povećanje vrijednosti omjera koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* u intestinalnom mikrobiomu pretilih miševa uslijed povećanog energetskeg iskorištenja konzumirane hrane. Bakterijske vrste koljena *Firmicutes* utječu na povećavanje razine upalnih parametara, a time i na upalne procese u pacijenata oboljelih od dijabetesa tipa 2. U istom radu istraživao se i utjecaj probiotika na omjer *Firmicutes* i *Bacteroidetes* u pretilih miševa s predijabetičkim stanjem. Prema istraživanju može se zaključiti da je suplementacija probiotičkim sojem utjecala na promjenu omjera u korist zastupljenosti *Bacteroidetes* koljena i značajno usporavanje progresije dijabetesa. S obzirom na to da su u ovom radu ispitivani miševi bili zdravi, povećanje zastupljenosti *Firmicutes* i *Bacteroidetes* koljena nakon suplementacije funkcionalnim hranjivim sastojcima ne može se povezati s rizikom od razvoja povećane tjelesne mase i oboljenja nastalih kao posljedica pretilosti. Vrijednosti omjera nisu značajno povećane, osim u slučaju dodatka soja *L. paracasei* 431[®] (*Firmicutes* : *Bacteroidetes* = 41% : 9%). Povećanje udjela ovih koljena u fecesu testiranih miševa nakon 5 dana može se povezati s doprinosom bioraznolikosti mikrobioma. Rezultati proizašli iz istraživanja Song i sur. (2019), koje je pratilo utjecaj sinbiotika sa sadržajem laktuloze na sastav mikrobioma zdravih miševa, pokazali su povećani udio *Firmicutes* kao i kod primjene mješavine inovativnih vlakana u sinbiotiku u ovom radu, ali udio *Bacteroidetes* i *Proteobacteria* bio je smanjen, što je suprotno dobivenim rezultatima ovog rada.

Za razliku od rezultata suplementacije laktulozom, inovativna vlakna u ovom istraživanju specifično su povećala udio ***Proteobacteria*** i ***Candidatus saccharibacteria***, što dokazuje važnost preciznog definiranja sadržaja formulacije prebiotika kao supstrata za intestinalni mikrobiom. Modulacijski učinak inovativnih vlakana na sastav *Proteobacteria* nakon 5 dana primjene suprotan je modulacijskom učinku prebiotika inulina, dok *L. paracasei* 431[®] nije značajno utjecao na modulaciju zastupljenosti *Proteobacteria*. Sličan biomodulacijski učinak uočen je nakon primjene sinbiotika. Štoviše, nakon 5 dana primjene sinbiotika, porast *Proteobacteria* i *Candidatus saccharibacteria* bio je još izraženiji (povećanje *Proteobacteria* za 15% i povećanje *Candidatus saccharibacteria* za 16%), što ukazuje na moguće značajnije

učinke na sastav intestinalnog mikrobioma koji nastaju kao posljedica kombiniranja probiotičkog soja s prebiotičkom mješavinom inovativnih vlakana ispitivanom u ovom radu. S obzirom na to da dodatak inulina i *L. paracasei* 431[®] zasebno nije rezultiralo ovakvom modulacijom sastava mikrobiote, ovo saznanje implicira na moguće selektivno iskorištenje mješavine inovativnih vlakana kao supstrata od strane bakterijskih vrsta koljena *Proteobacteria* i *Candidatus saccharibacteria* za vlastiti rast. Koljeno *Proteobacteria* jedno je od prvih kolonizatora GIT-a sisavaca. Proteobakterije smanjuju redoks potencijal i imaju ključnu ulogu u pripremi intestinalnog mikrobioma za kasniju kolonizaciju isključivim anaerobnim mikroorganizmima, neophodnima za zdravu funkciju crijeva. Primjena BMK kao probiotika u istraživanju Gryaznova i sur. (2022) rezultirala je povećanjem *Proteobacteria* u sastavu zdravog intestinalnog mikrobioma miševa što se povezuje s pozitivnim utjecajem na zdravlje miševa. U drugom istraživanju, gdje je promatran biomodulacijski učinak dodatka prehrambenog vlakna β -glukana na sastav mikrobioma u zdravih miševa, također je došlo do povećanja relativne zastupljenosti *Proteobacteria*. Iako koljenu *Proteobacteria* pripadaju potencijalni patogeni, njihovo povećanje brojnosti u intestinalnom mikrobiomu ispitivanih miševa nije značajno utjecalo na promjenu koncentracije acetata i butirata (Luo i sur., 2017). *Candidatus saccharibacteria* je nedovoljno istraženo koljeno koje čini značajan udio mikrobioma sisavaca, a najčešće se povezuje s oralnim bolestima (Nie i sur., 2022). Istraživanje s ciljem identifikacije rasta bakterijskih vrsta unutar intestinalnog mikrobioma krava, selektivno stimuliranog dodatkom celuloze, rezultiralo je uočljivim porastom bakterijskih vrsta koje pripadaju *Candidatus saccharibacteria* što ukazuje na mogući specifični biomodulacijski učinak određenih prehrambenih vlakana upravo na te bakterije (Opdahl i sur., 2018). Probiotički soj u sinbiotiku moguće da je pridonio modulaciji i većem udjelu koljena *Firmicutes* (32%) u odnosu na suplementiranje inovativnim vlaknima zasebno (29%), a inkorporacija inovativnih vlakana u sinbiotiku vjerojatno je pridonijela većem udjelu koljena *Bacteroidetes* (22%), u odnosu na odvojenu primjenu *L. paracasei* 431[®] (9%).

5.3.2. Metagenomička analiza na razini porodica i rodova

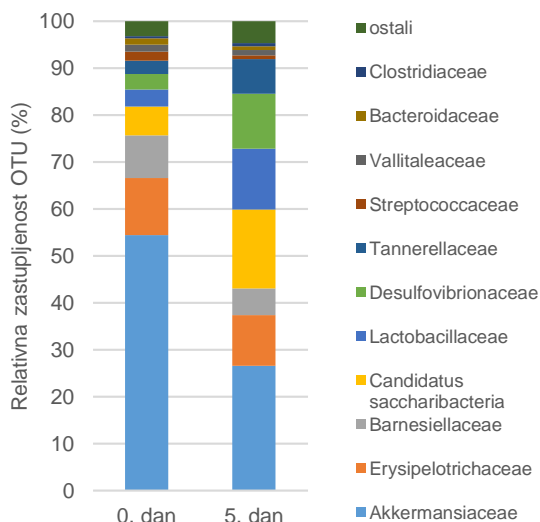
Metagenomičkom analizom uzoraka fecesa provedenom primjenom pristupa Illumina MiSeq sekvenciranja V4 varijabilnih 16S rRNA, na taksonomskoj razini porodica i rodova, identificirane su 44 različite porodice, odnosno 67 različitih rodova. Bakterijske porodice i rodovi u najznačajnijim udjelima prikazani su s obzirom na 0. i 5. dan, odnosno prije i nakon primjene funkcionalnih pripravaka dodanih standardnoj mišjoj hrani (Slike 18. i 19.). Identificirani rodovi u intestinalnoj mikrobioti miševa, hranjenih isključivo standardnom hranom, u najznačajnijim udjelima su: *Akkermansia* (43-54%), *Allobaculum* (7-12%), *Barnesiella* (8-10%), *Desulfovibrio* (3-15%) *Candidatus saccharimonas* (6-9%), *Lactobacillus* (2-6%), *Parabacteroides* (3-5%), *Bacteroides* i *Lactococcus* (~1%), a brojnost ostalih rodova

je manja od 1%. Rezultati proizašli metagenomičkom analizom u ovom radu uglavnom su u skladu su s literaturnim podacima. Prema Gryaznova i sur. (2022), dominantni bakterijski rodovi identificirani 16S rRNA sekvenciranjem u fecesu zdravih miševa su: *Akkermansia*, *Barnesiella*, *Tanerella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Allistipes*, *Desulfovibrio*, *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Allobaculum*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lactococcus*, *Intestinimonas*, *Prevotella*, *Muribaculum* i rodovi porodice *Lachnospiraceae*.

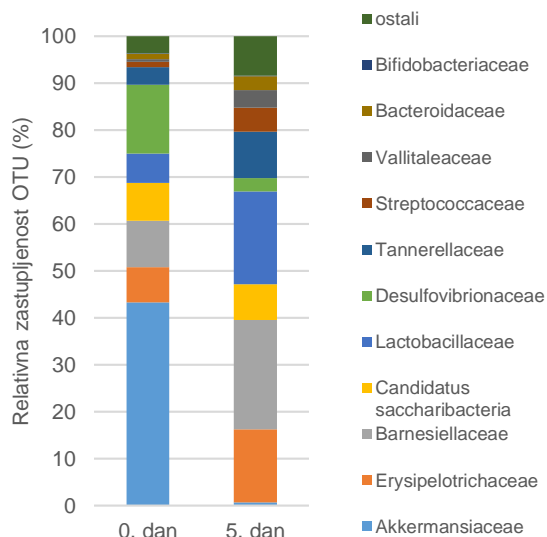
U dobivenim rezultatima (Slike 18. i 19.), općenito je uočljiv značajan porast bioraznolikosti identificiranih bakterijskih rodova i porodica sveukupnog sastava intestinalne mikrobiote nakon primjene određenog funkcionalnog pripravaka. Veća bioraznolikost intestinalne mikrobiote miševa sugerira pozitivni biomodulacijski potencijal mješavine inovativnih vlakana, inulina, *L. paracasei* 431® i sinbiotičke mješavine inovativnih vlakana s *L. paracasei* 431®. Trend koji prati dodatak svakog funkcionalnog hranjivog sastojka jest smanjenje udjela porodice *Akkermansiaceae* i roda *Akkermansia* i povećanje zastupljenosti porodice *Lactobacillaceae* i roda *Lactobacillus*, s time da najznačajniji biomodulacijski učinak na porodicu *Akkermansiaceae* i rod *Akkermansia* ima dodatak sinbiotika (relativno smanjenje udjela za 52%), a na *Lactobacillaceae* i *Lactobacillus* primjena probiotičkog soja *L. paracasei* 431® (relativno povećanje udjela za 18%).

Utjecaj smanjenja udjela ***Akkermansia*** na poboljšanje zdravlja u zdravim miševima, zbog nedovoljno podataka iz literature, nije moguće utvrditi. Većina istraživanja pripadnike roda *Akkermansia* povezuje s potencijalnim terapijskim učincima, jer povećanje njihove zastupljenosti ima protuupalno djelovanje i utječe na poboljšanje zdravlja uslijed metaboličkih poremećaja. Njihova visoka zastupljenost također se povezuje sa zdravim crijevima u ranoj, ali i kasnijoj fazi života (Deloule i sur., 2020). Potrebno je provesti daljnja istraživanja s ciljem razmatranja utjecaja smanjenja *Akkermansia* u zdravom mikrobiomu nakon primjene inovativnih hranjivih sastojaka na kasniji potencijal razvoja bolesti. Zanimljivo, iako je prema dobivenim rezultatima nakon primjene funkcijskih pripravaka prisutnost roda *Akkermansia* bila smanjena, zabilježen je porast udjela korisne vrste *Akkermansia muciniphila* u slučaju inulina, *L. paracasei* 431® te u slučaju sinbiotika, što doprinosi kvaliteti selektivne stimulacije rasta korisnih vrsta. Pripadnica roda *Akkermansia*, *Akkermansia muciniphila* je gram-negativna bakterijska vrsta, nužna za održavanje intestinalne imunosne homeostaze, povećanje integriteta crijevnog epitela, čija se brojnost standardno povećava nakon konzumacije fermentabilnih ugljikohidrata i hrane bogate polifenolima, te se smatra potencijalnim probiotikom nove generacije (Deloule i sur., 2020).

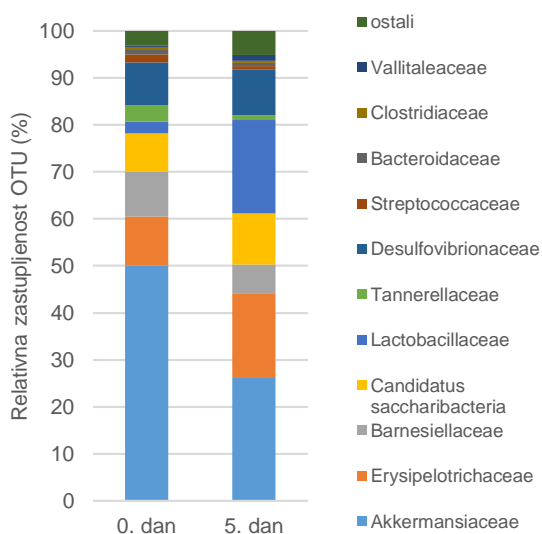
standardna hrana + inovativna vlakna



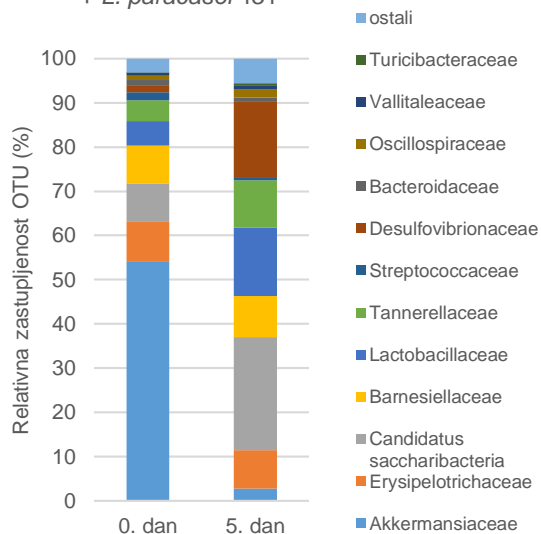
standardna hrana + inulin



standardna hrana + *L. paracasei* 431®

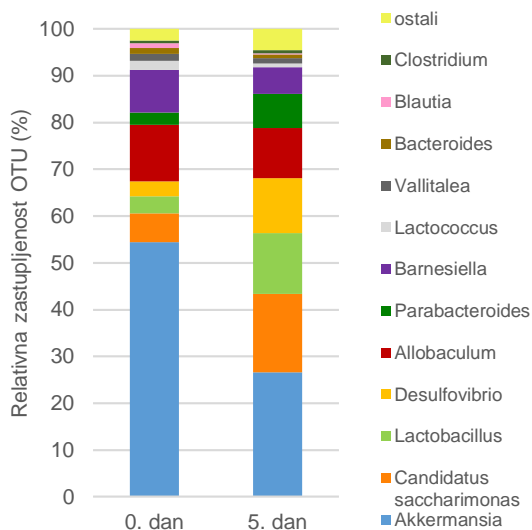


standardna hrana + inovativna vlakna + *L. paracasei* 431®

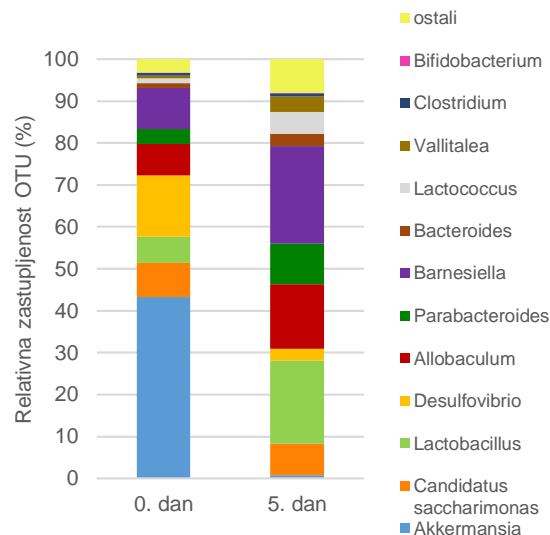


Slika 18. Relativna zastupljenost OTU na razini porodice 0. dan i 5. dan, odnosno prije i nakon hranjenja miševa standardnom mišjom hranom uz dodatak određenog funkcionalnog pripravka.

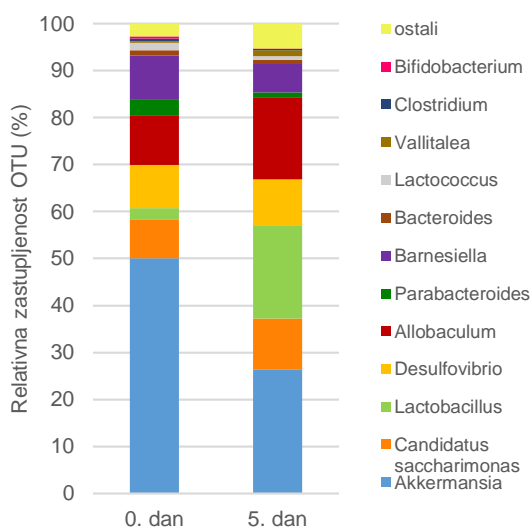
standardna hrana + inovativna vlakna



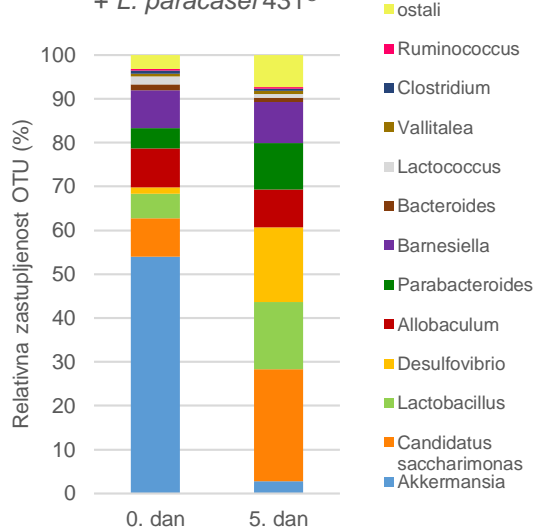
standardna hrana + inulin



standardna hrana + *L. paracasei* 431®



standardna hrana + inovativna vlakna + *L. paracasei* 431®



Slika 19. Relativna zastupljenost OTU na razini roda 0. dan i 5. dan, odnosno prije i nakon hranjenja miševa sa standardnom mišjom hranom uz dodatak određenog funkcionalnog pripravka.

S druge strane, intenzivnim istraživanjem zdravstvenih potencijala pripadnika roda ***Lactobacillus*** ustanovljeno je da je povećanje njegove brojnosti u intestinalnom mikrobiomu životinja, ali i ljudi korisna. Vrste roda *Lactobacillus* imaju protuupalne učinke, djeluju imunoregulatorno u procesu pregradnje kostiju posredovanom osteoklastima i osteoblastima, a sintezom kratkolančanih masnih kiselina održavaju homeostazu između domaćina i mikroorganizama na površini sluznice crijeva te time osiguravaju pravilnu funkciju crijevne epitelne barijere. Zastupljenost *Lactobacillus* roda, osim suplementacijom u obliku probiotika, može se povećati i redovitom konzumacijom fermentiranih namirnica u kojima je njihova

prisutnost prirodna (Gomaa i sur., 2020). Povećanje udjela *Lactobacillus* roda zabilježeno metagenomičkom analizom, u skladu je s rezultatima dobivenim mikrobiološkom analizom porasta broja *Lactobacillus* kolonija na MRS selektivnoj hranjivoj podlozi (Tablica 10. i Slika 14.). Najznačajniji laktogeni učinak postignut probiotičkim sojem implicira na relativno uspješnu adaptaciju *L. paracasei* 431[®] na nepovoljne uvjete GIT-a, epitelnu adheziju i kolonizaciju. Kombiniranjem *L. paracasei* 431[®] s mješavinom inovativnih vlakana u obliku sinbiotika, postignut je izraženiji biomodulacijski učinak na *Lactobacillus* u odnosu na odvojenu primjenu inovativnih vlakana, što je moguća posljedica prisutnog probiotičkog soja. Bez obzira na izraženiji učinak sinbiotika i probiotika, suplementacija prebiotcima inulinom i mješavinom inovativnih vlakana doprinijela je značajnom laktogenom učinku čime su se potvrdili svojstveni mehanizmi djelovanja prebiotika i potencijal primjene inovativnih vlakana, korištenih u ovom radu, za daljnja istraživanja u stimulaciji rasta korisnih bakterija unutar intestinalnog mikrobioma životinja i ljudi. Vrste *Lactobacillus johnsonii* i *Lactobacillus reuteri* su dominantne vrste roda *Lactobacillus* identificirane metagenomičkom analizom. BMK *Lactobacillus johnsonii* i *Lactobacillus reuteri* karakterizira modulacija intestinalnog mikrobioma mehanizmima eliminacije i inhibicije rasta te kolonizacija patogena i redukcija proupalnih citokina (Mu i sur., 2018; Tavella i sur., 2018; Zhang i sur., 2019).

Uz rod *Lactobacillus*, najistraživaniji bakterijski rod sa zdravstvenim benefitima je ***Bifidobacterium***. Prisutnost ovog roda u fecesu testiranih miševa nije bila značajna ni 0. dan, a ni 5 dana nakon dodatka funkcionalnih hranjivih sastojaka. Njihov se udio 5 dana nakon primjene inovativnih vlakana, probiotika i sinbiotika smanjio, što se ne može povezati s povoljnim učinkom na sastav mikrobiote. Dodatkom prehrambenih vlakana u normalnoj prehrani potiču se protuupalni procesi u domaćinu. Protuupalni procesi povezani su s povećanjem brojnosti rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* koji selektivno iskorištavaju prehrambena vlakna za vlastiti rast i sintezu metabolita s antimikrobnim i protuupalnim djelovanjem. Više probiotičkih dodataka promatranih u radu Kuo (2018), uključujući i sojeve rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, djelovali su protuupalno isključivo u prisutnosti vlakana. Primjena inulina prema dobivenim rezultatima, jedina je rezultirala biomodulacijskim učinkom s povećanjem udjela roda *Bifidobacterium* (porast zastupljenosti s 0,05% na 0,1%) što je očekivano zbog karakterističnog bifidogenog učinka inulina potvrđenog i rezultatima prethodne mikrobiološke analize (Tablica 10. i Slika 16.).

Ostali zastupljeni bakterijski rodovi u značajnim udjelima su *Allobaculum*, *Barnesiella*, *Candidatus saccharimonas*, *Desulfovibrio*, *Parabacteroides* i *Lactococcus*. Promjene u njihovim udjelima nakon biomodulacijskih učinaka postignutih funkcionalnim hranjivim sastojcima variraju. Uočljiv je relativno oprečan učinak inovativnih vlakana i inulina. Inovativna vlakna utjecala su na relativno smanjenu prisutnost rodova *Allobaculum* (-2%), *Barnesiella* (-

4%) i *Lactococcus* (-1%), te relativno povećanu prisutnost *Candidatus saccharimonas* (+11%) i *Desulfovibrio* (+9%), dok je primjena inulina na sastav intestinalnog mikrobioma rezultirala suprotnim učinkom (porast *Allobaculum* za 8%, *Barnesiella* za 13%, *Lactococcus* za 4% te smanjenje *Desulfovibrio* za 12% i *Candidatus saccharimonas* za manje od 1%). Vjerojatne razlike u sastavu i vrsti veza unutar ugljikohidratnih lanaca ova dva prebiotika ukazuju na moguću stimulaciju metaboličke aktivnosti različitih bakterijskih rodova. U jednom i drugom slučaju relativno je porastao udio roda *Parabacteroidete* i to primjenom inovativnih vlakana za 4%, a primjenom inulina za 6%.

Učinci bakterijskih vrsta roda ***Lactococcus*** na zdravlje crijeva nisu prepoznate poput vrsta unutar rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Fermentirani mliječni proizvodi izvor su BMK koje pripadaju rodu *Lactococcus*. Pojedine vrste roda *Lactococcus* imaju potencijalna protuupalna djelovanja i sudjeluju u redukciji oksidativnog stresa crijevnog epitela u miševa s induciranim kolitisom (Gryaznova i sur., 2022). Prema rezultatima proizašlim iz ovog rada, porast njihovog udjela u intestinalnom mikrobiomu testiranih miševa opažen je jedino nakon petodnevne primjene inulina što bi se moglo povezati s prednostima primjene ovog prebiotika. ***Parabacteroides*** rod je relativno nedavno definirani novi rod i pripada porodici *Tannerellaceae* unutar koljena *Bacteroidetes*. Pojedini sojevi roda *Parabacteroides* komensalne su bakterije i imaju moguću obrambenu ulogu u poremećajima poput multiple skleroze, dijabetesa tipa 2, kolorektalnog karcinoma i upalnih bolesti crijeva. Također, u istraživanjima se spominju i potencijalne probiotičke uloge u regulaciji sastava intestinalne mikrobiote životinja, ali i ljudi. Njihova dominantna prisutnost u mikrobioti označava zdravu funkciju crijeva (Cuffaro i sur., 2020). Primjena djelomično hidrolizirane guar gume kao prebiotika u prehrani ispitanika u radu Carlson i sur. (2016) posljedično je stimulirala kolonizaciju *Parabacteroides* i *Bacteroides* roda, što je moguće u korelaciji s pozitivnim zdravstvenim ishodima prehranbenih vlakana kao prebiotika. Prema dobivenim rezultatima u ovom radu, suplementacija inulinom uz rod *Parabacteroides*, utjecala je i na relativni porast brojnosti ***Bacteroides*** (+2%), što je u skladu s Tablicom 3. i navedenim specifičnim mikroorganizmima koji selektivno iskorištavaju inulin kao supstrat.

Primjena probiotičkog soja *L. paracasei* 431[®] relativno je smanjila je udio *Parabacteroides* u sastavu intestinalnog mikrobioma, ali u obliku sinbiotičkog pripravka taj učinak bio je obratan. Inovativna vlakna u kombinaciji s *L. paracasei* 431[®] moguće da su utjecala na porast udjela rodova *Parabacteroides*, *Desulfovibrio* te smanjila prisutnost roda *Allobaculum*. Međutim, značajnija modulacija učinaka na udjele ovih rodova bila je postignuta primjenom inovativnih vlakana. Isto tako, odvojenom primjenom *L. paracasei* 431[®] postignut je intenzivniji laktogeni učinak. Općenito je dodatak sinbiotika imao najznačajniji biomodulacijski učinak na rodove *Akkermansia* (smanjenje udjela za ~52%) i *Candidatus saccharimonas* (povećanje udjela za

~17%) u odnosu na njihovu odvojenu primjenu, gdje se udio *Akkermansia* smanjio za ~28% u slučaju inovativnih vlakana i za ~24% u slučaju *L. paracasei* 431[®], a *Candidatus saccharimonas* uvećao za ~10%, odnosno za ~3%. S obzirom na ostale pripravke funkcionalnih hranjivih sastojaka, ističe se porast zastupljenosti roda *Ruminococcus*. Literaturni podaci o koristima ovog roda su kontradiktorni. S jedne strane, pripadnici roda *Ruminococcus* povezuju se s rizikom razvoja pretilosti i povećana prisutnost u intestinalnom mikrobiomu je u pozitivnoj korelaciji s razvojem sindroma iritabilnog crijeva, dok, s druge strane, zbog sinteze butirata imaju potencijalnu ulogu u smanjenju rizika za razvoj karcinoma, stimulaciji imunosnog sustava i protuupalnom djelovanju (Gryaznova i sur., 2022).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata i provedenih analiza može se zaključiti sljedeće:

- *L. paracasei* 431[®] i inulin iskazuju različiti stupanj inhibicijskog djelovanja prema odabranim patogenim bakterijama. Time je potvrđeno antimikrobno djelovanje kao značajno funkcionalno svojstvo i jedan od temeljnih mehanizama za modulaciju sastava intestinalne mikrobiote.
- Biomodulacijski učinak primijenjene inovativne mješavine vlakana usporediv je s učinkom koji proizlazi iz bifidogenog i laktogenog učinka prebiotika inulina, te se temeljem mikrobiološke analize bakterijske populacije korisnih komensalnih bakterija može pretpostaviti da iskazuju prebiotički učinak.
- Metagenomičkom analizom primjenom metode nove generacije sekvenciranja dokazan je biomodulacijski učinak jer je prema rezultatima intervencija probiotičkim sojem, odnosno prebiotikom inulinom, inovativnom mješavinom vlakana, te združenom primjenom kao sinbiotičkog pripravka *L. paracasei* 431[®] i inovativne mješavine vlakana, utjecala na promjenu relativne zastupljenosti OTU već na razini koljena, gdje je najizraženiji efekt ustanovljen kroz povećanje udjela *Firmicutes* vrsta. Na razini roda najznačajniji učinak rezultira porastom udjela bakterija iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* te povećanjem udjela mukus-razgrađujuće bakterije *Akkermansia muciniphila* koja se istražuje kao nova generacija probiotika.
- Povećana zastupljenost bakterija iz roda *Lactobacillus* u intestinalnoj mikrobioti eksperimentalnih životinja upućuje na uspješnu adaptaciju alohtonog soja *L. paracasei* 431[®] u GIT miša, a time i na mogućnost kolonizacijskog potencijala *in vivo* te manipulacije sastava intestinalnog mikrobioma.
- Biomodulacijski učinci probiotika *L. paracasei* 431[®] te inulina i mješavine inovativnih vlakana kao prebiotika, ali i sinbiotika, temelj su za daljnja istraživanja potencijalne suplementaciju u obliku dodataka prehrani.
- Rezultati ovog istraživačkog okvira mogu se koristiti kao polazna osnova istraživanja za definiranje specifičnih sastojaka inovativne hrane za enteralnu primjenu, u sklopu razvoja preciznih probiotičkih sojeva unutar koncepta personalizirane medicine.

7. ZAHVALE

Zahvaljujemo se prvenstveno našoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Novak na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici te stručnom vodstvu kroz sve faze izrade ovog rada. Hvala Vam na izdvojenom vremenu, nesebičnoj podršci i na svim savjetima koji će nam svakako koristiti i u budućnosti.

Također se zahvaljujemo asistentici Katarini Butorac, mag. ing., pomoći tijekom izrade i obrade eksperimentalnog dijela rada, te prof. dr. sc. Blaženki Kos, doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc i Nini Čuljak, mag. ing.

Hvala i svim članovima Laboratorija za metabolizam i starenje Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Tihomira Baloga na gostoprimstvu i pomoći.

Na kraju, jedno veliko hvala našim obiteljima i prijateljima na motivaciji, bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom izrade i pisanja ovog rada.

8. LITERATURA

- Abdalla, A.K., Ayyash, M.M., Olaimat, A.N., Osaili, T.M., Al-Nabulsi, A.A., Shah, N.P. i sur. (2021) Exopolysaccharides as antimicrobial agents: Mechanism and spectrum of activity. *Front. Microbiol.* **12**: 664395.
- Allonsius, C.N., van den Broek, M.F., De Boeck, I., Kiekens, S., Oerlemans, E.F., Kiekens, F. i sur. (2017) Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. *Microb. Biotechnol.* **10**(6): 1753-1763.
- Barber, T.M., Kabisch, S., Pfeiffer, A.F., Weickert, M.O. (2020) The health benefits of dietary fibre. *Nutrients.* **12**(10): 3209.
- Bengoa, A.A., Dardis C., Garrote, G.L., Abraham, A.G. (2021) Health-Promoting Properties of *Lacticaseibacillus paracasei*: A Focus on Kefir Isolates and Exopolysaccharide-Producing Strains. *Foods.* **10**(10): 2239.
- Boger, M.C.L., Lammerts van Bueren, A., Dijkhuizen, L. (2018) Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular *exo*-Inulinase of *Lactobacillus paracasei* Strain W20. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**: 1539-18.
- Butorac, K., Novak, J., Bellich, B., Terán, L.C., Banić, M., Leboš Pavunc, A. i sur. (2021) Lyophilized alginate-based microspheres containing *Lactobacillus fermentum* D12, an exopolysaccharides producer, contribute to the strain's functionality *in vitro*. *Microb. Cell Fact.* **20**: 85.
- Carlson, J., Gould, T., Slavin, J. (2016) In vitro analysis of partially hydrolyzed guar gum fermentation on identified gut microbiota. *Anaerobe.* **42**: 60-66.
- Chen, K., Zhao, H., Shu, L., Xing, H., Wang, C., Lu, C. i sur. (2020) Effect of resveratrol on intestinal tight junction proteins and the gut microbiome in high-fat diet-fed insulin resistant mice. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **71**(8): 965-978.
- Clarke, G., Sandhu, K.V., Griffin, B.T., Dinan, T.G., Cryan, J.F., Hyland, N.P. (2019) Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions. *Pharmacol. Rev.* **71**(2): 198-224.
- Clifford, M.N. (2004) Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Med.* **70**: 1103-1114.
- Collins, M.D., Phillips, B.A., Zanoni, P. (1989) Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 105-108.

Cuffaro, B., Assouhoun, A.L., Boutillier, D., Súkeníková, L., Desramaut, J., Boudebouze, S. i sur. (2020) In vitro characterization of gut microbiota-derived commensal strains: selection of *Parabacteroides distasonis* strains alleviating TNBS-induced colitis in mice. *Cells*. **9**(9): 2104.

Cunningham, M., Azcarate-Peril, M.A., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D. i sur. (2021) Shaping the future of probiotics and prebiotics. *Trends Microbiol.* **29**(8): 667-685.

De Filippis, F., Pasolli, E., Ercolini, D. (2020) The food-gut axis: lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health. *FEMS Microbiol. Rev.* **44**: 454-489.

Deloule, V., Boisset, C., Hannani, D., Suau, A., Le Gouellec, A., Chroboczek, J. i sur. (2020) Prebiotic role of softwood hemicellulose in healthy mice model. *J. Funct. Food.* **64**: 103688.

Enam, F., Mansell, T.J. (2019) Prebiotics: tools to manipulate the gut microbiome and metabolome. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **46**(9-10): 1445-1459.

Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J. 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.

Gomaa, E.Z. (2020) Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **113**(12): 2019-2040.

González, S.N., Apella, M.C., Romero, N.C., Nader de Macías, M.E, Oliver, G. (1993) Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. *J. Food Protect.* **56**(9): 773-776.

Gryaznova, M., Dvoretzkaya, Y., Burakova, I., Syromyatnikov, M., Popov, E., Kokina, A. i sur. (2022) Dynamics of Changes in the Gut Microbiota of Healthy Mice Fed with Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Microorganisms.* **10**(5): 1020.

Hijova, E., Bertkova, I., Stofilova, J. (2019) Dietary fibre as prebiotics in nutrition. *Cent. Eur. J. Public Health.* **27**: 251-255.

Hor, Y.Y., Lew, L.C., Jaafar, M.H., Lau, A.S.Y., Ong, J.S., Kato, T. i sur. (2019) *Lactobacillus* sp. improved microbiota and metabolite profiles of aging rats. *Pharmacol. Res.* **146**: 104312.

Hutkins, R. W., Krumbeck, J. A., Bindels, L. B., Cani, P. D., Fahey Jr, G., Goh, Y. J. i sur. (2016) Prebiotics: why definitions matter. *Curr. Opin. Biotech.* **37**: 1-7.

HZJZ (2022) *Dijabetes*. HZJZ – Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-prevenција-nezaraznih-bolesti/odjel-za->

[koordinaciju-i-provodenje-programa-i-projekata-za-prevenciju-kronicnih-nezaraznih-bolest/dijabetes/](#)> pristupljeno: 20. lipnja 2022.

ISAPP (2019) Prebiotics. ISAPP – The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, <<https://isappscience.org/for-scientists/resources/prebiotics/>> pristupljeno: 10. lipnja 2022.

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 gastrointestinal pathophysiology* (Floch, M.H., Ringel, Y. i Wilker, W.A., ured.), Academic Press, London/San Diego/Cambridge/Oxford, str. 99-108.

Kerry, R.G., Kumar Patra, J., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S., Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* **26**(3): 927-939..

Klek, S., Krznaric, Z., Gundogdu, R. H., Chourdakis, M., Kekstas, G., Jakobson, T. i sur. (2015) Prevalence of malnutrition in various political, economic, and geographic settings. *JPEN-Parenter Enter.* **39**(2): 200-210.

Kuo, S.M. (2018) Does modification of the large intestinal microbiome contribute to the anti-inflammatory activity of fermentable fiber? *Current developments in nutrition.* **2**(2): nzx004.

Kvakova, M., Bertkova, I., Stofilova, J., Savidge, T. C. (2021) Co-Encapsulated Synbiotics and Immobilized Probiotics in Human Health and Gut Microbiota Modulation. *Foods.* **10**(6): 1297.

Larsen, N., de Souza, C., B., Krych, L., Kot., W., Leser, T., D., Sorensen, O. B. i sur. (2019) Effect of potato fiber on survival of *Lactobacillus* species at simulated gastric conditions and composition of the gut microbiota *in vitro*. *Food Res. Int.* **125**: 108644.

Li, D., Chen, H., Mao, B., Yang, Q., Zhao, J., Gu, Z. i sur. (2017) Microbial biogeography and core microbiota of the rat digestive tract. *Sci. Rep.* **7**(1): 1-16.

Lucas, N., Legrand, R., Deroissart, C., Dominique, M., Azhar, S., Le Solliec, M.A. i sur. (2019) *Hafnia alvei* HA4597 strain reduces food intake and body weight gain and improves body composition, glucose, and lipid metabolism in a mouse model of hyperphagic obesity. *Microorganisms.* **8**(1): 35.

Luo, Y., Zhang, L., Li, H., Smidt, H., Wright, A.D.G., Zhang, K. i sur. (2017) Different types of dietary fibers trigger specific alterations in composition and predicted functions of colonic bacterial communities in BALB/c mice. *Front. Microbiol.* **8**: p.966.

- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P. i sur. (2020) The firmicutes/bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients?. *Nutrients*. **12**(5): 1474.
- Mathur, H., Beresford, T.B., Cotter, P.D. (2020) Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*. **12**: 1679.
- Medrano, M., Hamet, M.F., Abraham, A.G., and Pérez, P.F. (2009) Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. *Anton. Leeuw*. **96**: 505-513.
- Mu, Q., Tavella, V.J., Luo, X. M. (2018) Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Front. Nutr*. **9**: 757.
- Nie, J., Utter, D.R., Kerns, K.A., Lamont, E.I., Hendrickson, E.L., Liu, J. i sur. (2022) Strain-Level Variation and Diverse Host Bacterial Responses in Episymbiotic Saccharibacteria. *Msystems*. **7**(2): e0148821.
- Novak, J., Butorac, K., Leboš Pavunc, A., Banić, M., Butorac, A., Lepur, A., i sur. (2021) A Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules*. **27**(1): 160.
- O'Toole, P., Marchesi, J., Hill, C. (2017) Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat. Microbiol*. **2**: 17057.
- Opdahl, L.J., Gonda, M.G., St-Pierre, B. (2018) Identification of uncultured bacterial species from *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *CANDIDATUS* Saccharibacteria as candidate cellulose utilizers from the rumen of beef cows. *Microorganisms*. **6**(1): 17.
- Penava L. (2022) Razvoj nutraceutičkih proizvoda s probioticima. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska.
- Preidis, G.A., Ajami, N.J., Wong, M.C., Bessard, B.C., Conner, M.E., Petrosino, J.F. (2015) Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. *J. Nutr. Biochem*. **26**: 1050-1057.
- Riaz Rajoka, M.S., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C. i sur. (2018) Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *LWT*. **89**: 638-647.
- Riaz Rajoka, M.S., Wu, Y., Mehwish, H.M., Bansal, M., Zhao, L. (2020) *Lactobacillus* exopolysaccharides: new perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. *Trends Food Sci. Technol*. **103**: 36-48.

Roberfroid, M.B. (2008) Prebiotics: concept, definition, criteria, methodologies, and products. U: *Handbook of Prebiotics* (Gibson, G.R. i Roberfroid, M.B., ured.), CRC Press, Boca Raton/London/New York, str. 40-41.

Rossi, M., Martinez, D., M., Amaretti, A., Ulrici, A., Raimondi, S., Moya, A. (2016) Mining metagenomic whole genome sequences revealed subdominant but constant *Lactobacillus* population in the human gut microbiota. *Environ.* **8**: 399-406.

Ruan, W., Engevik, M.A., Spinler, J.K., Versalovic, J. (2020) Healthy human gastrointestinal microbiome: composition and function after a decade of exploration. *Digest. Dis. Sci.* **65**(3): 695-705.

Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R., Rastall, R.A. (2019) Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Reviev. Gastroentero.* **16**(10): 605-616.

Satokari, R. (2019) Modulation of gut microbiota for health by current and next-generation probiotics. *Nutrients.* **11**: 1921.

Seibert, B., Cáceres, C.J., Cardenas-Garcia, S., Carnaccini, S., Geiger, G., Rajao, D.S. i sur. (2021) Mild and severe SARS-CoV-2 infection induces respiratory and intestinal microbiome changes in the K18-hACE2 transgenic mouse model. *Microbiol. Spectr.* **9**: e00536-21.

Sergeev, I. N., Aljutaily, T., Walton, G., Huarte, E. (2020) Effects of Synbiotic Supplement on Human Gut Microbiota, Body Composition and Weight Loss in Obesity. *Nutrients.* **12**(1): 222.

Song, M., Zeng, J., Jia, T., Gao, H., Zhang, R., Jiang, J. i sur. (2019) Effects of sialylated lactulose on the mouse intestinal microbiome using Illumina high-throughput sequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**(21): 9067-9076.

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., Elinav, E. (2019) The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nat. Med.* **25**(5): 716-729.

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. Gastro. Hepat.* **17**: 687-701.

Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo.* **47**: 57-73.

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 prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **4**: 77-84.

- Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* **39**: 227-235.
- Tarrah., A., dos Santos Cruz., B.C., Sousa Dias, R., da Silva Duarte, V., Pakroo, S., Licursi de Oliveira, L. i sur. (2021) *Lactobacillus paracasei* DTA81, a cholesterol-lowering strain having immunomodulatory activity, reveals gut microbiota regulation capability in BALB/c mice receiving high-fat diet. *J. Appl. Microbiol.* **131**: 1942-1957.
- Vandeputte, D., Falony G., Viera-Silva, S., Wang, J., Sailer, M., Theis, S. i sur. (2017) Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut.* **0**: 1-7.
- Veiga, P., Suez, J., Derrien, M., Elinav, E. (2020) Moving from probiotics to precision probiotics. *Nat. Microbiol.* **5**(7): 878-880.
- Verdenelli, M.C., Ghelfi, F., Silvi, S., Orpianesi, C., Cecchini, C., Cresci., A. (2009) Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur. J. Nutr.* **48**: 355-63.
- Wang, J., Lang, T., Shen, J., Dai, J., Tian, L., Wang, X. (2019) Core gut bacteria analysis of healthy mice. *Front. Microbiol* **10**: 887.
- Weickert, M.O., Pfeiffer, A.F. (2008) Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J. Nutr.* **138**: 439-442.
- Wieërs, G.J., Belkhir, L., Enaud, R., Philippart de foy, J., Dequenne, I., De timary, P. i sur. (2020) How Probiotics Affects The Microbiota. *Front. Cell. Infect. Mi.* **9**: 454.
- Williams, N.T. (2010) Probiotics. *Am.J. Health-Syst. Ph.* **67**(6): 449-458.
- Wilson, B., Whelan, K. (2017) Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32**: 64-68.
- Yan, F., Liu, L., Dempsey, P.J., Tsai, Y.H., Raines, E.W., Wilson, C.L. i sur. (2013) A *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived soluble protein, p40, stimulates ligand release from intestinal epithelial cells to transactivate epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **288**: 30742-30751.
- Yu, T., Zheng, Y.P., Tan, J.C., Xiong, W.J., Wang, Y., Lin, L. (2017) Effects of prebiotics and synbiotics on functional constipation. *Am. J. Med. Sci.* **353**(3): 282-292.
- Zhang, C., Derrien, M., Levenez, F., Brazeilles, R., Ballal, S. A., Kim, J. i sur. (2016) Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *ISME J.* **10**(9): 2235-2245.

Zhang, H., Sparks, J.B., Karyala, S.V., Settlage, R., Luo, X.M. (2015) Host adaptive immunity alters gut microbiota. *ISME J.* **9**(3): 770-781.

Zhang, W., Wang, J., Zhang, D., Liu, H., Wang, S., Wang, Y., Ji, H. (2019) Complete genome sequencing and comparative genome characterization of *Lactobacillus johnsonii* ZLJ010, a potential probiotic with health-promoting properties. *Front. Genet.* **10**: 812.

Zhou, Y., Cui, Y., Qu, X. (2019) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydr. Polym.* **207**: 317-332.

Zmora, N., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Mor, U., Dori-Bachash, M., Bashiardes, S. i sur. (2018) Personalized gut mucosal colonization resistance to empiric probiotics is associated with unique host and microbiome features. *Cell.* **174**(6): 1388-1405.

9. SAŽETAK

Lana Novković, Valentina Tušek

Biomodulacijski učinak sinbiotika na sastav intestinalne mikrobiote

Probiotici i prebiotici ili njihova združena primjena u formulaciji sinbiotika, intenzivno se istražuju kao mikrobne strategije za modulaciju intestinalnog mikrobioma u disbiozi. *Lactocaseibacillus paracasei* 431[®] je modelna probiotička bakterija i jedan od najbolje opisanih probiotičkih sojeva. U ovom radu, nakon karakterizacije antimikrobne aktivnosti *L. paracasei* 431[®], kao temeljnog mehanizma funkcionalnog djelovanja, te inhibicijskog potencijala prebiotičkih supstrata, fokus istraživanja je *in vivo* potencijal da soj pojedinačno i u sinbiotičkom pripravku s inovativnom mješavinom vlakana, modulira sastav intestinalne mikrobiote, u usporedbi s učincima inulina i probiotičkog soja *L. paracasei* 431[®]. Za mikrobnu profiliranje intestinalne mikrobiote primijenjene su mikrobiološke analize ciljnih populacija korisnih komensalnih bakterijskih vrsta. Metagenomička analiza sastava intestinalnog mikrobioma utemeljena je na najnovijoj tehnologiji sekvenciranja putem Illumina MiSeq platforme. Biomodulacijski učinak inovativne mješavine vlakana i sinbiotika u usporedbi s inulinom i *L. paracasei* 431[®], na sastav intestinalne mikrobiote ispitan je na animalnom modelu zdravih miševa soja C57BL/6. Prema dobivenim rezultatima, *L. paracasei* 431[®] inhibira rast kariogenog soja *Streptococcus mutans* ATCC 25175, enteropatogene *Salmonella enterica* s. Typhimurium FP1 i sporogene *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Mikrobiološka analiza potvrdila je da dodatak inulina, inovativne mješavine vlakana, *L. paracasei* 431[®] i sinbiotičke formulacije u standardnu mišju hranu utječe na broj poraslih kolonija *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Lactococcus* u intestinalnoj mikrobioti. Metagenomičkom analizom ustanovljeno je da intervencija probiotičkim sojem, odnosno prebiotikom inulinom, inovativnom mješavinom vlakana, te združenom primjenom sinbiotičkog pripravka *L. paracasei* 431[®] i inovativne mješavine vlakana, utječe na promjenu omjera bakterija intestinalne mikrobiote, već na razini koljena, gdje se najizraženiji efekt očituje kroz povećanje udjela *Firmicutes* i smanjenje *Verrucomicrobia*. Pri tome je najizraženiji učinak na razini roda evidentan povećanjem relativne zastupljenosti OTU *Lactobacillus* vrsta u intestinalnoj mikrobioti skupine hranjene uz dodatak svih funkcionalnih pripravaka. Ovo upućuje na laktogeni učinak, a time i mogućnost manipulacije sastava intestinalnog mikrobioma *in vivo*. Prema rezultatima, u skupini hranjenoj s dodatkom inulina ostvareno je značajno povećanje i roda *Bifidobacterium* čime je potvrđen bifidogeni učinak. Zanimljivo je da je ustanovljeno povećanje vrste *Akkermansia muciniphila* koja se istražuje kao nova generacija probiotika. Rezultati ovog istraživanja doprinose preliminarnim istraživanjima za razvoj inovativnih nutritivnih medicinskih proizvoda s ciljem primjene u enteralnoj prehrani.

Ključne riječi: intestinalni mikrobiom, laktogeni učinak, sinbiotici, prebiotici, probiotici

10. SUMMARY

Lana Novković, Valentina Tušek

Synbiotics as biomodulators of intestinal microbiome composition

Probiotics and prebiotics, or their combined use as synbiotics, are being intensively investigated as microbial-based therapies for modulating the intestinal microbiome during dysbiosis. *Lactobacillus paracasei* 431[®] is a model of probiotic bacteria and among the most documented probiotic strains. In this work, after following the characterization of antimicrobial activity of *L. paracasei* 431[®], and the inhibitory potential of prebiotic substrates, the focus was put *in vivo* potential of the strain to, individually or combined as a synbiotic with an innovative mixture of fibers, modulate the intestinal microbiota by comparing the effects with those of inulin and strain alone. For microbial profiling of the intestinal microbiota, the microbiological analyses of target populations of beneficial commensal bacterial species were undertaken. Metagenomic analysis of the composition of the intestinal microbiome is based on the next generation sequencing provided by the Illumina MiSeq platform. The biomodulation capacity of innovative fibers and synbiotics, compared to inulin and *L. paracasei* 431[®], on the composition of the intestinal microbiota, was investigated in an experimental model of healthy mice of C57BL/6 strain. According to the results, *L. paracasei* 431[®] inhibits the growth of the cariogenic strain *Streptococcus mutans* ATCC 25175, enteropathogenic *Salmonella enterica* s. Typhimurium FP1 and sporogenic *Bacillus subtilis* ATCC 6633. According to microbiological analysis, the addition of inulin, an innovative fiber mixture, *L. paracasei* 431[®] and synbiotic formulations to the standard mice diet positively affected the count of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Lactococcus*. Metagenomic analysis showed that intervention with probiotic strain, or inulin, innovative fiber mixture, and their combined application, modulated the ratio of intestinal bacteria, at the *phylum* level, where the most pronounced effect is evident through increase in *Firmicutes* and decrease in *Verrucomicrobia*. The most prominent effect at the genus level is manifested by the increase in the relative abundance of *Lactobacillus* species in the intestinal microbiota in the group fed with any of functional formulations. This suggests a lactogenic effect, and thus the possibility of manipulating the intestinal microbiome *in vivo*. According to the results obtained in the inulin-fed group, a significant increase in the *Bifidobacterium* spp. was found, which confirmed the bifidogenic effect. Interestingly, an increase in the *Akkermansia muciniphila* abundance, which is being investigated as the next generation of probiotics, was observed. The results of this research contribute to preliminary research for the development of innovative nutritional medical products with a potential application in enteral nutrition.

Key words: gut microbiome, lactogenic effect, synbiotics, prebiotics, probiotics