

NAPREDEK IN IZZIVI V RAZVOJU ŽIVIH BIOTERAPEVTSKIH IZDELKOV

PROGRESS AND CHALLENGES IN THE DEVELOPMENT OF LIVE BIOTHERAPEUTIC PRODUCTS

AVTORICE / AUTHORS:

asist. Nina Katarina Grilc, mag. farm.
izr. prof. dr. Špela Zupančič, mag. farm.
zaslužna prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko tehnologijo,
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:
E-mail: julijana.kristl@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Koža in sluznice ljudi in živali naseljuje veliko število mikroorganizmov, vključno z bakterijami, glivami, paraziti in virusi, ki jih skupno imenujemo mikrobiota. Milijoni let evolucije so privedli do simbiotskega razmerja med gostiteljem in mi-

POVZETEK

Koža in sluznice so naseljene z mikrobioto, ki ima ključno vlogo pri ohranjanju zdravja, saj lahko njeno neravnovesje povzroči različne bolezni. Probiotiki prispevajo k ponovni vzpostavitvi mikrobiotskega ravnovesja z različnimi mehanizmi, med katerimi so preprečevanje naselitve patogenov, modulacija imunskega sistema in krepitev zaščitne funkcije sluznic. V prispevku so obravnavani tradicionalni probiotiki ter probiotiki nove generacije, namenjeni uporabi v živih bioterapevtskih izdelkih. Za izdelavo le-teh so ključni ustrezna izbira sevov, njihova specifična karakterizacija, izbira metode sušenja in prilagoditev formulacije za vsak sev posebej. Kakovosten izdelek s probiotiki mora vsebovati zadostno količino živih bakterij, ki morajo ohraniti njihovo biološko aktivnost od vgradnje v formulacijo, shranjevanja do dostave na tarčno mesto. Kljub hitremu znanstvenemu napredku pa prav visoka stopnja preživetja nekaterih sevov še vedno predstavlja tehnološki izziv, ki je opisan v pričujočem članku. Probiotiki nove generacije obetajo velik potencial pri preprečevanju in zdravljenju nekaterih infekcijskih in vnetnih bolezni, kar je razvidno iz intenzivnih raziskav na tem področju.

KLJUČNE BESEDE:

probiotiki, živi bioterapevtski izdelki, sušenje, enkapsulacija, testiranje probiotikov, načrtovanje formulacij

ABSTRACT

The skin and mucous membranes are inhabited by microbiota, which play a crucial role in maintaining health, as its imbalance can lead to various diseases. Probiotics contribute to restoring microbiota balance through mechanisms such as inhibiting pathogen colonization, modulating the immune system, and strengthening the protective function of mucous membranes. This paper discusses traditional probiotics as well as next-generation probiotics designed for use in live biotherapeutic products. Their development requires appropriate strain selection, specific characterization, drying method optimization, and formulation adaptation for each strain. A quality probiotic product must contain sufficient live bacteria that retain their biological activity



from incorporation into the formulation, through storage, to delivery at the target site. Despite fast scientific advances, ensuring the high survival rate of some strains remains a technological challenge addressed in the present article. Next-generation probiotics hold great promise for the prevention and treatment of some infectious and inflammatory diseases, as evidenced by intensive research in this field.

KEY WORDS:

probiotics, live biotherapeutic products, drying, encapsulation, probiotic testing, formulation design

kroorganizmi, v katerem mikrobiota prispeva k številnim fiziološkim procesom gostitelja, gostitelj pa mikroorganizmom zagotavlja prostor in hranila, potrebna za njihovo preživetje. V zadnjem desetletju je znanstveno razumevanje vpliva mikrobiote na zdravje ljudi močno napredovalo. Večina raziskav je bila usmerjena na mikrobioto črevesja, kjer so ugotovili, da glavni prispevki mikrobiote vključujejo prebavo in fermentacijo ogljikovih hidratov, proizvodnjo vitaminov, preprečevanje kolonizacije patogenov in interakcije z imunskim odzivom (1). Nedavno so raziskovalci svojo pozornost usmerili tudi na druge mikrobiote, vključno z mikrobioto ustne votline, kože, vagine in zgornjega dela dihal (2, 3). Sestava mikrobiote ne izkazuje le pozitivnega vpliva na zdravje ljudi, vendar lahko deluje tudi negativno, saj v primeru disbioze, tj. povečane prisotnosti patogenih ali škodljivih v primerjavi s koristnimi mikroorganizmi, močno prispeva k razvoju različnih lokalnih infekcijskih in vnetnih bolezni. Ker trenutne raziskave kažejo na povezavo med črevesno mikrobioto, imunskim sistemom in številnimi organi v človeškem telesu, lahko disbioza prispeva tudi k nastanku sistemskih bolezni, kot so alergije, sladkorna bolezen tipa 2, debelost in nevrodegenerativne bolezni. Posledično sedanje raziskave mikrobiote dajejo zelo informativne rezultate, ki prispevajo k razumevanju nastanka številnih bolezni in s tem tudi novim strategijam zdravljenja (2, 3).

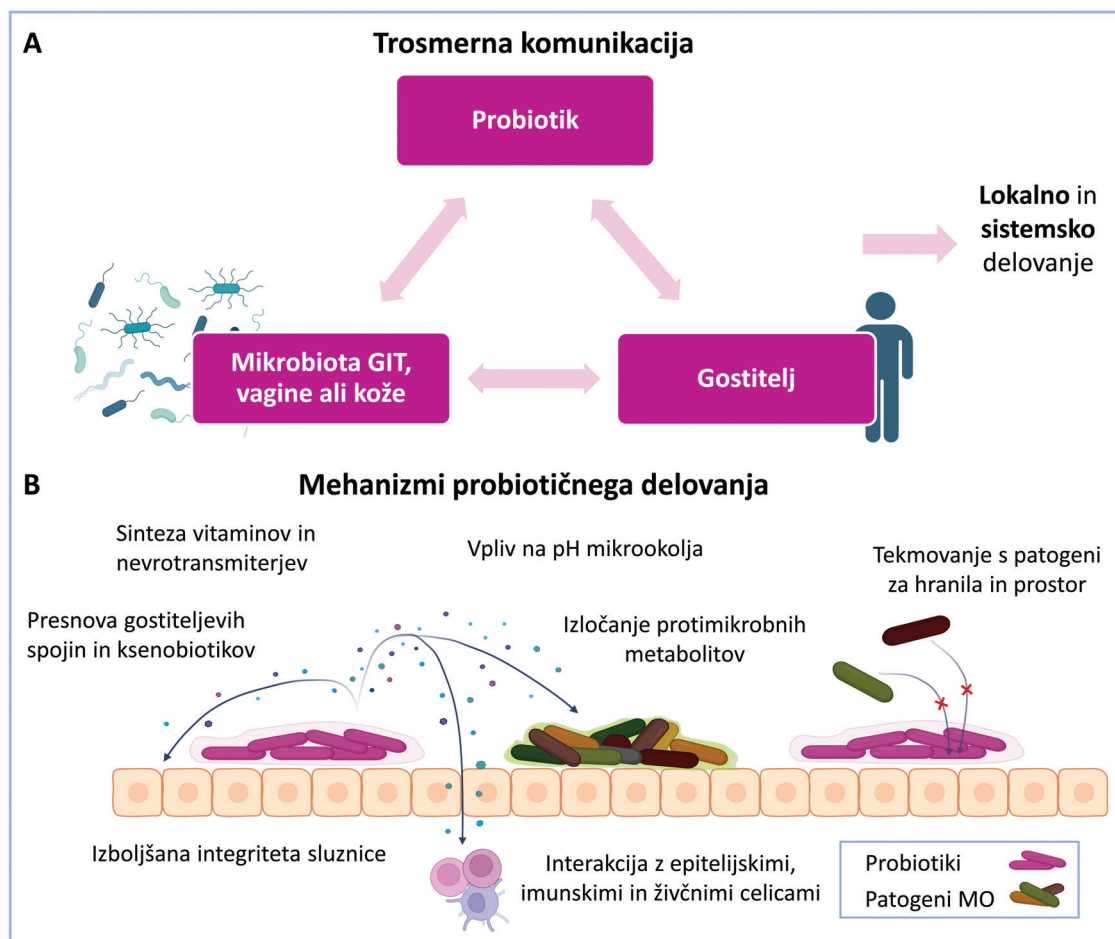
2 OD TRADICIONALNIH DO PROBIOTIKOV NASLEDNJE GENERACIJE

Ugodne učinke fermentirane hrane poznamo že tisočletja, konec 19. stoletja pa so znanstveniki odkrili, da so zanje za-

služne prav koristne bakterije oz. probiotiki. Uporaba slednjih za podporo splošnemu zdravju in preprečevanje ali zdravljenje črevesnih bolezni tako ni novost, pri čemer so probiotiki za ta namen izvirali sprva iz fermentiranih živil, kasneje pa so bili tudi izolirani iz zdrave črevesne mikrobiote. V zadnjih desetletjih probiotike uporabljamo tudi za zdravljenje in preprečevanje drugih z disbiozo povezanih bolezni, kot so vaginalne okužbe, parodontitis ter ekcem in atopijski dermatitis. Poleg tega pri slednjih prehajamo na uporabo avtohtonih probiotičnih sevov, izoliranih iz zdrave mikrobiote tarčnih področij. Za vaginalne okužbe je najpogostejše raziskovan v zdravi vaginalni mikrobioti prevladujoč *Lactobacillus crispatus*, za zdravljenje ekcema in atopijskega dermatitisa pa so npr. raziskovali kožni komezal *Staphylococcus hominis* (4–6).

Mehanizmi probiotičnega delovanja v glavnem slonijo na preprečevanju oz. odpravljanju disbioze z delovanjem proti patogenom. Slednje temelji na sproščanju sekundarnih metabolitov probiotikov s protibakterijskim ali protiglivičnim delovanjem in tekmovanju s patogeni za hranila ter sluznične površine, na voljo za adhezijo ter kolonizacijo. Poleg tega nekateri metaboliti, ki jih sproščajo probiotiki, izboljšujejo pregradno funkcijo sluzničnih epitelijev, nekateri pa izkazujejo imunomodulatorno delovanje in zavirajo hiperaktivni imunski odziv gostitelja, značilen za vnetne bolezni, kot sta parodontitis in kolitis (slika 1) (3, 7).

Hiter razvoj na področju odkrivanja in vrednotenja novih probiotikov je omogočil tudi napredek v tehnikah in pristopih za presejanje ter karakterizacijo potencialnih probiotičnih sevov, kot npr. napredek bioinformatike, podrobne raziskave metaboloma, tj. celotnega nabora metabolitov dotičnega preiskovanega seva, ter sekvenciranje naslednje generacije. To omogoča odkrivanje novih terapevtskih sevov oz. probiotikov naslednje generacije, katerih uporaba ni nujno osnovana na dolgoletni zgodovini uporabe (8, 9). Podrobna karakterizacija sevov postaja aktualna tudi zaradi vedno strožjih regulatornih zahtev. Tako Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (FDA) kot Evropska farmakopeja sta v zadnjih 10 letih namreč uvedli termin »živi bioterapevtski izdelki« (angl. *live biotherapeutic products*, LBP), ki lahko pridobijo dovoljenje za promet kot zdravila za zdravljenje specifičnih bolezni, vendar morajo biti v njih vključeni terapevtski sevi podrobno ovrednoteni. To vključuje identifikacijo na ravni vrste in seva ter ustrezno fenotipizacijo in genotipizacijo, za katero je zahtevano sekvenciranje celotnega genoma. Slednje je med drugim ključno za potrditev varnosti LBP, kar vključuje odsotnost genov za virulencne dejavnike in genov, ki nakazujejo na možnost prenosa odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam na tarčno mikrobioto (8, 10). Urad FDA je že odobril prva dva LBP, Rebyota™ in VOWST™ (11). Poleg probiotikov, LBP, živih tera-



Slika 1: Delovanje probiotikov na gostitelja. A) Kompleksna trosmerna komunikacija med probiotiki, mikrobioto in gostiteljem, ki na zdravje slednjega vpliva tako na lokalni kot sistemski ravni. B) Mehanizmi probiotičnega delovanja na ravni celic in tkiv. GIT – gastrointestinalni trakt; MO – mikroorganizmi. Celotna slika B in posamezni deli slike A so izdelani s programom Biorender.

Figure 1. Probiotic action on the host. A) Complex three-way communication between probiotics, microbiota, and the host, which affects both local and systemic levels. B) Mechanisms of probiotic activity on the cellular and tissue level. Figure B in its entirety and parts of Figure A were created in Biorender.

pevtskih bakterij in probiotikov naslednje generacije se v literaturi pojavljajo tudi izrazi, kot so prebiotiki, postbiotiki in sinbiotiki, ki so za boljše razumevanje predstavljeni v preglednici 1. Probiotične bakterije se lahko uporabljajo same, v kombinaciji s prebiotiki in sinbiotiki ali mešane z drugimi probiotičnimi sevi, da za izboljšanje učinka tvorijo konzorcij (tj. združba različnih bakterij, ki sodelujejo pri opravljanju določenih funkcij ali oblikovanju biofilma).

Za namen izboljšanja terapevtske učinkovitosti in varnostnega profila probiotičnih sevov, lahko slednje tudi gensko modificiramo. Varnostna tveganja lahko odpravimo z izbitjem genov za virulenco, poleg tega pa lahko uvedemo gene za encime s terapevtskim delovanjem ter citotoksične spojine z delo-

vanjem proti rakavim celicam ali imunomodulatorne snovi, kot so kemokini in citokini. Tako trenutno razvijajo več novih gensko spremenjenih bakterijskih sevov za zdravljenje raka in presnovnih bolezni (12, 13).

3 TEHNOLOŠKI VIDIK IZDELAVE ŽIVIH BIOTERAPEVTSKIH IZDELKOV

Pri izdelavi končnega izdelka s probiotiki oz. živimi terapevtskimi bakterijami moramo vgraditi zadostno količino

*Preglednica 1: Definicija izrazov, povezanih s koristnimi mikroorganizmi za zdravje (14).
Table 1: Definition of terms related to microorganisms beneficial for health (14).*

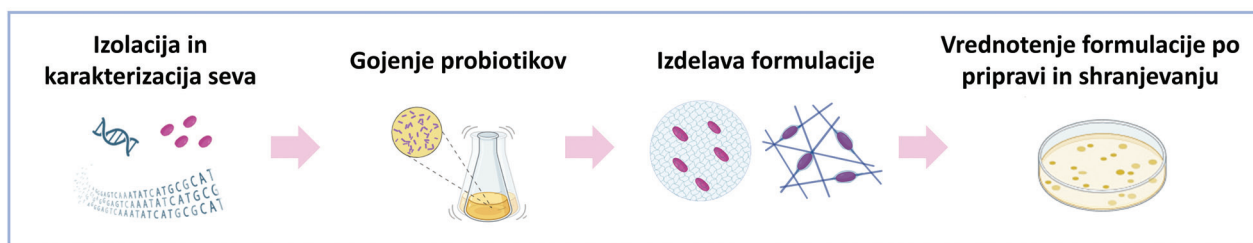
Probiotiki: živi mikroorganizmi, ki pri uporabi v ustreznih odmerkih koristno delujejo na zdravje gostitelja. Prebiotiki: neživi substrati, ki delujejo kot hranila za koristne mikroorganizme mikrobiote gostitelja, pri čemer med slednje spadajo tako namensko zaužiti probiotični sevi kot stalno prisotni komenzalni mikroorganizmi. Postbiotiki: pripravki iz neživih mikroorganizmov in/ali njihovih komponent s koristnim delovanjem na zdravje gostitelja. Sinbiotiki: pripravki s koristnim delovanjem na zdravje gostitelja, sestavljeni iz mešanice živih koristnih mikroorganizmov (probiotikov) in substratov, ki jih lahko selektivno izkoriščajo samo koristni mikroorganizmi. Probiotike, prebiotike, postbiotike in sinbiotike kot opisane zgoraj definira Mednarodna znanstvena organizacija za probiotike in prebiotike (<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>, ISAPP). Probiotiki naslednje generacije (angl. <i>next-generation probiotics</i>): mikroorganizmi, katerih terapevtsko delovanje je bilo odkrito in potrjeno izven okvira dolgotrajne uporabe, običajno s pomočjo modernih metod za mikrobiološko karakterizacijo. Živi bioterapevtski izdelki (angl. <i>live biotherapeutic products, LBP</i>): pripravki, ki vsebujejo žive mikroorganizme (ene vrste ali njihov konzorcij) s terapevtskim ali preventivnim delovanjem proti človeškim boleznim. Žive terapevtske bakterije (angl. <i>live therapeutic bacteria</i>): žive bakterije, ki predstavljajo aktivno komponento LBP.

bakterij in ohraniti njihovo biološko aktivnost. To vključuje zagotavljanje visoke stopnje bakterijskega preživetja med vgradnjo bakterij v dostavni sistem, shranjevanjem končnega izdelka ter izpostavitvijo bakterij neugodnim dejavnikom (npr. pH ali prebavnim encimom) v človeškem telesu po uporabi (15, 16). Za terapevtsko učinkovitost je namreč ključnega pomena, da na tarčnem mestu delovanja dosežemo potrebno visoke odmerke živih in biološko aktivnih terapevtskih bakterij. Po tem, ko se iz dostavnega sistema sprostijo probiotične celice, morajo slednje namreč reaktivirati želeno presnovno aktivnost, se deliti in vsaj prehodno kolonizirati tarčna mesta (12, 17). Zagotavljanje visoke stopnje preživetja v končnem izdelku predstavlja velik izziv zaradi strukturne in funkcionalne kompleksnosti bakterijskih celic. Poleg vrste, števila in živosti vhodnih terapevtskih bakterij je preživetje odvisno tudi od sestave formulacije in tehnološkega procesa izdelave dostavnega sistema oz. končnega izdelka (slika 2) (16, 18). Dolgotrajno ohranjanje bakterijske živosti zahteva zaustavitev bakterijskega metabolizma za preprečevanje litičnih procesov, saj le-ti vodijo k razgradnji bakterijske celične stene ali membrane in posledično do smrti celice (19, 20). Najpogostejša pristopa, ki se uporabljata za ta namen, sta krioprezervacija (zamrzovanje) in sušenje. Krioprezervacija je metoda izbora

na laboratorijski ravni, njeno širšo uporabo pa omejujejo izzivi pri povečevanju velikosti serij ter zahteve za vzdrževanje hladne verige (21). Za izdelavo končnih izdelkov je zato primernejši pristop ohranjanje živosti na osnovi sušenja.

3.1 SUŠENJE PROBIOTIKOV

Princip ohranjanja bakterijske živosti s sušenjem temelji na prehodu živih bakterij v stanje zaustavljenega metabolizma, imenovano anhidrobioza. Anhidrobioza na osnovi sušenja omogoči dolgotrajno preživetje bakterij pri shranjevanju nad nizkimi temperaturami, potrebnimi za krioprezervacijo. Poznamo različne metode sušenja, vsem pa sta skupna naslednja dejavnika stresa na bakterijske celice: dehidracija in z njo povezan intenziven osmotski šok. Ob dehidraciji namreč prihaja do odstranitve vode, ki je sicer vezana na polarne skupine proteinov in fosfolipidov. To vodi v njihovo entropijsko preurejanje na molekularni ali supramolekularni ravni, zaradi česar prihaja do porušenia funkcionalnih struktur proteinov in fosfolipidnih dvoslojev. Osmotski šok oz. bistveno zviševanje znotrajcelične koncentracije osmotsko aktivnih snovi, do katerega prihaja zaradi dehidracije bakterijskih celic med sušenjem, pa lahko povzroči tudi njihovo plazmolizo in s tem celično smrt (19, 20). Dodaten stres



Slika 2: Ključni koraki pri razvoju izdelka s probiotiki, ki lahko vsebuje probiotike, vgrajene v hidrofilno ogrodje (mikrokapsul ali zrnč) ali v nanovlakna. Slika je izdelana s programom Biorender.

Figure 2: Key steps in the development of a probiotic product, which may involve incorporating probiotics into a hydrophilic matrix (of microcapsules or granules) or embedding them within nanofibers. Figure was created in Biorender.

za posušene bakterije predstavlja še rehidracija, kateri so izpostavljene med rekonstitucijo oz. raztapljanjem suhega končnega izdelka pred administracijo ali med samo administracijo suhega izdelka, ko le-ta pride v stik s fiziološkimi tekočinami, npr. v črevesnem soku ali vaginalni tekočini. Tudi med rehidracijo namreč prihaja do osmotskega stresa na bakterijske celice, poleg tega pa lahko rehidracija povzroči poškodbe in povečano prepustnost celičnih membran zaradi hitrega prehoda fosfolipidnih dvoslojev iz gelu podobne oblike v obliko tekočih kristalov (22).

Vsi omenjeni procesi povzročajo poškodbe bakterijskih celic in potencialno vodijo v njihovo smrt. Z dehidracijo povezan stres lahko omilimo z dodatkom pomožnih snovi s stabilizacijskim delovanjem. Stabilizatorji izboljšajo preživetje bakterij med zamrzovanjem in sušenjem, saj zmanjšujejo osmotski stres ter termodinamično in kinetično stabilizirajo bakterije. Pod termodinamično stabilizacijo, znano tudi kot »hipotezo nadomestitve vode«, pojmujemo tvorbo vodikovih vezi med molekulami stabilizatorjev in komponentami bakterijskih celic, kot so proteini in maščobnokislinski ostanki fosfolipidov. Pri tem stabilizatorji nadomestijo odstranjeno vodo in s tem ohranjajo strukturno integriteto proteinov ter fosfolipidnih dvoslojev (14, 19, 23). Kinetična stabilizacija bakterijskih celic pomeni imobilizacijo bakterijskih celic oz. njihovih komponent v trdnem, pogosto steklastem ogrodju, kar omejuje difuzijo in gibanje tako strukturnih makromolekul kot celotnih bakterijskih celic ter tako upočasnjuje razgradne reakcije (20). Stabilizatorje najdemo v razredih mono-, di- ali oligosaharidov, poliolov in proteinov, med najpogostejše uporabljene pa so trehaloza, saharoza, laktoza in inulin (19, 24).

Najpogostejši metodi sušenja za ohranjanje živosti terapevtskih bakterij sta liofilizacija in sušenje z razprševanjem (21, 25, 26), v zadnjem času pa za ta namen vedno pogostejše uporabljajo elektrostatsko sukanje (27). Drugi možni tehnološki pristopi so še sušenje v zvrtničnih plasteh, va-

kuumsko sušenje (26), elektrostatsko razprševanje (14) in sušenje na zraku kot najbolj osnovna in preprosta, a tudi obsoletna metoda.

Liofilizacija je najpogostejše uporabljena metoda sušenja živih bakterij z najdaljšo zgodovino uporabe. Proces liofilizacije je sestavljen iz treh medsebojno odvisnih faz. Pred postopkom primarnega in sekundarnega sušenja moramo izvesti zamrzovanje, med katerim nastanejo ledeni kristali, ki lahko povzročijo poškodbe živih bakterijskih celic. To preprečimo ali omejimo z dodajanjem krioprotektantov (npr. glicerola) ali z ustrezno hitrostjo zamrzovanja, s katero vplivamo na morfologijo nastajajočih kristalov (14).

Sušenje z razprševanjem predstavlja alternativo liofilizaciji, saj ne vključuje zamrzovanja, po drugi strani pa sta za to metodo sušenja značilna mehanski in toplotni stres. Sušenje z razprševanjem namreč temelji na razprševanju vstopne tekočine (disperzije bakterij z dodatkom pomožnih snovi), med katerim so bakterije izpostavljene strižnim silam, nato pa so zaradi potrebe po izhlapevanju topila izpostavljene tudi povišanim temperaturam (vstopni zrak namreč lahko doseže 130–170 °C). Kljub temu da je izpostavitve bakterij omenjenim stresnim dejavnikom kratkotrajna, lahko to v kombinaciji z dehidracijskim stresom povzroči poškodbe ali smrt celic. V izogib omenjenim težavam lahko bakterije pred sušenjem z razprševanjem zaščitimo z enkapsuliranjem. Privlačno prednost sušenja z razprševanjem pred liofilizacijo predstavljajo časovna in energijska učinkovitost ter možnost kontinuirane izvedbe procesa (25, 28, 29).

Sušenje v zvrtničnih plasteh in vakuumsko sušenje za namen sušenja probiotikov preučujejo redkeje kot sušenje z razprševanjem in liofilizacijo (26). Glavni izziv sušenja v zvrtničnih plasteh predstavlja potreba po uporabi pomožnih snovi, primernih za granulacijo, ali inertnih nosilnih delcev, na katere lahko bakterije nanašamo. Poleg tega prihaja pri sušenju v zvrtničnih plasteh do izpostavitve



bakterij toplotnemu in mehanskemu stresu, čeprav sta le-ta manj izrazita kot pri sušenju z razprševanjem (30). Toplotnemu in mehanskemu stresu se izognemo pri vakuumskem sušenju, pri katerem je zaradi neželene oblike končnega izdelka (trdna pogača) pogosto potreben dodaten korak njegovega procesiranja, kot npr. lomljenje oz. drobljenje pogače. Poleg tega je vakuumsko sušenje, ki je najpogostejše izvedeno serijsko in ne kot kontinuiran proces, časovno relativno zahtevna metoda (26, 30).

Elektrostatsko sukanje predstavlja obetavno sodobno metodo za ohranjanje živosti bakterij, saj se med sušenjem curka polimerne disperzije s probiotičnimi celicami hkrati doseže tudi vgradnja oz. enkapsulacija bakterij v nanovlakna. To pomeni, da metoda omogoča sočasno sušenje, imobilizacijo celic in pripravo naprednega dostavnega sistema. Elektrostatsko sukanje temelji na izpostavitvi polimerne disperzije električnemu polju, pri čemer pride do elektrohidrodinamičnega pojava, poganjanja curka iz kapljice raztopine z ustrezno viskoznostjo ter njegovega intenzivnega raztezanja, zaradi česar ob hitrem izhlapevanju topila nastanejo trdna, suha nanovlakna. Elektrostatsko sukanje poteka pod relativno blagimi pogoji, saj ne zahteva visokih temperatur. Glavna stresna dejavnika, katerima so med elektrostatskim sukanjem izpostavljene bakterije, sta blag mehanski stres in visoka napetost. Za proces je pomembna tudi relativna vlaga, saj vpliva na učinkovito sušenje nanovlaken in delež vlage ter vodno aktivnost v končnem izdelku, ki za zagotavljanje preživetja bakterij med shranjevanjem ne sme biti previsoka (14).

3.2 ENKAPSULACIJA PROBIOTIKOV

Pod enkapsulacijo bakterij pojmuje njihovo ujetje v zaprt prostor s pomočjo fizične pregrade, npr. membrane oziroma obloge. To lahko izvedemo na ravni posameznih celic z oblaganjem s plastenjem polielektrolitov (angl. »layer-by-layer«) posameznih bakterijskih celic (31) ali pa z enkapsulacijo skupkov več bakterijskih celic, najpogostejše z mikrokapsuliranjem (32). Zgodovinsko izraz enkapsulacija v povezavi s probiotiki ni bil omejen le na ujetje v membrane, temveč ga uporabljamo tudi za ujetja bakterij v ogrodje iz pomožnih snovi, najpogostejše polimerov (33, 34).

Enkapsulacija je oblika imobilizacije bakterijskih celic, s katero lahko podaljšamo njihovo preživetje z vplivom na metabolizem in zaščito celic pred škodljivimi vplivi okolja. Tako kot krioprezervacija in sušenje, ki zaradi zmanjšanja aktivnosti vode v bakterijskih celicah zavirata fiziološke in razgradne procese v njih, tudi imobilizacija celotne bak-

terijske celice omeji njeno gibanje in s tem nekoliko upočasni metabolizem, čeprav ta učinek še zdaleč ni tako izrazit kot v primeru sušenja ali krioprezervacije (35). Nadalje lahko z enkapsulacijo bakterije zaščitimo pred neugodnimi dejavniki v človeškem telesu in med shranjevanjem (34). Takšno kombinacijo zaščitnega delovanja in vpliva imobilizacije na bakterijski metabolizem poznamo tudi iz naravno prisotnih bakterijskih biofilmov, za katere je znana povečana odpornost vanje vključenih bakterij na ekstremne pH vrednosti ali prisotnost spojin s protimikrobnim delovanjem (36).

Enkapsulacija bakterij je pomembna tudi pri njihovi lokalni dostavi, saj omogoča nadzorovano sproščanje in izboljša bioadhezijo, s čimer se podaljša zadrževanje terapevtskih bakterij na tarčnih sluznicah ali na koži. Za doseganje teh funkcij lahko uporabimo različne pomožne snovi in metode vgradnje v mikrokapsule. Enkapsulacija bakterij je tako še posebno razširjena v živilski tehnologiji, kjer probiotične bakterije vgrajujejo v biološko razgradljiva vodotopna polimerna ali proteinska ogrodja z metodami iztiskanja, emulgiranja ali koacervacije. Prva dva pristopa obsegata tvorbo delcev iz iztiskanih ali emulgiranih kapljic polimernih raztopin z dispergiranimi bakterijami, pogosto s premreževanjem, ter tako dosežeta ujetje bakterij v trdno ali gelasto ogrodje tvorjeno *in situ* (33). Pogoste pomožne snovi, ki jih uporabljajo kot tvorilce takšnih ogrodij, so naravni biokompatibilni polimeri, npr. natrijev alginat (37), pektin (38), sirotkine beljakovine (39) in karagenan (40). Pri koacervaciji prihaja do ločevanja s koloidom bogate in osiromašene tekoče faze, pri čemer za metodo uporabljajo podobne polimere in proteine kot pri mikrokapsuliranju z iztiskanjem ali emulgiranjem. Ločevanje faz lahko v odvisnosti od uporabljenih polimerov dosežemo s spreminjanjem pH ali temperature, dodatkom visokih koncentracij soli, dodatkom novih polimerov (npr. nasprotno nabitih), ki z že prisotnimi polimeri tvorijo medmolekulske interakcije ter z dodatkom ne-topil, ker pa so le-ta po večini toksična organska topila, je to običajno neprimeren pristop za enkapsulacijo bakterij. Bakterije s koacervacijo enkapsuliramo s tvorbo membrane, ki nastane iz koloidno bogate faze, ki obda probiotike (33, 41).

4 VREDNOTENJE IZDELKOV S PROBIOTIKI

Za vrednotenje probiotikov ali končnih izdelkov s probiotiki oz. živimi terapevtskimi bakterijami je ključen izbor ustreznih

metod za kvantifikacijo bakterijske živosti in/ali metabolne aktivnosti. S tem lahko potrdimo, da so bakterije obdržale želeno biološko aktivnost med vgradnjo in shranjevanjem, kar odločilno vpliva na terapevtsko učinkovitost.

Najpomembnejši vidik vrednotenja je določanje bakterijske živosti. Standarden pristop za vrednotenje živosti vključuje določanje števila kolonijskih enot (angl. *colony-forming units*) na masno ali volumsko enoto končnega izdelka. Kljub temu da je to metoda izbora, na takšen način ne moremo zaznati živih, a nekultivabilnih bakterij (angl. *viable but non-culturable*), tj. bakterij brez sposobnosti razmnoževanja in kolonizacije tarčnih sluznic, a z ohranjenjo presnovno aktivnostjo *in situ* na mestu delovanja, kjer vseeno sproščajo sekundarne metabolite (npr. protibakterijske ali imunomodulatorne), ki doprinesejo k probiotičnem delovanju (42, 43). Za celovitejšo oceno živosti so torej poleg določanja števila bakterijskih kolonij potrebne tudi druge metode, npr. mikroskopske tehnike ali pretočna citometrija po ustreznem diskriminatornem obarvanju živih in mrtvih bakterij ter kvantitativna reakcija s polimerazo in kvantifikacija 16S ribosomalne RNA kot metodi za kvantifikacijo bakterijskega genskega materiala v vzorcu (43, 44).

Učinkovitost ohranjanja živosti bakterij v končnem izdelku lahko vrednotimo tudi posredno, in sicer tako, da določimo njihovo relevantno aktivnost s testi protimikrobnega delovanja proti patogenom (v kokulturah ali z difuzijskimi testi na agarju) (45–47), z analizo izražanja relevantnih proteinov (48) in z različnimi metabolnimi testi (47, 49). Med slednjimi so pogosti tako nespecifični (npr. resazurinski test) kot tudi bolj specifični testi, namenjeni analizam določenih vrst bakterij. V primeru pogosto uporabljenih laktobacilov na primer njihov metabolizem vrednotimo z določanjem sproščanja laktata in spremembo pH (49, 50).

5 SKLEP

Probiotiki predstavljajo obetavne aktivne komponente za zdravljenje številnih bolezni, vendar je za njihovo uspešnost potreben izbor učinkovitega seva, njegova natančna karakterizacija in premišljena izdelava kakovostne in varne formulacije. Kljub napredku pri sušenju in enkapsulaciji bakterij ostajajo izzivi predvsem pri ohranjanju živosti bakterij in prenosu procesa z laboratorijskega na industrijski nivo. Glede na mehanizem delovanja pa imajo probiotiki velik terapevtski potencial, kar narekuje hitro razvijajoče se po-

dročje, zato je v prihodnosti na tržišču moč pričakovati vedno več LBP.

6 IZJAVA

Avtorji se zahvaljujemo Javni agenciji za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije za finančno podporo programa P1-0189 ter projektov J7-4418 in J4-4556.

7 LITERATURA

1. Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2013 May;13(5):321–35.
2. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Oct;16(10):605–16.
3. Stavropoulou E, Bezirtzoglou E. Probiotics in Medicine: A Long Debate. *Front Immunol.* 2020 Sep 25;11:2192.
4. Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, et al. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology.* 2021 Aug;29(8):667–85.
5. Vanechoutte M. The human vaginal microbial community. *Research in Microbiology.* 2017 Nov;168(9–10):811–25.
6. Grlic NK, Zidar A, Kocbek P, Rijavec T, Colja T, Lapanje A, et al. Nanofibers with genotyped *Bacillus* strains exhibiting antibacterial and immunomodulatory activity. *Journal of Controlled Release.* 2023 Mar;355:371–84.
7. Barzegari A, Kheyrolahzadeh K, Hosseiniyan Khatibi SM, Sharifi S, Memar MY, Zununi Vahed S. The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms. *IDR.* 2020 Feb;Volume 13:659–72.
8. O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol.* 2017 May;2(5):17057.
9. Al-Fakhry OM, Elekhawy E. Next-generation probiotics: the upcoming biotherapeutics. *Mol Biol Rep.* 2024 Dec;51(1):505.
10. Rouanet A, Bolca S, Bru A, Claes I, Cvejic H, Girgis H, et al. Live Biotherapeutic Products, A Road Map for Safety Assessment. *Front Med.* 2020 Jun 19;7:237.
11. Jain N, Umar TP, Fahner AF, Gibietis V. Advancing therapeutics for recurrent *clostridioides difficile* infections: an overview of vovw's FDA approval and implications. *Gut Microbes.* 2023 Dec 31;15(1):2232137.
12. Charbonneau MR, Isabella VM, Li N, Kurtz CB. Developing a new class of engineered live bacterial therapeutics to treat human diseases. *Nat Commun.* 2020 Apr 8;11(1):1738.
13. Meng J, Liu S, Wu X. Engineered probiotics as live biotherapeutics for diagnosis and treatment of human diseases. *Critical Reviews in Microbiology.* 2023 Mar 22;1–15.



14. Grlic NK, Kristl J, Zupančič Š. Can polymeric nanofibers effectively preserve and deliver live therapeutic bacteria? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2025 Jan;245:114329.
15. Sarao LK, Arora M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017 Jan 22;57(2):344–71.
16. Pot B, Vandenplas Y. Factors that influence clinical efficacy of live biotherapeutic products. *Eur J Med Res*. 2021 May 4;26(1):40.
17. Heavey MK, Durmusoglu D, Crook N, Anselmo AC. Discovery and delivery strategies for engineered live biotherapeutic products. *Trends in Biotechnology*. 2022 Mar;40(3):354–69.
18. Chang CJ, Lin TL, Tsai YL, Wu TR, Lai WF, Lu CC, et al. Next generation probiotics in disease amelioration. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019 Jul;27(3):615–22.
19. Merivaara A, Zini J, Koivunotko E, Valkonen S, Korhonen O, Fernandes FM, et al. Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. *Journal of Controlled Release*. 2021 Aug;336:480–98.
20. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. The Role of Vitrification in Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol*. 1998 Oct;60(1):73–103.
21. Kieps J, Dembczyński R. Current Trends in the Production of Probiotic Formulations. *Food*. 2022 Aug 4;11(15):2330.
22. Broeckx G, Vandenheuveld D, Claes IJ, Lebeer S, Kiekens F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016 May;505(1–2):303–18.
23. Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science*. 1984;223:701–3.
24. Gomez Zavaglia A, Tymczyszyn E, De Antoni G, Anibal Disalvo E. Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. *J Appl Microbiol*. 2003 Dec;95(6):1315–20.
25. Huang S, Vignolles ML, Chen XD, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2017 May;63:1–17.
26. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. *Biotechnol Prog*. 2007 Apr 9;23(2):302–15.
27. Shahriar S, Mondal J, Hasan M, Revuri V, Lee D, Lee YK. Electrospinning Nanofibers for Therapeutics Delivery. *Nanomaterials*. 2019 Apr 3;9(4):532.
28. Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*. 2008 Jul;105(1):1–13.
29. Tang HW, Abbasilasi S, Murugan P, Tam YJ, Ng HS, Tan JS. Influence of freeze-drying and spray-drying preservation methods on survivability rate of different types of protectants encapsulated *Lactobacillus acidophilus* FTDC 3081. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2020 Sep 1;84(9):1913–20.
30. Zaghari L, Basiri A, Rahimi S. Preparation and characterization of double-coated probiotic bacteria via a fluid-bed process: a case study on *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Engineering*. 2020 Sep 21;16(9):20190384.
31. Mirtič J, Kogej K, Gašperlin M, Lapanje A, Kristl J. Polielektrolitni kompleksi kot osnova za razvoj novih nanodelcev in nanoblog. *Farmacevtski vestnik*. 2016;67(4):310–7.
32. Kristl J, Zupančič Š, Mirtič J, Kocbek P. Napredni dostavni sistemi učinkovin za preventivo in zdravljenje parodontalne bolezni. *Farmacevtski vestnik*. 70(2162–171):2019.
33. Vivek K, Mishra S, Pradhan RC, Nagarajan M, Kumar PK, Singh SS, et al. A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*. 2023 Jun;3(1):100248.
34. Li S, Zhang YX. Sensitive delivery systems and novel encapsulation technologies for live biotherapeutic products and probiotics. *Critical Reviews in Microbiology*. 2024 May 3;50(3):371–84.
35. Žur J, Wojcieszyska D, Guzik U. Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization. *Molecules*. 2016 Jul 22;21(7):958.
36. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Sep;8(9):623–33.
37. Mirtič J, Rijavec T, Zupančič Š, Zvonar Pobirk A, Lapanje A, Kristl J. Development of probiotic-loaded microcapsules for local delivery: Physical properties, cell release and growth. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018 Aug;121:178–87.
38. Gebara C, Chaves KS, Ribeiro MCE, Souza FN, Grosso CRF, Gigante ML. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 2013 May;51(2):872–8.
39. Wang M, Wang C, Gao F, Guo M. Effects of polymerised whey protein-based microencapsulation on survivability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and physiochemical properties of yoghurt. *Journal of Microencapsulation*. 2018 Jul 4;35(5):504–12.
40. Cheow WS, Hadinoto K. Biofilm-Like *Lactobacillus rhamnosus* Probiotics Encapsulated in Alginate and Carrageenan Microcapsules Exhibiting Enhanced Thermotolerance and Freeze-Drying Resistance. *Biomacromolecules*. 2013 Sep 9;14(9):3214–22.
41. Nezamdoost-Sani N, Amiri S, Mousavi Khaneghah A. The application of the coacervation technique for microencapsulation bioactive ingredients: A critical review. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2024 Dec;18:101431.
42. Zhang S, Guo L, Yang K, Zhang Y, Ye C, Chen S, et al. Induction of *Escherichia coli* Into a VBNC State by Continuous-Flow UVC and Subsequent Changes in Metabolic Activity at the Single-Cell Level. *Front Microbiol*. 2018 Sep 25;9:2243.
43. Davis C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 2014 Aug;103:9–17.
44. Amna T, Hassan MS, Pandeya DR, Khil MS, Hwang IH. Classy non-wovens based on animate *L. gasseri*-inanimate poly(vinyl alcohol): upstream application in food engineering. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 May;97(10):4523–31.
45. Zupančič Š, Rijavec T, Lapanje A, Petelin M, Kristl J, Kocbek P. Nanofibers with Incorporated Autochthonous Bacteria as Potential Probiotics for Local Treatment of Periodontal Disease. *Biomacromolecules*. 2018 Nov 12;19(11):4299–306.
46. Heunis TDJ, Botes M, Dicks LMT. Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* 423 and its Bacteriocin in Nanofibers. *Probiotics & Antimicro Prot*. 2010 Mar;2(1):46–51.
47. Minooei F, Gilbert NM, Zhang L, Sarah NeCamp M, Mahmoud MY, Kyser AJ, et al. Rapid-dissolving electrospun nanofibers for intra-vaginal antibiotic or probiotic delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023 Sep;190:81–93.
48. Tong HW, Mutlu BR, Wackett LP, Aksan A. Manufacturing of bioactive nanofibers for bioremediation. *Biotechnol Bioeng*. 2014 Aug;111(8):1483–93.
49. Vass P, Pantea E, Domokos A, Hirsch E, Domján J, Németh Á, et al. Electrospun Solid Formulation of Anaerobic Gut Microbiome Bacteria. *AAPS PharmSciTech*. 2020 Aug;21(6):214.
50. Mahmoud MY, Wesley M, Kyser A, Lewis WG, Lewis AL, Steinbach-Rankins JM, et al. *Lactobacillus crispatus*-loaded electrospun fibers yield viable and metabolically active bacteria that kill *Gardnerella* in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023 Jun;187:68–75.