

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Dominika Puljić

6701/BT

POVRŠINSKI PROTEINI *LACTOBACILLUS* VRSTA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 4

Mentor: Prof. dr. sc. *Blaženka Kos*

Zagreb, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014- 09-7009).

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

POVRŠINSKI PROTEINI *LACTOBACILLUS* VRSTA

Dominika Puljić, 6701/BT

Sažetak: Kada je riječ o tehnološkim i zdravstvenim primjenama bakterija mliječne kiseline, sastav, struktura i komponente stanične stijenke, pogotovo površinski proteini, igraju glavne uloge. Stoga je cilj ovog rada bio dokazati prisutnost S-proteina i drugih površinskih proteina kod bakterijskih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus brevis* SF9B, *Lactobacillus brevis* SF15B i *Lactobacillus plantarum* D13. Provođenjem SDS-PAGE elektroforeze površinskih proteina dokazana je prisutnost S-proteina i SLAP (eng. Surface-Layer Associated Proteins). Potvrda prisutnosti S-proteina provedena je detekcijom gena koji kodiraju za S-proteine. Provedenom PCR reakcijom sa sojevima *L. helveticus* M92, *L. brevis* D6, *L. brevis* ZG1, *L. brevis* SF9B i *L. brevis* SF15B, s početnicama Sprot 1 i Sprot 2, a potom i DNA elektroforezom PCR produkata dobiveni su pozitivni signali za sve ispitivane *Lactobacillus* sojeve što ukazuje da su odabrane specifične početnice pogodne za detekciju gena koji kodiraju za površinske S-proteine.

Ključne riječi: adhezija, *Lactobacillus* sojevi, površinski proteini, S-layer i SLAP

Rad sadrži: 22 stranice, 6 slika, 3 tablice, 18 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Blaženka Kos

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc,
Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Rad predan: 7. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of biochemical engineering

Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

SURFACE PROTEINS OF *LACTOBACILLUS SPECIES*

Dominika Puljić, 6701/BT

Abstract: When it comes to technological and health applications of lactic acid bacteria, the composition, structure and components of the cell wall, especially surface proteins, play the main roles. Therefore, the aim of this thesis was to prove the presence of S-layer and other surface proteins in bacterial strains of *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus brevis* SF9B, *Lactobacillus brevis* SF15B and *Lactobacillus plantarum* D13. S-protein and SLAP (Surface-Layer Associated Proteins) were detected by SDS-PAGE electrophoresis of the surface proteins. Confirmation of the presence of S-protein was performed by detection of genes encoding S-proteins. PCR reaction with strains of *L. helveticus* M92, *L. brevis* D6, *L. brevis* ZG1, *L. brevis* SF9B and *L. brevis* SF15B with primers Sprot 1 and Sprot 2, and then DNA electrophoresis of PCR products gave the positive signals for all tested *Lactobacillus* strains which indicate that selected specific primers are suitable for the detection of genes encoding surface S-proteins

Keywords: adhesion, *Lactobacillus* strains, surface proteins, S-layer and SLAPs

Thesis contains: 22 pages, 6 figures, 3 tables, 18 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD Blaženka Kos, Full professor*

Technical support and assistance: *PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor*
Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Thesis delivered: July, 7th 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORETSKI DIO	2
2.1. Adhezija bakterija mliječne kiseline	2
2.2. Struktura površine stanica bakterija mliječne kiseline	4
2.3. S-proteini bakterija mliječne kiseline	5
2.3.1. Uloga S-proteina BMK	7
3. MATERIJALI I METODE RADA	8
3.1. MATERIJALI	8
3.1.1. Radni mikroorganizmi	8
3.1.2. Hranjive podloge	8
3.1.3. Kemikalije	9
3.1.4. Aparatura i pribor	10
3.2. METODE RADA	11
3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama	11
3.2.2. Ekstrakcija S-(surface) proteina i SLAP-a (eng. Surface-Layer Associated Proteins) s površine stanica <i>Lactobacillus</i> sojeva s 5 M i 1 M litijevim kloridom	11
3.2.3. Razdvajanje S-proteina i SLAP-a	11
3.2.4. SDS-PAGE	12
3.2.5. Tricin SDS-PAGE	13
3.2.6. Izolacija DNA	13
3.2.7. PCR	14
4. REZULTATI	16
4.1. Ekstrakcija i razdvajanje S-(surface) proteina i SLAP-a (eng. Surface-Layer Associated Proteins) s površine stanica <i>Lactobacillus</i> sojeva	16
4.2. Ispitivanje prisutnosti gena koji kodiraju za S-proteine	18
5. ZAKLJUČCI	19
6. LITERATURA	20

1. UVOD

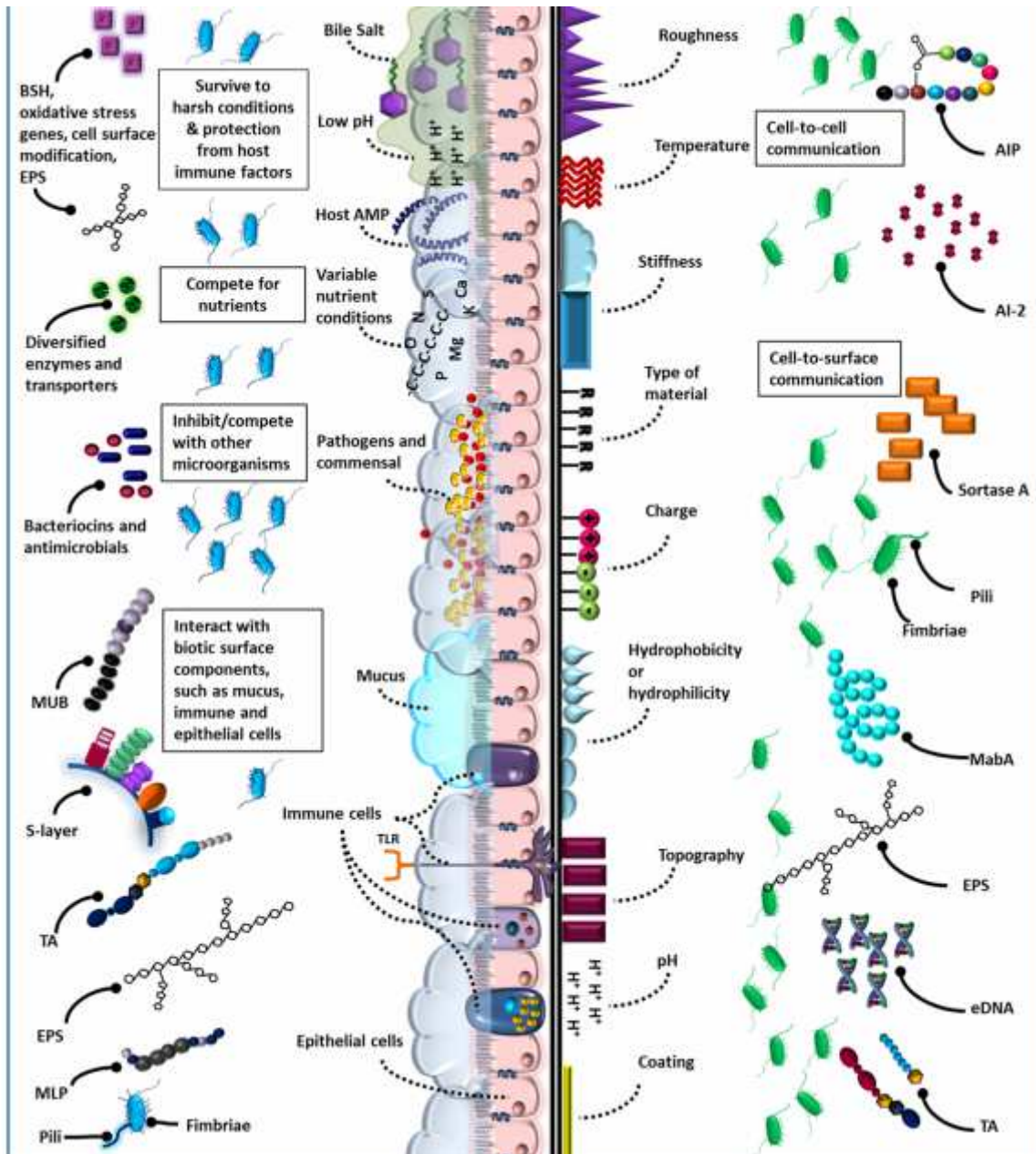
Bakterije mliječne kiseline (BMK) su heterogena grupa mikroorganizama koju čine brojni rodovi kao što su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc*. To su Gram-pozitivne, nesporigene, acidotolerantne, štapićaste ili okruglaste, katalaza-negativne bakterije s niskim sadržajem G+C parova baza u DNA molekuli te proizvode mliječnu kiselinu kao glavni proizvod fermentacije ugljikohidrata. Zbog visoke prilagodljivosti naseljavaju različita staništa od biljaka, mlijeka i mliječnih proizvoda, mesa, vina do mukoznih površina gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta te usne šupljine. Osim važne tehnološke uloge u fermentaciji hrane u zadnjim desetljećima se sve više istražuje i potencijalna biomedicinska primjena BMK (Arena i sur., 2017). Određeni sojevi BMK, posebno sojevi laktobacila, se komercijalno koriste kao probiotici zbog dokazanih pozitivnih učinaka na zdravlje domaćina. Zbog njihovog GRAS (eng. Generally Recognized as Safe) statusa BMK se smatraju prikladnim vektorima za terapijske proteine ili antigene na površini sluznice. Neki bakterijski sojevi iz roda *Lactobacillus* ispunjavaju stroge probiotičke kriterije jer dobro preživljavaju u uvjetima probavnog sustava, otporne su na žučne soli i enzime probavnog sustava, asimiliraju kolesterol u prisutnosti žučnih soli te proizvode antimikrobne supstancije koje inhibiraju rast potencijalno patogenih mikroorganizama. Kada je riječ o tehnološkim i zdravstvenim primjenama BMK-a, sastav, struktura i komponente stanične stijenke, pogotovo površinski proteini, igraju glavne uloge (Chapot-Chartier i Kulakauskas, 2014). Kod nekih probiotičkih sojeva, osobito *Lactobacillus* vrsta, na površini stanice postoji makromolekularni parakristalni sloj S-proteina, koji je odgovoran za mnoga pozitivna svojstva probiotičkih sojeva. Stoga je cilj ovog rada bio dokazati prisutnost S-layer i drugih površinskih proteina kod bakterijskih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus brevis* SF9B, *Lactobacillus brevis* SF15B i *Lactobacillus plantarum* D13, koji su izolirani, identificirani i okarakterizirani kao probiotički u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

2. TEORETSKI DIO

2.1. Adhezija bakterija mliječne kiseline

Adhezija na površinu sluznice je prvi korak za uspješnu kolonizaciju površine domaćina i BMK su razvile više čimbenika da je ostvare. Preduvjet crijevne kolonizacije je sposobnost preživjeti teške uvjete GI trakta, uključujući litičko djelovanje probavnih enzima, aktivnost žučnih soli, ekstremno niski pH u želucu, oksidativni i hiperosmotski stres u debelom crijevu i antimikrobnu aktivnost imunoloških faktora domaćina. Genomskim istraživanjima je utvrđeno da su glavni geni koji omogućuju BMK adekvatnu sposobnost naseljavanja GI trakta upravo oni koji promiču preživljavanje, metaboličke aktivnosti i interakcije s domaćinom i endogenom mikrobiotom. BMK sadrže vrste koje pokazuju različiti stupanj i način opstanka u intestinalnom traktu. Neke od njih su autohtone vrste, ali metagenomika i eksperimentalni dokazi ukazuju da je većina BMK alohtonska vrsta, tj. da su to prolazni kolonizatori koji potječu od hrane ili usne šupljine i tako se slučajno ili namjerno unesu u intestinalni trakt. Biokemijske detalje takvih interakcija je teško odrediti, zbog heterogenosti komponenti sluzi, mnoštva uključenih čimbenika i sveukupne složenosti procesa adhezije (slika 1) (Arena i sur., 2017).

Usporedna genomika je pokazala da se prilagodba BMK na različite ekološke niše postiže dobicom novih gena i degeneracijom ili gubitkom više neophodnih gena. BMK u mliječnim proizvodima su izgubile metaboličke aktivnosti koje nisu neophodne u takvim relativno konstantnim i slabo konkurentnim okruženjima dok one BMK koje koloniziraju crijeva, ekološke niše karakterizirane promjenjivim hranjivim tvarima, biokemijsko-fizičkim stresom i kompleksnim mikrobnim zajednicama, pokazuju širu metaboličku fleksibilnost i specifične životne funkcije bitne za preživljavanje u crijevima. Tako je npr. komparativna genomika i fenotipska analiza nekoliko sojeva *L. rhamnosus* iz različitih ekoloških niša pokazala da je klaster gena za pile, SpaCB,A više prevladavao kod izolata humanog porijekla nego u izolatima iz mliječnih proizvoda. Štoviše, među izolatima humanog porijekla, pile su proizvodili samo sojevi iz intestinalnog trakta, ali ne i sojevi iz usta i vagine, što naglašava ključnu ulogu pila u gastrointestinalnom (GI) staništu i odražava mehanizam specijalizacije niša (Arena i sur., 2017).



Slika 1. Značenje biotičkih i abiotičkih svojstava sluznice crijeva domaćina na bakterijsku adheziju i formiranje biofilma (Arena i sur., 2017)

Biotičke površine (na lijevoj strani) kao što je sluznica crijeva mogu biti neprijateljsko okruženje bakterijama zbog aktivnosti žučnih soli, niskog pH, imunoloških čimbenika domaćina, promjenjivih uvjeta okoline te prisutnosti drugih bakterija. BMK su sposobne preživjeti nepovoljne uvjete, natjecati se za hranjive tvari, kompetitivno isključiti druge mikroorganizme i ući u interakciju s biotičkim komponentama. Sastav površine bakterijske stanice i molekule koje proizvode BMK utječu na vezanje, razvoj, sazrijevanje i eventualno poremećaje u razvoju biofilma.

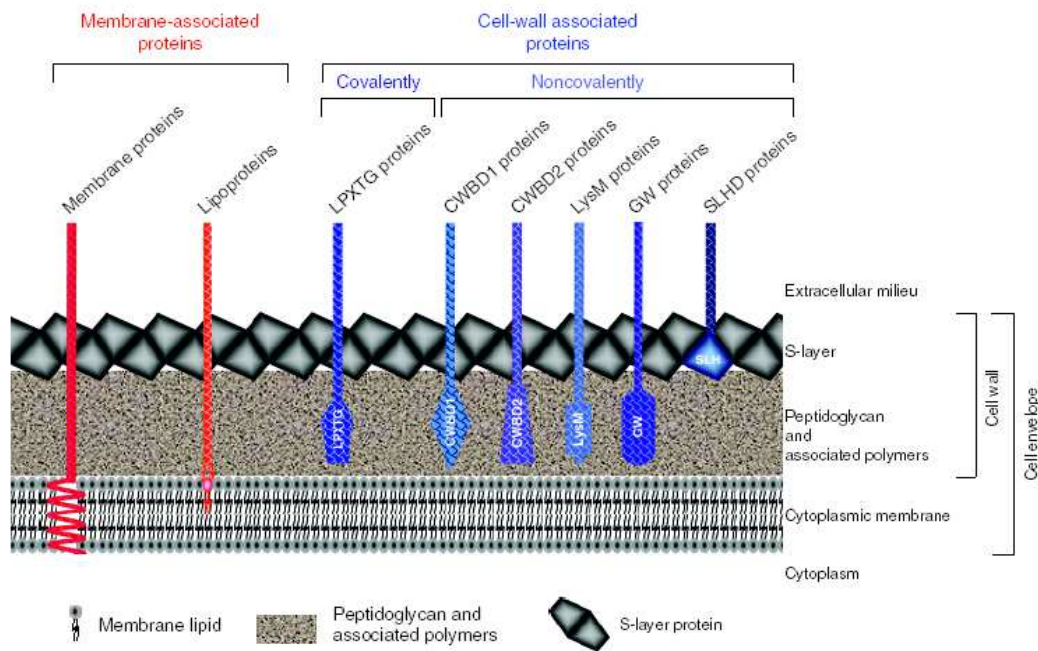
Različite komponente na površini stanice, kao što su ugljikohidrati, lipoteihonske kiseline, proteini s LPXTG motivima, posreduju specifičnu adheziju i mogu djelovati kao adhezini. Otkad su adhezini identificirani provode se brojna istraživanja o mehanizmima adhezije. *Lactobacillus* vrste vežu molekule kao što su manozna, mucini crijeva štakora ili glikolipidi što znači da adhezija ne zahtijeva jedinstveni mehanizam. Na primjer, rekombinantni CbsA *L. crispatus* JCM 581020 i SlpB *L. crispatus* K31321 se vežu na kolagen tip I i IV. SlpA od *L. acidophilus* NCFM se veže na specifični receptor eksprimiran nezrelim ljudskim dendritičkim stanicama. Nadalje, S-slojevi proteina posreduju vezanje bakterijskih stanica na receptore kao što su fibronektin i laminin kao i humane epitelne stanične linije (Wang i sur., 2017).

2.2. Struktura površine stanica bakterija mliječne kiseline

Struktura površine stanica bakterijskih stanica i razvoj strukture su uključeni u mehanizme kolonizacije i interakcije bakterija s domaćinom budući da struktura i sastav stanične stijenke određuju svojstva površine, što zauzvrat utječe na adheziju. Stanična membrana BMK je prekrivena višeslojnim peptidoglikanskim omotačem s teihonskim kiselinama, uključujući lipoteihonsku kiselinu (LTA) i teihonsku kiselinu stanične stijenke (WTA), pile, proteine i egzopolisaharide. Kod nekih vrsta stanična stijenka može biti još okružena i parakristalnim slojem, S- proteinima. Pokazalo se da su ove komponente uključene u različitoj mjeri prilikom adhezije BMK na mukozne površine (Arena i sur., 2017).

Bakterijski površinski proteini imaju jako važnu ulogu u molekularnom dijalogu, tj. interakciji između bakterije i domaćina. Kao sastavni dio laktobacila omogućuju adheziju u gastrointestinalnom traktu, kompetitivnu ekskluziju patogena, modulaciju imunološkog odgovora te služe kao mehanička barijera u nepovoljnim uvjetima (Johnson i sur., 2015). Nakon što se sintetiziraju u citoplazmi, 5-10% bakterijskih proteina se otpušta izvan citoplazmatske membrane. Kod Gram-pozitivnih bakterija, uključujući i BMK, većina se ovih proteina izlučuje posebnim sekretornim putem. Gotovo svi proteini nakon izlučivanja imaju N-terminalni signalni peptid sastavljen od približno 30 aminokiselina koji se nakon translokacije proteina preko citoplazmatske membrane odcjepljuje odgovarajućom signalnom peptidazom. Zatim se protein otpušta u izvanstanični medij ili veže na citoplazmatsku membranu ili komponente stanične stijenke. Kod BMK, površinski proteini čine oko 80% sekrecijskih proteina (Chapot-Chartier i Kulakauskas, 2014). Bakterijski površinski proteini se dijele u četiri glavne grupe : i) proteini usidreni u citoplazmatsku membranu putem transmembranskih domena, ii) lipoproteini kovalentno vezani na lipide stanične membrane , iii) proteini s LPXTG motivom na C-terminalnom kraju kovalentno vezani za peptidoglikan pomoću sortaza , iv) proteini s bilo

kojom specifičnom domenom za vezanje na staničnu stijenku (slika 2) (Desvaux i sur., 2006).

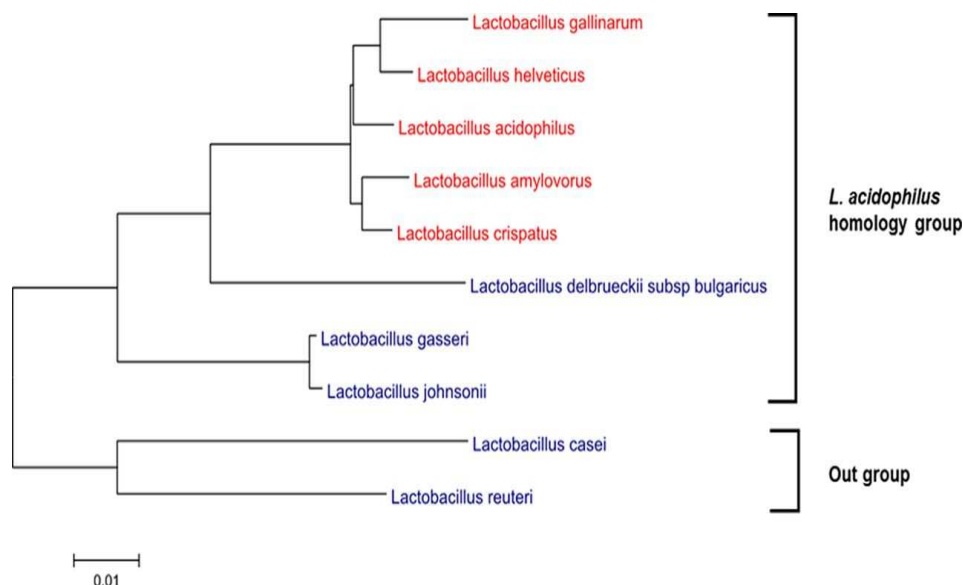


Slika 2. Shematski prikaz različitih skupina proteina prisutnih na površini stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija: membranski proteini: (i) sadrže jednu ili više transmembranskih domena ili (ii) su lipoproteini koji se kovalentno vežu na citoplazminu membranu pomoću dugolančanih masnih kiselina; proteini vezani na staničnu stijenku (i) sadrže LPXTG, ili neke druge specifične motive, na C-terminalnom kraju, a kovalentno se vežu na peptidoglikan pomoću sortaze, ili (ii) sadrže domenu za vezanje na staničnu stijenku (engl. *cell wall binding domain*, CWBD). Poznate su CWBD1, CWBD2, LysM, GW i SLHD domene (Desvaux i sur., 2006).

Ovi osnovni mehanizmi vezanja bakterija služe za objašnjenje mnogo složenijih proteinskih struktura kao što je S-sloj, pili, flagele i celulosomi (Desvaux i sur., 2006).

2.3. S-proteini bakterija mliječne kiseline

Bakterijski S-slojevi su polupropusni proteinski kristalni nizovi koji se sastoje od samoobnavljajućih (engl. self-assembling) (gliko)proteinskih podjedinica nazvanih S-proteini (engl. S-layer proteins, Slps). S-proteini se osim u laktobacilima, koji su Gram-pozitivne bakterije, mogu naći i u Gram-negativnim bakterijama i vrstama *Archaea*, ali nisu prisutni u svim mikroorganizmima. Blisko povezani sojevi nekadašnje *Lactobacillus acidophilus* homologne grupe se danas mogu jasno podijeliti osim po usporednim genomskim analizama i po njihovoj sposobnosti stvaranja S-sloja (slika 3) (Johnson i sur., 2015).



Slika 3. Filogenetički odnosi različitih *Lactobacillus* sojeva temeljeni na sekvencama 16S rRNA gena. Crveno su označene vrste čiji sojevi sintetiziraju S-protein, a plavo vrste koje ne sintetiziraju S-protein (Johnson i sur., 2015)

S-proteini laktobacila imaju neke uobičajene i prepoznatljive osobine, kao što je nizak sadržaj cisteina i metionina, visok sadržaj hidrofobnih i hidroksilnih aminokiselina te relativno mala veličina (25 do 71 kDa) (Hollman i sur., 2010). SlpA/Slp1 (46 kDa) je dominantni proteinski sastojak *L. acidophilus* homologne grupe uz još SlpB/Slp2 (47kDa) i SlpX (51 kDa) proteine (Johnson i sur., 2015). Na N-terminalnom kraju proteina sadrže tipičnu signalnu sekvencu, koja je karakteristična i za S-proteine drugih prokariotskih mikroorganizama. Nekoliko pripadnika grupe *L. delbrueckii* posjeduje dva gena koja kodiraju za površinske proteine, jedan prigušeni i jedan aktivno transkribirani. Laktobacili mogu preraspodjelom DNA eksprimirati alternativne gene za S-proteine prilikom prilagodbe različitim stresnim čimbenicima, kao što su drastične promjene uvjeta okoline. Tako je kod *L. brevis* ATCC14869 kao odgovor na promjene okoline jedinstvenim mehanizmom aktivacije transkripcije došlo do promjene sadržaja S-proteina. Laktobacili, uključujući i još neke bakterije kao što su *Bacillus anthracis*, *Clostridium fetus* i *Tannerella forsythia* sadrže više gena koji kodiraju za S-proteine (Hollman i sur., 2010). S-proteini oblikuju dvodimenzionalne rešetke na najudaljenijem sloju stanice te su nekovalentnim interakcijama povezani sa staničnom stijenkom (Johnson i sur., 2015). SLH (eng. S-layer homologous) motivi nisu identificirani kod laktobacila, već se pretpostavlja da se S-proteini vežu na staničnu stijenku pomoću sekundarnih polimera stanične stijenke. Prema istraživanju se S-proteini *L. brevis* i *L. buchneri* vežu na neutralne polisaharide, a vezanje S-proteina rekombinantnog SlpA *L. brevis* ATCC 8287 se odvija pomoću N-terminalne

sekvence odnosno C-terminalne sekvence SlpA bakterije *L.acidophilus* ATCC 4356 i CbsA bakterije *L. crispatus* JCM 5810. Istraživanjima sa SlpA od *L. acidophilus* ATCC 4356 i CbsA od *L. crispatus* JCM 5810 je prikazano kako dolazi do interakcija između negativnog naboja sekundarnih polimera stanične stijenke i pozitivnog naboja S-proteina. Pokazalo se vezanje SlpA i CbsA na teihonske kiseline te CbsA na lipoteihonske kiseline pročišćene od *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus faecalis*, ali ne i na teihonsko-polisaharidnu frakciju stanične stijenke *L. crispatus* JCM 5810 (Hollman i sur., 2010). Prema Åvall-Jääskeläinen i sur. (2008) SlpA *L. brevis* ATCC 8287 se veže na neutralne polisaharide vodikovim vezama. Ove regije za vezanje S-proteina na staničnu stijenku imaju različite sekvence i najvjerojatnije su izložene na površini S-sloja proteina. Zbog poteškoća u dobivanju visokokvalitetnih kristala za rendgensku kristalografiju, detaljne strukturne informacije o S-proteinima su nepoznate (Wang i sur., 2017).

2.3.1. Uloga S-proteina BMK

S-layer proteini su pronađeni kod filogenetski vrlo različitih skupina mikroorganizama te se smatra da je njihova biološka uloga specifična ovisno o vrsti mikroorganizma. Pretpostavlja se da S-layer proteini imaju ulogu zaštitnog omotača i ulogu molekularnih „sita“ za različite molekule ili ione, da sudjeluju u adheziji stanica i određivanju oblika stanice kod *Archaea* i nekih bakterija te da su faktori virulencije kod patogenih mikroorganizama (Hollman i sur., 2010). S-proteini različitih vrsta *L.acidophilus* homologne skupine su važni za adheziju, imunomodulaciju te kompetitivnu ekskluziju patogena (Johnson, 2015).

Jakava-Viljanen i sur. (2002) su ustanovili da su S-layer proteini *Lactobacillus* sojeva koji su izolirani iz gastrointestinalnog trakta (GIT) i fecesa svinja, značajni prilikom adhezije ovih sojeva na intestinalne epitelne stanične linije, intestinalnu i želučanu sluz i komponente ekstracelularnog matriksa sisavaca čiji su glavni sastojci kolagen i laminin (Hollman i sur., 2010).

Smatra se da posttranslacijska modifikacija, glikozilacija S-proteina kod *L. buchneri*, *L. kefir* i *L. helveticus* povećava njihov afinitet za lipidne membrane te utječe na združivanje bakterijskih stanica i imunomodulacijska svojstva proteina što je značajno s aspekta razvoja vektora za vakcine (Hollman i sur., 2010).

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu su korišteni sojevi bakterija mliječne kiseline prikazani u tablici 1. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 1. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu i uvjeti uzgoja

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	D6	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	ZG1	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	SF9B	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	SF15B	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D13	MRS, 37°C, anaerobno

3.1.2. Hranjive podloge

Za čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline korištene su hranjive podloge sljedećeg sastava:

- MRS (Man-Rogosa-Sharpe)- agar sastava (g/L): pepton10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO₄x7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20; u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge iznosi 6,5; sterilizacija pri 121°C/15min.
- MRS (Man-Rogosa-Sharpe) tekuća hranjiva podloga jednakog je sastava kao MRS agar, samo bez dodanog agara

3.1.3. Kemikalije

- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- amonij-perokosodisulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- litijev klorid, „Aplichen“, Njemačka
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- TEMED (N, N, N', N' -tetrametiletilen), „Sigma“, SAD
- β -merkaptotanol, „Sigma“, SAD
- metilensko modriilo R-250, „Sigma“, SAD
- tricin, „Acros Organics“, SAD
- glutaraldehid, „Acros Organics“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- standard za elektroforezu proteina (molekulske mase 14-97 kDa), „Pharmacia“, SAD
- standard za elektroforezu proteina (molekulaske mase 1-26,6 kDa, Ultra Low Molecular Weight MarkerTM), „Sigma-Aldrich“, Velika Britanija
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- proteinaza K, „Fermentas“, Kanada
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agaroza, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- početnica Sprot1, „Invitrogen“, SAD
- početnica Sprot2, „Invitrogen“, SAD

3.1.4. Aparatura i pribor

- Petrijeve zdjelice
- epruvete
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- ependorfice
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- pinceta
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- Spektra/Por porozne membrane za dijalizu, „Spectrum Laboratories“, SAD
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- tresilica, "New Brunswick Scientific", SAD
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- komora za elektroforezu, „Sigma“, SAD
- elektroforetske kadice, „Clever, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT
- BioSpec Nano, "Shimatzu", Japan

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta sojevi se inokuliraju u svježju hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u tablici 1.

3.2.2. Ekstrakcija S-(surface) proteina i SLAP-a (eng. Surface-Layer Associated Proteins) s površine stanica *Lactobacillus* sojeva s 5 M i 1 M litijevim kloridom

Ekstrakcija S-proteina i SLAP proteina modificirana je prema standardnom LiCl S-sloj ekstrakcijskom protokolu za *L. acidophilus* (Goh i sur., 2009; Lortal i sur., 1992). Razdvajanje S-proteina i SLAP proteina se provodi pomoću 5 M i 1 M otopine litijevog klorida. Prekonoćne kulture stanica ispitivanih sojeva se centrifugiraju 10 minuta pri $2,236 \times g$ (rcf) i 4°C . Talog stanica se ispiru dva puta hladnim fosfatnim puferom $\text{pH}=7,4$. Dodaje se 10 mL 5 M litijevog klorida (LiCl) s ciljem odvajanja S-proteina i SLAP proteina od stanica i slijedi inkubacija 30 min pri 4°C uz povremeno protresanje. Nakon 10 minuta centrifugiranja pri $8,994 \times g$ (rcf) i 4°C , izdvojeni supernatanti svakog soja se prebace u Spectra/Por poroznu membranu i dijaliziraju u hladnoj destiliranoj vodi na magnetskoj miješalici tijekom 24 sata. Sadržaj svake membrane se nakon dijalize centrifugira 30 min pri $20,000 \times g$ (rcf). Talog proteina svakog soja nakon dijalize se resuspendira u 100 μl reducirajućeg reagensa i 900 μl dH_2O , prokuha 3-5 minuta i nanosi na gel za SDS-PAGE se pomoću Hamiltonove igle (Beganović i sur. 2011; Johnson i sur. 2013) (3.2.4.).

3.2.3. Razdvajanje S-proteina i SLAP-a

Talog dobiven nakon dijalize se resuspendira u 1 mL 1 M otopine LiCl pri 4°C tijekom 15 minuta kako bi se razdvojili SLAP proteini od S-proteina koji nisu topljivi u 1 M LiCl. Nakon 10 minuta centrifugiranja suspenzije pri $20,000 \times g$, izdvojeni supernatanti se prebace u Spectra/Por membranu i ponovno se provodi dijaliza. Sadržaj membrane nakon druge dijalize se centrifugira 30 minuta pri $20,000 \times g$ (rcf). Talog proteina nakon druge dijalize se resuspendira u 10 μl pufera za uzotke (reducirajući reagens), zagrijava 3-5 minuta i nanosi na gel za Tricine SDS-PAGE pomoću Hamiltonove igle (Haider i sur., 2012) (3.2.5.).

3.2.4. SDS-PAGE

Pripremljeni uzorcima se nanose na 10%-tni poliakrilamidni gel. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) se provodi u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min. Nakon završene elektroforeze, gel se boji u otopini koja sadrži 0,02% Coomassie Brilliant Blue praha, 25% izopropanola i 10% octene kiseline, kroz najmanje 3 h. Nakon bojenja, gel je inkubiran u 10%-tnoj otopini octene kiseline do obezbojenja pozadine te nakon toga skeniran (Beganović i sur. 2011; Johnson i sur. 2013).

Priprava 10 %-tnog poliakrilamidnog gela:

gel za separaciju (10 %-tni)- donji gel:

Tris (hidroksimetil aminometan)-HCl pufer pH 8,8	2,5 ml
Akrlamid	2,5 ml
destilirana voda	2,5 ml
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin)	5 μ l
amonijev persulfat (10 %-tni APS)	38 μ l

gel za sabijanje (10 %-tni)-gornji gel:

Tris-HCl pufer pH 6,8	2,13 ml
Akrlamid	0,3 ml
TEMED	5 μ l
APS (10 %-tni)	22,5 μ l

Pufer za elektroforezu (10 x koncentrat), za 1000 ml:

30 g Tris-a
144 g glicina
10 g SDS-a

Pufer za uzorke za elektroforezu (5 x konc.)-reducirajući reagens (za 25 ml):

0,75 g Tris-a
0,095 g EDTA
2,5 g SDS-a (2%)
10 ml glicerola (10%)
0,005% bromfenol plavo
25% β -merkaptetoetanol

3.2.5. Tricin SDS-PAGE

Pripremljeni uzorci se nanose na poliakrilamidni gel. Tricin SDS-PAGE se provodi u komori za elektroforezu pri naponu od 125-150 V kroz 90 min. Nakon završene elektroforeze, donji gel se stavlja u otopinu za fiksiranje s 5% (v/v) glutaraldehidom tijekom 30 minuta, a nakon toga boji u otopini koja sadrži 0,02% Coomassie Brilliant Blue praha, 25% izopropanola i 10% octene kiseline. Nakon bojenja, gel je inkubiran u 10%-tnoj otopini octene kiseline do obezbojenja pozadine te nakon toga skeniran (Haider i sur., 2012).

Priprava poliakrilamidnog gela:

gel za separaciju (10 %-tni)- donji gel:

2,5 M Tris-HCl pufer pH 8,8	5,6 ml
30 % akrilamid/bisakrilamid	3,33 ml
destilirana voda	0,9 ml
TEMED	6 µl
30 mg/ml APS	150 µl

gel za sabijanje (4 %-tni)-gornji gel:

2,5 M Tris-HCl pufer pH 8,8	0,76 ml
30 % akrilamid/bisakrilamid	0,66 ml
destilirana voda	3,42 ml
TEMED	5 µl
30 mg/ml APS	150 µl

Pufer za elektroforezu (1 x koncentrat), za 1000 ml:

3,03 g Tris-a
4,5 g tricina
0,5 g SDS-a

3.2.6. Izolacija DNA

Volumen od 1,5 ml prekonocnih kultura bakterija mliječne kiseline se centrifugira i ispire u GTE puferu (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500 µl GTE pufera, uz dodatak lizozima (8 mg/500 µl) i RNA-ze (50 µl/ml), i inkubiraju 30 minuta pri 37°C. Zatim se doda 250 µl 2% SDS-a i vorteksira 1 min. Nakon toga se doda 100 µl neutralnog fenol-kloroforma, vorteksira 30 sekundi i centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5

minuta. Supernatant, bez interfaze, se pomiješ s 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8), i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) slijedi centrifugiranje na 13 000 o/min tijekom 10 minuta. Talog se resuspendir u 300 µl 0,3 M NaAc i 10 mM MgCl₂ i vorteksir. Nakon dodatka 700 µl apsolutnog etanola (ohlađenog na -20°C), uzorak se inkubira preko noći pri -20°C. Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 14000 o/min tijekom 20 minuta. Talog se suspendira u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na -20°C) i ponovno centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Talog DNA se resuspendira u 50 µl TE (10mM Tris (pH 7,8) i 1mM EDTA) pufera.

3.2.7. PCR

Umnožavanje DNA molekule PCR metodom je provedeno u DNA-termobloku, Mastercycler personal, "Eppendorf". Kao DNA-kalup korištena je cjelokupna DNA bakterijskih stanica izolirana kao što je to opisano u poglavlju 3.2.5. Za sintezu željenog fragmenta DNA korištene su oligonukleotidne početnice Sprot1 i Sprot2 (Callegari i sur., 1998):

Sprot15' - CAG ATG ATA TCG CAT GCT TAT TCA AAG TTA GCA ACC TTA AC - 3'

Sprot25' - AACGCGTCGACATGCATCATTATAGGCTCCTTTCTCATG - 3'

Sastav reakcijske smjese volumena 25 µl je prikazana u tablici 2. Kao negativna kontrola je korištena PCR reakcijska smjesa bez DNA kalupa. PCR reakcija je provedena prema uvjetima navedenim u tablici 3. Nakon reakcije, 20 µl reakcijske smjese je nanešeno na 1% agarozni gel i elektroforeza je provedena u kadici za elektroforezu pri naponu od 190V.

Nakon provedene elektroforeze, gel je 30 minuta inkubiran u otopini etidij-bromida koncentracije 0,5 µg/mL, te zatim osvijetljen ultraljubičastim svjetlom na transluminatoru i snimljen pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa gel Capture (Leboš Pavunc i sur. 2012).

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije

Sastojci reakcijske smjese	Volumen
EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix)	12,5 µL
Kalup (DNA)	1 µL
Početnica Sprot 1	0,05 µL
Početnica Sprot 2	0,05 µL
dH ₂ O	11,4 µL
UKUPAN VOLUMEN:	25 µL

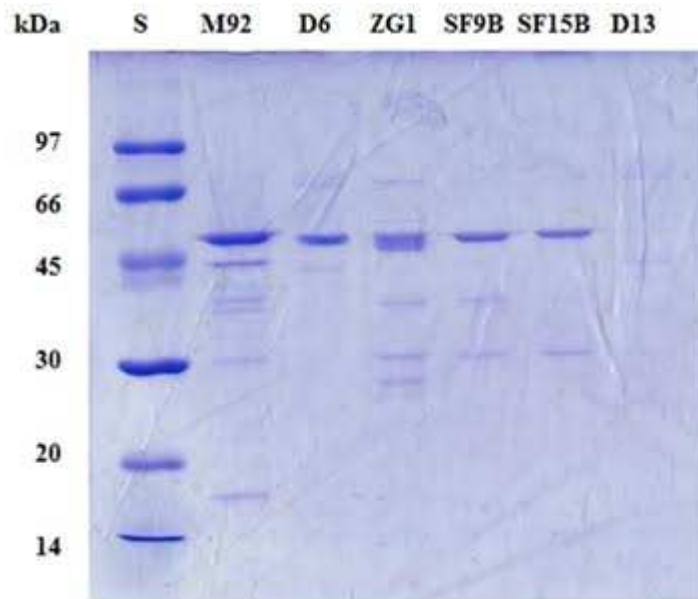
Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije za amplifikaciju Sprot1 i Sprot2

Uvjeti PCR reakcije	T [°C]	vrijeme
Početna denaturacija	94	5 min
25 ciklusa:		
Denaturacija	94	1min
Sparivanje početnica	45	1 min
Produljivanje lanca DNA	72	2 min
Završno produljivanje lanca DNA	72	8 min

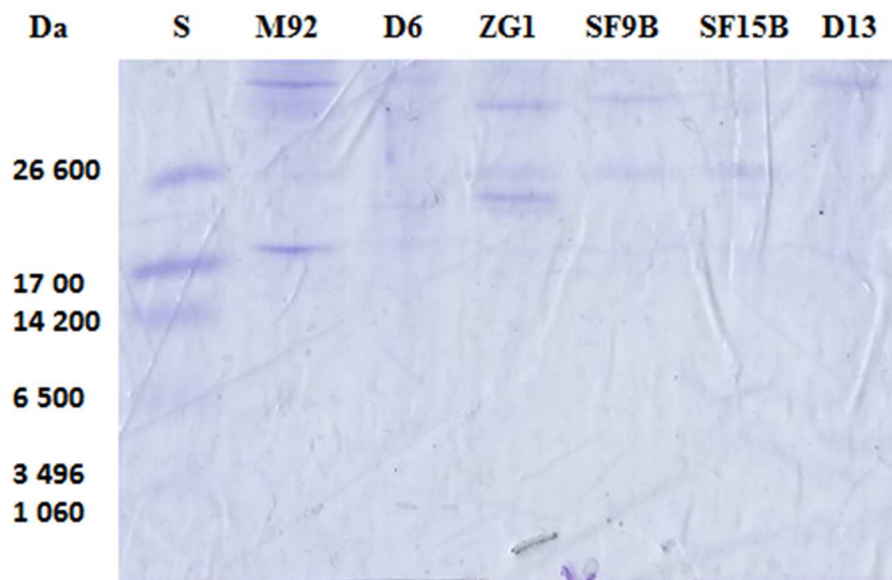
4. REZULTATI

4.1. Ekstrakcija i razdvajanje S-(surface) proteina i SLAP-a (eng. Surface-Layer Associated Proteins) s površine stanica *Lactobacillus* sojeva

S- proteini se nalaze kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te *Archea*. Prisutni su na površini stanične stijenke nekoliko vrsta bakterija roda *Lactobacillus*: *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. helveticus* i *L. hilgardii* te kod bakterijskih vrsta iz nekadašnje *Lactobacillus acidophilus* grupe. Molekulska masa se kreće u rasponu od 40 do 200 kDa. Usporedbom s S-proteinima ostalih Gram pozitivnih bakterija, S-proteini iz roda *Lactobacillus* su jedinstveni zbog toga što ne posjeduju SLH (eng. S-layer homologous) domenu, najmanji su od svih poznatih S-proteina (25-71 kDa) i imaju visoku pI vrijednost, od 9,35 do 10,4. Uz S-proteine se mogu naći i SLAP (eng. Surface-Layer Associated Proteins) čija je funkcija još uvijek nepoznata (Hynönen i Palva, 2013; Uroić i sur. 2016). S ciljem ekstrakiranja S-proteina i proteina koji su na njih vezani (eng. SLAP) stanice su tretirane s litijevim kloridom (LiCl). Kao pozitivna kontrola korišten je soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji eksprimira proteine S-sloja i detaljno je okarakteriziran kao probiotički soj u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Kos i sur., 2003; Frece i sur., 2005; Beganović i sur., 2011). Kao negativna kontrola odabran je soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine na površini stanica. Nakon tretmana s 5 M LiCl provedena je dijaliza supernatanta u kojem se nalaze ekstrahirani S-proteini i SLAP proteini. Nakon dijalize je proveden SDS-PAGE taloga s ciljem detekcije proteina (slika 4). Kao standard su korišteni proteini molekulske mase u rasponu koji odgovara očekivanoj molekulskoj masi S-proteina. Na slici 4 su jasno vidljive proteinske vrpce veličine oko 45 kDa kod svih ispitanih sojeva kao i kod pozitivne kontrole (*L. helveticus* M92), dok kod negativne kontrole (*L. plantarum* D13) nije vidljiva proteinska vrpca s obzirom da taj soj ne eksprimira S-proteine i SLAP proteine. Resuspendiranjem taloga proteina nakon prve dijalize u 1 M LiCl provedeno je razdvajanje SLAP proteina od S-proteina, koji u litijevom kloridu nisu topljivi. Nakon druge dijalize je proveden tricin SDS-PAGE taloga u kojem se nalaze SLAP proteini (slika 5). Tricin SDS-PAGE se koristi za detekciju proteina niskih molekulskih masa. Na slici 5 vidljivo je da kod svih sojeva, osim kod negativne kontrole, postoje proteinske vrpce niskih molekulskih masa, što pokazuje da *L. plantarum* D13, osim što ne sadrži S-protein, ne sadrži niti SLAP proteine, za razliku od ostalih ispitivanih sojeva, koji uz S-proteine sadrže i SLAP proteine.



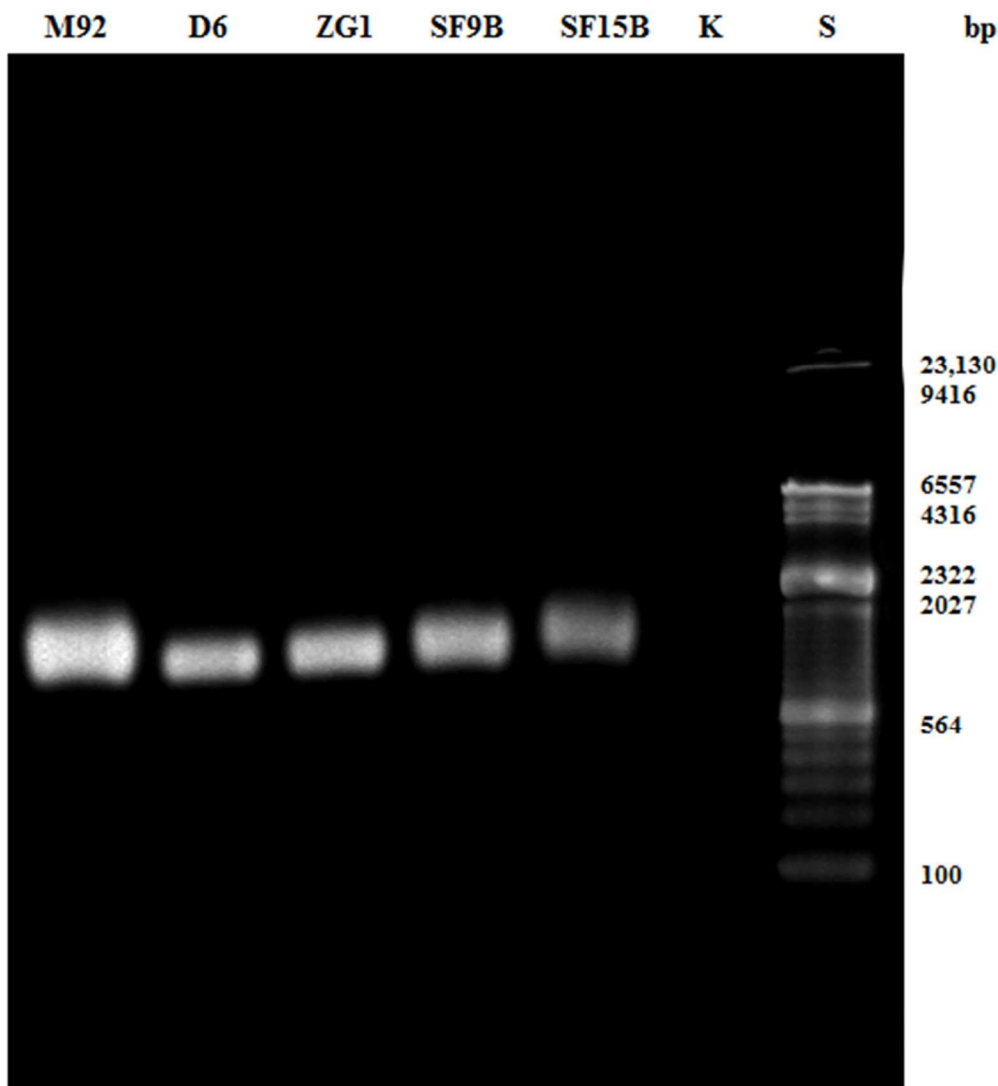
Slika 4. Ispitivanje prisutnosti S-proteina i SLAP proteina nakon prve dijalize provođenjem SDS-PAGE elektroforeze taloga uzorka proteina nakon tretmana s 5 M LiCl: S-standard, M92-*L. helveticus*, D6-*L. brevis*, ZG1-*L. brevis*, SF9B-*L. brevis*, SF15B-*L. brevis*, D13-*L. plantarum*



Slika 5. Ispitivanje prisutnosti SLAP proteina nakon druge dijalize provođenjem Tricine SDS-PAGE elektroforeze supernatanta uzorka proteina nakon tretmana s 1 M LiCl: S-standard, M92-*L. helveticus*, D6-*L. brevis*, ZG1-*L. brevis*, SF9B-*L. brevis*, SF15B-*L. brevis*, D13-*L. plantarum*

4.2. Ispitivanje prisutnosti gena koji kodiraju za S-proteine

Provedena je PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) reakcija sa sojevima *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus brevis* SF15B, kod kojih je uspješno provedena ekstrakcija S-proteina i SLAP-a, s početnicama Sprot 1 i Sprot 2, za detekciju gena koji kodiraju za S-proteine (slika 6). Kao negativna kontrola je korišten uzorak reakcijske smjese bez DNA kako bi bili sigurni da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije korištenih početnica. Vrpca koja odgovara veličini željenog produkta je vidljiva kod svih ispitanih sojeva (veličine oko 1300 bp).



Slika 6. Elektroforeza PCR produkata u agaroznom gelu, umnoženih specifičnim početnicama, Sprot 1 i Sprot 2. S-standard, M92-*Lactobacillus helveticus*, D6-*Lactobacillus brevis*, ZG1-*Lactobacillus brevis*, SF9B-*Lactobacillus brevis*, SF15B-*Lactobacillus brevis*, K–negativna kontrola (PCR reakcijska smjesa bez DNA kalupa)

5. ZAKLJUČCI

1. S-proteini i SLAP proteini su ekstrahirani s površine stanica odabranih *Lactobacillus* sojeva te je potvrđena njihova prisutnost primjenom SDS-PAGE elektroforeze.
2. Nakon provedene DNA elektroforeze PCR produkata, vidljivi su pozitivni signali za sve ispitivane *Lactobacillus* sojeve što ukazuje da su odabrane specifične početnice pogodne za detekciju gena koji kodiraju za površinske S-proteine.

6. LITERATURA

Arena M. P., Capozzi V., Spano G., Fiocco D. (2017) The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**: 2641-2657.

Åvall-Jääskeläinen S., Hynonen U., Ilk N., Pum D., Sleytr U. B., Palva A. (2008) Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. *BMC Microbiology* **8**: 165.

Beganović J., Frece J., Kos B., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Šušković J. (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**: 43-53.

Callegari M. L., Riboli B., Sanders J. W., Cocconcelli, P. S., Kok J., Venema G., Morelli L. (1998) The S-layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892: cloning, sequence and heterologous expression. *Microbiology* **144**: 719–726.

Chapot-Chartier M.-P., Kulakauskas S. (2014) Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial cell factories* **13**: S9.

Desvaux M., Dumas E., Chafsey I., Hebraud M. (2006) Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein. *FEMS Microbiology Letters* **256**: 1-15.

Frece J., Kos B., Svetec I. K., Zgaga Z., Mrša V., Šušković J. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 285-292.

Goh Y. J., Azcarate-Peril M. A., O'Flaherty S., Durmaz E., Valence F., Jardin J., Lortal S., Klaenhammer T. R. (2009) Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3093-3105.

Haider S. R., Helen J. R., Sharp B. L. (2012) Tricine-SDS-PAGE, U: Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, (Kurien, B.T., Scofield, R.H., ured.), Springer Science+Business Media, str. 81-91.

- Hollman A., Delfederico L., Miyoshi A., Disalvo E. A., De Antoni G., Semorile L., Azevedo V. (2010) S-layer proteins from lactobacilli as vaccine delivery systems. *International Journal of Microbiology Research* **2**: 30-43.
- Hynönen U., Palva A. (2013) *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **9**: 5225–5543.
- Jakava-Viljanen , M., Åvall-Jääskeläinen S., Messner P., Sleyter U. B., Palva A. (2002) Isolation of three new surface layer proteins genes (slp) from *Latobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. *Journal of Bacteriology* **184**: 6786-6795.
- Johnson B. R., Hymes J., Sanozky-Dawes R., Henriksen E. D., Barrangou R.,Klaenhammer T. R. (2015) Conserved S-layer-associated proteins revealed byexoproteomic survey of S-layer-forming lactobacilli. *Applied Environmental Microbiology* **82**: 134–145.
- Johnson B. R. , Selle K., O’Flaherty S., Goh Y.J., Klaenhammer, T. (2013) Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Microbiology* **159**: 2269-2282.
- Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 981-987.
- Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos B., Uroić K., Blažić M., Šušković J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technology and Biotechnology* **50 (2)**: 141-151.
- Lortal S., Vanheijenoort J., Gruber K., Sleytr U. B. (1992) S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. *Journal of General Microbiology* **138**: 611-618.
- Uroić, K., Beganović, J., Hynönen, U., Pietilä, T. E., Leboš Pavunc, A., Kant, R., Kos, B., Palva, A., Šušković, J. (2016) The role of S-layer in adhesive and immunological properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT - Food Science and Technology* **69**: 623-632.

Wang R., Jiang L., Ming Z., Zhao L., Hao Y., Guo H., Sang Y., Zhang H., Ren F. (2017) The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a Human Intestinal Epithelial Cell Line Requires S-layer Proteins. *Scientific Reports* **7**:44029.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni

Ime i prezime studenta