

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Manuela Šantak

616/MB

**PROBIOTIČKA SVOJSTVA**  
**SOJA *Lactobacillus brevis* SF15B**  
**KOJI EKSPRIMIRA**  
**S-PROTEINE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno – biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014- 09-7009), pod mentorstvom dr. sc. Jagode Šušković, red. prof., Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te uz pomoć dr. sc. Ksenije Uroić, više asistentice.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, dr.sc. Jagodi Šušković, red. prof. na stručnom vodstvu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada, te na prezentacijama i seminarima kojima se trudila približiti nam nastavni sadržaj.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Blaženki Kos, red. prof. na divnom odnosu prema studentima i trudu.*

*Veliko hvala dr. sc. Kseniji Uroić, višoj asistentici, i Martini Banić, dipl. ing., na svim korisnim savjetima, velikoj motivaciji, nesebičnoj pomoći i divnoj atmosferi prilikom pripreme i izrade ovog rada.*

*Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška za vrijeme trajanja studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za primjenu antibiotika,  
enzima, probiotika i starter kultura

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Biotehnologija

### PROBIOTIČKA SVOJSTVA SOJA *Lactobacillus brevis* SF15B KOJI EKSPRIMIRA S- PROTEINE

*Manuela Šantak, 616/MB*

**Sažetak:** Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kada su prisutni u odgovarajućem broju, poboljšavaju zdravlje domaćina. Bakterije mliječne kiseline, među kojima se posebno ističu bakterije iz roda *Lactobacillus*, su najbolji modeli za probiotičku upotrebu te karakterizaciju pozitivnih učinaka. Cilj ovog rada bio je ispitati probiotička svojstva soja *Lactobacillus brevis* SF15B koji eksprimira S-proteine. Pritom se kao pozitivna kontrola koristio soj *L. helveticus* M92 koji eksprimira S-proteine, dok je negativna kontrola bio soj *L. plantarum* D13 koji navedene proteine ne eksprimira. Osim S-proteina, na površini stanica ispitivanog soja nalaze se i SLAP (Eng. Surface-Layer Associated Proteins). Uloga S-proteina u probiotičkom djelovanju soja SF15B ispitana je iz aspekta adhezije na mucin, prilikom čega je dokazano da prisutnost sloja S-proteina pridonosi boljim adhezijskim svojstvima. Osim toga, soj *L. brevis* SF15B ima sposobnost preživljavanja u pojedinim nepovoljnim uvjetima koji mogu vladati u ljudskom gastrointestinalnom traktu te pokazuje značajnu proteolitičku aktivnost.

**Ključne riječi:** probiotici, *Lactobacillus brevis*, S-proteini, SLAP, adhezija

**Rad sadrži:** 43 strane, 5 tablica, 22 slike, 41 referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** dr. sc. Jagoda Šušković, red. prof.

**Pomoć pri izradi:**

Dr. sc. Ksenija Uroić, viši asistent

Dipl. ing. Martina Banić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
2. Prof.dr.sc. Jagoda Šušković
3. Izv. prof.dr.sc. Ksenija Durgo
4. Izv.prof.dr.sc. Jasna Mrvčić

**Datum obrane:** 23. rujna 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic**  
**And Starter Culture Technologies**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### **PROBIOTIC CHARACTERISTICS OF STRAIN *Lactobacillus brevis* SF15B EXPRESSING S-PROTEINS**

*Manuela Šantak, 616/MB*

**Abstract:** Probiotics are live microorganisms which, when administered in adequate amount, confer a health benefit on the host. Lactic acid bacteria, especially bacteria of the genus *Lactobacillus*, are of first choice microorganisms for probiotic application and characterization of their effect on human health. The aim of this study was to examine probiotic properties of the strain *Lactobacillus brevis* SF15B which expresses S-layer proteins. Strain *L. helveticus* M92, which also contains layer of S-proteins on the surface of the bacterial cells, was used as positive control, while strain *L. plantarum* D13, which doesn't express mentioned proteins, was used as negative control. Besides S-layer proteins, on the cell surface of strain SF15B there are also SLAPs (Eng. Surface-Layer Associated Proteins). The role of S-layer proteins in probiotic activity of strain SF15B was examined from the aspect of adhesion to mucin, during which it was proven that the presence of S-layer proteins contributes to better adhesion properties. In addition, strain *L. brevis* SF15B has the ability to survive in the various rigorous conditions which are present in the human gastrointestinal tract and exhibits significant proteolytic activity.

**Keywords:** probiotics, *Lactobacillus brevis*, S-layer proteins, SLAP, adhesion

**Thesis contains:** 43 pages, 22 figures, 5 tables, 41 references

**Original in:** Croatian

**Graduate 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. Jagoda Šušković, Full professor

**Technical support and assistance:** Phd. Ksenija Uroić, Senior Assistant and BSc Martina Banić, Assistant

**Reviewers:**

1. PhD. Blaženka Kos, Full professor
2. PhD. Jagoda Šušković, Full professor
3. PhD. Ksenija Durgo, Associate professor
4. PhD. Jasna Mrvčić, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September 23, 2016

# SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
2	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1	ZAJEDNIČKE KARAKTERISTIKE PROBIOTIKA .....	3
2.2	<i>Lactobacillus i Bifidobacterium</i> .....	4
2.3	SELEKCIONIRANJE SOJEVA I UČINCI NA ZDRAVLJE .....	6
2.4	ZNAČAJNE SMJERNICE SVJETSKJE ZDRAVSTVENE ORGANIZACIJE (WHO, 2002. godina).....	6
2.4.1	IDENTIFIKACIJA SOJEVA .....	6
2.4.2	SIGURNOSNA UPOTREBA I PREPORUKE U POVIJESTI .....	6
2.4.3	TOLERANCIJA NA UVJETE U GASTOINTESTINALNOM TRAKTU .....	7
2.4.4	KLINIČKA ISPITIVANJA NA LJUDIMA .....	7
2.5	UČINCI PROBIOTIKA NA ZDRAVLJE .....	7
2.5.1	UTJECAJ PROBIOTIKA NA POREMEĆAJE U CRIJEVIMA .....	8
2.5.2	PREVENCIJE ALERGIJA .....	9
2.5.3	ANTIKANCEROGENA SVOJSTVA PROBIOTIKA.....	10
2.5.4	PRIMJENA PROBIOTIKA U REGULIRANJU RAZINE KOLESTEROLA U KRVU.....	10
2.6	BUDUĆA ISTRAŽIVANJA PROBIOTIKA.....	13
3	EKSPERIMENTALNI DIO .....	15
3.1	MATERIJALI.....	15
3.1.1	Radni mikroorganizmi.....	15
3.1.2	Hranjive podloge .....	15
3.1.3	Kemikalije .....	16
3.1.4	Aparatura i pribor .....	17

3.2	METODE RADA .....	17
3.2.1	Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	17
3.2.2	Adhezija na mucin.....	18
3.2.3	Analiza proteinazne aktivnosti .....	19
3.2.4	Denaturirajuća gradijentna gel elektroforeza (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) .....	20
3.2.5	Ekstrakcija SLAP (engl. S-layer associated proteins) proteina pomoću LiCl ...	22
3.2.6	Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata u različitim uvjetima.....	23
4	REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1	Denaturirajuća gradijentna gel elektroforeza (DGGE).....	24
4.2	Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata u različitim uvjetima .....	26
4.3	Analiza proteinazne aktivnosti .....	32
4.4	Ekstrakcija SLAP proteina pomoću LiCl .....	34
4.5	Adhezija na mucin .....	37
5	ZAKLJUČAK .....	39
6	LITERATURA .....	40



# 1 UVOD

Mikrobi su stoljećima bili dio svakodnevne ishrane, no tek nedavno je razvijen koncept „probiotika“. 1997. godine, Elie Metchnikoff, ruski dobitnik Nobelove nagrade, predložio je upotrebu korisnih mikroba u borbi protiv štetnih i patogenih mikroorganizama u ljudskim crijevima. Prije više od jednog stoljeća, Metchnikoff je u svojoj knjizi pod naslovom „Produljenje života“ opisao korisne učinke bakterija mliječne kiseline (Metchnikoff, 1910.). Izraz „probiotik“ priznat je 1961. godine, kada su Lilly i Stillwell predložili navedeni izraz za supstance proizvedene pomoću mikroorganizama koji potiču rast drugih mikroba. Fuller je 1989. godine definirao probiotike kao „žive mikrobne dodatke prehrani, koji imaju povoljan učinak na domaćina i održavaju intestinalnu ravnotežu“. Definicija probiotika se nadalje modificirala pa glasi: „Probiotik je jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primjenjene u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone kulture“ (Havenaar i Huis in't Veld, 1992; Šušković, 1996.). Koncept fekalne transplantacije vjerojatno će redefinirati budućnost probiotika kao mješovitih kultura mikroorganizama.

Rodovi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* predstavljaju glavninu probiotičkih proizvoda dostupnih na tržištu. Štoviše, većina njih ima dugu povijest sigurne upotrebe u hrani te se nalaze na europskoj QPS listi i/ili imaju GRAS status za sigurnu upotrebu u specifičnoj hrani. Bakterije mliječne kiseline i rod *Bifidobacterium* su vjerojatno najbolji modeli za probiotičku upotrebu te karakterizaciju pozitivnih učinaka. Rodovi *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Propionibacterium* i *Lactococcus* su također istraženi iz aspekta probiotičkog djelovanja. U tom slučaju, vrednovanje bi trebalo krenuti od potencijalnih sigurnosnih pitanja, a onda prikazivanja učinkovitosti i pozitivnih učinaka.

Cilj ovog rada bio je ispitati probiotička svojstva soja *Lactobacillus brevis* SF15B koji eksprimira S-proteine. Pritom se kao pozitivna kontrola koristio soj *L. helveticus* M92 koji sadrži S-proteine, dok je negativna kontrola bio soj *L. plantarum* D13 koji ne sadrži S-proteine. Nakon DGGE analize (Eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), provedena je ekstrakcija S-proteina te na njih vezanih proteina (Eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP) koji imaju nepoznatu funkciju, ali mogu pomoći u razumijevanju djelovanja probiotika, biologije stanične stijenke i imunomodulacije (Goh i sur., 2009). Nadalje,

provedeno je ispitivanje uloge S-proteina stanica soja *L. brevis* SF15B u adheziji na mucin, što je jedan od glavnih preduvjeta probiotičkog djelovanja u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Nadalje, ispitano je njegovo preživljavanje te brzina rasta u različitim nepovoljnim uvjetima te je provedena analiza proteolitičke aktivnosti ispitivanog soja.

## 2 TEORIJSKI DIO

### 2.1 ZAJEDNIČKE KARAKTERISTIKE PROBIOTIKA

Svi probiotički sojevi dozvoljeni za humanu primjenu moraju sadržavati određeni broj svojstava predloženih od strane FAO/WHO 2002. godine, koji su usmjereni na identifikaciju sojeva, funkcionalne karakteristike, procjenu sigurnosti i učinkovito ispitivanje na ljudima. Poželjno je da su potencijalni probiotički sojevi porijeklom iz čovjeka, izolirani iz usta, gastrointestinalnog trakta ili fecesa. Kao takvi, probiotici trebaju biti dio normalne, zdrave crijevne mikrobiote. Na primjer, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus vaginalis*, *Lactobacillus reuteri* i *Lactobacillus salivarius*, izolirani iz trbušne šupljine čovjeka, pokazuju korisna probiotička svojstva. Međutim, tradicionalno fermentirano mlijeko i slični proizvodi, uključujući jogurt, sir, kefirna zrnca, Maasai mlijeko te prirodno fermentirano goveđe mlijeko, su također istraženi kao izvor bakterija mliječne kiseline, bifidobakterija i drugih mikroorganizama. U majčinom mlijeku se također nalaze određeni probiotički sojevi, najčešće *Lactobacillus* spp. sa imunomodulacijskom aktivnošću. Maasai mlijeko, tradicionalno fermentirano mlijeko podrijetlom iz Kenije, prethodno je uzeto za izolaciju bakterija *Lactobacillus* spp., koje su zatim korištene kao starter kulture. *Kule naoto*, *kwerionik* ili *amasi* (*mukaka wakakora* ili *zifa*), tradicionalna fermentirana mlijeka sa probiotičkim svojstvima, proizvode se i konzumiraju prvenstveno u Keniji i Zimbabveu. Kefirna zrnca se koriste za izolaciju potencijalnih probiotičkih sojeva te u pripremi fermentiranih mliječnih proizvoda. Sirevi iz raznih zemalja poput Italije, Argentine i Bugarske su također korišteni za izolaciju sojeva *Lactobacillus plantarum* koji su izloženi ispitivanju tolerancije na različite fiziološke faktore, uključujući i preživljavanje u mediju baziranom na mlijeku. Jogurt je još jedan primjer tradicionalno pripremljenog fermentiranog mliječnog proizvoda dobro prihvaćenog od strane potrošača. Tijekom procesiranja jogurta, *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus* su pokazali simbiotsku povezanost i smatraju se probiotičkim mikrobima. Pojam „simbiotski“ označava kombiniranu primjenu specifičnih probiotika zajedno sa prebioticima kako bi se odredile prednosti kroz sinergističko djelovanje dvaju komponenta (Bellavia i sur., 2013.). Završna faza ispitivanja uključuje utvrđivanje sigurnosti, fermentabilnosti, arome, teksture i roka uporabe. Druge karakteristike poput sadržaja kisika, redoks potencijala i aktiviteta vode su također vrlo važne za osiguranje preživljavanja probiotičkih mikroorganizama tijekom skladištenja. Interakcije između

uobičajenih starter kultura i probiotičkih mikroorganizama, poput sinergističkih ili antagonističkih učinaka, mogu također utjecati na senzorska svojstva, kao i na preživljavanje probiotičkih mikroba, kako u samom proizvodu, tako i u humanom gastrointestinalnom traktu. Za razliku od probiotičkih formulacija baziranih na mlijeku, diljem svijeta postoje različita pića koja se koriste za izolaciju i karakterizaciju probiotičkih bakterija sa specifičnim svojstvima. Neki od tih tradicionalnih napitaka su bazirani na žitaricama. Primjer je *Yosa*, fermentirani proizvod od žitarica baziran na zobi, koji ima široku primjenu u nordijskim zemljama i predstavlja zamjenu za osobe koje pokazuju intoleranciju na laktozu te izbjegavaju proizvode životinjskog porijekla, soju ili mliječne proteine. Fermentirani *Yosa* proizvod korišten je za stabilizaciju prolaska kroz crijevo kod starijih osoba. *Bosa*, bugarski napitak napravljen od žitarica, koristio se za izolaciju bakterija *Lactobacillus* spp. *Mageu (amaHewu)*, tradicionalno bezalkoholno piće iz Sjeverne Afrike, napravljeno je od kukuruzne krupice i u njemu dominira *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* koji se može dalje koristiti za karakterizaciju probiotičkih svojstava. Diljem svijeta mogu se naći i mnogi drugi fermentirani napitci od žitarica koji su se koristili za izolaciju probiotičkih mikroorganizama, uključujući *Pozol* (Meksiko) i *Togwa* (Tanzanija). Nadalje, postoje brojni voćni i biljni napitci koji su tijekom vremena stekli popularnost, pa je tako na primjer *hardaliye* fermentirano piće od grejpa iz kojeg je izolirano mnogo laktobacila. Osim probiotika baziranih na piću, postoje dokazi o korištenju mesa i povrća kao potencijalnih izvora probiotičkih mikroorganizama. Napretkom novije high-throughput tehnologije za analizu mikrobiote, velik broj studija je istražio mikrobnu dinamiku tijekom fermentacije te moguću ulogu probiotičkih mikroorganizama tijekom fermentacije, skladištenja i konzumacije. Primjer je upotreba soja *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1. tijekom fermentacije zelenih maslina. U ovom procesu, u mikrobnoj flori prevladavaju probiotički sojevi koji se mogu koristiti kao starter kulture i probiotičke kulture.

## **2.2 *Lactobacillus* i *Bifidobacterium***

Glavne *Lactobacillus* vrste koje su uzete u obzir za proučavanje probiotičkih svojstava uključuju *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*,

*Lactobacillus reuteri* i *Lactobacillus rhamnosus*. Bakterije mliječne kiseline (BMK) su tolerantne na kiselinu te su fermentativne i koriste se kao starter kulture u većini fermentirane hrane. BMK imaju unutarnji kapacitet tolerancije na niske pH vrijednosti, visoke koncentracije žučnih soli te imaju sposobnost adhezije na površinu crijevne sluznice. Molekularne studije su otkrile da je velik dio njihovih genoma zadužen za iskorištavanje i transport šećera. Intestinalna prilagodba je također jasna s obzirom na prisutnost proteina potrebnih za vezanje na sluznicu, na primjer adhezijskih proteina u *Lactobacillus acidophilus* te gena za hidrolizu žučnih soli u *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus casei* eksprimira razne proteine u crijevima miša za bolju prilagodbu na intestinalne uvjete. *Lactobacillus casei* Shirota (LcS) je bio predmet znanstvenih istraživanja u svrhu dokazivanja njegovih probiotičkih svojstava i sigurnosti njegove primjene kroz više od 70 godina. *In vitro* ispitivanjima uočeno je da LcS pokazuje veću toleranciju na želučane sokove te prisutnost natrijevog deoksikolata od drugih sojeva korištenih u proizvodnji jogurta (Pradeep i sur., 2014.). Brojne znanstvene studije, *in vitro*, na životinjama te također kliničke studije, potvrdile su brojne korisne učinke ovog soja u tijelu, poput modulacije intestinalne mikroflore, funkcionalnosti crijeva te stimulacije određenih funkcija imunološkog sustava (Spanhaak i sur., 1999.; Hori i sur., 2003.; Bellavia i sur., 2014.; Frece i sur., 2005.; Morimoto i sur., 2005.; Nagao i sur., 2000.; Takeda i Okumura, 2004.; Yuki i sur., 1999.). *Bifidobacterium* spp. je također korišten za probiotičku primjenu jer dijeli mnoge fenotipske karakteristike sa laktobacilima. U usporedbi sa laktobacilima, bifidobakterije nastanjuju vrlo ograničenu nišu, poput humanog ili animalnog gastrointestinalnog trakta, a u nekim slučajevima i crijeva insekata. Najvažnija metabolička funkcija intestinalne mikroflore uključuje digestiju (fermentaciju) neprobavljivih ugljikohidrata (celuloza, hemiceluloza, pektin, guma, škrob) pomoću bakterijskih enzima pri čemu kao produkti nastaju kratkolančane masne kiseline (SCFA) te plinovi (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, metan) (Backhed i Tremaroli, 2012.). Glavne izolirane i proučavane vrste uključuju *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum* i *B. pseudocatenolatum*. Genomske studije koje su proučavale sojeve *Bifidobacterium* su otkrile da oni mogu koristiti široki raspon ugljikohidrata, poput fruktana inulinskog tipa, arabinogalaktana, arabinoksilana te škroba. Posebni operoni su uključeni u specijalne svrhe, poput razgradnje amilopektina kod sojeva *B. breve* te upotrebu širokog raspona jednostavnih šećera kod *B. dentium*. Sojevi *Bifidobacterium* također pokazuju promjene na nivou transkriptomike i proteomike u intestinalnim uvjetima ili crijevnom okolišu.

## **2.3 SELEKCIONIRANJE SOJEVA I UČINCI NA ZDRAVLJE**

Prema smjernicama WHO/FAO iz 2002. godine, probiotička svojstva nisu samo specifična za vrstu, nego i za soj. Slično tome, regulatorne smjernice izdala je Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA), prema kojima se korisni učinci jednog soja ne mogu primijeniti na drugi, čak ni unutar iste vrste. Probiotici su selekcionirani prema njihovoj sposobnosti prolaska kroz gornji dio gastrointestinalnog trakta (s obzirom na niski pH i visoke koncentracije žučnih soli), kolonizaciji crijevnog epitela te antimikrobnoj aktivnosti prema patogenima. Osim toga, karakterizacija i odabir na početku moraju biti u skladu sa smjernicama WHO/FAO. Glavni koraci uključuju identifikaciju sojeva molekularnim alatima, funkcionalnu karakterizaciju koristeći *in vitro* i *in vivo* modele, procjenu formulacije te kontrolu kvalitete.

## **2.4 ZNAČAJNE SMJERNICE SVJETSKE ZDRAVSTVENE ORGANIZACIJE (WHO, 2002. godina)**

### **2.4.1 IDENTIFIKACIJA SOJEVA**

Danas je prihvaćeno da su probiotička svojstva specifična za soj. Prema tome, kod identifikacije probiotičkih mikroorganizama na razini roda ili vrste, identifikacija soja se smatra jednom od osnovnih aspekata u probiotičkoj karakterizaciji. Biokemijska karakterizacija treba biti upotpunjena genotipskom karakterizacijom baziranom na molekularnim alatima za identifikaciju sojeva ili diferencijaciju. Sekvencioniranje cijelog genoma probiotičkih sojeva može djelovati kao uputa za validaciju i komercijalizaciju.

### **2.4.2 SIGURNOSNA UPOTREBA I PREPORUKE U POVIJESTI**

Sojevi korišteni za probiotičku karakterizaciju trebaju biti sigurni za primjenu, što se može utvrditi identifikacijom odgovarajućeg izvora iz kojeg je soj izoliran te povijesti

njegove uporabe. Preporučeno je da se kod probiotičkih sojeva ispituje antibiotska rezistencija, metabolička sposobnost te produkcija toksina u sisavcima. Smatra se da su probiotički sojevi izolirani iz tradicionalne hrane ili pića sigurni zbog njihove duge primjene kod ljudi tijekom povijesti.

### **2.4.3 TOLERANCIJA NA UVJETE U GASTROINTESTINALNOM TRAKTU**

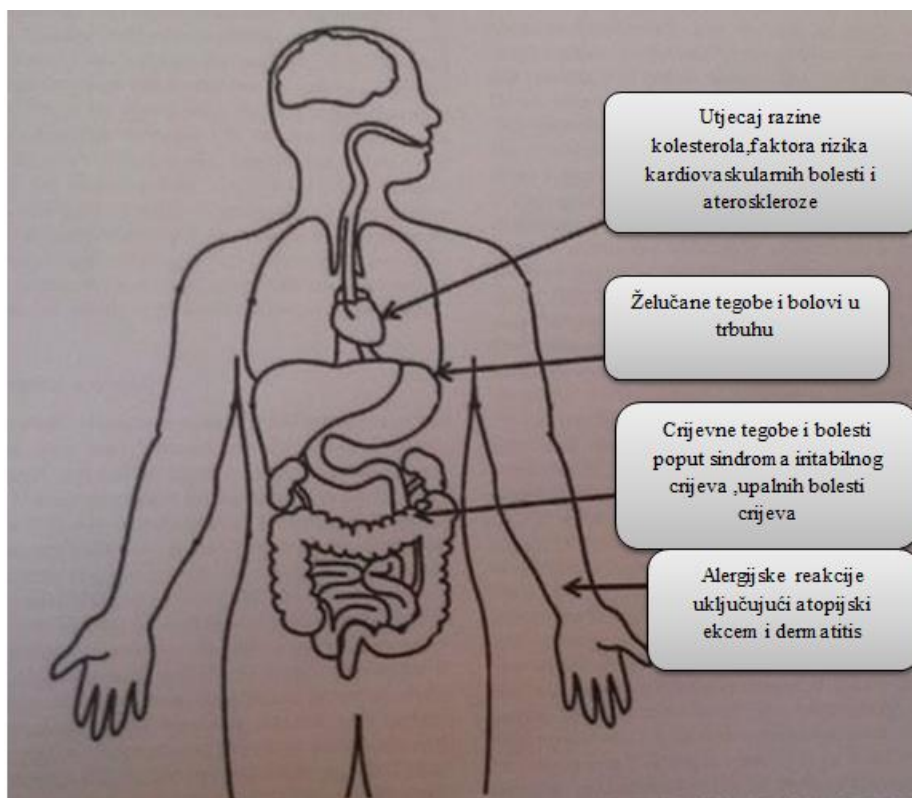
Preživljavanje probiotičkih sojeva je karakterizirano njihovom sposobnošću da prežive u određenim uvjetima gastrointestinalnog trakta poput kiselosti te visoke koncentracije žučnih soli (Kos, 2001.). Za odabir probiotičkih sojeva također je važan antimikrobni potencijal prema patogenima. Dopuštenje za upotrebu probiotika je bazirano na poštivanju kriterija prema internacionalnim smjernicama koje uključuju identifikaciju, sigurnost i učinkovitost (Joint FAO/ WHO, 2002.). Mnoge studije su pokazale sekreciju bioaktivnih faktora koji djeluju inhibitorno na velik broj patogena. Adhezija na površinu crijevnog epitela može se odrediti pomoću *in vitro* testova adhezije baziranih na raznim crijevnim epitelnim stanicama te *in vivo* na modelima životinja.

### **2.4.4 KLINIČKA ISPITIVANJA NA LJUDIMA**

Bazirano na studijama sa životinjama, testiranja na ljudima su napravljena da se potvrde traženi učinci na zdravlje te se utvrdi biološko i statističko značenje. Kliničke studije uključuju razne faze: faza 1 (sigurnost), faza 2 (djelotvornost), faza 3 (učinkovitost), faza 4 (utjecaj vanjskih faktora na preživljavanje).

## **2.5 UČINCI PROBIOTIKA NA ZDRAVLJE**

Osim pozitivnih učinaka probiotika, postoje nekoliko kliničkih stanja koja se mogu liječiti primjenom specifičnih probiotika. Primjer je dijareja, gastroenteritis, sindrom iritabilnog crijeva, upalne bolesti crijeva, Chronova bolest te simptomi intolerancije na laktozu (Slika 1.).



**Slika 1.** Glavna područja ispitivanja učinaka probiotika na zdravlje čovjeka: smanjenje rizika pojave kardiovaskularnih bolesti i alergija; ublažavanje želučanih tegoba te simptoma poput upalnih bolesti crijeva, sindroma iritabilnog crijeva te Chronove bolesti.

Ovi živi mikroorganizmi imaju brojne korisne učinke na zdravlje, uključujući prevenciju pojave raka ili hipertenzije, terapijske učinke na funkcije intestinalnog trakta, imunološke funkcije te utjecaj na zdravlje želuca (Hasler, 2002.). Mehanizam prevencije pojave raka povezan je sa njihovim bioproductima, koji mogu smanjiti proliferaciju stanica raka (Bruhn i sur., 2002.). Nadalje, probiotici mogu poboljšati simptome intolerancije na laktozu te smanjiti razinu kolesterola u serumu (Sanders i Huis, 1999.).

### **2.5.1 UTJECAJ PROBIOTIKA NA POREMEĆAJE U CRIJEVIMA**

Za održavanje intestinalne mikroflore važna je cjelokupna i stabilna suradnja između mikroflore, imunološkog sustava te barijere koju čini crijevna mukoza. Svaki događaj koji dovodi do promjene jedne od ovih komponenata izaziva poremećaj ravnoteže s posljedicom lokalnih ili sistemskih bolesti (Blaut, 2002.; Abbasi i sur., 2015.). Probiotici imaju pozitivan učinak u slučaju dijareje (Guandalini i sur., 2000.) koja može biti uzrokovana virusnom ili



bakterijskom infekcijom ili biti posljedica primjene antibiotika (Cremonini i sur., 2002.). Također je bitno naglasiti da učinkovitost probiotičkih sojeva ovisi o tipu dijareje. Na primjer, probiotici su učinkoviti kod dijareje uzrokovane rotavirusom. Glavni probiotički sojevi koji se koriste za kliničku primjenu kod djece su *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus rhamnosus* te *Lactobacillus reuteri*. Mnoge studije su koristile soj *Lactobacillus rhamnosus* GG kod dijareje uzrokovane bakterijom *Clostridium difficile* te u prevenciji pojave „pouchitisa“, upale zdjeličnog rezervoara. Mogući mehanizam može biti imunomodulacija, odnosno povećana sekrecija imunoglobulina A. Neke probiotičke bakterije izlučuju sekretorne peptide, odnosno bakteriocine, koji mogu inhibirati rast nekih patogena prisutnih u želucu. Vjeruje se da probiotički mikroorganizmi konkuriraju patogenima, virusima i bakterijama u vezanju na crijevni epitel. Upalne bolesti crijeva, kao što su Chronova bolest i ulcerativni kolitis, daju jak imunosti odgovor na crijevne mikroorganizme. Probiotici imaju primjenu kod ublažavanja upalnih bolesti crijeva, koje mogu biti posljedica stimulacije imunosti odgovora domaćina koji uključuje proliferaciju imunosti stanica, pojačanu fagocitnu aktivnost, povećanu sekreciju imunoglobulina A te promjenu cjelokupnog mikrobnog sastava. Neke BMK, uključujući *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*, također poboljšavaju intoleranciju na laktozu prilikom njene proizvodnje. Naime, fermentirani mliječni proizvodi poput jogurta se obično preporučaju za regulaciju intolerancije na laktozu. U slučaju konstipacije, vjeruje se da bakterije mliječne kiseline izlučuju organske kiseline koje modificiraju crijevnu mikrobiotu te ubrzavaju prolazak hrane kroz crijeva.

## **2.5.2 PREVENCIJE ALERGIJA**

Probiotici pokazuju antialergijske učinke degradacijom ili modifikacijom struktura enteralnih antigena, stabilizacijom mikrobiote, jačanjem obrambene barijere crijevne sluznice, regulacijom sekrecije proinflammatory medijatora te razvojem imunosti sustava. Klinička ispitivanja djelovanja probiotika kod djece su pokazala značajno smanjenje učestalosti pojave ekcema, posebno ekcema uzrokovanih imunoglobulinom E. Uvidom u administraciju probiotika, dokazano je da primjena probiotika tijekom trudnoće može smanjiti rizik od pojave ekcema u prvoj godini života. U slučaju alergija na hranu, dojenčad hranjena sa sojem *Lactobacillus rhamnosus* GG pokazuje povećanje tolerancije na proteine kravljeg mlijeka. Interakcije crijevne mikrobiote i probiotika imaju značajnu ulogu u imunološkoj regulaciji te predispoziciji za alergije. Nadalje, današnje spoznaje dokazuju da se pojedinačni klinički

izvještaji ne mogu generalizirati te se probiotici ne mogu smatrati kao terapijska zamjena kod liječenja alergija. Doduše, svojstva probiotika su specifična za soj, a još se mora razjasniti točan mehanizam djelovanja.

### **2.5.3 ANTIKANCEROGENA SVOJSTVA PROBIOTIKA**

Nekoliko probiotičkih sojeva koji pripadaju rodovima *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus* spp. pokazuju antikancerogenu, antimutagenu te antitumorsku aktivnost u različitim životinjama. Kratkolančane masne kiseline koje proizvodi intestinalna mikrobiota imaju važnu ulogu u održavanju zdravlja sluznice debelog crijeva. Probiotički sojevi ne proizvode antikancerogeni butirrat, za razliku od crijevnih bakterija koje pripadaju klasteru klostridija IV i XIVa. Mehanizam antikancerogene aktivnosti butirata može biti inhibicija proliferacije, indukcija apoptoze te diferencijacija tumorskih stanica. Probiotici također utječu na fermentaciju ugljikohidrata i proteina, obogaćivanje mikrobiote pridonoseći povećanju aktivnosti razgradnje saharoze i snižavanjem proteolitičke aktivnosti. Naime, proteolitička fermentacija krajnjih produkata ili metabolita je potencijalno toksična. Zasad je proveden tek mali broj uspješnih studija koje istražuju probiotike, prebiotike ili sinbiotike sa potencijalnom antikancerogenom aktivnošću kod ljudi. Predloženo je da je sinbiotik možda učinkovitiji od bilo kojeg probiotika ili prebiotika u prevenciji kolorektalnog karcinoma ( Roberfroid, 1998.).

### **2.5.4 PRIMJENA PROBIOTIKA U REGULIRANJU RAZINE KOLESTEROLA U KRVI**

Povećane razine kolesterola u krvi povećavaju rizik od kardiovaskularnih i sličnih bolesti. Predloženo je da uvođenje probiotika u dijetalnu prehranu može pomoći u kontroli razine kolesterola u serumu. *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium lactis* koji se nalaze u jogurtu mogu sniziti razinu kolesterola u serumu. *In vitro* testovi su otkrili da se kolesterol u mediju može istaložiti uz pomoć laktobacila te se žučne soli mogu dekonjugirati. Kapacitet sniženja kolesterola je vjerojatno specifičan za soj, a klinička istraživanja na ljudima još nisu uključena (Tablica 1.). Koronarna bolest srca povezana je sa razinom kolesterola u serumu (De Jong i sur., 2007.). Biljni steroli (fitosteroli) utječu na razinu kolesterola u serumu tako da inhibiraju apsorpciju kolesterola i LDL kolesterola ( Lazarou i sur., 2009.).

**Tablica 1.** Neki komercijalno dostupni probiotički mikroorganizmi

<i>Probiotički soj</i>	<i>Izvor izolacije i komercijalna primjena</i>	<i>Učinci ili primjena</i>
<b><i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 i <i>Bifidocaterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>, BB-12</b>	LA-5 je selektirao Chr.Hansen za proizvodnju mliječnih probiotičkih proizvoda, koji uglavnom uključuju dječju formulu i dijetalne dodatke. Izoliran je iz humanog ždrijela te korišten u prehranbenim proizvodima tijekom 1970-ih.	LA-5 i <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12 smanjuju dijareju te konstipaciju kod starijih pacijenata
<b><i>Lactobacillus acidophilus</i> NCDO 1748</b>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCDO 1748 u fermentiranim mliječnim proizvodima je patentirala Arla Foods.	Onemogućava negativne utjecaje antibiotika te imobilizira mutagene iz hrane
<b><i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM</b>	Izoliran je na Carolina Food Microbiology (NCFM). Komercijaliziran je u dodacima i fermentiranoj hrani.	Održava zdravlje crijeva.
<b><i>Lactobacillus casei</i> Shirota</b>	Dr. Minoru Shirota ga je izolirao u Kyoto Imperial University's School of Medicine iz fermentiranog mliječnog napitka zvanog Yakult.	Povoljni učinci na kroničnu konstipaciju i sindrom kratkog crijeva (SBS)
<b><i>Lactobacillus gasseri</i> OLL2716 (LG21)</b>	Izolirali su ga Warren i Marshall 1982.godine s ciljem pronalaska zamjene za antibiotik kod liječenja infekcije bakterijom <i>H. pylori</i> .	Povoljni učinci kod infekcije bakterijom <i>H. pylori</i> te upala želučane sluzi

---

**Tablica 1.( nastavak) Neki komercijalno dostupni probiotički mikroorganizmi**

---

<i>Probiotički soj</i>	<i>Izvor izolacije i komercijalna primjena</i>	<i>Učinci ili primjena</i>
<b><i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>, F19</b>	Soj izoliran iz zdrave sluznice debelog crijeva. Koristi se u fermentiranim mliječnim proizvodima poput Cultura u Švedskoj i Danskoj.	Pomaže u održavanju crijevne flore tijekom primjene antibiotika
<b><i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>, <i>Lactobacillus casei</i> 431</b>	Izolirani iz fecesa zdrave djece.	Efikasni kod dojenčadi i mlađe djece u slučaju dijareje.
<b><i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, LGG</b>	Izoliran iz crijeva zdravog čovjeka te je komercijalno dostupna preko tvrtke Valio u Finskoj.	Prevenција i liječenje dijareje izazvane primjenom antibiotika te putničke dijareje.
<b><i>Lactobacillus rhamnosus</i>, GR-1 i <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14</b>	GR-1 je izoliran iz mokraćne cijevi, dok je RC-14 izoliran iz rodnice zdravih žena.	Značajno poboljšanje urogenitalnog zdravlja žena.
<b><i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001 i <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019</b>	Selekcioniran iz zbirke kultura New Zealand Dairy Research Institute.	Povoljni učinci kod gastrointestinalnih poremećaja te pozitivni učinci na imunitet
<b><i>Bifidobacterium longum</i> BB536</b>	Izoliran iz zdrave dojenčadi te komercijalno dostupan kao Morinaga Bifidus mlijeko.	Stimulacija imunosne aktivnosti i održavanje ravnoteže crijevne mikrobiote.

---

## 2.6 BUDUĆA ISTRAŽIVANJA PROBIOTIKA

Tržište trenutno nudi veliki broj proizvoda baziranih na probioticima i formulacije sa raznim učincima na zdravlje. Na primjer, postoji velik broj specifičnih društava koji izdaju preporuke o primjeni probiotika, poput Europskog društva o dječjoj gastroenterologiji, hepatologiji i prehrani (ESPGHAN) te odgovarajućeg društva u Sjevernoj Americi (NASPGHAN) o primjeni probiotika u tretmanu i prevenciji raznih bolesti. Međutim, u Europskoj Uniji još uvijek nisu dokazane zdravstvene tvrdnje o probioticima. Nepodudarnost ne znači da probiotički proizvodi nisu od koristi za cijelu populaciju, ali ukazuju na to da su studije do sad provele istraživanja na rizičnim populacijama ili subjektima sa specifičnim bolestima. Buduće studije moraju imati dokumentaciju o zdravstvenim tvrdnjama. Vijabilnost probiotičkih sojeva koja osigurava odgovarajuću dozu je vrlo važna za industrijsku standardizaciju. Sastav hrane te uvjeti procesiranja nisu navedeni na etiketi proizvoda, iako oni mogu utjecati na vijabilnost, učinkovitost i stabilnost probiotičkih sojeva. Tehnologija enkapsuliranja je vrlo korisna u održavanju stabilnosti probiotičkih sojeva u različitim vrstama hrane. Također, probiotički sojevi ne bi trebali utjecati na aromu i teksturu proizvoda na tržištu. Važno je da tehnološke i senzorske potrebe zadovoljavaju proces proizvodnje probiotičkih formulacija. Učinkovitost probiotika bazirana na kliničkim ispitivanjima treba biti u skladu sa kliničkim rezultatima te smanjenjem faktora rizika. U slučaju pretilosti, specifične promjene crijevne mikrobiote mogu nastupiti zbog probiotika, koji mogu pomoći u kontroli masnoća te smanjenju rezistencije na inzulin. Imunostimulacijska aktivnost laktobacila je dokazana pojačanom imunološkom funkcijom kod starijih osoba. No, tek se trebaju utvrditi specifične zdravstvene tvrdnje o probioticima u kontroli pretilosti ili imunogeničnosti. Meta-analiza kliničkih testova je pokazala da je vrlo teško postići suglasnost općih zdravstvenih tvrdnji jer se većina testova oslanja na različite sojeve ili kombinacije sojeva, kao i različite koncentracije te različite ciljne grupe. Specifične tvrdnje za važne bolesti, poput infekcije HIV-om ili karcinoma, trebaju biti vezane uz kliničke testove bazirane na velikom broju ljudi. Analize vezane uz biomarkere trebaju biti u korelaciji sa krajnjim kliničkim točkama. Na primjer, promjene kod inflamatornih citokina trebaju biti potpomognute smanjenjem ili prevencijom pojave bolesti. Probiotici imaju kompleksni mehanizam djelovanja na brojne metaboličke puteve; međutim, teško je primijeniti farmakološke regulacije. Sve više je postalo jasno da probiotici imaju „blaži“ učinak na zdravlje nego liječenje specifičnih simptoma bolesti. Ipak, uloga crijevne mikrobiote je sve više priznata kao jedan od glavnih čimbenika koji utječu na zdravlje. Pojavom „omiks“

tehnologija, utjecaj crijevne mikrobiote se može detaljnije proučiti u raznim uvjetima, što eventualno može dovesti do boljeg razumijevanja mikrobne uloge u fiziologiji domaćina. Na primjer, nedavno je pokazano da *Faecalibacterium prausnitzii* pokazuje snažnu anti-inflamatornu aktivnost kod osoba koje boluju od Chronove bolesti, pripadnici klastera klostridija IV i XIV formiraju spore koje induciraju regulatorne T stanice u debelom crijevu te može imati terapijski potencijal, a *Akkermansia muciniphila* se pokazala efikasnom u kontroli masnoće te liječenju poremećaja metabolizma izazvanih dijetama. Još jedan primjer je primjena transplantacije fekalne mikrobiote za suzbijanje infekcije bakterijom *Clostridium difficile*. Takve studije mogu dovesti do oblikovanja novih probiotika ili inovativnih kombinacija mikroba koji će se koristiti u terapijske svrhe.

## 3 EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1 MATERIJALI

#### 3.1.1 Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu u in vitro eksperimentima su korištena tri soja bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* prikazana u Tablici 1. Soj čija svojstva ispituje je *L. brevis* SF15B. Kao pozitivna kontrola korišten je soj *L. helveticus* M92 koji eksplicira S-proteine, a kao negativna kontrola korišten je soj *L. plantarum* D13 koji ne eksplicira S-proteine. Navedeni sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Sojevi se čuvaju pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola te su neposredno prije eksperimenta inokulirani u svježu tekuću podlogu i inkubirani prekonočno pri optimalnoj temperaturi rasta.

**Tablica 2.** Bakterijski sojevi korišteni u ovom diplomskom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	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 održavanje, čuvanje i uzgoj korištene su optimalne hranjive podloge za bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus*:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je jednakog sastava kao MRS agar, samo bez dodatka agara.

### 3.1.3 Kemikalije

U ovom eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- agaroz, „Appligane“, Strasbourg, Francuska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- APS, "Kemika", Hrvatska
- citratna kiselina, Sigma“, SAD
- Dcode dye solution, "Biorad", SAD
- dNTP mix, 10 mM, „Promega“, SAD
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim, Njemačka
- fiziološka otopina
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- Gene Ruler DNA standard, „Fermentas“, Kanada
- GoTaq® Flexi Buffer, „Promega“, SAD
- GoTaq® Flexi DNA Polymerase, „Promega“, SAD
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- gvanidin hidroklorid (GHCl), „AppliChem GmbH“, Njemačka
- HDA1 i HDA2 specifične početnice
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- karbonatni i bikarbonatni pufer
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- kristal-violet, „Kemika“, Hrvatska
- LiCl, "Aplichen", Njemačka
- magnezijev klorid, 25 mM, „Promega“, SAD
- mucin, „Sigma“, SAD
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Nuclease Free Water "Ambion", SAD
- obrano mlijeko u prahu, „Fluka“, Njemačka
- reducirajući reagens
- standard za elektroforezu proteina (molekulske mase 14-97 kDa), „Pharmacia“, SAD
- TEMED, „Sigma“, SAD
- Tween 20, „Sigma“, SAD
- $\lambda$  HindIII DNA standard, „Fermentas“, Kanada



### **3.1.4 Aparatura i pribor**

U ovom eksperimentalnom radu korištena je sljedeća aparatura i pribor:

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec Nano, "Shimatzu", Japan
- centrifuga CENTAUR 2, „Sanyo“, Engleska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- DGGE system, „BioRad“, SAD
- elektroforetske kadice, „Cleaver Scientific Ltd“, Velika Britanija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrotitarske pločice s 96 jažica
- PCR uređaj, „Applied Biosystems“, SAD
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- tresilica, "New Brunswick Scientific“, SAD
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

## **3.2 METODE RADA**

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

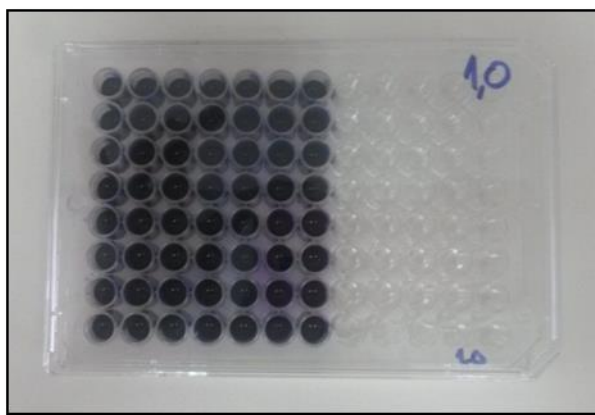
Probiotički sojevi su čuvani pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta probiotički sojevi su inokulirani u svježju optimalnu hranjivu podogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u Tablici 2.

### 3.2.2 Adhezija na mucin

Adhezija probiotičkih sojeva navedenih u Tablici 2. na mucin u *in vitro* uvjetima provedena je na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica (Slika 2). Mikrotitarska pločica je prethodno pripravljena na način da se jažice tretiraju otopinom mucina koncentracije 10 mg/mL u karbonat/bikarbonatnom puferu (50 mmol/L, pH 9,6) te inkubiraju preko noći pri 4°C. Jažice se ispiru tri puta sa fosfatnim puferom i nakon toga se dodaje po 100 µL fosfatnog pufera (PBS) sa 1% Tween 20 i inkubira se 1 sat pri sobnoj temperaturi kako bi se mucin imobilizirao. Iz jažica se pažljivo izvadi PBS sa Tweenom i nakon toga u svaku jažicu se dodaje po 100 µL prethodno pripravljene suspenzije sojeva u tri paralele. Izrasle kulture sojeva navedenih u Tablici 2. se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, a apsorbancija im je podešena tako da se dobiju uzorci koncentracije  $A_{620} = 0,5$  za svaki od ispitivanih sojeva. Stanice se resuspendiraju u 4 mL fiziološke otopine, odnosno u otopini 5 M gvanidin hidroklorida ( $M=95,53$  g/mol) za skidanje S-proteina. Osim u jažice sa mucinom, suspenzije sojeva se također dodaju u jažice bez mucina što služi kao kontrola adhezije. U slijepu probu umjesto stanica se dodaje fosfatni pufer. Tako pripravljene pločice se inkubiraju preko noći pri 37 °C.

Neadhezirane stanice se uklanjaju uzastopnim ispiranjem sa 0,05 % Tween 20 u fosfatnom puferu.

Adhezirane stanice se detektiraju dodatkom kristal violeta u svaku jažicu, ispiranjem tri puta sa fosfatnim puferom i dodavanjem citratnog pufera (50 mmol/L, pH 4,0). Mjeri se apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“ pri 620 nm, izračunava se srednja vrijednost i standardna devijacija.

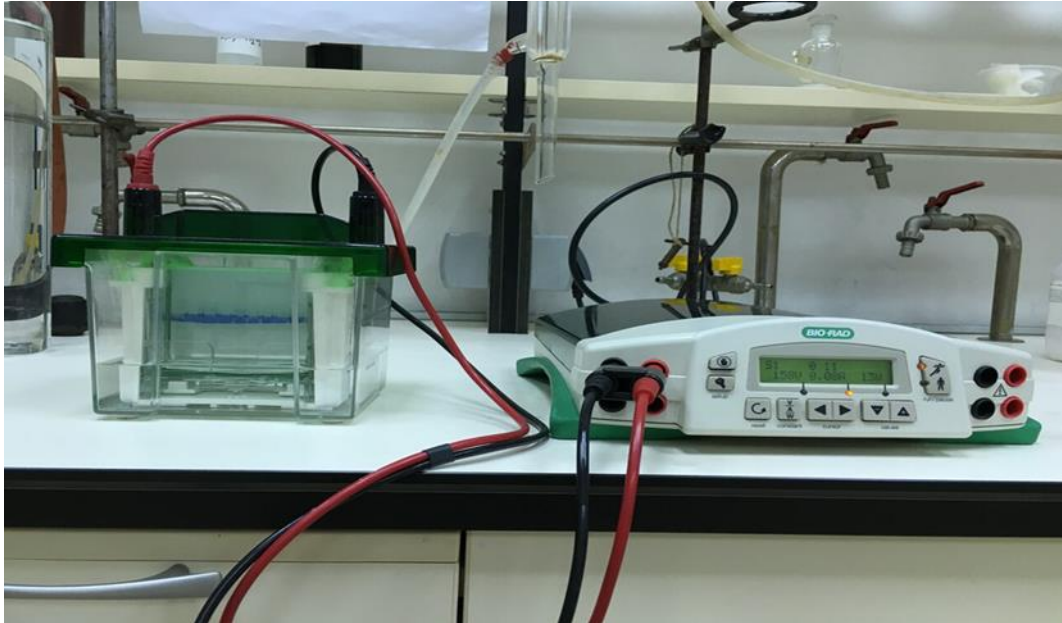


**Slika 2.** Prikaz mikrotitarske pločice sa 96 jažica u kojoj je provedeno ispitivanje adhezije probiotičkih sojeva na mucin.

### 3.2.3 Analiza proteinazne aktivnosti

Prekonoćne kulture stanica se resuspendiraju u 5 mL otopine obranog mlijeka (2%). Kao kontrola se koristi 5 mL same otopine obranog mlijeka. Provođi se inkubacija preko noći pri 37 °C. Prebaci se 1 mL bistre suspenzije i centrifugira se 5 min pri 10 000 o/min. Nakon toga supernatant se pomiješa sa reducirajućim reagensom (omjer 15:5) koji sadrži SDS za denaturaciju proteina. Uzorci se zagrijavaju 10 min pri 80°C. Pomoću Hamiltonove igle se na gel za SDS-poliakrilamidnu gel elektroforezu nanose uzorci. Kao standard se dodaju proteini niske molekulske mase zajedno sa reducirajućim reagensom.

SDS-PAGE (eng. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (4% gel za sabijanje i 12% gel za razdvajanje) se provodi pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min u kadici za elektroforezu ( Slika 3.). Nakon završene elektroforeze, gel se boji u 0,1%-tnom metilenskom modrilu R-250 s 50% metanola i 7% octene kiseline kroz najmanje 3 sata. Nakon bojanja, gel se odbojava u 7%-tnoj octenoj kiselini. Nakon završene elektroforeze SDS-PAGE proteinski gelovi se skeniraju (Scanjet 3800; Hewlett Packard, CA, SAD).



**Slika 3.** Prikaz aparature za provođenje SDS- PAGE

### **3.2.4 Denaturirajuća gradijentna gel elektroforeza (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)**

Koncentracija DNA se mjeri pomoću BioSpec Nano uređaja (valna duljina 0.2 mm za 1  $\mu$ L), pri čemu se kao slijepa proba koristi TE pufer. Nakon toga se provodi PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) za DGGE s HDA1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') i HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') početnicama. Kao negativna kontrola da fragment dobiven na gelu nije dimer početnica koristi se uzorak koji ne sadrži DNA.

Nakon toga se provodi DNA elektroforeza dobivenih PCR produkata na agaroznom gelu u 1x TAE puferu. Kao standard se koristi 0,5  $\mu$ L Gene Rulera (100 bp Ladder) i 0,25  $\mu$ L  $\lambda$  HindIII.

DNA elektroforeza se provodi pri 200 V i 80 mA kroz 30 min u kadici za elektroforezu. Nakon završene elektroforeze gel se boja sa otopinom etidijevog bromida koncentracije 0,5  $\mu$ g/mL kroz 10 min. Nakon toga se gel prebaci na UV transiluminator te se pomoću programa Gel Capture snimi slika gela pri valnoj duljini od 254 nm.

Prikaz aparature za pripravu gela za DGGE je prikazan na Slici 4. Gel za DGGE se priprema tako da se pomiješaju reagensi prema proračunu za različite gradijente kako je

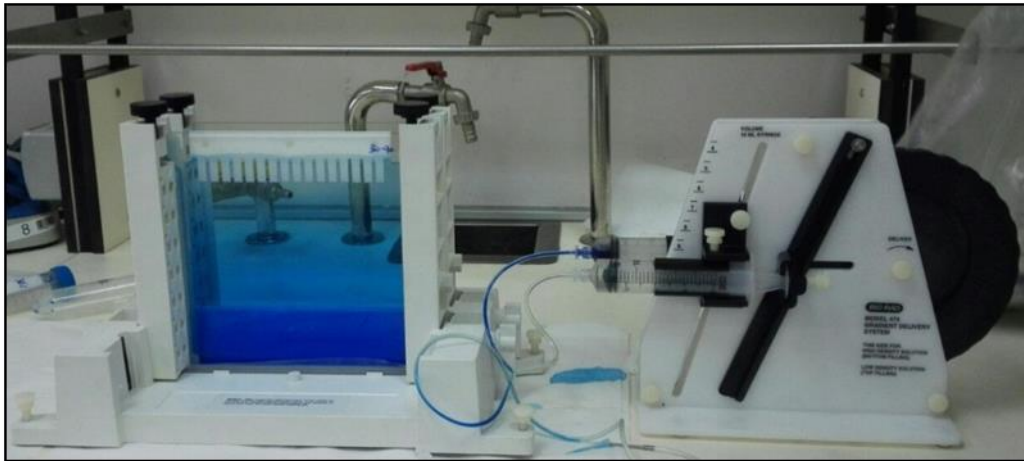
prikazano u Tablici 3. Ukupni volumen 100%-tne i 0%-tne otopine se izračuna zbrajanjem potrebnog volumena tih otopina prema željenom gradijentu (postotku) zaokruženom na prvi cijeli broj, čiji rezultati su prikazani u Tablici 4. Neposredno prije nanošenja gela u suspenziju se doda 130 $\mu$ L APS-a (stock 0,1g/mL) i 5,8 $\mu$ L TEMED-a. U suspenziju gela višeg postotka dodaje se plava boja Dcode dye solution (100 $\mu$  L na 5mL - 300  $\mu$ L) kako bi se te dvije suspenzije razlikovale. Kao uzorci se koriste PCR produkti svakog soja, a kao standard se koriste pomiješani sojevi jer DGGE nema komercijalne standarde. Nanošenje uzoraka započinje kod postignutih 58°C, a sama elektroforeza započinje kod postignutih 60°C. Nakon elektroforeze provodi se bojanje gela u etidijevom bromidu i skeniranje. DGGE elektroforeza se provodi pri 220 V kroz 3 sata, a nakon završene elektroforeze gel se tretira na isti način kao kod DNA elektroforeze.

**Tablica 3.** Prikaz proračuna reagenasa potrebnih za dobivanje gela različitog gradijenta

PRIPREMA GELA ZA DGGE (volumena 34 mL)				
REAGENS	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	100 %	0 %
Urea		7 M	7,14 g	/
Formamid		40 %	6,8 mL	/
TAE	50x	1x	340 $\mu$ L	34 $\mu$ L
Akrilamid/bisakrilamid	40 %	8 %	3,4 mL	3,4 mL
Voda			Nadopuniti do ukupnog volumena	
UKUPNI VOLUMEN			17 mL	17 mL

**Tablica 4.** Prikaz potrebnih volumena otopina za dobivanje željenog gradijenta gela 1 (od 30 do 70 %) i gela 2 (od 40 do 60 %)

Volumen100 %	Volumen 0 %	%	Ukupni volumen	Broj gela
3,4	13,6	20	17	
5,1	11,9	30	17	<b>Gel 1</b>
6,8	10,2	40	17	<b>Gel 2</b>
8,5	8,5	50	17	
10,2	6,8	60	17	<b>Gel 2</b>
11,9	5,1	70	17	<b>Gel 1</b>



**Slika 4.** Prikaz aparature za pripravu gela za DGGE

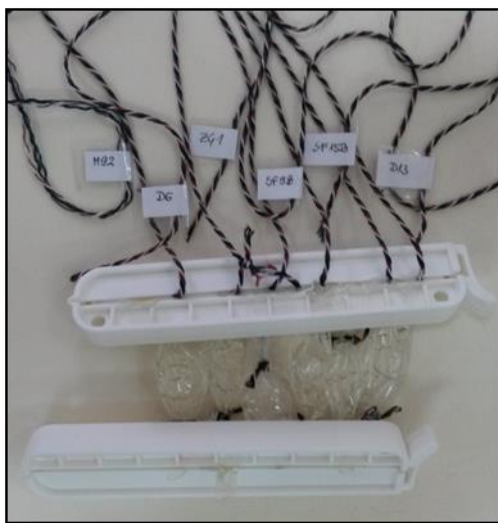
### **3.2.5 Ekstrakcija SLAP (engl. S-layer associated proteins) proteina pomoću LiCl**

Ekstrakcija SLAP proteina je modificirana prema standardnoj LiCl S-sloj ekstrakcijskom protokolu za *L. acidophilus* (Goh i sur., 2009; Lortal i sur., 1992). Prekonočne kulture stanica su centrifugirane 10 minuta pri 2,236 x g (rcf) i 4°C. Talog stanica se ispiru 2 puta s hladnim fosfatnim puferom pH=7,4. Dodaje se 10 mL 5 M litijevog klorida (LiCl) i 30 min se drži na 4°C uz povremeno protresanje. Centrifugira se 10 minuta pri 8,994 x g (rcf) i 4°C. Supernatant u kojem se nalaze S-proteini i SLAP proteini svakog soja se prebace u Spectra/Por poroznu membranu (Slika 5.) i dijalizira u hladnoj destiliranoj vodi na magnetskoj mješalici 24 h, mijenjajući prvih 8 h vodu svaka 2 h.

Sadržaj svake membrane nakon dijalize se centrifugira na sobnoj temperaturi 30 min pri 20,000 x g (rcf). Talog se resuspendira u 1 mL 1 M LiCl pri 4°C i 15 minuta kako bi se razdvojili SLAP protein od S-proteina koji nisu topljivi u 1 M LiCl. Suspenzija se centrifugira 10 minuta pri 20,000 x g. Supernatante koji sadrže SLAP proteine se prebace u Spectra/Por membranu i provodi se ponovna dijaliza. Sadržaj membrane nakon druge dijalize se centrifugira 30 minuta pri 20,000 x g (rcf). Talog se resuspendira u 10 µL reducirajućeg reagensa i prokuha 10 min pri 80°C. Na gel za SDS-PAGE se pomoću Hamiltonove igle stavlja 5 µL svakog uzorka, 5 µL standarda i 3 µL reducirajućeg reagensa.

Na gel se nanose i uzorci nakon prve dijalize kako bi se provjerila učinkovitost provedene metode. Ostatak sadržaja membrane nakon 1. dijalize se centrifugira pri 20 000 o/min 30 min. Pomiješa se 15 µL supernatanta s 5 µL reducirajućeg reagensa, a talog se

resuspendira s 10  $\mu$ L reducirajućeg reagensa. Uzorci se prokuhaju 10 min na 80°C i nanose na gel, također Hamiltonovom iglom.



**Slika 5.** Prikaz pripremljenih ispitivanih uzoraka prije dijalize koji se nalaze u Spectra/Por poroznoj membrani pričvršćeni na krajevima vezicom.

### **3.2.6 Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata u različitim uvjetima**

Prati se rast prekonocnih kultura BMK u mikrotitarskim pločicama pri različitim temperaturama (30 °C, 37 °C i 45 °C), sniženom pH (pH=3) koji je podešen 1M HCl-om, uz dodatak određene količine soli (4,5 % i 6,5 % NaCl) te uz dodatak žučnih soli (0,5 %, 1 % te 1,5 %). 15  $\mu$ L prekonocnih kultura odabranih izolata se nanose na 4 mikrotitarske pločice pri čemu se na dvije prati rast u svim pripremljenim medijima u 3 paralele te se one inkubiraju pri 37 °C, na trećoj se prati rast BMK u čistoj MRS podlozi pri 30 °C, a na četvrtoj se prati rast BMK u čistoj MRS podlozi pri 45 °C. Slijepu probu čini čisti MRS medij. Nakon nanošenja uzoraka, određuje se početna apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“ pri 620 nm i pločice se inkubiraju pri određenim temperaturama. Mjerenje apsorbancije se provodi svaka 2 sata prvih 6 sati te na kraju procesa, odnosno 22. i 24. sat. Nakon 24 sata izračunavaju se srednje vrijednosti i standardna devijacija te se određuje rast svakog ispitivanog soja ovisno o datim uvjetima.

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

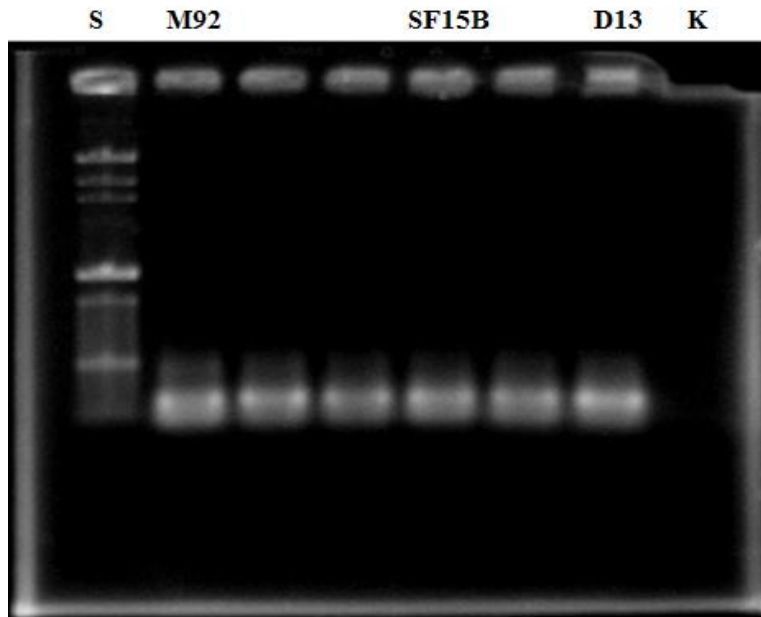
### 4.1 Denaturirajuća gradijentna gel elektroforeza (DGGE)

Gel elektroforezom u denaturirajućem gradijentu (Eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) omogućeno je razlikovanje bakterijskih sojeva unutar iste bakterijske vrste. Stoga su u ovom radu uspoređeni bakterijski sojevi koji pripadaju rodu *Lactobacillus*. Samoju elektroforezi prethodila je izolacija DNA, nakon čega je slijedilo mjerenje koncentracije na BioSpec Nano uređaju. Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 5. Zatim je provedena PCR (Eng. Polymerase Chain Reaction) metoda sa specifičnim početnicama HDA1 i HDA2 početnicama te DNA elektroforeza dobivenih PCR produkata na agaroznom gelu. Rezultati su prikazani na Slici 6. Na slici 7. prikazan je gel nakon provedene DGGE metode.

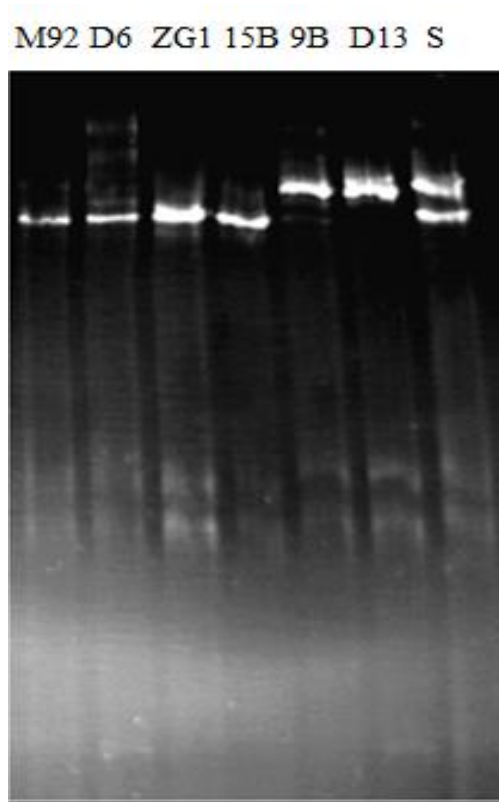
**Tablica 5.** Prikaz rezultata mjerenja koncentracije BioSpec Nano uređajem pri valnoj duljini od 0.2 mm.

Uzorak	Koncentracija (ng/ $\mu$ L)
M92	47,07
SF15B	176,92
D13	366,86





**Slika 6.** Prikaz gela nakon provedene DNA elektroforeze; S-standard; M92- *Lactobacillus helveticus*; SF15B - *Lactobacillus brevis*; D13 - *Lactobacillus plantarum*; K – negativna kontrola



**Slika 7.** Prikaz slike od 30% do 70% gela nakon provedene DGGE; S - standard; M92 - *Lactobacillus helveticus*; D6 - *Lactobacillus brevis*; ZG1 - *Lactobacillus brevis*; SF15B - *Lactobacillus brevis*; SF9B - *Lactobacillus paraplantarum*; D13 - *Lactobacillus plantarum*

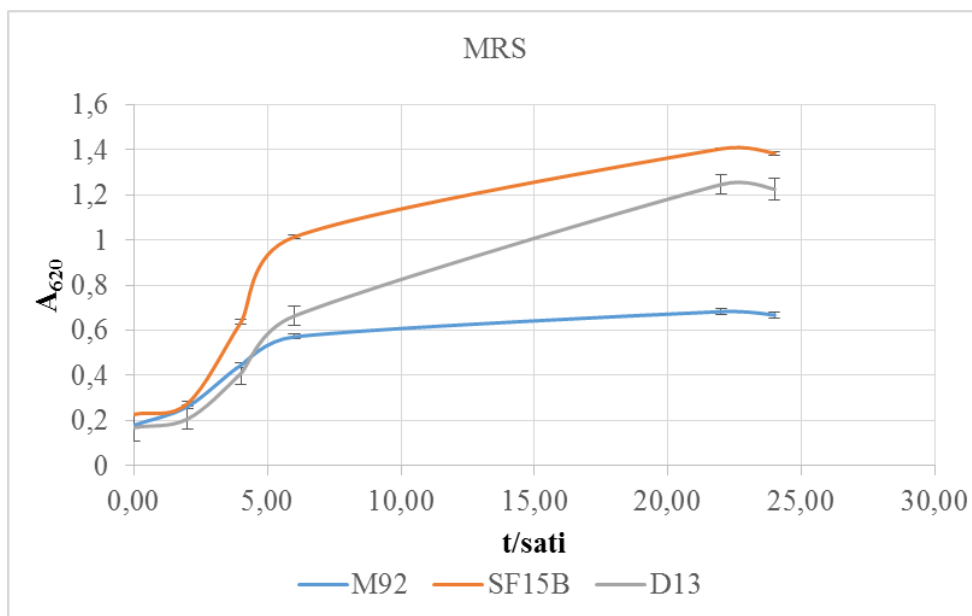
Uspješnost PCR reakcije potvrđena je gel elektroforezom jer su dobivene vrpce svih sojeva koji su analizirani. Korištenjem negativne kontrole, odnosno uzorka koji ne sadrži DNA utvrđeno je da dobiveni fragment na gelu nije rezultat dimerizacije početnica HDA1 i HDA2 jer u zadnjoj jažici u koju nije stavljena DNA nije detektirana vrpca ( Slika 6.).

Kod DGGE se kao uzorci koriste PCR produkti svakog soja. Primjenom DGGE metode mogu se razlikovati vrste, a da bi se mogli uspoređivati rezultati koriste se dodatni sojevi za analizu ( D6 – *L. brevis*, SF9B – *L. paraplantarum*, SF15B – *L. brevis* ). Prema dobivenim rezultatima na Slici 7. vidi se da sojevi *L. helveticus* M92, *L. brevis* D6, *L. brevis* ZG1 te *L. brevis* SF15B imaju vrpce na istom mjestu, odnosno u istoj ravnini dok njima srodni sojevi *L. paraplantarum* SF9B i *L. plantarum* D13 imaju također vrpce u istoj ravnini, ali na drugom mjestu. Kao standard se koriste pomiješani sojevi te su zato u zadnjem stupcu vidljive dvije vrpce.

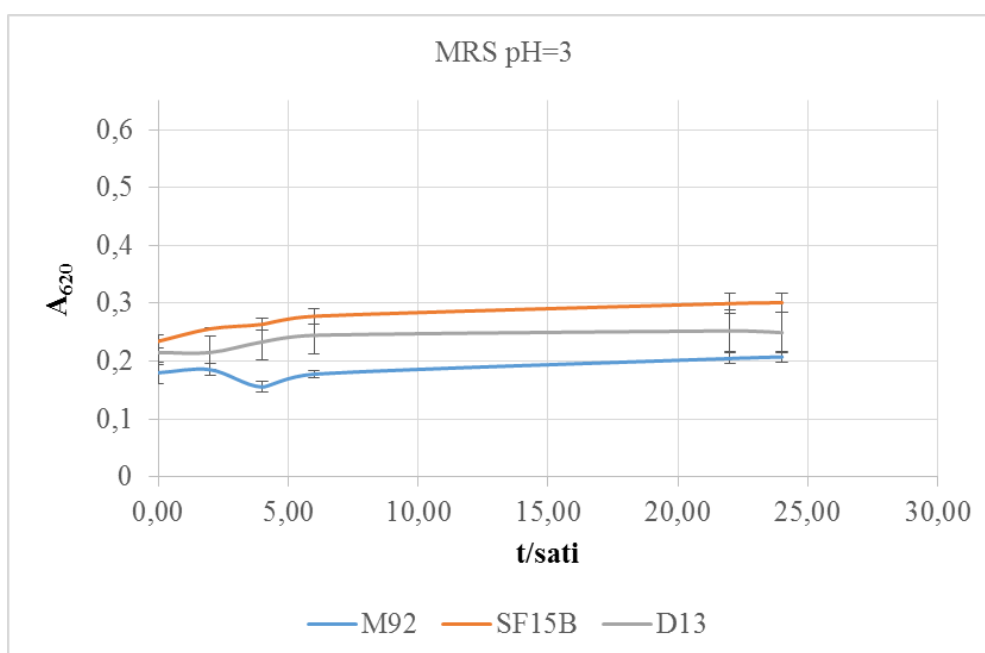
#### **4.2 Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata u različitim uvjetima**

U gastrointestinalnom traktu prevladavaju stresni uvjeti poput niskog pH, aktivnosti probavnih enzima, probavnih sokova itd., pri čemu S-proteini mikroorganizama koji ih sadrže imaju zaštitnu ulogu tijekom takvih uvjeta. Žuč koja se izlučuje u tankom crijevu smanjuje preživljavanje bakterija remeteći strukturu stanične membrane, te izazivajući razgradnju i denaturaciju proteina i molekule DNA. Za probiotike je preporučena tolerancija na koncentraciju žučnih soli između 0,15 i 0,5 % što je u rasponu fiziološke koncentracije u GIT.

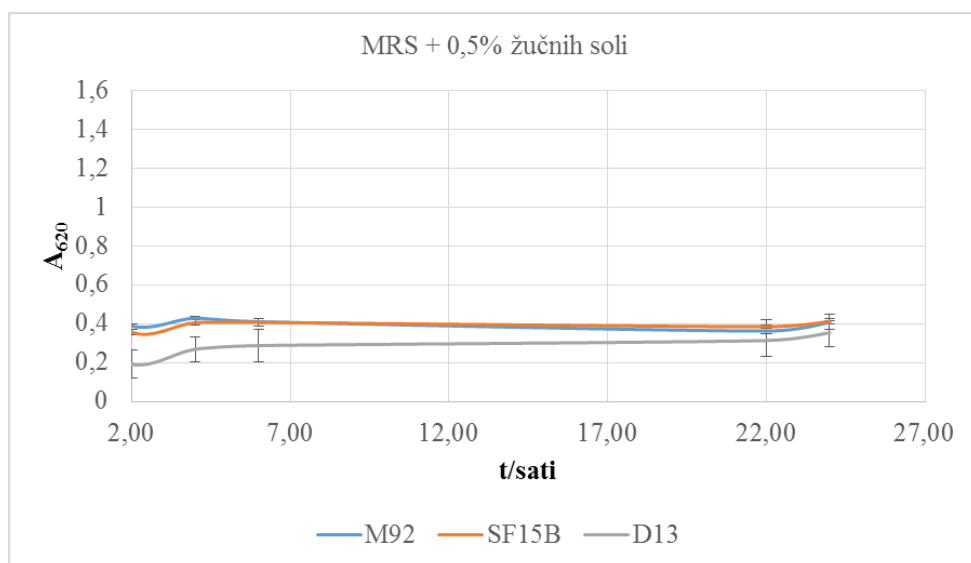
U ovom radu ispitan je rast prekonocnih kultura bakterija mliječne kiseline pri različitim temperaturama (30 °C, 37 °C i 45 °C), sniženom pH (pH = 3) uz dodatak određene količine soli (4,5 % i 6,5 % NaCl) te uz dodatak žučnih soli (0,5 %, 1 % te 1,5 %). Brzina rasta ispitivanog soja *L. brevis* SF15B uspoređivala se sa brzinom rasta sojeva *L. helveticus* M92 koji je korišten kao pozitivna kontrola te *L. plantarum* D13 koji je korišten kao negativna kontrola. Svi su pokusi provedeni tri puta u te tri paralele, nakon čega su izračunate srednje vrijednosti i standardna devijacija te na osnovu dobivenih rezultata nacrtane krivulje rasta svakog bakterijskog soja ( Slike 8.,9.,10.,11.,12.,13.,14.,15.,16.).



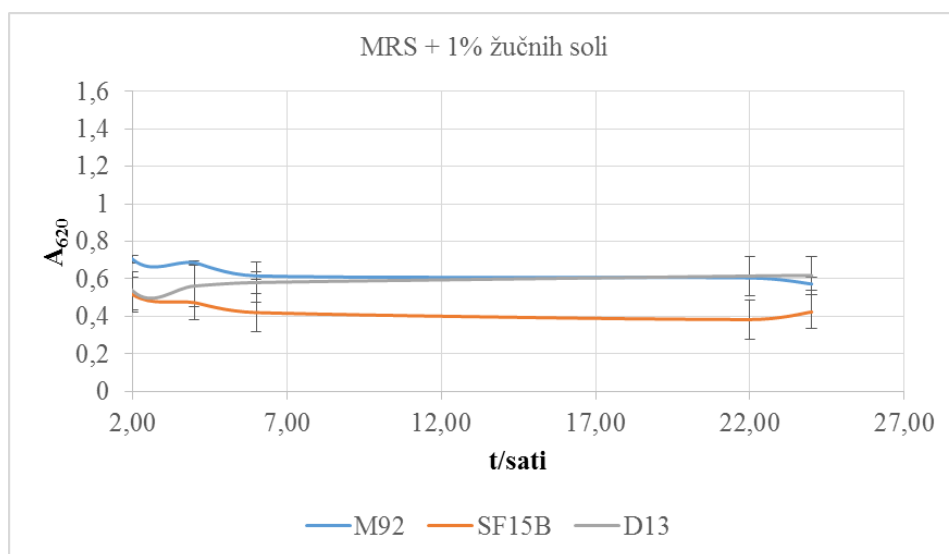
**Slika 8.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B i *Lactobacillus plantarum* D13 u čistoj MRS tekućoj podlozi.



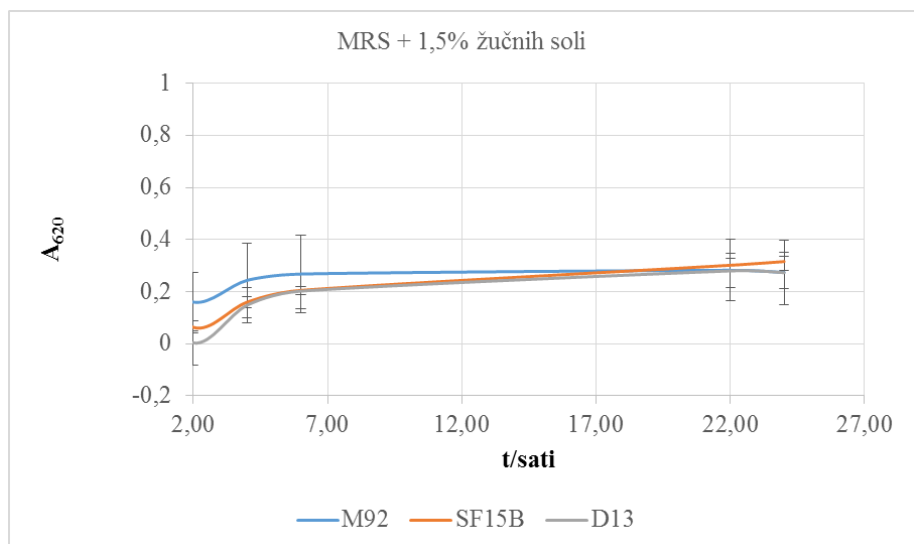
**Slika 9.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B te *Lactobacillus plantarum* D13 u MRS tekućoj podlozi pri pH=3.



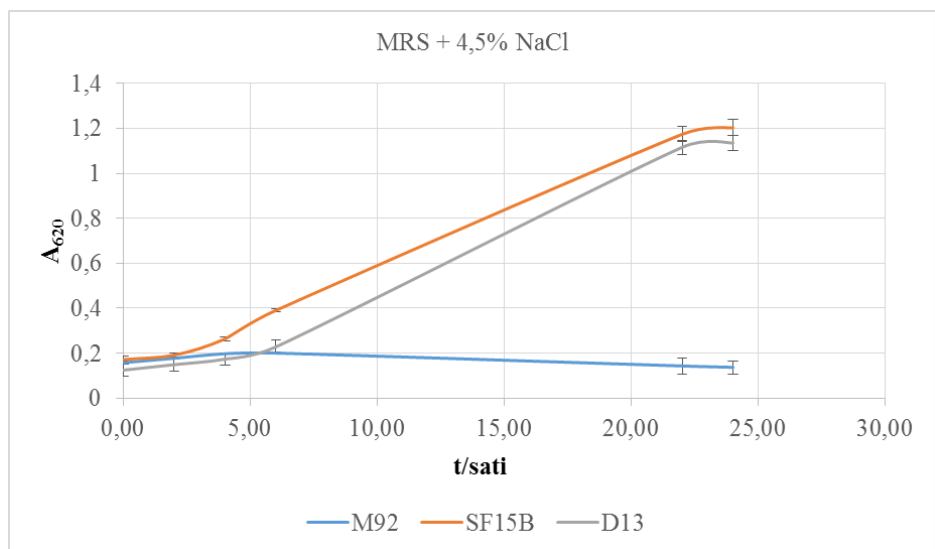
**Slika 10.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B te *Lactobacillus plantarum* D13 u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 0,5 % žučnih soli.



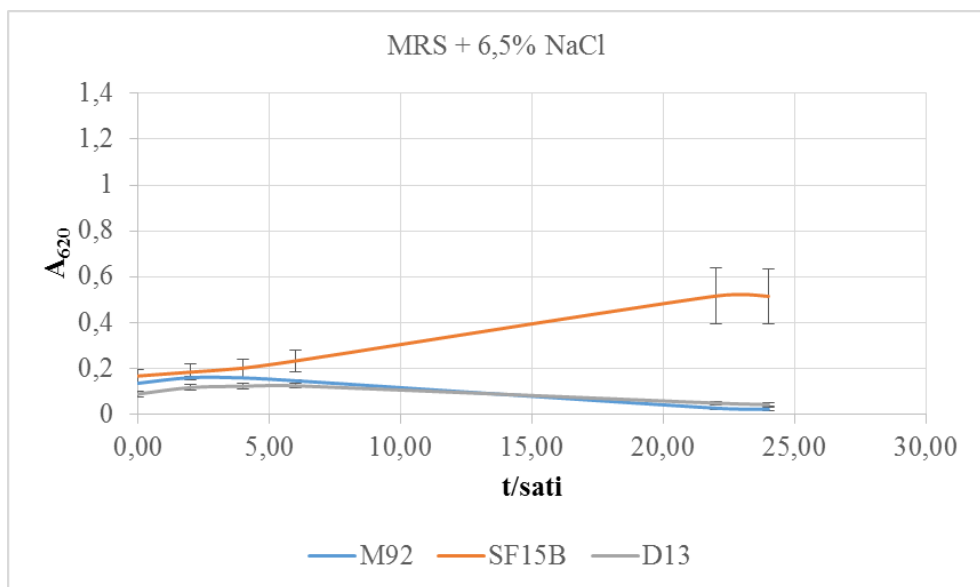
**Slika 11.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B te *Lactobacillus plantarum* D13 u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 1 % žučnih soli.



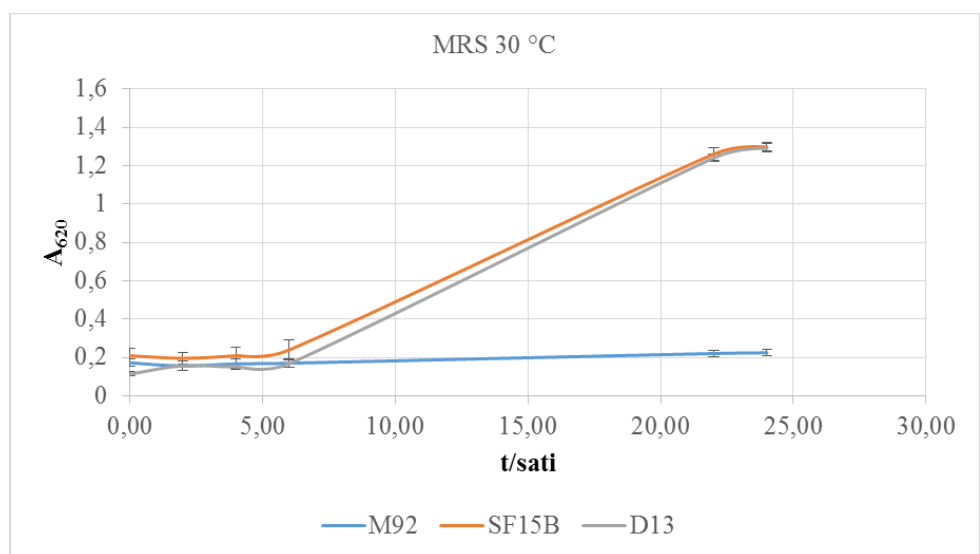
**Slika 12.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B te *Lactobacillus plantarum* D13 u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 1,5 % žučnih soli.



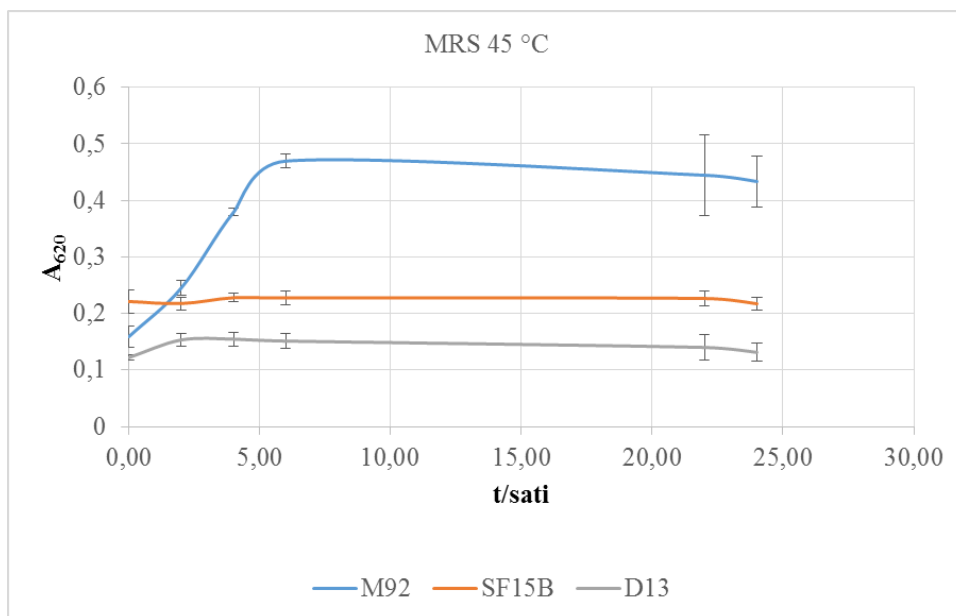
**Slika 13.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B te *Lactobacillus plantarum* D13 u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 4,5 % NaCl.



**Slika 14.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B te *Lactobacillus plantarum* D13 u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 6,5 % NaCl.



**Slika 15.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B te *Lactobacillus plantarum* D13 u MRS tekućoj podlozi pri 30 °C.



**Slika 16.** Rast probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* SF15B te *Lactobacillus plantarum* D13 u MRS tekućoj podlozi pri 45 °C.

U MRS tekućoj podlozi najbolju sposobnost rasta pokazao je ispitivani soj *Lactobacillus brevis* SF15B, dok su u MRS tekućoj podlozi pri pH = 3 sva tri soja pokazala podjednaku sposobnost rasta.

U MRS podlozi sa dodatkom žučnih soli koncentracija 0,5 %, 1% i 1,5% najbolju sposobnost rasta pokazao je soj *L. helveticus* M92, dok je najmanju sposobnost rasta pokazao ispitivani soj *L. brevis* SF15B.

U MRS podlozi sa dodatkom 4,5 % NaCl najmanju sposobnost rasta pokazao je soj *L. helveticus* M92. Soj *L. brevis* SF15B najbolje je rastao u podlozi sa dodatkom 6,5% NaCl, dok je u podlozi sa dodatkom 4,5% NaCl pokazao podjednaku sposobnost rasta kao i soj *L. plantarum* D13.

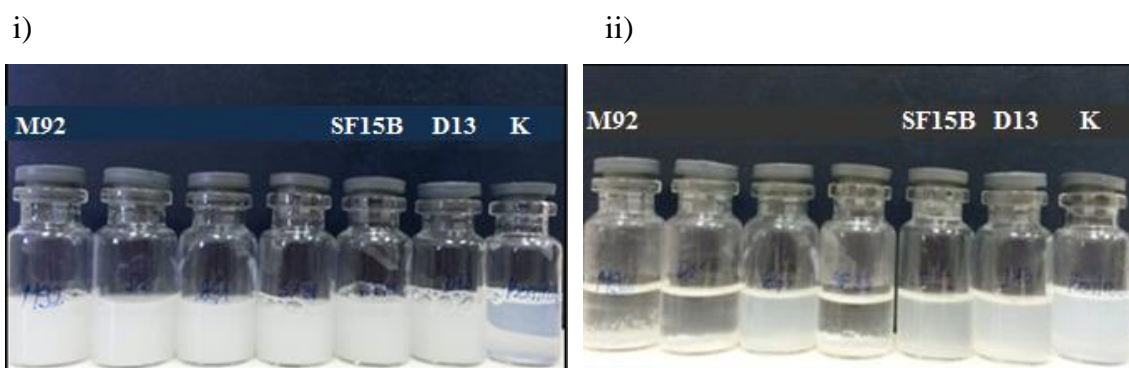
Kod temperature od 30 °C najbolju sposobnost rasta u MRS tekućoj podlozi su pokazali sojevi *L. brevis* SF15B te *L. plantarum* D13. Kod temperature od 45 °C najbolju sposobnost rasta u MRS tekućoj podlozi pokazao je soj *L. helveticus* M92.

Ispitivani soj *L. brevis* SF15B prema dobivenim rezultatima ima potencijal za preživljavanje u uvjetima ljudskog gastrointestinalnog trakta, što je jedna od najvažnijih preduvjeta za izbor probiotičkih sojeva.

### 4.3 Analiza proteinazne aktivnosti

Bakterije mliječne kiseline zahtijevaju brojne esencijalne faktore rasta. Mlijeko, bogati medij za rast, sadrži niske koncentracije slobodnih aminokiselina i peptida važnih za učinkovit rast bakterija ( Shihata i Shah, 2000.; Vasiljević i sur., 2005.). Kao odgovor na ovakva ograničenja, BMK su razvile kompleksni sustav proteinaza i peptidaza, koje omogućuju iskorištenje kazeina kao dodatnog izvora organskog dušika (Smid i sur., 1991.). Za proteolitičku aktivnost odgovorne su proteinaze stanične stijenke BMK koje im omogućuju rast u mlijeku, sudjeluju u formiranju arome i teksture proizvoda, te u sintezi biološki aktivnih peptida (Leboš Pavunc i sur., 2012.). Probiotička bakterija *L. helveticus* M92 je na temelju prethodnih istraživanja pokazala značajnu proteolitičku aktivnost te je u ovom ispitivanju služila kao pozitivna kontrola (Beganović i sur., 2013.).

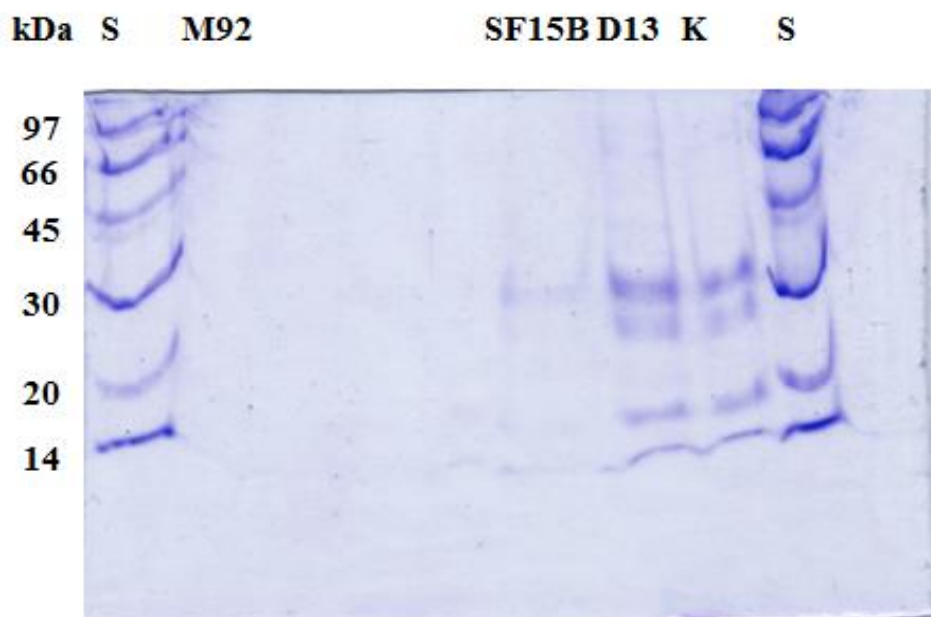
Kulture stanica su preko noći inkubirane u otopini obranog mlijeka da bi se ispitala njihova proteolitička aktivnost (Slika 17.) Nakon toga su uzorci nanešeni na gel i napravljena je SDS – PAGE elektroforeza kako bi se utvrdila prisutnost proteina u obranom mlijeku (Slika 18.)



**Slika 17.** Određivanje proteolitičke aktivnosti u obranom mlijeku uspoređivanjem uzoraka prije (i) i nakon (ii) inkubacije preko noći pri 37 °C

M92 - *Lactobacillus helveticus*; SF15B - *Lactobacillus brevis*; D13 - *Lactobacillus plantarum*; K – kontrola (otopina obranog mlijeka)





**Slika 18.** Ispitivanje hidrolize kazeina pomoću odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline SDS-PAGE metodom; S- standard proteina niske molekulske mase; M92- *Lactobacillus helveticus*; SF15B - *Lactobacillus brevis*; D13 - *Lactobacillus plantarum*; K – kontrola (otopina obranog mlijeka)

Prema dobivenim rezultatima vidi se da soj *Lactobacillus helveticus* M92 pokazuje proteolitičku aktivnost nakon prekonoćne inkubacije pri 37 °C (Slika 17.) jer je došlo do bistrenja otopine uslijed razgradnje kazeina. Proteolitička aktivnost ovog soja potvrđena je na gelu za SDS – PAGE elektroforezu jer nije detektirana vrpca koja odgovara kazeinu (Slika 18.).

Kod ispitivanog soja *Lactobacillus brevis* SF15B došlo je do blagog bistrenja otopine što ukazuje da ovaj soj također pokazuje proteolitičku aktivnost ( Slika 17.). To je potvrđeno na gelu za SDS – PAGE elektroforezu (Slika 18.) jer je zbog prisutnosti proteaza došlo do razgradnje kazeina iz obranog mlijeka i vrpca koja odgovara kazeinu se ne vidi.

Soj *Lactobacillus plantarum* D13 ne pokazuje proteolitičku aktivnost jer nakon prekonoćne inkubacije nije došlo do bistrenja otopine (Slika 17.), što se može vidjeti i usporedbom sa kontrolom. Na gelu za SDS – PAGE elektroforezu je detektirana vrpca koja odgovara kazeinu jer nisu prisutne proteaze koje bi razgradile kazein čime je potvrđeno da ovaj soj ne posjeduje proteolitičku aktivnost (Slika 18.).

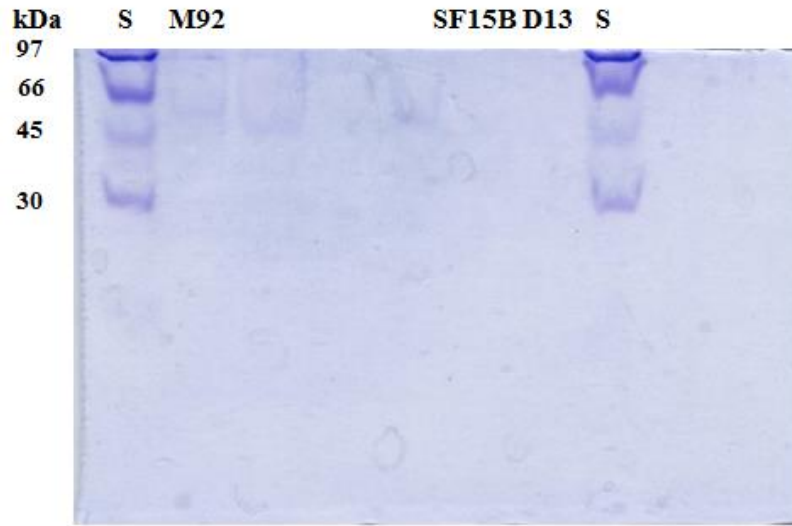
Ispitivani bakterijski soj *L.brevis* SF15B, kao i soj *L. helveticus* M92, koji su okarakterizirani kao probiotičke kulture, a posjeduju proteolitičku aktivnost, imaju veliki potencijal za primjenu u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda.

#### 4.4 Ekstrakcija SLAP proteina pomoću LiCl

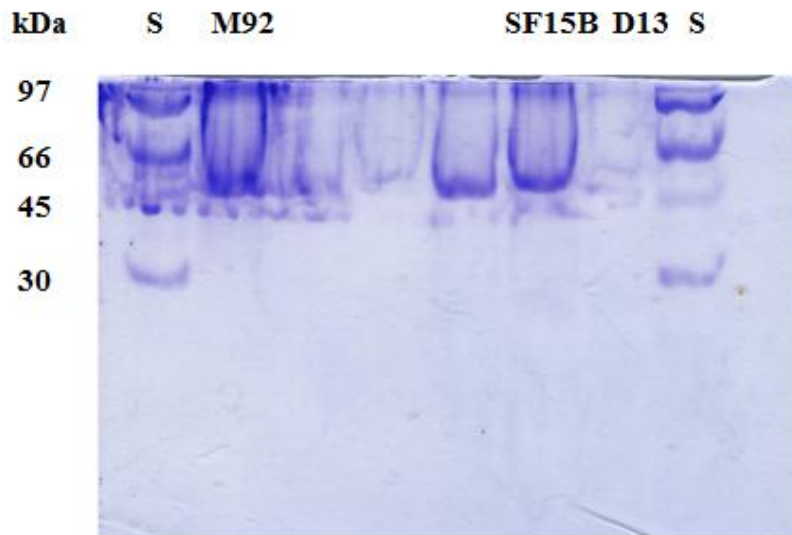
Površinski sloj sadrži proteine ili glikoproteine koji su poznati kao S-proteini (SLPs), odnosno to su dvodimenzionalni, visoko porozni kristalni nizovi ili podjedinice koje predstavljaju najudaljeniji sloj stanične stijenke kod većine bakterija, uključujući i vrste koji pripadaju rodu *Lactobacillus* (Sára i Sleytr, 2000.; Åvall-Jääskeläinen i Palva, 2005.). Molekulska masa S-proteina bakterija iz roda *Lactobacillus* je od 25 kDa do 71 kDa (Boot i sur., 1995.; Toba i sur., 1995.). Većina S-proteina bakterija iz roda *Lactobacillus* nije glikozilirana (Sára i Sleytr, 2000.). S-proteini imaju visoku pI vrijednost koja je u rasponu od 9.35 do 10.40. Geni koji kodiraju za S - proteine su sekvencionirani iz vrsta poput *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. brevis* i *L. crispatus*. Laktobacili posjeduju razne gene koji kodiraju za S-proteine (*slpA*, *slpB*, *slpH1* i *slpH2*) (Åvall-Jääskeläinen i Palva, 2005.).

Ekstrakcija SLAP proteina je modificirana prema standardnoj LiCl S-sloj ekstrakcijskom protokolu za *L.acidophilus* (Goh i sur., 2009; Lortal i sur., 1992).

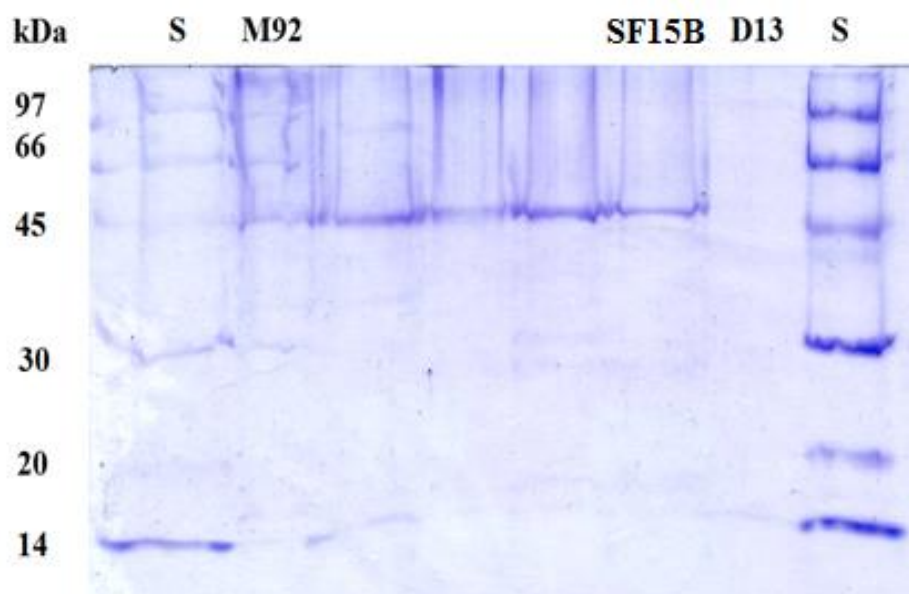
Prekonočne kulture stanica su tretirane sa 5 M soli litijevog klorida (LiCl), a nakon centrifugiranja se u supernatantu nalaze S-proteini i SLAP proteini svakog soja te se provodi dijaliza. Nakon prve dijalize provedena je SDS – PAGE elektroforeza supernatanta kako bi se utvrdila uspješnost metode, odnosno prisutnost S-proteina (Slika 19.). Zatim se talog resuspendira u 1 M LiCl kako bi se razdvojili SLAP proteini od S-proteina koji nisu topljivi u 1 M LiCl. Provedi se ponovno dijaliza supernatanta u kojem se nalaze SLAP proteini i radi se SDS – PAGE elektroforeza da se utvrdi prisutnost SLAP proteina ( Slika 20.).



**Slika 19.** Ispitivanje prisutnosti S-proteina provođenjem SDS-PAGE elektroforeze supernatanta nakon prve dijalize; S - standard; M92- *L. helveticus*; SF15B – *L. brevis*; D13 – *L. plantarum*



**Slika 20.** Ispitivanje prisutnosti S-proteina provođenjem SDS-PAGE elektroforeze taloga nakon prve dijalize; S-standard; M92- *L. helveticus*; SF15B- *L. brevis*; D13 – *L. plantarum*



**Slika 21.** Ispitivanje prisutnosti SLAP proteina provođenjem SDS-PAGE elektroforeze nakon druge dijalize; S-standard; M92- *L. helveticus*; SF15B – *L. brevis*; D13 – *L. plantarum*.

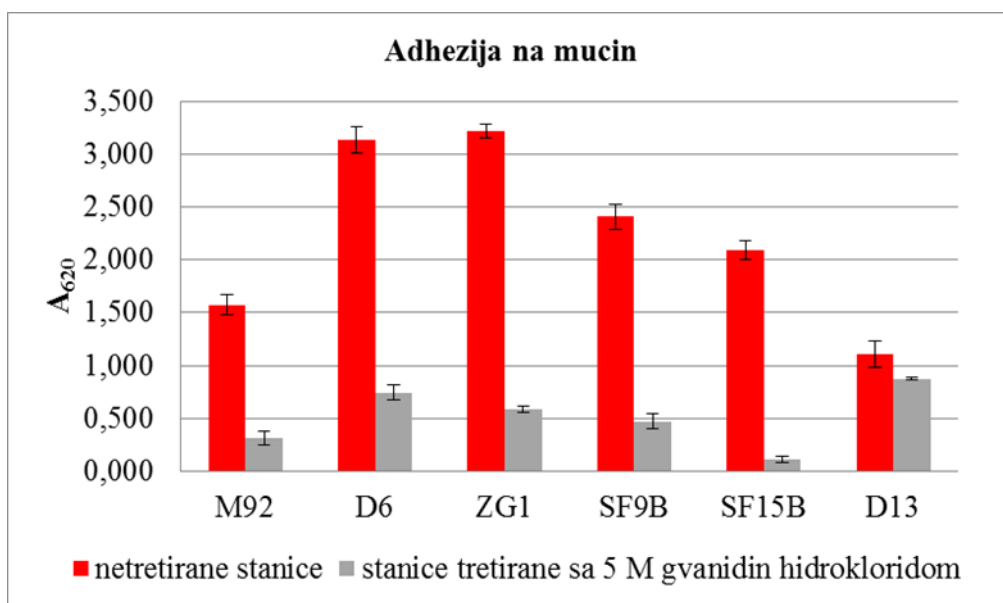
Rezultati nakon prve dijalize prikazani su na Slici 19. i pokazuju uspješnost ove metode taloženja S-proteina i SLAP proteina pomoću LiCl. Na gel za SDS – PAGE su nanešeni supernatant i talog i na gelu nisu detektirane vrpce, što potvrđuje teoriju da se u supernatantu ne nalaze proteini. Rezultati nakon druge dijalize prikazani su na Slici 20. Na gel za SDS – PAGE nanešen je talog i vidljive su vrpce kod soja *Lactobacillus helveticus* M92 koji je korišten kao pozitivna kontrola jer sadrži gene koji kodiraju za S-proteine te kod ispitivanog soja *Lactobacillus brevis* SF15B. Kod soja *Lactobacillus plantarum* D13 nisu vidljive vrpce što je u skladu s tim da taj soj ne eksprimira S-proteine te je korišten kao negativna kontrola. U usporedbi sa standardom na Slici 20. vidi se da su molekulske mase dobivenih vrpca kod sojeva M92 i SF15B u rasponu od 45 do 97 kDa, što odgovara S-proteinima čija je molekulska masa od 25 – 71 kDa.

Slika 21. prikazuje rezultate nakon druge dijalize koji potvrđuju da su kod soja *L. helveticus* M92 i ispitivanog soja *L. brevis* SF15B prisutni SLAP proteini. Nakon provedene SDS – PAGE elektroforeze dobivene su vrpce čija je molekulska masa u rasponu od 45 – 97 kDa, što odgovara molekulskoj masi SLAP proteina. Kod soja *L. plantarum* D13 na gelu nisu vidljive vrpce što dokazuje da kod ovog soja nisu prisutni SLAP proteini.

## 4.5 Adhezija na mucin

Sluznica crijeva je vrlo važan čimbenik u obrambenom mehanizmu gastrointestinalnog trakta. (Iwai i sur., 2009.). Kao glavni sastojak sluznice, mucin služi kao mjesto interakcije crijevne mikroflore i patogenih bakterija ( Robbe i sur., 2004) te istovremeno sprječava adheziju bakterijskih i virusnih patogena na sluznicu crijeva i toksina apsorbiranih u tijelu (Robbe i sur., 2004.; Beyaz i Liman, 2009.). Sposobnost adhezije crijevnih bakterija je važna za kolonizaciju i rast u intestinalnom traktu ( Namba i sur., 2007.). Adhezijska svojstva bakterija omogućavaju njihovo duže zadržavanje u intestinalnom traktu. Sposobnost pojedinih probiotičkih sojeva da inhibiraju kolonizaciju patogena, invaziju te modulaciju imunskog odgovora je također povezana sa sposobnošću adhezije na sluznicu crijeva ili epitelne stanice ( Laparra i Sanz, 2009.)

U ovom radu provedeno je istraživanje sposobnosti adhezije soja *Lactobacillus brevis* SF15B na mucin. Kao pozitivna kontrola koristio se soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji eksprimira S-proteine, a kao negativna kontrola soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ne sadrži S-proteine.



**Slika 22.** Ispitivanje *in vitro* adhezije probiotičkih sojeva u mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica M92 - *Lactobacillus helveticus*; SF15B - *Lactobacillus brevis*; D13 - *Lactobacillus plantarum*

U mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica ispitivala se *in vitro* adhezija probiotičkih sojeva navedenih u Tablici 2. te su dobiveni rezultati prikazani na Slici 22.

Soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji je služio kao pozitivna kontrola jer sadrži S-proteine je pokazao znatno veću apsorbanciju nakon tretmana sa fiziološkom otopinom nego sa gvanidin hidrokloridom ( Slika 22.) Ovi rezultati ukazuju na to da S-proteini imaju važnu ulogu u adheziji stanica na mucin.

Soj *Lactobacillus brevis* SF15B je pokazao vrlo slične rezultate kao i pozitivna kontrola. Dobiveni rezultati ukazuju na to da je nakon tretmana sa gvanidin hidrokloridom došlo je do značajnog smanjenja apsorbancije u odnosu na tretman sa fiziološkom otopinom ( Slika 22.), što znači da su S-proteini prisutni kod soja *Lactobacillus brevis* SF15B zaslužni za adheziju na mucin jer se smanjenjem apsorbancije smanjila i sposobnost vezanja na mucin.

Soj *Lactobacillus plantarum* D13, koji je služio kao negativna kontrola jer ne sadrži S-proteine, je nakon tretmana sa fiziološkom otopinom pokazao neznatno veću apsorbanciju u odnosu na tretman sa gvanidin hidrokloridom ( Slika 22.) Ovi rezultati ukazuju na to da se nakon tretmana sa gvanidin hidrokloridom nije promijenila sposobnost stanica za vezanje na mucin te da su za adheziju stanica soja *L. plantarum* D13 na mucin odgovorni neki drugi adhezijski faktori.

## 5 ZAKLJUČAK

1. DGGE metodom dokazano je da je soj *L. brevis* SF15B srodan sojevima *L. helveticus* M92, *L. brevis* D6 i *L. brevis* ZG1, od kojih svi navedeni sojevi eksprimiraju S-proteine.
2. Turbidimetrijskim određivanjem brzine rasta utvrđeno je da je ispitivani soj *Lactobacillus brevis* SF15B pokazao najbolje svojstvo rasta u MRS podlozi pri 30 °C te u MRS podlozi sa dodatkom 4,5 % i 6,5 % NaCl. Stanice soja *Lactobacillus brevis* SF15B su pokazale značajno svojstvo rasta kod niskih pH vrijednosti kakve vladaju u pojedinim dijelovima ljudskog gastrointestinalnog trakta, dok se dodatkom žučnih soli značajno smanjilo svojstvo rasta ispitivanog soja.
3. Analizom proteinazne aktivnosti utvrđena je proteolitička aktivnost soja *Lactobacillus brevis* SF15B, što ukazuje na njegov potencijal u primjeni kao starter kultura za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda.
4. Stanice soja *L. brevis* SF15B na svojoj površini uz sloj S-proteina sadrže i SLAP proteine, koji uz S-proteine vjerojatno imaju ulogu u važnim probiotičkim svojstvima navedenog soja. S-proteini soja *L. brevis* SF15B imaju ulogu u adheziji stanica tog soja na mucin.

## 6 LITERATURA

Abbasi M.H., Zahedi M., Darvish Moghadam S., Shafieipour S., Hayat Bakhsh A. (2015) Small bowel bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome: the first study in Iran. *Middle East J Dig Dis.* **7**(1), 36-40.

Åvall-Jääskeläinen S, Palva A. (2005) *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 511-29.

Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Džidara, P., Šušković, J. (2013) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe - section Molecular biology, genetics and biotechnology.* **20**, 58-64.

Bellavia M., Rappa F., Lo Bello M., Brecchia G., Tomasello G., Leone A., Spatola G., Uzzo ML., Bonaventura G., David S., Damiani P., Hajj Hussein I., Zeenny M.N., Jurjus A., Schembri-Wismayer P., Cocchi M., Zummo G., Farina F., Gerbino A., Cappello F., Traina G.J. (2014) *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* supplementation reduces tissue damage of intestinal mucosa and liver after 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid treatment in mice. *Biol Regul Homeost Agents.* **28**(2), 251-61.

Beyaz F. and Liman N. (2009) The Prenatal Development and Histochemistry of the Ileal Mucins in the Bovine Fetuses. *Anatomia, Histologia, Embryologia. Journal of Veterinary Medicine Series C.* **38**, 436-442.

Blaut M. (2002) Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *Eur J Nutr.* **41**(1), 111-6.

Bruhn C.M., Bruhn J.C., Cotter A. (2002) Consumer attitudes toward use of probiotic cultures. *J Food Sci.* **67**, 1969–1972.

Cremonini F., Di Caro S., Covino M. (2002) Effect of different probiotic preparations on anti *Helicobacter pylori* therapy - related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol.* **97**, 2744-9.

De Jong N., Zuur A., Wolfs M.C. (2007) Exposure and effectiveness of phytosterol/-stanol-enriched margarines. *Eur J Clin Nutr.* **61**, 1407–1415.



Frece, J., Kos, B., Beganović, J., Vuković, S., Šušković, J. (2005) In vivo testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World J Microb Biot.* **21**: 1401-1408.

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. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 3093-3105.

Guandalini S., Pensabene L., Zikri M.A. (2000) *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J. Pediatr Gastroenterol. Nutr.* **30**, 54-60.

H.J. Boot, C. Kolen, J.M. Van Noort, P.H. Pouwels, *Journal of Bacteriology* **175** (1993) 6089–6096.

Hasler C.M. (2002) Functional foods: benefits, concerns and challenges. A position paper from the American Council on Science and Health. *J Nutr.* **132**, 3772–378.

Huis in't Veld, J.H.J, Havenaar, R., 1992. Selection criteria for microorganisms for probiotic use, in: Jensen, J.F., Hinton, M.H., Mulder R.W.A.W. (Eds.), Probiotics and Pathogenicity, Flair No 6. DLO Spelderholt Centre for Poultry Research and Information Services, pp. 11-19.

Hori T., Kiyoshima J., Yasui H. (2003) Effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on the natural killer activity of blood mononuclear cells in aged mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 420-2.

Iwai T., Ichikawa T., Goso Y., Ikezawa T., Saegusa Y., Okayasu I., Saigenji K. and Ishihara K. (2009) Effects of indomethacin on the rat small intestinal mucosa: immunohistochemical and biochemical studies using anti-mucin monoclonal antibodies. *Journal of Gastroenterology*, **44**, 277-284.

Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada 2002.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Laparra J.M. and Sanz Y. (2009) Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology*, **49**, 695-701.

- Lazarou C., Panagiotakos D.B., Kouta C. (2009) Dietary and other lifestyle characteristics of Cypriot school children: results from the nationwide CYKIDS study. *BMC Public Health*. **9**, 147–186
- 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 Technol. Biotechnol.* **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. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 611-618.
- M. Sára, U.B. Sleytr, *Journal of Bacteriology* **182** (2000) 859–868.
- Metchinkoff E. (1910) The prolongation of life. New York & London: *G.P. Putnam's sons Ed*
- Morimoto K., Takeshita T., Nanno M., Tokudome S., Nakayama K. (2005) Modulation of natural killer cell activity by supplementation of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in habitual smokers. *Prev Med* **40**, 589-94.
- Nagao F., Nakayama M., Muto T., Okumura K. (2000) Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy subjects. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2706-08.
- Namba A., Mano N. and Hirose H. (2007) Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. *Journal of Applied Microbiology*, **102**, 1307-1317.
- Pradeep K., Kuttappa M.A., Prasana K.R. (2014) Probiotics and oral health: an update. *SADJ* **69**(1), 20-4.
- Robbe C., Capon C., Coddeville B. and Michalski J. (2004) Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochemical Journal*, **384**, 307-316.
- Roberfroid M.B. (1998) Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Br. J. Nutr.* **80**, 197-202.

Sanders M.E., Huis in't Veld J. (1999) Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **76**, 293–315.

Shihata A., Shah N.P. (2000) Proteolytic profile of yoghurt and probiotic bacteria, *Int. Dairy J.* **10**, 401–408.

Smid E.J., Poolmann B., Konings W.N. (1991) Casein utilization by lactococci, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2447–2452.

Spanhaak S., Havenaar R., Schaafsma G. (1998) The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52**, 899-907.

Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Takeda K., Okumura K. (2007) Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-Cell Activity. *J. Nutr.* **137**, 791-3.

Tremaroli V., Backhed F. (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* **489**, 242-449.

T. Toba, R. Virkola, B. Westerlund, Y. Bjorkman, J. Sillanpaa, T. Vartio, N. Kalkkinen, T.K.Korhonen (1995) *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2467–2471.

Vasiljevic T., Shah N.P., Jelen P. (2005) Growth characteristics of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 as affected by different neutralizers, *Aust. J. Dairy Technol.* **60**, 3–9.

Yuki N., Watanabe K., Mike A., Tagami Y., Tanakara R., Ohwaki M., Morotomi M. (1999) Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using antibodies. *Int. J. Food Microbiol.* **48**, 51-7.

