

# Fermentacijski profil bakterijskih sojeva iz različitih izvora kao funkcionalnih starter kultura

---

Iveljić, Ana-Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:878205>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Ana-Marija Iveljić

**FERMENTACIJSKI PROFIL  
BAKTERIJSKIH SOJEVA IZ  
RAZLIČITIH IZVORA KAO  
FUNKCIONALNIH STARTER  
KULTURA**

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. Jasne Novak te uz pomoć dr. sc. Martine Banić.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta HRZZ IP-2019-04-2237 „Potential therapeutic biomolecules of next-generation probiotics (PRO-BIO 2.0)“.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr.sc. Jasni Novak na pomoći, savjetima, podršci i usmjeravanju u cjelokupnoj realizaciji diplomskog rada.  
Posebnu zahvalu upućujem svojim roditeljima bez kojih ovo ne bi bilo moguće.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

## FERMENTACIJSKI PROFIL BAKTERIJSKIH SOJEVA IZ RAZLIČITIH IZVORA KAO FUNKCIONALNIH STARTER KULTURA

Ana-Marija Iveljić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058206279

**Sažetak:** Sukladno svjetskom trendu porasta primjene probiotika povećan je i znanstveni interes, ali i interes za aspekt legislative i kliničkih smjernica probiotičkih bakterija. Cilj ovog diplomskog rada je fenotipska karakterizacija bakterijskih sojeva iz različitih mikrookoliša slijedeći zahtjeve probiotičkog koncepta s fokusom na fermentacijski profil. Metabolička aktivnost bakterijskih sojeva ispitana je kontroliranom kultivacijom tijekom 48 sati pri 37 °C u obranom mlijeku. Statistički najznačajnija acidifikacija određena je nakon rasta *Lactobacillus fermentum* D12 u obranom mlijeku i u obranom mlijeku s različitim koncentracijama soli. Koagulacijski kapacitet potvrđen je fenotipski za sve ispitivane sojeve nakon 24 i 48 sati kultivacije u obranom mlijeku. Primjenom protokola za ciljanu ekstrakciju proteinaza, priređeni su ekstrakti proteina koji iskazuju kazeinolitičku aktivnost te analizirani SDS-PAGE metodom. Djelomično pročišćene proteinaze sojeva *L. lactis* ZGBP5-32 i ZGZA7-10 i u vrlo niskim koncentracijama pokazale su kazeinolitičku aktivnost. Modifikacija protokola ekstrakcije implementiranjem ultrafiltracije koja je doprinijela pročišćavanju proteinaza što je potvrđeno SDS-PAGE metodom za proteinske ekstrakte sojeva *L. brevis* D6 i SF9B, *L. fermentum* D12 i *L. plantarum* D13. Daljnja istraživanja bit će usmjerena na karakterizaciju bioaktivnih peptida uslijed proteazne aktivnosti odabranih kazeinolitičkih bakterija mliječne kiseline. Karakterizacija kazeinolitičkih bakterija mliječne kiseline u ovom radu može pridonijeti odabiru proteolitčkih sojeva kao mliječnih starter kultura.

**Ključne riječi:** probiotici, fermentacija, bakterije mliječne kiseline, proteinaza

**Rad sadrži:** 37 stranica, 2 slike, 14 tablica, 52 literaturna 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. Jasna Novak

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. Martina Banić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Tonči Rezić (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Jasna Novak (mentor)
3. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (član)
4. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (zamjenski član)

**Datum obrane:** 23. rujna 2022.

## 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

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

### FERMENTATION PROFILE OF BACTERIAL STRAINS FROM DIFFERENT SOURCES AS A FUNCTIONAL STARTER CULTURE

*Ana-Marija Iveljić, univ. bacc. ing. biotechn. 0058206279*

**Abstract:** In accordance with the worldwide trend of increased use of probiotics, scientific interest has increased, as well as the aspect of legislative framework and clinical guidelines. The aim of this thesis is the phenotypic characterization of bacterial strains from different microenvironments following the requirements of the probiotic concept with a focus on the fermentation profile. The metabolic activity of bacterial strains was tested by controlled cultivation for 48 hours at 37 °C in skimmed milk. The most statistically significant acidification was determined after the growth of *Lactobacillus fermentum* D12 in skimmed milk and in skimmed milk with different concentrations of salt. Coagulation capacity was confirmed phenotypically for all tested strains after 24 and 48 hours of cultivation in skimmed milk. By applying the protocol for the targeted extraction of proteinases, extracts of proteins showing caseinolytic activity were prepared and analyzed by the SDS-PAGE method. Partially purified proteinases of *L. lactis* strains ZGBP5-32 and ZGZA7-10 showed caseinolytic activity even in very low concentrations. The modification of the extraction protocol by implementing ultrafiltration contributed to the purification of proteinases, which was confirmed by the SDS-PAGE method for protein extracts of strains *L. brevis* D6 and SF9B, *L. fermentum* D12 and *L. plantarum* D13. Further research will be focused on the characterization of bioactive peptides due to the protease activity of selected caseinolytic lactic acid bacteria. The characterization of caseinolytic lactic acid bacteria in this work may contribute to the selection of proteolytic strains as lactic starter cultures.

**Keywords:** *probiotics, fermentation, lactic acid bacteria, proteinase*

**Thesis contains:** 37 pages, 2 figures, 14 tables, 52 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Jasna Novak, PhD, Full professor

**Technical support and assistance:** Martina Banić, PhD

**Reviewers:**

1. Tonči Rezić, PhD, Full professor (president)
2. Jasna Novak, PhD, Full professor (mentor)
3. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor (member)
4. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** September 23<sup>th</sup> 2022



## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE .....	3
2.2. PROBIOTICI.....	6
2.3. PREBIOTICI I POSTBIOTICI.....	10
2.4. SINBIOTICI.....	11
2.5. PROBIOTICI NOVE GENERACIJE .....	12
2.6. MEHANIZMI DJELOVANJA PROBIOTIKA.....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>15</b>
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.3. Kemikalije .....	17
3.1.4. Aparatura i pribor.....	18
3.2. METODE RADA.....	19
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	19
3.2.2. Određivanje pH i postotka sintetizirane mliječne kiseline u supernatantu kulture .	19
3.2.3. Test koagulacije .....	19
3.2.4. Ekstrakcija proteinaza BMK .....	20
3.2.5. Ultrafiltracija supernatanta .....	20
3.2.6. SDS-PAGE (engl. <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> , <i>SDS-PAGE</i> ) analiza potencijalnih proteinaza .....	20
<b>5. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>22</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>31</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>32</b>

# 1. UVOD

Početak prošlog stoljeća Elie Metchnikoff zaključio je da konzumiranje fermentiranih mliječnih proizvoda, kao što je jogurt, ima koristan učinak na zdravlje i dugovječnost starijih Bugara. Međutim, njegova ideja počela se razvijati tek drugom polovicom prošlog stoljeća s ciljem pronalaska prirodnog načina poboljšanja zdravlja ljudi i životinja korištenjem fermentiranih proizvoda i čistih kultura bakterija mliječne kiseline kao živih lijekova za terapiju ili prevenciju bolesti. Od tada, pojam probiotik označava pojedinačnu ili mješovitu kulturu živih mikroorganizama s blagotvornim djelovanjem na organizam domaćina. Danas probiotici predstavljaju novu strategiju u promicanju zdravlja zahvaljujući istraživanjima ljudskog crijevnog ekosustava i važnosti disbalansa mikrobiote kod nekoliko bolesti i sindroma. Upotreba komenzalnih bakterija (bakterije normalne crijevne mikrobiote) u obnavljanju različitih ljudskih ekosustava (koža, crijeva, vagina) dovodi do pojave novih vrsta probiotika koji se nazivaju probiotici sljedeće generacije (engl. *Next-Generation Probiotics NGP*) ili živi bioterapeutski proizvodi (engl. *Live Bio-Therapeutic Products, LBP*) (Martin i Langella, 2019).

Zbog svojih probiotičkih, ali i antimikrobnog potencijala, bakterije mliječne kiseline (BMK) imaju dugu tradiciju upotrebe u mliječnoj industriji kao starter kulture. Jedne su od najranije proučavanih bakterija u mikrobiologiji hrane jer su sastavni dio prirodne mikroflore mlijeka i sudjeluju u spontanoj fermentaciji. Mogu se koristiti u proizvodnji mliječnih proizvoda u svrhu poboljšanja kvalitete i senzornih svojstava i sprečavanja rasta i razmnožavanja patogenih bakterija (Kieliszek i sur., 2021). BMK fermentiraju šećere u mliječnu kiselinu, a proteolitičkim djelovanjem razgrađuju kazein i pritom omogućuju stanicama dušične komponente nužne za rast, ali i slobodne aminokiseline kojih u prirodnom okruženju obično nema puno. Proteolitička aktivnost pridonosi organoleptičkim svojstvima mliječnih proizvoda, ali omogućuje i oslobađanje bioaktivnih peptida iz većih mliječnih proteina koji pridonose apsorpciji minerala, antihemolitičkom, antimutagenom, antioksidativnom, antimikrobnom i imunomodulatornom djelovanju (Novak i sur., 2022). Kako se ove bakterije najviše koriste u proizvodnji sira, neophodno je odrediti karakteristike sojeva kako bi se olakšao postupak same proizvodnje i povećala kvaliteta krajnjeg proizvoda. Nadalje, pojavljuje se i primjena u proizvodnji funkcionalne hrane ili peptida koji bi se koristili kao aktivni sastojci za lijekove ili kao dodatak prehrani (Raveschot i sur., 2018).

Cilj ovog istraživanja bio je identificirati bakterije mliječne kiseline na temelju fenotipskih i genotipskih značajki te ispitati fermentacijski profil karakterizacijom proteolitičke aktivnosti. pH vrijednost i koncentracija mliječne kiseline praćeni su kako bi se procijenio potencijal testiranih sojeva BMK za zakiseljavanje mlijeka. Mogućnost induciranja aktivnosti proteinaze ispitana je inokuliranjem sojeva u obrano mlijeko umjesto optimalnog medija (MRS/M17). Naposljetku izvršena je ekstrakcija proteinaza, pročišćavanje ultrafiltracijom i analiza SDS-PAGE metodom.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne, nesporogene, mezofilne, kemoorganotrofi, katalaza-negativne, mikroaerofilne bakterije koje se prema produktima metabolizma mogu podijeliti na:

- homofermentativne (obligatno i fakultativno homofermentativne) - produkt fermentacije je mliječna kiselina
- heterofermentativne - produkti fermentacije su mliječna kiselina, ali i ugljikov dioksid, etanol i acetat.

Energiju dobivaju fermentacijom ugljikohidrata, a za razgradnju heksoza koriste glikolizu ili Embden-Meyerhof-Parnasov put i 6-fosfoglukonat/fosfoketolazni put. BMK obuhvaćaju 20 rodova: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Sporolactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Oenococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella*, *Actinomyces* i *Atopobium*. Po taksonomiji, BMK pripadaju koljenu *Firmicutes*, razredu *Bacilli*, redu *Lactobacillales* i porodici *Lactobacillaceae*. Iznimka je rod *Bifidobacterium* koji pripada koljenu *Actionobacteria*. Karakterizira ih GRAS status (engl. *Generally Recognized As Safe*), a rodovi koji se najčešće koriste u proizvodnji fermentirane hrane su *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Za taksonomsku identifikaciju BMK primjenjuju se fenotipske i genotipske metode. Fenotipska svojstva lako se mogu okarakterizirati biokemijskim testovima koji su standardizirani za ispitivanje mikrobnog metabolizma, međutim potrebno ih je provjeriti molekularno-genetičkim metodama kao što su PCR DNA fingerprinting (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), analiza slučajno umnoženih fragmenata DNA (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD), usporedba sekvenci očuvanih regija 16S rRNA gena, elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE), elektroforeza u denaturirajućem gradijentu (engl. *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*, DGGE) i sekvencioniranje cijelog genoma (Castro-González i sur., 2019).

Molekularni mehanizmi probiotičkog djelovanja BMK uključuju površinske molekule poput glikoproteina, lipoproteina, lipoteihonske kiseline, egzopolisaharida, pilusa i flagelina. Osim toga, djelatne molekule BMK su i različiti metaboliti kao što su značajne količine organskih kiselina (mliječna i octena), diacetil, vodikov peroksid, etanol, SCFA, ekstracelularne vezikule,

bakteriocini, laktaze i hidrolaze žučnih soli (Banić, 2021). Inhibitorno djelovanje organskih kiselina temelji se na difundiranju nedisociranog oblika molekule kroz staničnu membranu i interferiranje s osnovnim metaboličkim funkcijama. Vodikov peroksid djeluje antimikrobno zbog jakog oksidativnog utjecaja i razaranja osnovne molekularne strukture staničnih proteina, a ugljikov dioksid stvara anaeroban okoliš i uzrokuje disfunkciju permeabilnosti (Gao i sur., 2022).

S-proteini na površinskom sloju stanica nekih BMK sastavljeni su od identičnih glikoproteinskih podjedinica kovalentno povezanih s površinom stanica. Budući da su u direktnom kontaktu s okolinom, S-proteini imaju važnu ulogu u adheziji bakterija na različite supstrate i površine, a također djeluju i kao mehanička barijera u nepovoljnim uvjetima. Pronađeni su kod *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus hilgardii* (Beganović i sur., 2013).

Neke bakterije proizvode bakteriocine, ribosomski sintetizirane peptide koji djeluju bakteriostatsko ili bakteriocidno na srodne bakterijske vrste. Njihovo djelovanje može biti uskog ili širokog spektra, a općenito je usmjereno prema gram-pozitivnim vrstama s niskim sadržajem gvanina i citozina u molekuli DNA. Bakteriocini se vežu na lipide u membrani te na taj način ili sprječavaju sintezu stanične stijenke ili uzrokuju stvaranje pora. Oba mehanizma dovode do smrti bakterijske stanice. Također mogu uzrokovati poremećaje u DNA, RNA i sintezi proteina. Upotreba bakteriocina u prehrambenoj industriji vrlo je važna jer služe kao zamjena za kemijske konzervanse koji mijenjaju organoleptička svojstva hrane. Trenutno su komercijalno dostupna tri bakteriocina: nisin, pediocin-PA1 i Micocin® (smjesa karnociklina A, karnobakteriocina BM1 i piscikolina 126), a mogu se primjenjivati izravno inokulacijom producenta bakteriocina, dodavanjem pročišćenog bakteriocina ili fermentiranog proizvoda koji sadrži proizvođače bakteriocina (Simons i sur., 2020).

Bakterijama mliječne kiseline za rast je potrebna dostatna količina slobodnih aminokiselina i niskomolekularnih peptida kojima mlijeko kao medij ne obiluje. Zbog toga BMK posjeduju aktivni sustav proteinaza pomoću kojih se proteini mlijeka hidroliziraju do aminokiselina i peptida. Od proteina, mlijeko sadrži kazein i proteine sirutke. Kazein je najzastupljeniji protein i zbog toga je glavni izvor aminokiselina u mlijeku. Kazein čine frakcije koje sadrže velik broj aminokiselinskih ostataka prolina koji onemogućuju nastajanje  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -nabranih ploča pa se formiraju nestrukturirane otvorene molekule kazeina koje su osjetljive na djelovanje

proteinaza. Stabilnost kazeina ovisi o kiselosti mlijeka, količini soli i temperaturi. Dodatkom kiseline ili enzimskog pripravka može se potpomoći koagulacija kazeina što ima primjenu u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda (Fox, 1989).

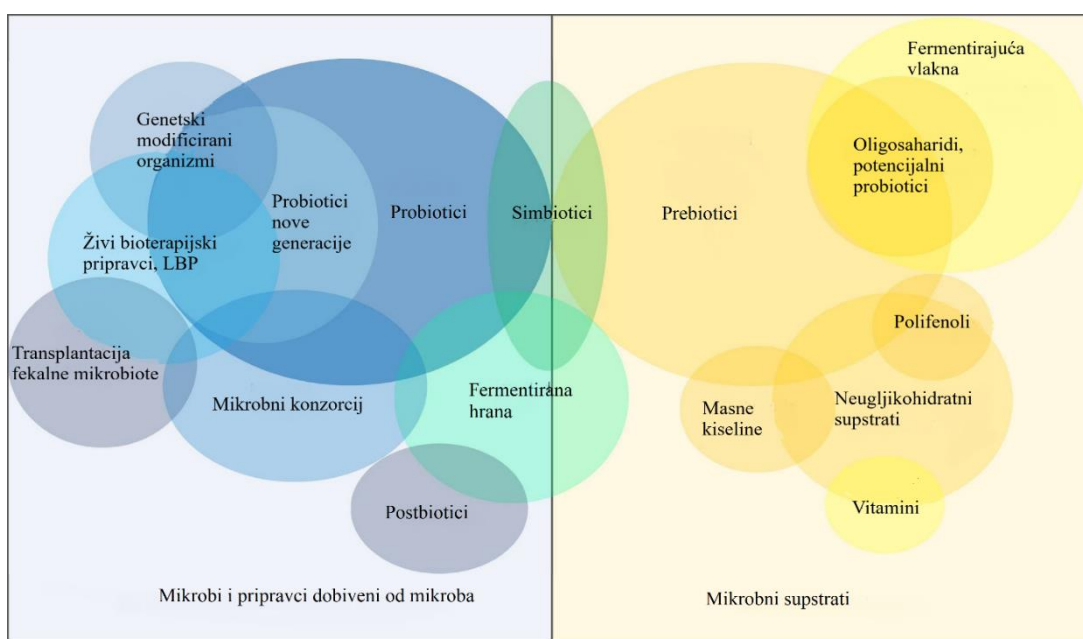
Proteolitički sustav čine dvije glavne vrste enzima: proteinaze i peptidaze. Proteinaze iniciraju proteolizu kazeina u peptide različitih veličina koji se unose u stanicu specifičnim transportnim sustavom i djelovanjem intracelularnih peptidaza razgrađuju na kraće peptide i aminokiseline. Ovaj proteolitički sustav omogućuje rast BMK, a nastali peptidi, aminokiseline i derivati su glavni prekursori specifičnih komponenti okusa, kao što su alkoholi, aldehidi, kiseline i esteri (Smit i sur., 2005). Ekspresija proteinaze u odabranim sojevima BMK može biti povezana s prisutnošću Fmc<sup>+</sup> (engl. *fast milk-coagulating*) fenotipa ili kapacitetom acidifikacije kao što je to slučaj za *Streptococcus thermophilus*. Proteinaza stanične ovojnice PrtS odgovorna je za zakiseljavanje mlijeka, a ovisno o njejoj prisutnosti sojevi *S. thermophilus* dijele se na dvije fenotipske skupine; sojeve sa sporim i brzim zakiseljavanjem (Fmc<sup>+</sup> fenotip). Stvaranje kiseline rezultira inhibicijom patogenih bakterija i bakterija uzročnika kvarenja hrane te snižavanjem pH vrijednosti koja uzrokuje taloženje kazeina i zgrušavanja zbog čega je sposobnost brzog zakiseljavanja važna svojstvo u proizvodnji sira (Dandoy i sur., 2011).

BMK proizvode i egzopolisaharide koji omogućuju lakšu adheziju na različite površine i formiraju biofilm koji štiti stanicu od mehaničkih oštećenja, dehidracije i bakteriofaga, a međuostalom poboljšavaju strukturu mliječnih proizvoda (Zannini i sur., 2016).

Bakterije mliječne kiseline se u industriji najviše koriste kao starter kulture i biokonzervansi. Dodaju se najviše u svrhu stvaranja mliječne kiseline, čime se poboljšava aktivnost sirila i ubrzava proces, ali i u svrhu stvaranja željenih okusa, mirisa i teksture gotovog proizvoda. Upotrebom komercijalnih funkcionalnih starter kultura u proizvodnji poboljšala se tehnološka kvaliteta proizvoda, ali se izgubila bioraznolikost mikrobiote i okus tradicije. Međutim, uvođenjem starter kultura s autohtonim, prethodno fenotipski i genotipski okarakteriziranim sojevima postigla bi se ujednačena kvaliteta, ali s očuvanom autohtonom aromom i teksturom (Topisirović i sur., 2006).

## 2.2. PROBIOTICI

Razmatranje crijevne flore neophodno je za razumijevanje važnosti iste za ljudsko zdravlje. Bakterijska kolonizacija crijeva počinje pri rođenju te se razvija i transformira tijekom života, ovisno o složenom međudnosu prehrane, genoma, stila života i upotrebe antibiotika. Svaki pojedinac u gastrointestinalnom traktu ima sto do tisuću mikrobnih vrsta, a bilo kakva promjena u njihovoj raznolikosti može rezultirati poremećajima i bolešću. Konvencionalni lijekovi za takve bolesti imaju vrlo ograničenu učinkovitost zbog pojave patogena otpornih na antibiotike, pa je pronalazak jednostavnih i jeftinih rješenja tog problema postalo ključno pitanje današnjice (Kerry i sur., 2018). Velikim tehnološkim napretkom i razvojem raznih „omičkih“ alata kao što su genomika, metabolomika, transkriptomika i proteomika omogućuje se dublji uvid u interakcije probiotika i prebiotika s mikrobiomom i domaćinom. Kako se znanje nastavlja širiti, razvijaju se regulatorni okviri, kliničke smjernice i trendovi u industriji te se razvijaju nova polja koja se presijecaju i graniče s već definiranim poljima probiotika i prebiotika (slika 1).



**Slika 1.** Međudnos probiotika i prebiotika i srodnih polja (prema Cunningham i sur., 2021a) Konceptualna karta temelji se na dva različita koncepta. Prvi koncept su mikrobi i pripravci dobiveni od mikroba (nijansa plave), a drugi mikrobni supstrati (nijanse žute). Između njih su pripravci koje čine oba koncepta (nijanse zelene). Trenutni i potencijalni odnosi prikazani su preklapanjem oblika. Napomena: veličina i oblik koji predstavlja svako polje samo je u vizualne svrhe

Iako je fermentirana hrana zastupljena u ljudskoj prehrani već tisućama godina, tek je početkom 20. stoljeća Louis Pasteur otkrio uzročnike fermentacije, a Élie Metchnikoff povezo da na sastav crijevne mikrobiote utječe prehrana i da se štetni mikrobi mogu zamijeniti korisnim što se smatra temeljem probiotičkog koncepta (Šušković i sur., 1997). Henry Tissier je potom zaključio da je u uzorcima stolice djece oboljele od proljeva manja mikrobiološka koncentracija određene vrste bakterija nego u onoj zdrave djece. Njegov prijedlog za oralnu primjenu živih mikroorganizama (bifidobakterija) u pacijenata s proljevom i pomoć u obnavljanju crijevne mikroflore bio je prvi takve vrste. Modernu definiciju probiotika kao održivu mono ili mješovitu kulturu bakterija koja primjenjena pozitivno utječe na domaćina iznijeli su Havenaar i Huisint (Kerry i sur., 2018). Revolucija u sekvenciranju DNA dovela je do znatnog napretka u istraživanju probiotika i izazvala potrebu za regulaciju i karakterizaciju probiotika. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) 2001. godine definirale su probiotike kao „žive mikroorganizme koji primjenjeni u adekvatnoj količini imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina“ (FAO/WHO, 2001). Dokument je sadržavao karakteristike koje mikroorganizam mora posjedovati da bi se proglasio probiotikom, a time je usaglašeno da se izraz koristi samo za definirane i sigurne mikrobne zajednice dokazanih zdravstvenih učinaka (Banić, 2021). Različiti mikroorganizmi trenutno se koriste kao probiotici (tablica 1), ali rodovi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* najbrojniji su u komercijalnim probioticima.



**Tablica 1.** Mikroorganizmi koji se trenutno najviše koriste kao probiotici (prilagođeno prema Kerry i sur., 2018)

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

Da bi se mikroorganizam mogao primjeniti kao probiotik mora zadovoljiti opće, tehnološke i funkcionalne izborne kriterije (tablica 2). U opće kriterije ubrajaju se podrijetlo, precizna taksonomska identifikacija, zdravstvena sigurnost i provjera prisutnosti rezistencije na antibiotike. Pod tehnološkim kriterijima smatraju se preživljavanje i zadržavanje aktivnosti tijekom pripreme i skladištenja proizvoda, a funkcionalni kriteriji uključuju adheziju na crijevni epitel koja ovisi o autoagregaciji i koagregaciji s patogenima, antimikrobno djelovanje prema patogenim mikroorganizmima, poticanje imunološkog odgovora i promjene mikrobnog metabolizma u probavnom traktu (Coman i sur., 2014; Jensen i sur., 2014). Iako probiotici imaju značajan potencijal u prehranbenoj i kliničkoj primjeni, potrebna su značajna istraživanja kako bi se probiotici implementirali u ljudsku prehranu. Procjena sigurnosti probiotika vrlo je važna zbog potencijalne infektivnosti, patogenosti, prisustva toksina, moguće rezistencije na antibiotike ili pogrešno identificiranog probiotičkog soja (Schiffrin i Blum, 2001).

**Tablica 2.** Izborni kriteriji za odabir probiotika (prilagođeno prema Šušković i sur., 2001)

<b>Opći kriteriji</b>	točna taksonomska identifikacija
	humano podrijetlo za humane probiotike
	netoksičnost i nepatogenost
	genetička stabilnost(nema prijenosa plazmida)
	otpornost prema žučnim kiselinama
	otpornost prema niskim pH vrijednostima
<b>Tehnološki kriteriji</b>	stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke
	visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom razvoju( $10^6$ - $10^4$ mL <sup>-1</sup> ili g <sup>-1</sup> ), npr 100 g proizvoda osigurava $10^8$ - $10^{10}$ živih stanica
	brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije
	dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese
<b>Funkcionalni kriteriji</b>	sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u "ciljanom" području primjene u organizmu
	sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela
	produkcija antimikrobnih supstancija, uključujući bakteriocine, vodikov peroksid i organske kiseline
	antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama
	moгуćnost kompetencije sa sudionicima normalne mikroflore, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje proizvode autohtona mikroflora
	imunomodulacijski učinak
sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje	

### 2.3. PREBIOTICI I POSTBIOTICI

Prebiotički koncept započeo je u ranim 50-im godinama prošlog stoljeća otkrićem faktora rasta u majčinu mlijeku. 1995. godine prebiotik je definiran kao „neprobavljiv sastojak hrane koji korisno djeluje na domaćina stimulirajući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterijskih vrsta koje su već prisutne u crijevima te na taj način poboljšavaju ljudsko zdravlje“ (Gibson i Roberfroid 1995). Da bi sastojak hrane bio identificiran kao prebiotik, sljedeći uvjeti moraju biti zadovoljeni:

- da se ne apsorbira i hidrolizira u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta
- da selektivno stimulira rast korisnih bakterija u debelom crijevu
- da sprječava rast patogena i zaraznost, a pritom pozitivno utječe na zdravlje (Božanić i Tratnik, 1999)

Napredak u razumijevanju interakcija između mikrobiote, domaćina i prehrane doveli su u pitanje tradicionalan koncept prebiotika, a još uvijek znanstvena zajednica pokušava pronaći jedinstvenu definiciju. Pitanja koja se trenutno postavljaju su anatomska ograničenja crijeva, potreba za fermentacijom, ograničenja na ugljikohidrate i potreba za modulacijom mikrobiote (Bindels i sur., 2015). Uzevši ih u obzir, ISAPP je 2017. predložio sljedeću definiciju prebiotika: „supstrat koji mikroorganizmi u domaćinu selektivno koriste i pridonose zdravlju“ (Gibson i sur., 2017). Prebiotici, prikazani u tablici 3, mogu se konzumirati kao dodaci prehrani ili kao funkcionalni sastojci u različitim prehrambenim proizvodima – žitarice, zaslađivači, mlijeko, jogurt itd. Prilikom obrade mogu biti izloženi temperaturi, pH i kemijskim stresorima što omogućuje njihov transport i aktivnost u debelom crijevu (Cunningham i sur., 2021b).

Znanstvenim studijama opisani su različiti korisni učinci probiotika u regulaciji metabolizma, no neke druge studije dovodile su u pitanje njihovu učinkovitost. Stoga je došlo do definiranja postbiotika – preparata neživih mikroorganizama i/ili njihovih komponenti, što ih čini sigurnim za upotrebu, a pritom, za razliku od probiotika, ne zahtijevaju stroge uvjete proizvodnje/čuvanja. Trenutno su identificirani različiti oblici postbiotika:uropeptidi izvedeni iz peptidoglikana, egzopolisaharidi, teihoična kiselina, izlučeni proteini/peptidi, bakteriocini (acidofilin, reuterin, bifidin), organske kiseline, vitamini i kratkolančane masne kiseline (engl. *Short-chain fatty acids, SCFA*) (Bourebaba i sur., 2022).

**Tablica 3.** Postbiotici i prebiotici i njihovi prirodni izvori (prilagođeno prema Kerry i sur., 2018)

	<i>Bioaktivna komponenta</i>	<i>Prirodni izvor</i>
<b>POSTBIOTICI</b>	Bakteriocin	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	topljivi medijator	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>
	Butaonat	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
	Polifosfat	<i>Levilactobacillus brevis</i>
	egzopolisaharid	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	kratkolančana masna kiselina	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<b>PREBIOTICI</b>	fruktooligosaharid	luk, poriluk, šparoge, češnjak, zob
	Inulin	banana, agava, cikorija, luk, češnjak
	izomaltooligosaharid	miso, soja, med
	Laktuloza	obrano mlijeko
	Laktosukroza	mliječni šećer
	galaktooligosaharid	slanutak, ljudsko mlijeko, grašak, grah
	sojin oligosaharid	Soja
	ksilooligosaharid	voće, povrće, med

#### 2.4. SINBIOTICI

„Kombinacija probiotika i prebiotika koji blagotvorno utječu na domaćina poboljšavajući preživljavanje i implementaciju živih mikrobioloških dodataka prehrani u gastrointestinalnom traktu, selektivnim poticanjem rasta i/ili aktiviranjem metabolizma jednog ili ograničenog broja bakterija“ definira se kao sinbiotik (slika 1) (Gibson i Roberfroid, 1995). Komercijalni interes za funkcionalnu hranu koja sadrži sinbiotike raste zbog svijesti o dobrobiti za zdravlje crijeva i prevenciju bolesti. Neki od uobičajenih sinbiotičkih sastava prikazani su u tablici 4.

**Tablica 4.** Kombinacije sinbiotika (prilagođeno prema Kerry i sur., 2018)

<i>Prebiotik</i>	<i>Probiotik</i>
fruktooligosaharid	<i>Bifidobacteria, Bacteroides fragilis, Peptostreptococcaceae, Klebsiellae</i>
inulin	<i>Bifidobacterium animalis, L. acidophilus, L. paracasei</i>
laktuloza	<i>Bifidobacteria lactis, L. bulgaricus, L. acidophilus, L. Rhamnosus</i>
izomaltooligosaharid	<i>Bifidobacteria, Bacteroides fragilis</i>

## 2.5. PROBIOTICI NOVE GENERACIJE

Kako se proučavanje mikrobiote nastavljalo pomoću bioinformatike, metagenomskog sekvencioniranja i 16S ribosomske DNA, tako su se pojavili novi bakterijski kandidati za ublažavanje/sprječavanje bolesti. Među ostalima, tu su uključeni *Prevotella copri*, *Christensenella minuta*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Akkermansia muciniphila* i *Bacteroides thetaiotaomicron* koji kontroliraju inzulinsku rezistenciju te *Bacteroides fragilis* koji smanjuje upalu i pokazuje antikancerogeno djelovanje (Chang i sur., 2019). FDA (engl. *Food and Drug Administration*) 2010. predložila je razmatranje statusa lijeka za probiotičke proizvode te je 2012. uvela kategoriju probiotika nove generacije (engl. *Next-Generation Probiotic, NGP*). Živi bioterapeutski proizvod (engl. *Live-Bio-therapeutic product, LBP*) je „biološki proizvod koji sadrži žive mikroorganizme, namijenjen prevenciji ili liječenju različitih stanja i bolesti ljudi, ali nije cjepivo“ (Rouanet i sur., 2020). Za tržište Europske Unije 2019., objavljivanjem monografije Europske farmakopeje, LBP-i službeno su prihvaćeni kao nova kategorija medicinskih proizvoda. S obzirom da se smatraju medicinskim proizvodima, LBP-i moraju biti proizvedeni po svim tehničkim zahtjevima kao i ostali lijekovi, među kojima je i dobra proizvođačka praksa (engl. *Good Manufacturing Practice, GMP*) koja inače zahtjeva uklanjanje mikroorganizama iz proizvoda, a kod LBP-a se mora osigurati deklarirani broj živih mikroorganizama (engl. *Colony forming units g<sup>-1</sup>*, CFU g<sup>-1</sup>) do kraja roka trajanja. Na učinkovitost LBP-a utječu okolišni faktori (kisik, tehnike obrade proizvoda) i faktori domaćina (pH, stres, etnička pripadnost, sastav mikrobioma, zdravlje, a najviše prehrana) pa je kliničku aktivnost vrlo teško dokazati. Iz tog razloga, niti jedan još nije odobren od strane FDA (Banić, 2021). Optimizacija procesa obrade mikrobnih proizvoda, kao što je primjerice sušenje smrzavanjem, nužna je kako bi se omogućila ciljana isporuka lijeka u organizmu (Torp i sur., 2022).

## 2.6. MEHANIZMI DJELOVANJA PROBIOTIKA

Crijevna mikrobiota utječe na razvoj centralnog živčanog sustava preko crijeva-mozak barijere te promjene u mikrobioti crijeva dovode do poremećaja u centralnom živčanom sustavu, što može rezultirati bolestima kao što su depresija, Parkinsonova bolest ili shizofrenija (Zhu i sur., 2017). Slično se može dogoditi i s crijeva-jetra barijerom što rezultira proliferacijom štetnih bakterija i nakupljanjem toksina pa se povećava rizik za oštećenja jetre (Konturek i sur., 2018). Tijekom godina istraživanja probiotika, zdravstvenih prednosti konzumacije istih pojavilo se sve više. Prema WHO, probiotici su drugi najvažniji u sustavu obrane imuniteta nakon što antibiotici postanu neučinkoviti uslijed antibiotske rezistencije. Probiotici mogu pomoći u različitim akutnim i kroničnim stanjima, osobito pri terapiji antibioticima, radijacijom ili imunosupresivima, kod kojih je uobičajena promjena sastava crijevnog flore.

Mehanizmi djelovanja probiotika su:

- Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama (antimikrobno djelovanje, kompeticija za nutrijente, kompeticija za mjesta adhezije)
- Promjene metabolizma mikroorganizma u probavnom traktu
- Stimulacija imunološkog sustava

Uloge probiotika mogu se podijeliti na metaboličke, imunološke i na održavanje homeostaze crijeva. Metaboličkim funkcijama probiotika smatraju se djelovanja protiv dijabetesa i pretilosti, ublažavanje intolerancije na laktozu, uklanjanje toksina, smanjenje kolesterola, hidroliza žučnih soli i proizvodnja vitamina. Homeostaza crijeva očuvana je uz pomoć balansirane crijevnog flore, a probiotici sudjeluju u prevenciji i liječenju različitih tipova dijareje i sindroma iritabilnog crijeva te omogućuju otpornost na kolonizaciju patogena i antimikrobnu aktivnost. U imunološke funkcije probiotika pripadaju ublažavanje i prevencija alergija, proizvodnja antitijela, jačanje imuniteta i kontrola upalne bolesti crijeva (Shi i sur., 2016).

Dokazano je da probiotici smanjuju učestalost kožnih bolesti (Lizardo i Tavarina, 2022) hipertenzije u odraslih (Khalesi i sur., 2014), povećavaju gustoću kostiju i štite od osteoporoze (Collins i sur., 2017), pomažu u liječenju nealkoholnog steatohepatitisa (Mingfei i sur., 2021). Također, imaju i antipatogena, antidiabetička (protuupalna, antikancerogena i antialergijska svojstva (Kerry i sur., 2018). Progresija COVID-19 infekcije stavljena je pod kontrolu suplementacijom probioticima i prebioticima (Walton i sur., 2021).

Fermentacija oligofruktoze u debelom crijevu rezultira povećanjem apsorpcije kalcija, povećanjem fekalne mase, skraćanje vremena zadržavanja fekalne mase u crijevima i moguće smanjenje lipida u krvi te povećanje broja bifidobakterija u debelom crijevu što dovodi do brže redukcije amonijaka, a bržu produkciju vitamina i probanih enzima (Hauser i sur., 2017).

Osim na ljude, sinbiotici su se pokazali efikasni i kod životinja. Primjerice, dokazano je djelovanje na infekciju bakterijom *Salmonella enterica* u kokoši nesilice (Kimminau i sur., 2021), zdravlje svinja (Liao i Nyachoti, 2017), miševa (Paturi i sur., 2015) pa čak i kukaca (Savio i sur., 2022).

Pojedinačni i grupni „bakterijski potpis“ jedinstven je za svaki mikrobiom, odnosno jedinku i povezan je sa zdravstvenim stanjem, statusom bolesti, biomarkerima domaćina, karakteristikama prehrane i životnim stilom. Jedinstveni taksonomski profil ključan je za predviđanje incidencije bolesti, napretka i odgovora na liječenje. Na temelju tih podataka dolazi se do ciljane strategije za modulaciju mikrobnog sastava sinbioticima unutar domaćina na osobnoj razini ili razini podskupine populacije (Cunningham i sur., 2021b).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Sojevi bakterija mliječne kiseline koji su korišteni prilikom izrade ovog rada prikazani su u tablici 5. Navedeni 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 5.** Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu

#### Bakterijski sojevi

<i>Levilactobacillus brevis</i> D6	<i>Bifidobacterium</i> 2B
<i>Levilactobacillus brevis</i> SF9B	<i>Bifidobacterium</i> 3
<i>Levilactobacillus brevis</i> SF15B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 2A
<i>Levilactobacillus brevis</i> ZG 1-K7	<i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14
<i>Lactobacillus fermentum</i> D12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12
<i>Lactobacillus plantarum</i> D13	<i>Lactobacillus plantarum</i> 8/1
<i>Lactobacillus plantarum</i> 8/2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 1-LGG
<i>Lactobacillus helveticus</i> M92	<i>Lactobacillus reuteri</i> 9
<i>Lactobacillus plantarum</i> ( <i>rhamnosus</i> ) 4	<i>Lactobacillus</i> sp. 7A
<i>Lactococcus lactis</i> ZGBP5-32	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ZG 7-10



Za uzgoj BMK prilikom izrade ovog rada korištene su slijedeće podloge:

- a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj BMK roda *Lactobacillus*  
MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biolife“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
  
- b) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj BMK roda *Lactococcus*  
M17 agar („Biolife“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvašćev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5; laktoza 5; natrijev 55 glicerofosfat 19; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

### 3.1.3. Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- amonijev persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- Deoksinukleotidi, „TaKaRa“, SAD
- EDTA, „Sigma-Aldrich“, SAD
- etanol, 70 % (v v-1) „Kemika“, Hrvatska
- etanol, apsolutni, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Njemačka
- fenolftalein „Kemika“, Hrvatska
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Sjeverna Makedonija
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- kalcijev klorid „Gram mol“, Hrvatska
- klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- metanol, „Sigma-Aldrich“, SAD
- metilensko modri R-250, „Sigma-Aldrich“, SAD
- magnezijev klorid, „Applied Biosystems“, SAD
- natrijev dodecilsulfat (sds), „Sigma“, SAD
- natrijev hidroksid „Kemika“, Hrvatska (natrijeva luzina)
- natrijev klorid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- obrano mlijeko u prahu, „Sigma-Aldrich“, SAD
- octena kiselina „Kemika“, Hrvatska
- početnice „Invitrogen“, SAD
- pufer bez MgCl<sub>2</sub>, „Applied Biosystems“, SAD
- QIAquick PCR Purification Kit, „Qiagen“ Njemačka
- R-metilensko modri R-250, „Sigma“ SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- Taq polimeraza, „TaKaRa“, SAD

- TE pufer, „Sigma-Aldrich“, SAD
- TEMED (N', N', N', N'-tetrametilen), „Sigma-Aldrich“, SAD
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- $\lambda$  DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

#### 3.1.4. Aparatura i pribor

- Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit. „Merck“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete “Eppendorf”, SAD
- Centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- elektroforetske kadice, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- epruvete „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlemeyerove tikvice „Technische Glaswerke Ilmenau“, Njemačka
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- kadica za elektroforezu, „Eppendorf“, SAD
- kivete, „Eppendorf“, SAD
- kivete za centrifugiranje 15 ml i 50 ml, „Falcon“, Engleska
- magnetna mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrobiološka ušica, „Syntesys“, Italija
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- PCR uređaj ABI 2720, „Applied Biosystems“, SAD
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za kivete, „NeoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Inkolab“, Hrvatska
- vortex V1 plus „Biosan“, Latvija
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Sojevi su 24 sata prije provođenja eksperimenta inokulirani u optimalni hranjivi medij (MRS ili M17), odnosno obrano mlijeko i inkubirani pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  u anaerobnim uvjetima.

### 3.2.2. Određivanje pH i postotka sintetizirane mliječne kiseline u supernatantu kulture

pH vrijednost, stupanj kiselosti i postotak proizvedene mliječne kiseline određeni su prema metodama opisanim u Kos i sur. (2003). Supernatantu kulture, dobivenom centrifugiranjem prekonoćnih kultura BMK, pomoću pH metra određena je pH vrijednost. Za određivanje stupnja kiselosti i postotka sintetizirane mliječne kiseline 1 ml supernatanta kulture razrijeđen je s 19 ml destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 ml. Razrijeđeni uzorak je titriran s 0,1 M NaOH uz dodatak fenolftaleina kao indikatora, do pojave blijedo ružičaste boje. Broj mililitara NaOH utrošenih za neutralizaciju, pomnožen s dva predstavlja kiselost u stupnjevima Soxhlet-Henkela ( $^{\circ}\text{SH}$ ). Sva mjerenja provedena su tri puta, kako bi se statistički obradili rezultati.

Postotak proizvedene mliječne kiseline izračunat je prema slijedećoj formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = a \times 20 \times f\text{NaOH} \times 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}\text{SH} \times 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}$$

$$f\text{NaOH} = 1$$

$$(1^{\circ}\text{SH} \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%))$$

### 3.2.3. Test koagulacije

Kapacitet koagulacije sojeva BMK određen je prema Hebert i sur. (2001). Sojevi su inokulirani u obrano mlijeko (10 % (m/V)) i obrano mlijeko (10 % (m/V)) s 2 %, 4 % i 6 % NaCl te inkubirani pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  48 h. Koagulacija je praćena nakon 24 h i 48 h uzgoja. Sojevi BMK

koji su pokazali Fmc<sup>+</sup> fenotip imaju odličan koagulacijski kapacitet (+++), dok su drugi obilježeni kao: bez koagulacije (-), umjerena koagulacija (+) i dobra koagulacija (++)

#### 3.2.4. Ekstrakcija proteinaza BMK

Nakon inkubacije u optimalnom hranjivom mediju provedena je ekstrakcija proteinaza iz bakterijskih kultura prema Villegas i sur. (2015). Prekonoćne kulture bakterijskih stanica centrifugirane su pri 8000 g 10 min pri 4 °C te je biomasa stanica dva puta isprana s 0,85 % (w/v) fiziološkom otopinom uz dodatak CaCl<sub>2</sub> (10 mM), a potom ponovo centrifugirana na 8000 g 5 minuta pri 4 °C. Stanice su resuspendirane u 20 mM Tris-HCl puferu (pH 7,5) uz dodatak CaCl<sub>2</sub> (5 mM). Uzorci su potom inkubirani pri sobnoj temperaturi 30 min i centrifugirani 15 min pri 8000 g. Supernatant je pohranjen pri 4 °C, a biomasa stanica je isprana i resuspendirana u Tris-HCl puferu (20 mM) te pohranjena pri 4 °C.

#### 3.2.5. Ultrafiltracija supernatanta

Nakon provedene ekstrakcije proteinaze, supernatanti su podvrgnuti filtraciji kroz 100-kDa membranu (Amicon Ultra15 Centrifugal Filter Unit) centrifugiranjem pri 4000 g 10 min na sobnoj temperaturi prema uputama proizvođača.

#### 3.2.6. SDS-PAGE (engl. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, *SDS-PAGE*) analiza potencijalnih proteinaza

SDS-PAGE analiza odrađena je prema Laemmli (1970). Uzorci pripremljeni ultrafiltracijom su razdvojeni pomoću SDS-PAGE na poliakrilamidnom (8 % (v/v)) gelu. Pripremljeni su gel za razdvajanje, gel za sabijanje i pufer za elektroforezu prema sastavu u tablici 6. U 15 µL svakog uzorka dodano je 5 µL reducirajućeg reagensa te su prokuhani 2 min. Nakon kuhanja ukupni volumen uzorka nanešen je na gel te je elektroforetsko razdvajanje provedeno u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 50 V tijekom 3 h. Korišten je standard ProSieve QuadColor Protein Marker koji sadrži proteine molekulske mase u rasponu 4,6-315 kDa. Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,1 % metilenskog modrila R-250, 50 % metanola i 7 % octene kiseline) tijekom 3 h, a zatim je inkubiran u otopini octene kiseline (7 % (v/v)) do obezbojenja pozadine.

**Tablica 6.** Sastav poliakrilamidnog gela i pufera za elektroforezu

<b>Poliakrilamidni gel (8 %)</b>		<b>Pufer za elektroforezu</b>
donji gel za separaciju (100 mL): Tris-HCl pufer pH 8,8 : 2,5 mL akrilamid: 2,13 mL destilirana voda: 2,5 mL TEMED: 5 $\mu$ L APS (10 %): 38 $\mu$ L	gornji gel za sabijanje (100 mL): Tris-HCl pufer pH 6,8: 2,13 mL akrilamid: 0,3 mL TEMED: 5 $\mu$ L APS (10 %): 22,5 $\mu$ L	30 g Tris 144 g glicin 10 g SDS

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

Autohtoni sirevi potencijalna su funkcionalna hrana i nosači probiotičkih mikroorganizama u ljudska crijeva. Probiotički učinak sira ovisi o broju bakterijskih sojeva koji imaju svojstva probiotika. U ovom radu su korišteni autohtoni bakterijski sojevi izolirani iz mikrobiote sira, a bakterije mliječne kiseline prirodno su prisutne, odnosno dio su autohtone mikrobne populacije u takvim fermentiranim proizvodima. Važan čimbenik odabira sojeva bakterija mliječne kiseline za upotrebu kao starter kultura je testiranje učinkovitosti, u kojem se procjenjuje brzina rasta, proizvodnja kiseline i prilagodba na sol. Metabolička aktivnost bakterijskih sojeva ispitana je kontroliranom kultivacijom tijekom 48 sati pri 37 °C u obranom mlijeku. Praćeni su parametri fermentacije: pH vrijednost, koncentracija mliječne kiseline te je određivan broj bakterija mliječne kiseline. Sposobnost brzog zakiseljavanja mlijeka važna je karakteristika sojeva koji se koriste kao starter kulture u proizvodnji sira pa je provjera te sposobnosti od iznimnog značaja. U ovom istraživanju odabrani su brzi zakiseljivači obranog mlijeka, što se očituje pretvorbom laktoze u mliječnu kiselinu, što je potvrđeno određivanjem mliječne kiseline i snižavanjem pH vrijednosti tijekom rasta kulture. Kao što se očekivalo, sojevi su obvezni ili fakultativni heterofermentativni sojevi BMK i proizvedena je mliječna i octena kiselina koje, osim što određuju organoleptička svojstva, djeluju kao biokonzervansi sprječavajući rast kontaminanata te doprinose sigurnosti i kvaliteti proizvoda. Rast bakterija kvarenja sira inhibira se kiseljenjem, pa sinteza visokih koncentracija mliječne kiseline utječe i na kvalitetu sira. Ispitivana je sposobnost prilagodbe na sol, odnosno NaCl, što je značajno odrediti zbog tehnološkog aspekta primjene BMK kao funkcionalnih starter kultura. Provedena je kultivacija u obranom mlijeku s dodatkom različitih koncentracija natrijeva klorida (2 %, 4 % i 6 % NaCl) te su praćeni parametri kao i tijekom kontrolirane kultivacije u obranom mlijeku. Na kraju eksperimenta izračunate su srednje vrijednosti i standardna devijacija. Ovisno o dodanoj koncentraciji natrijeva klorida, rezultati su prikazani u tablicama 9-12.

**Tablica 9.** pH vrijednost, koncentracija proizvedene mliječne kiseline u supernatantu kulture (g/L) i rast BMK izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta\log$  CFU/mL) različitih sojeva bakterija (D6, D12, D13 i ZG7-10) mliječne kiseline tijekom 48 sati uzgoja u obranom mlijeku uz izračunate standardne devijacije ( $\pm$ )

	vrijeme	D6	D12	D13	ZG7-10
<i>pH</i>	0	6,57 ( $\pm 0,10$ )	6,62 ( $\pm 0,10$ )	6,58 ( $\pm 0,14$ )	6,67 ( $\pm 0,07$ )
	6	6,35 ( $\pm 0,17$ )	6,45 ( $\pm 0,06$ )	6,43 ( $\pm 0,16$ )	6,21 ( $\pm 0,18$ )
	24	5,87 ( $\pm 0,46$ )	5,23 ( $\pm 0,55$ )	5,43 ( $\pm 0,35$ )	5,13 ( $\pm 0,28$ )
	48	4,48 ( $\pm 0,25$ )	4,32 ( $\pm 0,25$ )	4,60 ( $\pm 0,55$ )	4,63 ( $\pm 0,12$ )
<i>koncentracija mliječne kiseline</i>	0	0	0	0	0
	6	1,20 ( $\pm 0,85$ )	0,75 ( $\pm 0,56$ )	1,20 ( $\pm 0,85$ )	1,50 ( $\pm 0,42$ )
	24	3,00 ( $\pm 2,24$ )	2,70 ( $\pm 0,73$ )	3,30 ( $\pm 1,12$ )	3,15 ( $\pm 0,97$ )
	48	5,70 ( $\pm 2,78$ )	4,95 ( $\pm 1,60$ )	6,30 ( $\pm 2,55$ )	5,10 ( $\pm 1,70$ )
<i><math>\Delta\log</math> CFU/mL</i>	0-6.	0,10 ( $\pm 0,07$ )	0,01 ( $\pm 0,12$ )	0,04 ( $\pm 0,02$ )	0,27 ( $\pm 0,20$ )
	0-24.	0,14 ( $\pm 0,22$ )	0,20 ( $\pm 0,09$ )	0,39 ( $\pm 0,35$ )	0,52 ( $\pm 0,05$ )
	0-48.	0,61 ( $\pm 0,05$ )	0,57 ( $\pm 0,19$ )	0,08 ( $\pm 0,30$ )	0,72 ( $\pm 0,31$ )

**Tablica 10.** pH vrijednost, koncentracija proizvedene mliječne kiseline u supernatantu kulture (g/L) i rast BMK izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta\log$  CFU/mL) različitih sojeva bakterija (D6, D12, D13 i ZG7-10) mliječne kiseline tijekom 48 sati uzgoja u obranom mlijeku uz dodatak 2 % NaCl uz izračunate standardne devijacije ( $\pm$ )

	vrijeme	D6	D12	D13	ZG7-10
<i>pH</i>	0	6,42 ( $\pm 0,16$ )	6,44 ( $\pm 0,16$ )	6,37 ( $\pm 0,13$ )	6,45 ( $\pm 0,11$ )
	6	6,28 ( $\pm 0,20$ )	6,33 ( $\pm 0,15$ )	6,25 ( $\pm 0,18$ )	6,14 ( $\pm 0,19$ )
	24	5,99 ( $\pm 0,28$ )	5,65 ( $\pm 0,17$ )	6,01 ( $\pm 0,25$ )	5,15 ( $\pm 0,24$ )
	48	5,16 ( $\pm 0,86$ )	4,24 ( $\pm 0,16$ )	5,11 ( $\pm 0,55$ )	4,73 ( $\pm 0,07$ )
<i>koncentracija mliječne kiseline</i>	0	0	0	0	0
	6	1,20 ( $\pm 0,85$ )	1,20 ( $\pm 0,21$ )	1,20 ( $\pm 0,21$ )	1,65 ( $\pm 0,21$ )
	24	1,65 ( $\pm 1,18$ )	2,25 ( $\pm 0,37$ )	1,80 ( $\pm 0,73$ )	3,30 ( $\pm 0,76$ )
	48	4,20 ( $\pm 2,36$ )	4,50 ( $\pm 1,27$ )	4,20 ( $\pm 1,70$ )	5,10 ( $\pm 0,85$ )
<i><math>\Delta\log</math> CFU/mL</i>	0-6.	0,02 ( $\pm 0,09$ )	-0,13 ( $\pm 0,18$ )	0,20 ( $\pm 0,06$ )	0,29 ( $\pm 0,24$ )
	0-24.	-0,10 ( $\pm 0,02$ )	0,40 ( $\pm 0,30$ )	0,28 ( $\pm 0,16$ )	0,37 ( $\pm 0,27$ )
	0-48.	-0,61 ( $\pm 0,06$ )	0,43 ( $\pm 0,25$ )	-0,13 ( $\pm 0,24$ )	0,41 ( $\pm 0,36$ )



**Tablica 11.** pH vrijednost, koncentracija proizvedene mliječne kiseline u supernatantu kulture (g/L) i rast BMK izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta\log$  CFU/mL) različitih sojeva bakterija (D6, D12, D13 i ZG7-10) mliječne kiseline tijekom 48 sati uzgoja u obranom mlijeku uz dodatak 4 % NaCl uz izračunate standardne devijacije ( $\pm$ )

	<b>vrijeme</b>	<b>D6</b>	<b>D12</b>	<b>D13</b>	<b>ZG7-10</b>
<b>pH</b>	0	6,38 ( $\pm 0,20$ )	6,39 ( $\pm 0,17$ )	6,36 ( $\pm 0,20$ )	6,44 ( $\pm 0,18$ )
	6	6,27 ( $\pm 0,24$ )	6,29 ( $\pm 0,17$ )	6,21 ( $\pm 0,20$ )	6,21 ( $\pm 0,15$ )
	24	6,08 $\pm 0,22$	5,78 ( $\pm 0,23$ )	6,01 ( $\pm 0,17$ )	5,43 ( $\pm 0,30$ )
	48	5,38 ( $\pm 0,74$ )	4,77 ( $\pm 0,28$ )	5,12 ( $\pm 0,39$ )	5,03 ( $\pm 0,11$ )
<b>koncentracija mliječne kiseline</b>	0	0	0	0	0
	6	1,05 ( $\pm 0,76$ )	0,75 ( $\pm 0,56$ )	1,20 ( $\pm 0,21$ )	1,05 ( $\pm 0,76$ )
	24	1,35 ( $\pm 0,97$ )	1,50 ( $\pm 0,42$ )	1,65 ( $\pm 0,56$ )	3,00 ( $\pm 1,18$ )
	48	3,90 ( $\pm 2,12$ )	4,20 ( $\pm 1,70$ )	4,20 ( $\pm 1,70$ )	4,50 ( $\pm 1,27$ )
<b><math>\Delta\log</math> CFU/mL</b>	0-6.	0,02 ( $\pm 0,03$ )	-0,03 ( $\pm 0,19$ )	0,31 ( $\pm 0,04$ )	0,20 ( $\pm 0,30$ )
	0-24.	-0,37 ( $\pm 0,15$ )	0,26 ( $\pm 0,33$ )	0,33 ( $\pm 0,09$ )	0,28 ( $\pm 0,30$ )
	0-48.	-0,75 ( $\pm 0,24$ )	0,36 ( $\pm 0,19$ )	-0,10 ( $\pm 0,25$ )	0,47 ( $\pm 0,18$ )

**Tablica 12.** pH vrijednost, koncentracija proizvedene mliječne kiseline u supernatantu kulture (g/L) i rast BMK izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta\log$  CFU/mL) različitih sojeva bakterija (D6, D12, D13 i ZG7-10) mliječne kiseline tijekom 48 sati uzgoja u obranom mlijeku uz dodatak 6 % NaCl uz izračunate standardne devijacije ( $\pm$ )

	<b>vrijeme</b>	<b>D6</b>	<b>D12</b>	<b>D13</b>	<b>ZG</b>
<b>pH</b>	0	6,31 ( $\pm 0,20$ )	6,31 ( $\pm 0,16$ )	6,31 ( $\pm 0,23$ )	6,40 ( $\pm 0,18$ )
	6	6,22 ( $\pm 0,24$ )	6,23 ( $\pm 0,16$ )	6,15 ( $\pm 0,17$ )	6,22 ( $\pm 0,14$ )
	24	6,04 ( $\pm 0,16$ )	6,02 ( $\pm 0,07$ )	6,01 ( $\pm 0,06$ )	5,61 ( $\pm 0,18$ )
	48	5,60 ( $\pm 0,45$ )	5,31 ( $\pm 0,09$ )	5,61 ( $\pm 0,18$ )	5,40 ( $\pm 0,10$ )
<b>koncentracija mliječne kiseline</b>	0	0	0	0	0
	6	1,05 ( $\pm 0,76$ )	1,35 ( $\pm 0,37$ )	1,05 ( $\pm 0,21$ )	1,20 ( $\pm 0,85$ )
	24	1,35 ( $\pm 0,97$ )	1,65 ( $\pm 0,56$ )	1,35 ( $\pm 0,37$ )	2,40 ( $\pm 1,12$ )
	48	3,30 ( $\pm 1,70$ )	2,70 ( $\pm 0,73$ )	3,00 ( $\pm 1,53$ )	3,00 ( $\pm 1,12$ )
<b><math>\Delta\log</math> CFU/mL</b>	0-6.	-0,09 ( $\pm 0,10$ )	0,01 ( $\pm 0,14$ )	0,12 ( $\pm 0,12$ )	-0,24 ( $\pm 0,15$ )
	0-24.	-0,13 ( $\pm 0,06$ )	-0,44 ( $\pm 0,32$ )	-0,86 ( $\pm 0,23$ )	0,16 ( $\pm 0,26$ )
	0-48.	-0,81 ( $\pm 0,18$ )	-0,44 ( $\pm 0,18$ )	-0,94 ( $\pm 0,04$ )	-0,15 ( $\pm 0,34$ )

Odabrani sojevi BMK pokazali su dobar rast pri koncentracijama od 2 i 4 % soli, dok je pri 6 % njihov rast usporen. Utjecaj soli na rast BMK proučavali su Korkeala i sur. (1992) i došli do zaključka da sol u nižim koncentracijama manjim od 2 % potpomaže, a većim od 3 % inhibira rast BMK. Do sličnog rezultata došli su i Santo i sur. (2005).

Što se pH vrijednosti obranog mlijeka tiče (sa i bez dodatka soli), početna vrijednost bila je podjednaka, a kretala se u rasponu 6,67 - 6,31. Nakon 6 sati uzgoja pH vrijednost pada u podjednakim omjerima kod svih sojeva. Međutim, nakon 24 sata uzgoja, pH vrijednost kod sojeva koji su rasli u prisutnosti soli, sporije pada. Iako sol u siru ima višestruka poželjna svojstva kao što je poboljšanje organoleptičkih svojstava i sprječavanje rasta nepoželjnih bakterija, ipak visoke koncentracije soli mogu utjecati na metaboličku aktivnost, među ostalim na usporavanje procesa proteolize.

Sukladno padu pH vrijednosti, koncentracija mliječne kiseline je rasla tijekom 48 - satnog uzgoja sojeva BMK. Očekivano, najuspješniju acidifikaciju proveli su sojevi koji su kultivirani u obranom mlijeku bez dodatka soli. Statistički najznačajnija acidifikacija određena je nakon rasta *L. fermentum* D12.

Koagulacija mlijeka ključni je proces u proizvodnji većine mliječnih proizvoda i odvija se istovremeno s kiseljenjem. Za preliminarno ispitivanje potencijala sojeva BMK kao starter kulture u proizvodnji sira, ispitana je vjerojatnost koagulacije mlijeka nakon 24 i 48 sati uz kvalitativno određivanje Fmc<sup>+</sup> fenotipa uz prisutnost različitih koncentracija soli. *L. brevis* D6, proizvođač S-sloja (Uroić i sur., 2016) i ZG7-10 pokazali su izvrsnu koagulaciju nakon 48 sati uzgoja, međutim ZG7-10 je tu aktivnost koagulacije izgubio u obranom mlijeku s 2 % NaCl-a dok to nije bio slučaj kod D6. Nijedan soj nije pokazao aktivnost koagulacije pri 4 i 6%-tnim koncentracijama natrijeva klorida.

**Tablica 13.** Kvalitativna detekcija koagulacije i prisutnosti Fmc<sup>+</sup> fenotipa nakon 16 sati kultivacije sojeva bakterija roda *Lactobacillus* i *Lactococcus* u obranom mlijeku

<b>Soj BMK</b>	<b>Koagulacija mlijeka</b>
<i>L. helveticus</i> M92	+++ / +++ / +++
<i>L. brevis</i> D6	+ / +++ / +++
<i>L. brevis</i> ZG1-K7	++ / ++ / +++
<i>L. brevis</i> SF9B	+ / - / ++ / ++
<i>L. plantarum</i> SF15B	+ / + / +
<i>L. plantarum</i> SF9C	- / ++ / +
<i>L. plantarum</i> SF15C	+ / - / ++ / ++
<i>L. plantarum</i> D13	+ / ++ / +++
<i>L. fermentum</i> D12	- / ++ / + / -
<i>Lc. lactis</i> ZGPR1-51	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGPR2-4	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGPR2-11	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGBP4-1	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGBP4-2	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGBP5-32	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGBP5-51	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGBP6-51	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGZA7-6	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGZA7-10	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGZA9-2	+++ / +++ / +++
<i>Lc. lactis</i> ZGZA9-11	+++ / +++ / +++

Rezultati predstavljaju tri pojedinačna ponavljanja, prikazana kao: - nema koagulacije, +/- slaba koagulacija, + umjerena koagulacija, ++ dobra koagulacija, +++ odlična koagulacija

**Tablica 14.** Koagulacija različitih sojeva bakterija (D6, D12, D13 i ZG7-10) mliječne kiseline nakon 24-satnog i 48-satnog uzgoja u obranom mlijeku, te u obranom mlijeku s dodatkom različitih koncentracija natrijeva-klorida (2 %, 4 % NaCl i 6 % NaCl)

	<b>vrijeme uzgoja</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>
<b><i>L. brevis</i> D6</b>	obrano mlijeko	-	+++
	2 % NaCl	-	+++
	4 % NaCl	-	-
	6 % NaCl	-	-
<b><i>L. fermentum</i> D12</b>	obrano ml.	+++	+
	2 % NaCl	-	++
	4 % NaCl	-	-
	6 % NaCl	-	-
<b><i>L. plantarum</i> D13</b>	obrano ml.	+++	++
	2 % NaCl	-	+
	4 % NaCl	-	-
	6 % NaCl	-	-
<b><i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ZG7-10</b>	obrano ml.	+++	+++
	2 % NaCl	-	-
	4 % NaCl	-	-
	6 % NaCl	-	-

Rezultati: - nema koagulacije, + umjerena koagulacija, ++ dobra koagulacija, +++ odlična koagulacija

Pretpostavljena proteinaza iz sojeva BMK oslobođena je pomoću  $\text{CaCl}_2$  te su dobiveni proteinski ekstrakti analizirani SDS-PAGE metodom. Proteini u sirovim ekstraktima proteinaza *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13, *L. brevis* SF9B i *L. brevis* ZG1-K7 vizualizirani su SDS-PAGE metodom i prikazani na slici 2. Kao što je očekivano, tamo gdje su intezivnije trake na SDS-PAGE gelu prisutna je veća koncentracija proteina.



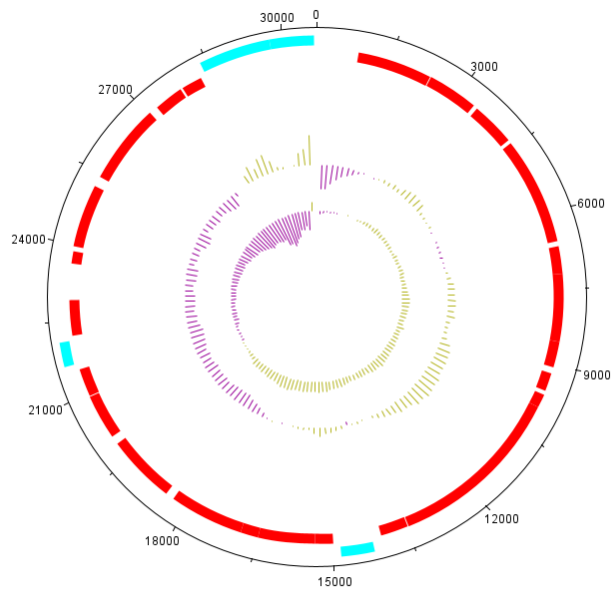
**Slika 2.** SDS-PAGE potencijalnih proteinaza izoliranih sojeva bakterija mliječne kiseline *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13, *Lc. lactis* ZGZA7-10, *Lc. lactis* ZGBP5-32, *L. brevis* SF9B i *L. brevis* ZG1-K7, iz uzoraka A) taloga proteina, B) supernatanta ekstrakta proteina i C) supernatanta ekstrakta proteina nakon ultrafiltracije

Postupak ekstrakcije nije primjenjiv za detekciju proteina iz *Lc. lactis* budući da proteinske vrpce nisu otkrivene niti u uzorku peleta niti u supernatantu proteinskih ekstrakta (slika 2). Proteinski ekstrakti *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12 i *L. plantarum* D13 sadržavali su proteine različitih molekularnih masa izolirane iz peleta ili supernatanta (slika 2A i 2B) pa je potrebna optimizacija protokola s ciljem uklanjanja nečistoća. Kako bi se to moglo postići, proteini su pročišćeni ultrafiltracijskom membranom s graničnom vrijednosti od 100 kDa. Ultrafiltracijom je uklonjen

veći dio kontaminanata, a djelomično pročišćen proteinski ekstrakt na SDS-PAGE gelu pokazao je prisutne pojedinačne proteinske vrpce (slika 2C). Iako je grupa proteina detektirana pomoću SDS-PAGE, prisutnu navodnu proteinazu tek treba definirati. Daljnja optimizacija postupka uključivala bi uvođenje različite uvjete ionske jakosti i obradu s različitim koncentracijama NaCl (Villegas i sur., 2015). Veći prinosi proteinaze mogli bi se postići optimizacijom sastava medija za rast sojeva. Dokazano je da je ekspresija gena proteolitičkog sustava *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 značajno niža nakon dodatka hidrolizata kazeina u kemijski definiranu podlogu. Identificirali su proteinsku vrpcu približne molekularne mase 190 kDa što odgovara proteinazi CRL 581 soja. Nakon uzgoja stanica u MRS podlozi i kemijski definiranoj podlozi dopunjenoj peptidima, proteinaza PrtL nije detektirana što pridaje na važnosti sastava medija (Brown i sur., 2017).

Provođenjem PCR reakcije sa specifičnim početnicama, prema Strahinić i sur. (2013), detektirani su geni koji kodiraju za enzime koji sudjeluju u proteolitičkoj aktivnosti različitih sojeva bakterija mliječne kiseline. Rezultati gel elektroforeze potvrdili su da je PCR reakcija uspješno provedena jer su vidljive vrpce kod svih analiziranih spojeva. U negativnoj kontroli nije vidljiva vrpca što upućuje na to da dobivene vrpce nisu rezultat dimerizacije početnica. Na gelu dobivena je očekivana veličina PCR produkta veličine oko 685 pb, što dovodi do zaključka da je intragenska regija prtP/prtM odgovorna za ekspresiju proteaza prisutna.

Daljnjim istraživanjima mogla bi se utvrditi uloga enzima u sintezi bioaktivnih peptida, primjerice analizom masenom spektroskopijom otpuštenih peptida u siru. Procjeni kapaciteta biosinteze mogućih biopetida, može doprinijeti *in silico* genomska analiza. Soj ZGZA7-20 potpuno je sekvencioniran u istraživanjima Laboratorija (Novak i sur., 2022), te je funkcionalnom anotacijom detektiran set proteinaza i odgovarajućih transportnih protein za koje se pretpostavlja da su dio proteolitičkog sustava, a na slici 3 je prikazan genomski atlas koji omogućuje uvid u osnovne genomske karakteristike ovog soja.



**Slika 3.** Cirkularna mapa ZGZA7-10 pseudokromosoma izrađena pomoću DNAPlotter programa

Također, razvijaju se i metode za ekstrakciju bioaktivnih peptida iz komine nakon fermentacije. Ograničenost selektivnog taloženja s trikloroocetnom kiselinom, etanolom i amonijevim sulfatom može se prevladati korištenjem proteolitičkih BMK koje proizvode mliječnu kiselinu koja zakiseljuje kominu i tako doprinosi taloženju proteina (Raveschot i sur., 2018).

Konačno, upotreba proteolitičkih sojeva *Lactococcus* i *Lactobacillus* kao funkcionalnih starter kultura nudi ekonomski isplativ, industrijski primjenjiv pristup za oporavak bioaktivnih peptida dobivenih iz mlijeka. Karakterizacija proteolitičkog sustava probiotičkih bakterija doprinosi pozitivnom utjecaju ovih bakterija na zdravstveni učinak njihovih biopeptida.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Iako su SDS-PAGE analizom proteinskih ekstrakata sojeva *Lactobacillus* vizualizirane intenzivne proteinske vrpce SDS-PAGE analizom postupak se mora optimizirati kako bi se dodatno purificirale proteinaze.
2. Karakterizacija kazeinolitčkih bakterija mliječne kiseline u ovom radu može pridonijeti odabiru proteolitčkih sojeva kao mliječnih starter kultura.



## 7. LITERATURA

Banić M (2021) Potencijalne terapijske biomolekule probiotičkih sojeva autohtonih bakterija mliječne kiseline (disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

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

Bindels L, Delzenne N, Cani PD, Walter J (2015) Opinion: Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 303-310 doi:10.1038/nrgastro.2015.47

Bourebaba Y, Marycz K, Mularczyk M, Bourebaba L (2022) Postbiotics as potential new therapeutic agents for metabolic disorders management. *Biomed Pharmacother* **153** 113138. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113138>

Božanić R, Tratnik LJ (1999) Prebiotički supstrati i bakterije mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **49**, 27-46. <https://hrcak.srce.hr/93340>. Pristupljeno 9. srpnja 2022.

Brown L, Villegas JM, Elean M, Fadda S, Mozzi F, Saavedra, L, i sur. (2017) YebC, a putative transcriptional factor involved in the regulation of the proteolytic system of *Lactobacillus*. *Scientific Reports* **7**, 8579. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09124-1>

Castro-González JM, Castro P, Sandoval H, Castro-Sandoval D (2019) Probiotic lactobacilli precautions. *Front Microbiol* **10**, 375. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00375>

Chang CJ, Lin TL, Tsai YL, Wu TR, Lai WF, Lu CC, Lai HC (2019) Next generation probiotics in disease amelioration. *J Food Drug Anal* **27** 615-622. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.011>

Collins FL, Rios-Arce ND, Schepper JD, Parameswaran N, McCabe LR (2017) The Potential of Probiotics as a Therapy for Osteoporosis. *Microbiol Spectr* **5**. doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0015-2016.

Cunningham M, Azcrate-Peril MA, Barnard A, Benoit V, Grimaldi R, Guyonnet D, Holscher HD i sur. (2021) Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends Microbiol* **29**, 667-685 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>.

Cunningham M, Vinderola G, Charalampopoulos D, Lebeer S, Sanders ME, Grimaldi R (2021) Applying probiotics and prebiotics in new delivery formats – is the clinical evidence transferable? *Trends Food Sci Technol* **112** 495-506 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.009>

Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, i sur. (2014) In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®), *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYN BIO(®) against pathogens. *J Appl Microbiol* **117**, 518–527.

Dandoy D, Fremaux C, de Frahan MH, Horvath P, Boyaval P, Hols P, i sur. (2011) The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb Cell Fact* **10** doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S21

FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations/WHO - World Health Organization, London, Ontario. [www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf). Pristupljeno 9. srpnja 2022.

Fox PF (1989) Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening. *J Dairy Sci* **6** 1379-1400. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8)

Gao X, Zhao J, Zhang H, Chen W, Zhai Q (2022) Modulation of gut health using probiotics: the role of probiotic effector molecules. *Future Food: J Food Agric Soc* **1** 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.011>.

Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125** 1401-1412 <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ i sur. (2017) *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Hauser G, Benjak Horvat I, Zelić M, Prusac M, Velkovski Škopić O (2020) Probiotici i prebiotici – koncept. *Medicus* **29**, 95-114. <https://hrcak.srce.hr/232206> Pristupljeno 10. srpnja 2022.

Hebert EM, De Giori GS, Raya RR (2001) Isolation and characterization of a slowly milk-coagulating variant of *Lactobacillus helveticus* deficient in purine biosynthesis. *Appl Environ Microb* **67**, 1846-1850. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1846-1850.2001>

Jensen H, Roos S, Jonsson H, Rud I, Grimmer S, van Pijkeren JP, Britton RA (2014) Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiology (Reading, England)* **160**, 671–681.

Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *J Food Drug Anal* **26**, 927-939. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>

Khalesi S, Sun J, Buys N, Jayasinghe R (2014) Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension* **64**, 897-903

Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek KI, Kot AM (2021) Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules* **26**, 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>

Kimminau EA, Karnezos TP, Berghaus RD, Jones MK, Baxter JA, Hofacre CL (2021) Combination of probiotic and prebiotic impacts Salmonella Enteritidis infection in layer hens. *J Appl Poult Res* **30**, <https://doi.org/10.1016/j.japr.2021.100200>.

Konturek PC, Harsch IA, Konturek K, Schink M, Zopf Y (2018) Gut-liver axis: How intestinal bacteria affect the liver. *MMW Fortschr. Med* **160**, 11-15. <https://doi.org/10.1007/s15006-018-1051-6>

Korkeala H, Alanko T, Tiusanen T (1992) Effect of Sodium Nitrite and Sodium Chloride on Growth of Lactic Acid Bacteria. *Acta Vet Scand* **33**, 27–32. <https://doi.org/10.1186/BF03546933>

Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**, 981–987.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Liao SF, Nyachoti M (2017) Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr* **3** 331-343. doi: 10.1016/j.aninu.2017.06.007

Lizardo MVP, Tavaría FK (2022) Chapter 19 - Probiotics and skin health. *Advanced Food and Health Applications*. Academic Press, Porto. Str. 389-405.

Martin R, Langella P (2019) Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. *Front Microbiol* **10**, 1047. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01047>

Mingfei Y, Lingling QC, Yanmeng L, Baohong W, Bjorn B, Lanjuan L (2021) An update on the Efficacy and Functionality of Probiotics for the Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Engineering* **7**, 679-686.

Novak J, Leboš Pavunc A, Butorac K, Banić M, Čuljak N, Rak H i sur. (2022) Caseinolytic proteases of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains isolated from fermented dairy products. *Mljekarstvo* **72**, 11-21. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2022.0102>

Paturi G, Butts CA, Bentley-Hewitt KL, Hedderly D, Stoklosinski H, Ansell J (2015) Differential effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on gut microbiota and gene expression in rats. *J Funct Foods* **13** 204-213

Raveschot C, Cudennec B, Coutte F, Flahaut C, Frémont M, Drider D, i sur. (2018) Production of bioactive peptides by *Lactobacillus* species: from gene to application. *Front Microbiol* **9**, 2354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354>

Rouanet A, Bolca S, Bru A, Claes I, Cvejic H, Girgis H, i sur. (2020) Live Biotherapeutic Products, A Road Map for Safety Assessment. *Front Med* **7** <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00237>

Santo MLPE, Lisboa C, Alves FG (2005) Effect of different levels of sodium chloride and glucose on fermentation of sardines (*Sardinella brasiliensis*) by *Lactobacillus sakei* 2a. *Braz arch biol technol* **48**, 42-52.

Savio C, Mugo-Kamiri L, Upfold JK (2022) Bugs in Bugs: The Role of Probiotics and Prebiotics in Maintenance of Health in Mass-Reared Insects. *Insects* **13**, 376. doi: 10.3390/insects13040376.

Schiffrin EJ, Blum S (2001) Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. *Curr Opin Biotechnol* **12**, 499-502. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00253-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00253-6)

Shi LH, Balakrishnan K, Thiagarajah K, Ismaliza MI, Yin OS (2016) Beneficial Properties of Probiotics. *Trop Life Sci Res* **27**, 73-90. doi: 10.21315/tlsr2016.27.2.6

Simons A, Alhanout K, Duval RE (2020) Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms* **8**, 639.

Smit G, Smit BA, Engels WJM (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev* **29** 591-610. doi: 10.1016/j.femsre.2005.04.002

Strahinic I, Lozo J, Terzic-Vidojevic A, Fira D, Kojic M, Golic M, i sur. (2013) Technological and probiotic potential of BGRA43 a natural isolate of *Lactobacillus helveticus*. *Front Microbiol* **4** doi:10.3389/fmicb.2013.00002

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

Šušković J, Kos B, Goreta J, Matošić S (2001) Role of lactic acid bacteria and bifi dobacteria in synbiotic effect. *Food Technol Biotechnol* **39**, 227-235.

Topisirović LJ, Kojić M, Fira Đ, Golić N, Strahinić I, Lozo J (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* **112**, 230-235.

Torp AM, Bahl MI, Boisen A, Licht TR (2022) Optimizing oral delivery of next generation probiotics. *Trends Food Sci Technol* **119**, 101-109.

Uroić K, Novak J, Hynönen U, Pietilä TE, Leboš Pavunc A, Kant R, i sur. (2016) The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT - Food Sci Technol* **69**, 625-632. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.013>

Villegas, JM, Brown L, Savoy de Giori G, Hebert EM (2015) Characterization of the mature cell surface proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *J Appl Microbiol* **99**, 4277-4286.

Walton GE, Gibson GR, Hunter KA (2021) Mechanisms linking the human gut microbiome to prophylactic and treatment strategies for COVID-19. *Br J Nutr* **126**, 219-227.

Zannini E, Waters DM, Coffey A, Arendt EK (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 1121-1135. doi: 10.1007/s00253-015-7172-2

Zhu CS, Grandhi R, Patterson TT, Nicholson SE (2018) A review of traumatic brain injury and the gut microbiome: Insights into novel mechanisms of secondary brain injury and promising targets for neuroprotection. *Brain Sci* **8**, 113. <https://doi.org/10.3390/brainsci8060113>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Ana-Marija Iveljić izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



---

Vlastoručni potpis