

In vitro adhezija bakterija mliječne kiseline iz majčinog mlijeka

Ribić, Valentina

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:159:327279>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Valentina Ribić

***IN VITRO* ADHEZIJA BAKTERIJA
MLIJEČNE KISELINE IZ
MAJČINOŠ MLIJEKA**

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 doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc te uz pomoć dr. sc. Katarine Butorac i Nine Čuljak, mag. ing. biotechn.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta *Hrvatske zaklade za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“* (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

Želim zahvaliti svojoj mentorici, doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc na mentorstvu, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Također, zahvaljujem dr. sc. Katarini Butorac i Nini Čuljak, mag. ing. biotechn. na velikoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada i na brojnim korisnim savjetima.

Hvala i mojoj obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i strpljenju tijekom studiranja.

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: Bioproceno inženjerstvo

IN VITRO ADHEZIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ MAJČINOG MLIJEKA

Valentina Ribić, univ. bacc. ing. biotechn.
0058210637

Sažetak: Cilj ovog rada bio je *in vitro* ispitati adhezijska i probiotička svojstva sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka. Ispitana su svojstva sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 kroz eksperimente adhezije na Caco-2 stanice i na proteine ekstracelularnog matriksa te ispitivanjem preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT) pri čemu je istovremeno ispitana i uloga S-proteina u adheziji i zaštiti od nepovoljnih uvjeta. Također, eksperimentom kompetitivne ekskluzije ispitano je djelovanje sojeva *L. brevis* MB13 i MB20, *Limosilactobacillus fermentum* MC1 te *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 i KR19 prema patogenoj vrsti *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1. Provedenim eksperimentima dokazano je da sojevi *L. brevis* MB13 i MB20 posjeduju adhezijska svojstva i mogu preživjeti nepovoljne uvjete GIT-a, međutim za to je odgovoran S-sloj proteina čije uklanjanje uzrokuje značajno smanjenje adhezije te nemogućnost preživljavanja u GIT-u. Također, kompetitivnom ekskluzijom dokazano je da svi ispitani sojevi imaju antimikrobno djelovanje prema *S. enterica* serovar Typhimurium FP1.

Ključne riječi: probiotičke bakterije, majčino mlijeko, adhezijska svojstva, S-sloj proteina

Rad sadrži: 50 stranica, 15 slika, 2 tablice, 88 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac; Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (mentor)
3. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (član)
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (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 Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

IN VITRO ADHESION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM HUMAN BREAST MILK

Valentina Ribić, univ. bacc. ing. biotechn.
0058210637

Abstract: The aim of this work was to test *in vitro* the adhesion and probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from human breast milk. The properties of *Levilactobacillus brevis* strains MB13 and MB20 were tested through experiments of adhesion on Caco-2 cells and extracellular matrix proteins and survival tests in simulated conditions of the gastrointestinal tract (GIT), at the same time the role of S-protein in adhesion and protection against adverse conditions was tested. Also, the activity of *L. brevis* MB13 and MB20, *Limosilactobacillus fermentum* MC1, *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 and KR19 strains against the pathogenic species *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 was tested using a competitive exclusion experiment. The conducted experiments proved that *L. brevis* strains MB13 and MB20 possess adhesive properties and can survive unfavorable conditions of the GIT, however, the S-layer protein is responsible for this, the removal of which causes a significant reduction in adhesion and the inability to survive in the GIT. Also, competitive exclusion proved that all tested strains have antimicrobial activity against *S. enterica* serovar Typhimurium FP1.

Keywords: *probiotic bacteria, human breast milk, adhesion properties, S-layer*

Thesis contains: 50 pages, 15 figures, 2 tables, 88 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: Andreja Leboš Pavunc, PhD

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD; Nina Čuljak, MSc

Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor (president)
2. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Jasna Mrvčić, PhD, Full professor (member)
4. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 23rd, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	2
2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE KAO PROBIOTICI	4
2.2.1. Probiotici	4
2.2.2. Mehanizmi djelovanja probiotika	4
2.3. MAJČINO MLIJEKO KAO IZVOR BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	7
2.3.1. Sastav majčinog mlijeka	8
2.3.2. Probiotička mikroflora majčinog mlijeka	9
2.3.3. Funkcije probiotičkih bakterija iz majčinog mlijeka	10
2.4. GASTROINTESTINALNI TRAKT	11
2.4.1. Mikrobiota gastrointestinalnog trakta	11
2.4.2. Proteini ekstracelularnog matriksa	11
2.5. MEHANIZMI ADHEZIJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE NA EPITELNE STANICE CRIJEVA	12
2.5.1. Proteini koji se vežu na sluznicu	12
2.5.2. Lipoteihoična kiselina	12
2.5.3. Flagele (bičevi) i pili (dlačice)	12
2.5.4. Ekstracelularni polisaharidi	13
2.5.5. S-sloj	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Mikroorganizmi	17
3.1.2. Stanične linije	17
3.1.3. Hranjive podloge	17
3.1.4. Kemikalije	18
3.1.5. Aparatura i pribor	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	20
3.2.2. Adhezija bakterijskih stanica na Caco-2 stanice	20
3.2.3. Adhezija bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa (ECM-a)	21
3.2.4. Preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	23
3.2.5. Kompetitivna ekskluzija patogene bakterije <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium FP1 sa sojevima BMK	24
3.2.6. Vizualizacija adhezije bakterija mliječne kiseline na Caco-2 stanični monosloj	25
3.2.7. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom	26

3.2.8. Obrada rezultata	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. ADHEZIJA BAKTERIJSKIH STANICA	27
4.2. PREŽIVLJAVANJE U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA.....	30
4.3. KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA PATOGENA <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium s BMK.....	32
4.4. VIZUALIZACIJA ADHEZIJE BMK NA CACO-2 STANIČNI MONOSLOJ.....	35
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) veoma su važni mikroorganizmi koji sudjeluju u očuvanju zdravlja čovjeka, a isto tako imaju i veliku industrijsku važnost zbog svoje sposobnosti fermentacije ugljikohidrata do mliječne kiseline. Velikom broju BMK dokazana su probiotička svojstva, odnosno dokazano je da povoljno djeluju na zdravlje čovjeka na način da djeluju na bolesti srca, snižavaju razinu kolesterola u krvi, imaju antimikrobno, antioksidacijsko i antikancerogeno djelovanje, a također povoljno utječu na zdravlje gastrointestinalnog (GI) i urogenitalnog trakta te stimuliraju imunološki sustav čovjeka. Također, kod BMK izuzetno je bitna njihova sposobnost preživljavanja i adhezije u gastrointestinalnom traktu (GIT) kako bi mogle pozitivno djelovati na zdravlje domaćina (Kechagia i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio *in vitro* ispitati adhezijska svojstva određenih sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka. Adhezijska svojstva ispitana su pomoću nekoliko različitih metoda. Prva korištena metoda je bila adhezija odabranih sojeva BMK na Caco-2 stanice (stanice raka debelog crijeva) pri čemu su Caco-2 stanice zapravo modelne stanice koje predstavljaju same stanice debelog crijeva iz čovjeka. Adhezija na Caco-2 stanice proučavana je i direktnom vizualizacijom na fluorescencijskom mikroskopu. Druga metoda kojom su se ispitivala adhezijska svojstva je adhezija sojeva BMK na proteine ekstracelularnog matriksa: fibronektin, kolagen i laminin. Također je ispitano i preživljavanje odabranih sojeva BMK u simuliranim uvjetima GIT-a pri čemu su potrebni uvjeti postignuti pomoću simuliranog želučanog soka i simuliranog soka tankog crijeva. Uz adhezijska svojstva ispitano je i antimikrobno djelovanje odabranih sojeva prema patogenom mikroorganizmu *Salmonella enterica* serovar Typhimurium eksperimentom kompetitivne ekskluzije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su grupa bakterija koja obuhvaća rodove *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* i druge, međutim u mliječnim fermentiranim proizvodima najčešće se pronalaze navedeni rodovi (Mathur i sur., 2020). BMK su Gram-pozitivni, nesporogeni, nepatogeni i anaerobni ili fakultativno aerobni mikroorganizmi koji se mogu pronaći u raspadnutim biljnim i životinjskim tkivima, fekalijama te u različitim sirovinama, kao što su mlijeko, meso i brašno, koje se koriste za proizvodnju fermentirane hrane. Ovisno o produktima njihova metabolizma, BMK se mogu podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne mikroorganizme. Kod homofermentativnih BMK iz jedne molekule glukoze fermentacijom nastaju dvije molekule mliječne kiseline, dok heterofermentativne BMK, uz jednu molekulu mliječne kiseline, kao produkt fermentacije glukoze stvaraju još etanol i ugljikov dioksid.

BMK su jedna od najznačajnijih skupina bakterija koje se koriste za proizvodnju fermentirane i procesirane hrane kao što su jogurt, kefir, vrhnje, sir, maslac, ali i za dobivanje fermentiranih žitarica i mesa te napitaka od voća i povrća kao što je prikazano u tablici 1 (Gupta i sur., 2018). Fermentacijom nastaje mliječna kiselina koja snižava pH okoline te na taj način inhibira rast nepoželjnih i patogenih mikroorganizama čime se omogućava čuvanje i konzerviranje hrane. Postoje tri glavna metabolička puta odgovorna za razvoj okusa fermentirane hrane - glikoliza, lipoliza i proteoliza (Bintsis, 2018). Laktoza se razgrađuje glikolizom do piruvata koji se onda može prevesti do diacetila, acetoina, acetaldehida ili octene kiseline pri čemu su neki od ovih spojeva odgovorni za pojedine okuse hrane. BMK imaju malu ulogu u lipolizi, ali je zato proteoliza glavni mehanizam odgovoran za razvijanje pojedinih okusa fermentirane hrane. Razgradnja proteina djelovanjem renet enzima (enzima sirila) te proteinaze i peptidaze stanične stijenke daje male peptide i slobodne aminokiseline koje se mogu pretvoriti u alkohole, aldehide, estere i kiseline odgovorne za razvoj pojedinih okusa (Law, 1999).

BMK, osim što pridonose okusu, teksturi i nutritivnoj vrijednosti hrane te imaju biozaštitnu ulogu u sprječavanju kvarenja hrane, posjeduju i terapijske učinke te se stoga istražuju i koriste kao probiotičke kulture koje promiču zdravlje.

Tablica 1. Tipovi fermentirane hrane i napitaka koji se povezuju s BMK (prilagođeno prema Gupta i sur., 2018)

Fermentirani proizvodi	Različite vrste BMK
Mliječni proizvodi	
Maslac i mlaćenica	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Jogurt	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophiles</i>
Sladoled	<i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> i <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Fermentirano probiotičko mlijeko, skuta, Lassi	<i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i>
Kefir	<i>Lentilactobacillus kefir</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i>
Sirevi	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophiles</i>
Fermentirano povrće	
Krastavci	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Fermentirane masline	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Kiseli kupus	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Fermentirane žitarice	
Kiselo tijesto, Idli i Dosa	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Companilactobacillus farciminis</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus amylovorus</i> , <i>Limosilactobacillus reuteri</i> , <i>Limosilactobacillus pontis</i> , <i>Limosilactobacillus panis</i> , <i>Companilactobacillus alimentarius</i>
Alkoholni napitci	
Vino (malolaktična fermentacija)	<i>Oenococcus oeni</i>
Rižino vino	<i>Lactobacillus sakei</i>
Ostali proizvodi	
Sojino mlijeko	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium</i>
Riba	<i>Companilactobacillus alimentarius</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i>
Fermentirane kobasice	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Latilactobacillus curvatus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
Sok od rajčice, naranče i grejpa	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> , <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>

2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE KAO PROBIOTICI

2.2.1. Probiotici

Probiotici su živi mikroorganizmi koji se konzumiraju kao dio prehrane (izravno ili neizravno) pri čemu imaju blagotvoran učinak na zdravlje domaćina ometajući rast štetnih mikroorganizama i poboljšavaju ravnotežu mikrobiote u GI sustavu domaćina (ljudi i životinja) (Gupta i sur., 2018). BMK su najčešće korištene bakterije s probiotičkim svojstvima koje se koriste u mnogim dodacima prehrani te u funkcionalnoj hrani i napitcima. Prema Plaza-Diaz i sur. (2019) najvažnija svojstva probiotika su humano podrijetlo, sigurnost (GRAS status – engl. *Generally Recognized as Safe*), nepatogenost i netoksičnost te sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uvjetima GIT-a što obuhvaća nisku pH vrijednost, otpornost prema želučanim enzimima i žučnim solima. Također, probiotici trebaju imati antagonističko djelovanje prema patogenim mikroorganizmima te stimulirati imunološki sustav domaćina i općenito pozitivno utjecati na zdravlje domaćina. I na kraju, da bi se određeni mikroorganizam mogao koristiti kao probiotik tijekom tehnološkog procesa proizvodnje probiotičkog pripravka ne smije doći do značajnih gubitaka aktivnosti i broja živih stanica te smanjenja brzine njegovog rasta.

2.2.2. Mehanizmi djelovanja probiotika

Prema Bermudez-Brito i sur. (2012) postoji nekoliko različitih mehanizama djelovanja probiotika te su oni navedeni u nastavku i prikazani na slici 1.

Prvi od mehanizama djelovanja probiotika je jačanje crijevne epitelne barijere. Crijevna barijera glavni je obrambeni mehanizam organizma koji se koristi za održavanje integriteta epitela i zaštitu organizma od okoline. Zaštitni dio crijevne barijere čine mukozni sloj, antimikrobni peptidi, sekretorni IgA (imunoglobulini A) i adhezijski kompleks epitelnog spoja (Ohland i Macnaughton, 2010). U trenutku kad dođe do oštećenja crijevne barijere i poremećaja njezine funkcije te bakterijski i prehrambeni antigeni uspiju doći do submukoze, izaziva se imunološki odgovor koji rezultira crijevnim poremećajima kao što je razvoj upalne bolesti crijeva (Hooper i sur., 2001). Međutim, konzumiranje probiotika može poboljšati integritet crijevne barijere na nekoliko načina koji obuhvaćaju izravno djelovanje na epitel (npr. povećanje ekspresije mucina u vrčastim stanicama (engl. *goblet cells*)), modulaciju imunološkog sustava, a može imati i izravne učinke na komenzalne i patogene bakterije (npr. antimikrobni peptidi i kompeticija za prijanjanje) (van Zyl i sur., 2020).

Drugi mehanizam djelovanja je kolonizacija probiotičkih bakterija u GIT-u čime se one vežu na stijenku crijeva domaćina i stvaraju čvrstu vezu koja im naknadno omogućava

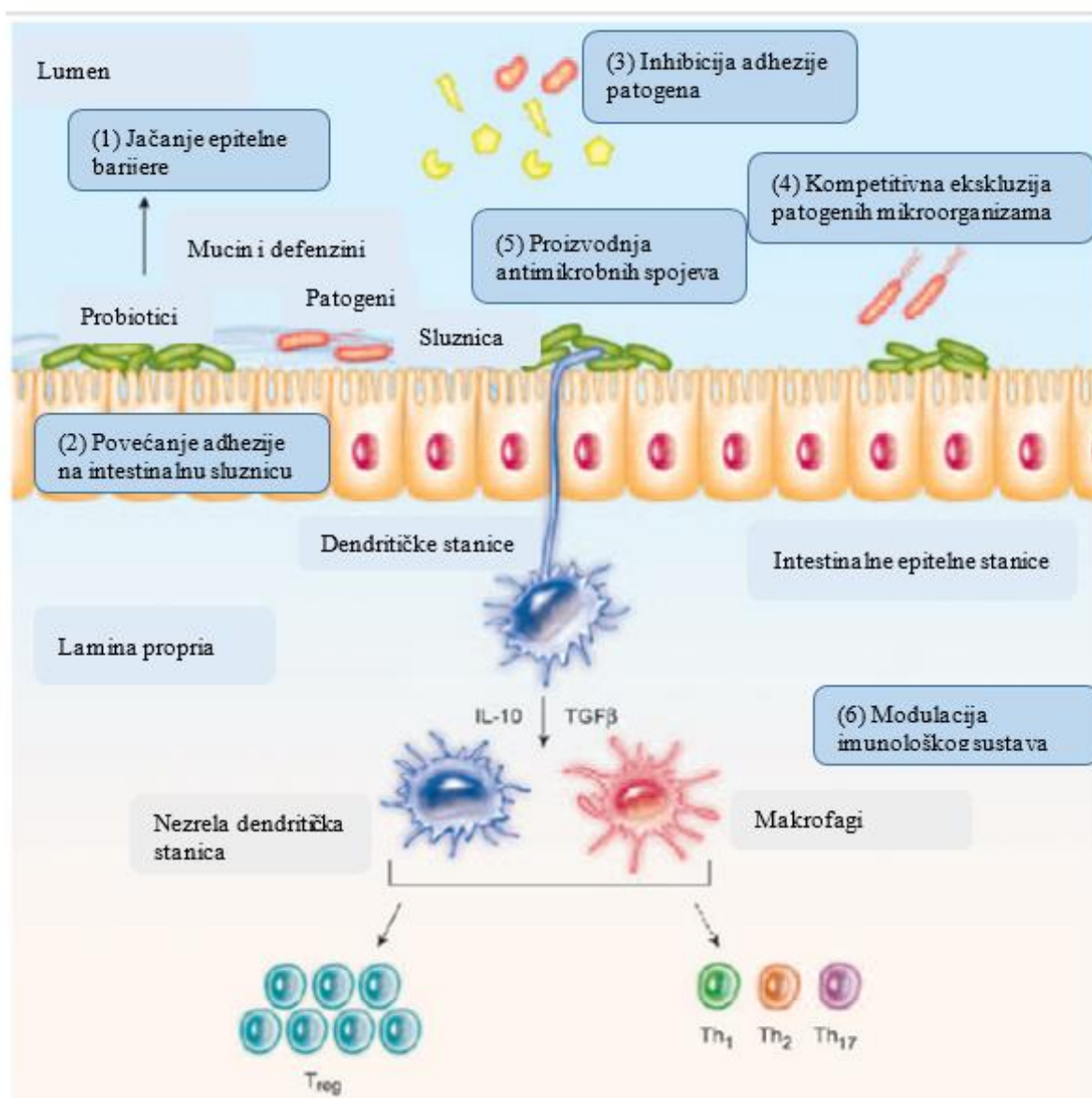
modulaciju imunološkog sustava, a istovremeno onemogućava vezanje patogenim vrstama (van Zyl i sur., 2020). BMK sadrže različite površinske karakteristike koje su uključene u njihovu interakciju s crijevnim epitelnim stanicama i sluznicom. Crijevne epitelne stanice luče mucin, složenu smjesu glikoproteina koja je glavna komponenta sluznice, i na taj način sprječavaju adheziju patogenih bakterija (Collado i sur., 2005). Također, u mukoznom gelu prisutni su i lipidi, slobodni proteini, imunoglobulini i soli. Ova specifična interakcija između bakterijskih stanica i crijevnih epitelnih stanica ukazuje na povezanost između površinskih proteina probiotičkih bakterija i kompetitivnog isključivanja patogenih bakterija (Ouwehand i sur., 2002).

Treći mehanizam djelovanja je kompetitivna ekskluzija patogenih mikroorganizama pri čemu se probiotičke vrste vežu na intestinalne stanice i na taj način onemogućavaju vezanje i kolonizaciju patogenih vrsta (Plaza-Diaz i sur., 2019). Mehanizmi koje jedna vrsta bakterija koristi za isključivanje, odnosno smanjenje rasta druge vrste, su različiti, a uključuju sljedeće mehanizme: stvaranje neprijateljske mikroekologije, eliminaciju dostupnih bakterijskih receptorskih mjesta, proizvodnju i izlučivanje antimikrobnih tvari i selektivnih metabolita te kompetitivno iscrpljivanje esencijalnih nutrijenata (Rolfe, 1991).

Četvrti mehanizam djelovanja je produkcija antimikrobnih spojeva. Probiotički sojevi BMK fermentiraju ugljikohidrate u GIT-u pri čemu nastaju metaboliti kao što su octena, mravlja, jantarna i mliječna kiselina. Ovi spojevi čine crijevnu okolinu kiselom i na taj način inhibiraju rast bakterijskih patogena. Organske kiseline, većinom mliječna i octena kiselina imaju veliki inhibicijski učinak na Gram-negativne bakterije te su one najzaslužnije za djelovanje probiotičkih vrsta na patogene bakterije (Dicks i Botes, 2010). Također, nedisocirani oblik mliječne kiseline djeluje kao permeabilizator vanjske stanične membrane Gram-negativne bakterije, a zatim disocira unutar bakterijske citoplazme nakon ulaska u bakteriju (Alakomi i sur., 2000). Osim organskih kiselina, neke BMK proizvode i bakteriocine. Bakteriocini su multifunkcionalne, ribosomski proizvedene proteinske tvari s antimikrobnim djelovanjem u određenim koncentracijama (Chikindas i sur., 2018). Drugim riječima, bakteriocini su proteinski toksini koje proizvode bakterije, a koji inhibiraju rast sličnih bakterijskih vrsta u odnosu na bakteriju producenta (Bemena i sur., 2014). Produkcija bakteriocina ključni je mehanizam akcije koji se koristi za inhibiciju patogenih mikroorganizama u GIT-u. Bakteriocini mogu imati bakteriostatski ili izravni bakteriocidni učinak na patogene čime ograničavaju sposobnost patogena da kolonizira crijeva. Antimikrobne aktivnosti bakteriocina omogućavaju probiotičkim sojevima koji ih proizvode da steknu konkurentsku prednost u

složenom gastrointestinalnom okruženju (O'Shea i sur., 2012). Uz organske kiseline i bakteriocine, vodikov peroksid (H_2O_2) je također jedan od važnijih antimikrobnih mehanizama protiv patogena. Vodikov peroksid može uzrokovati smanjenu virulentnost patogena, smanjenu invaziju patogena u epitelne stanice ili smrt crijevnih patogena nakon epitelne intracelularne difuzije koja mijenja transkripciju gena i prijenos signala (Knaus i sur., 2017). Siderofori su još jedan antimikrobni spoj koji proizvode BMK. Naime, željezo je esencijalni mikronutrijent koji igra središnju ulogu u metabolizmu i proliferaciji većine crijevnih mikroorganizama, uključujući komenzalne bakterije i crijevne patogene (Turroni i sur., 2014). Siderofori su organski spojevi male molekulske mase i visokog afiniteta za kelatiranje željeza koje proizvode mikroorganizmi kao što su bakterije i gljivice (Ahmed i Holmström, 2014). Ovi spojevi inhibiraju rast, proliferaciju i postojanost konkurentskih mikroorganizama oduzimajući im željezo. Pritom bakterije koje proizvode siderofore vežu slobodno željezo dostupno u svom okruženju koje je bitno za druge mikroorganizme te im ga na taj način oduzimaju. Biosurfaktanti koje proizvode određeni sojevi BMK također interferiraju s patogenim bakterijama. Biosurfaktanti su skupina spojeva s površinskim i emulgirajućim djelovanjem koji se koriste u mnogim različitim biomedicinskim primjenama (Markande i sur., 2021). Izolirano je nekoliko sojeva BMK koji proizvode biosurfaktante, ili vezane za stanice ili ih izlučuju, s antibakterijskim, antivirusnim i antifungalnim svojstvima. Biosurfaktanti uzrokuju permeabilizaciju stanica koje narušavaju ili liziraju strukturu fizičke stanične membrane (Duarte i sur., 2014).

Probiotici također stimuliraju imunološki sustav domaćina na način da proizvode molekule s imunomodulatornom i protuupalnom funkcijom koje zatim mogu utjecati na imunološke stanice i izazvati imunološki odgovor (D'Amelio i Sassi, 2018). Plaza-Diaz i sur. (2019) navode enzimsku aktivnost probiotičkih vrsta kao jedan od važnijih mehanizama djelovanja probiotika. Naime, probiotičke bakterijske vrste povećavaju aktivnost enzima koji imaju poželjna djelovanja, a s druge strane smanjuju aktivnost enzima koji daju toksične produkte te na taj način štite zdravlje domaćina. Probiotici također imaju značajnu ulogu u stimulaciji i proizvodnji antitijela u crijevima, posebno imunoglobulina A (IgA) (Yan i Polk, 2011). Antitijela koja se oslobađaju u lumenu crijeva mogu inhibirati prijanjanje patogena na crijevne epitelne stanice interferirajući s adhezivnim receptorima stanica na membrani patogena.



Slika 1. Mehanizmi djelovanja probiotika (prilagođeno prema Bermudez-Brito i sur., 2012)

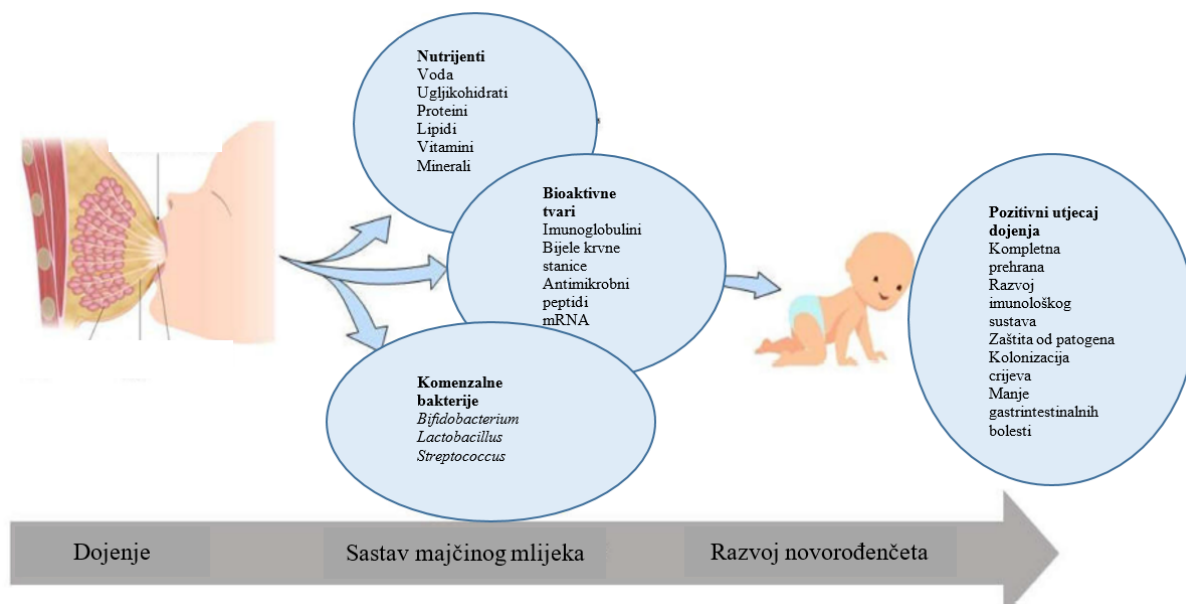
2.3. MAJČINO MLIJEKO KAO IZVOR BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Ljudsko majčino mlijeko osigurava ključne hranjive tvari i bioaktivne spojeve koji podržavaju rast i razvoj imuniteta tijekom djetinjstva (Lyons i sur., 2020), ali je i glavna odrednica cjelokupnog zdravlja pojedinca tijekom cijelog života. Američka akademija za pedijatriju (AAP) preporučuje da se dojenčad treba dojiti prvih šest mjeseci života uz nastavak dojenja tijekom proširenja prehrane barem do jedne godine i više (AAP, 2012). U istraživanjima koja su proveli Kramer i sur. (2003) te Ladomenou i sur. (2010) dokazano je da dojena djeca imaju puno zdraviju i kvalitetniju mikrobiotu crijeva te smanjenu učestalost razvoja određenih bolesti. Određene studije dokazuju trenutačnu ulogu dojenja u sprječavanju dijareje,

nekrotizirajućeg enterokolitisa (oštećena i upaljena površina crijeva), upale srednjeg uha i respiratornih infekcija te dugoročno djelovanje kojim se smanjuje mogućnost razvoja leukemije, malokluzije, upalne bolesti crijeva, pothranjenosti, pretilosti i dijabetesa (Victora i sur., 2016; Klement i sur., 2004). Varijacije u sastojcima mlijeka i bioaktivnim spojevima kao rezultat demografskih i genetskih čimbenika, životnog stila i izloženosti majke mogu imati pozitivne i negativne učinke na zdravlje dojenčadi. U novije vrijeme upravo se majčino mlijeko koristi kao izvor novih probiotičkih sojeva (Rajoka i sur., 2017).

2.3.1. Sastav majčinog mlijeka

Kao što je već spomenuto, majčino mlijeko sastoji se od odgovarajuće količine hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva koji osiguravaju potpunu prehranu za novorođenče u razvoju, kao i korisnih bakterije koje štite osjetljivi imunološki sustav novorođenčeta od bolesti (Lyons i sur., 2020). Osim esencijalnih nutrijenata koji obuhvaćaju proteine, masti, ugljikohidrate, vitamine i minerale, majčino mlijeko također sadrži i širok raspon imunoloških stanica i bioaktivnih komponenata koje djeluju protuupalno i imaju probiotička svojstva. To uključuje antimikrobne peptide kao što su bakteriocini, laktoferin, lizozim, laktadherin, zatim citokine, kemokine, imunoglobuline, faktore rasta, oligosaharide, glikokonjugate i masne kiseline. Međutim, osim esencijalnih nutrijenata te bioaktivnih spojeva, ljudsko majčino mlijeko sadrži mnogo različitih vrsta bakterija. U prošlosti su se bakterije izolirane iz majčinog mlijeka smatrale kontaminantima koji potječu s kože majke i usne šupljine djeteta ili su posljedica neispravnog rukovanja ili skladištenja majčinog mlijeka (Gavin i Ostovar, 1977). Međutim, danas je široko prihvaćeno da majčino mlijeko ima svoju jedinstvenu mikrobiotu koja se sastoji od velikog broja različitih vrsta komenzalnih bakterija. Majčino mlijeko ima važnu ulogu u inokulaciji crijeva dojenčadi bakterijama nakon rođenja. Shvaćanje da mikrobiota ljudskog mlijeka pridonosi zdravlju dojenčadi rezultiralo je brojnim istraživanjima kako bi se razjasnili točni mehanizmi djelovanja, a koji uključuju proizvodnju antimikrobnih spojeva, sprječavanje adhezije patogenih bakterija na crijevni epitel i povećanje proizvodnje crijevnog mucina (Rajoka i sur., 2017; Jara i sur., 2011). Iz svega navedenog, može se zaključiti da dojenje novorođenom djetetu osigurava zaštitu od patogena, poboljšava njegov imunološki razvoj, osigurava potpunu prehranu i promiče kolonizaciju crijeva te smanjuje broj slučajeva GI bolesti. Na slici 2 prikazan je sastav majčinog mlijeka i pozitivni učinci dojenja.



Slika 2. Sastav majčinog mlijeka i pozitivni učinci dojenja na novorođenče (prilagođeno prema Lyons i sur., 2020)

Sastav majčinog mlijeka mijenja se tijekom perioda laktacije ovisno o nutritivnim potrebama djeteta. Kolostrum je prvo mlijeko koje se pojavljuje nakon porođaja, odnosno to je mlijeko iz prve faze laktacije. Kolostrum sadrži visoke koncentracije imunoglobulina, posebice imunoglobulina A koji je bitan za razvoj imunološkog sustava novorođenčeta (Hurley i Theil, 2011). Također, kolostrum sadrži visoke udjele leukocita, faktora rasta te više proteina, a manje masti i laktoze u odnosu na mlijeko iz kasnijih perioda laktacije. Kolostrum je bogat i mikroelementima i makroelementima te vitaminima topljivima u masti (Łubiech i Twarużek, 2020). Iduću fazu laktacije karakterizira prijelazno mlijeko, a 4 do 6 tjedana nakon poroda mlijeko smatra zrelim te više nema značajnijih promjena u njegovom sastavu (Lyons i sur., 2020).

2.3.2. Probiotička mikroflora majčinog mlijeka

Majčino mlijeko jedan je od glavnih faktora koji mikrobiološki oblikuju crijeva novorođenčeta upravo zahvaljujući visokom udjelu probiotičkih bakterija (Martín i sur., 2007). Prema Heikkilä i Saris (2003) smatra se da novorođenče u prosjeku dnevno kroz 800 mL majčinog mlijeka unese 10^4 - 10^6 komenzalnih bakterija. Ove bakterije nisu samo prisutne u mlijeku, nego su i transkripcijski aktivne te su funkcionalni sudionici u crijevnoj zajednici dojenčeta (Asnicar i sur., 2017) i služe kao fiziološki i kontinuirani izvor komenzalnih i potencijalnih probiotičkih bakterija za crijeva dojenčeta.

Mlijeko se prvo prenosi iz majčinih crijeva do mliječnih žlijezdi preko dendritičkih stanica, koje mogu prodrijeti u crijevni epitel i na taj način prenijeti bakterije iz crijeva. Bakterije zatim cirkuliraju do mliječnih žlijezdi pomoću limfnog sustava i krvotoka te se zajedno s mlijekom tijekom dojenja prenose u tijelo djeteta i na taj način sudjeluju u oblikovanju crijevne mikrobiote novorođenčeta (Łubiech i Twarużek, 2020).

Majčino mlijeko sadrži širok spektar bakterija kao što su *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, BMK, *Propionibacterium* i *Bifidobacterium* i sve ove skupine imaju značajnu ulogu u razvoju i zaštiti novorođenčeta. Probiotičke bakterije prisutne su u majčinom mlijeku u koncentracijama od 10^1 do 10^7 CFU mL⁻¹ (Łubiech i Twarużek, 2020).

2.3.3. Funkcije probiotičkih bakterija iz majčinog mlijeka

Prema Ojo-Okunola i sur. (2018) postoji nekoliko različitih pozitivnih učinaka probiotičkih bakterija iz majčinog mlijeka.

U različitim istraživanjima dokazano je da dolazi do vertikalnog prijenosa bakterija iz majčinog mlijeka na novorođenče (Murphy i sur., 2017; Milani i sur., 2015). Također je dokazano da fekalni bakteriom novorođenčadi koja su dojena sadrži dominantan broj *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp., dok su crijeva novorođenčadi koja su hranjena s adaptiranim mlijekom pretežito kolonizirana s enterokokima, enterobakterijama i patogenom *Clostridium difficile* vrstom (Walker i Iyengar, 2015).

In vitro studije pokazuju da *Lacticaseibacillus rhamnosus* i *Lactobacillus crispatus*, izolirani iz majčinog mlijeka, imaju antiinfektivno djelovanje protiv *Staphylococcus aureus* (Heikkilä i Saris, 2003), dok *Lactobacillus salivarius* sojevi iz majčinog mlijeka imaju zaštitni učinak protiv djelovanja *Salmonella enterica* serovar Cholerasuis na životinjskim modelima na način da inhibiraju adheziju na mucin (Olivares i sur., 2006).

Majčino mlijeko izvor je bifidobakterija koje su odgovorne za aktivaciju T-regulatornih stanica koje poboljšavaju rezistenciju prema patogenim mikroorganizmima. Sojevi *Limosilactobacillus fermentum* i *Ligilactobacillus salivarius* pokazali su *in vitro* imunomodulatorno djelovanje moduliranjem aktivacije podskupina mononuklearnih stanica periferne krvi, „natural killer“ CD8⁺ stanica, citokina i kemokina (Perez-Cano i sur., 2010).

Isto tako, dokazana je i poveznica između probiotičkih bakterija iz majčinog mlijeka i razvoja alergija. Studije na životinjama pokazale su da probiotičke vrste podrijetlom iz majčinog mlijeka, *Lactobacillus gasseri* i *Loigolactobacillus coryniformis* smanjuju pojavu i težinu alergijskih reakcija na protein kravljeg mlijeka (Lara-Villoslada i sur., 2007).

Probiotičke bakterije također posjeduju metaboličku aktivnost čime omogućavaju probavu oligosaharida sadržanih u majčinom mlijeku razgrađujući ih na kratkolančane masne kiseline s obzirom da dojenčad nema potrebne enzime za njihovu probavu (Ojo-Okunola i sur., 2018).

Mikrobiota iz majčinog mlijeka može posjedovati i antikancerogeno djelovanje. Naime, *in vitro* studija koju su proveli Kim i sur. (2003) pokazala je terapijsko djelovanje BMK iz majčinog mlijeka, točnije, vrste *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, protiv raka debelog crijeva.

2.4. GASTROINTESTINALNI TRAKT

2.4.1. Mikrobiota gastrointestinalnog trakta

Mikroorganizmi su prisutni u ljudskom organizmu, a najveća koncentracija prisutna je u debelom crijevu. Ljudi ulaze u prvi kontakt s bakterijama pri porodu, a mikrobiota je podložna trajnim promjenama tijekom života ovisno o različitim čimbenicima kao što su prehrana, izloženost antigenima, infekcije ili lijekovi, ali i genetika, dob ili higijenski čimbenici (Dieterich i sur., 2018). Koncentracija mikrobiote raste duž GIT-a, s malim brojem u želucu, ali vrlo visokim koncentracijama u debelom crijevu. Želudac i tanko crijevo imaju vrlo nepovoljne uvjete te je vrlo mali broj bakterija otporan na njihove kiseline, žuč ili enzime gušterače. U želucu se nalazi 10^1 CFU g^{-1} , u tankom crijevu 10^3 CFU g^{-1} , u jejunumu 10^4 CFU g^{-1} , u ileumu 10^7 CFU g^{-1} i u debelom crijevu 10^{12} CFU g^{-1} (Sekirov i sur., 2010).

2.4.2. Proteini ekstracelularnog matriksa

Ekstracelularni matriks (ECM) je vrlo dinamična struktura s različitim funkcijama. Sastoji se od brojnih makromolekula zaduženih za strukturnu potporu, staničnu signalizaciju i regulaciju fizioloških procesa. ECM se sastoji od proteoglikana i glikoproteina koji se izlučuju lokalno i spajaju u organiziranu mrežu. Glavni vlaknasti proteini koji tvore dijelove ECM-a su kolagen, elastin, fibronektin, laminin i vitronektin koji omogućavaju bakterijsku adheziju (Vaca i sur., 2020). Kolagen je glavni glikoprotein koji čini 30 % svih proteina koji se nalaze u ljudskom tijelu. On ima značajnu ulogu u održavanju strukture tkiva, staničnoj adheziji, razvoju embrija i u mnogim drugim procesima. Fibronektin je višedomenski glikoprotein prisutan u tjelesnim tekućinama i na površini stanica s glavnom funkcijom povezivanja stanica na ECM. Laminin je multifunkcionalna molekula s ukupno 15 heterotrimernih izoforma različito raspoređenih u bazalne membrane, vezivno tkivo, staničnu površinu, kožu i krvne žile. Ovaj ECM protein je zadužen za održavanje strukturnog oblika, migraciju stanica i signalizaciju.

2.5. MEHANIZMI ADHEZIJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE NA EPITELNE STANICE CRIJEVA

Sposobnost prianjanja primarni je kriterij za odabir probiotičkih mikroorganizama. BMK kao probiotički mikroorganizmi imaju nekoliko važnih mehanizama pomoću kojih se adheziraju na stanice crijevnog epitela. Kako bi se vezali za crijevne stanice bakterije koriste različite strukture kao što su flagele, pili (dlačice), proteini S-sloja, lipoteihoična kiselina, egzopolisaharidi i proteini koji se vežu na sluznicu (Alp i Kuleaşan, 2019).

2.5.1. Proteini koji se vežu na sluznicu

Epitelne stanice crijeva i čvrste veze između njih, uz glikokaliks i slojeve sluzi na tim stanicama, predstavljaju glavnu fizičku barijeru za mikroorganizme i druge toksične spojeve. Epitelne stanice izlučuju složenu smjesu glikoproteina koja se zove mucin, a koja je glavna komponenta sluznog sloja i koja inhibira vezanje patogenih bakterija (González-Rodríguez i sur., 2012). Međutim, probiotičke BMK stupaju u interakciju sa stanicama crijevnog epitela i sluzi zbog toga što posjeduju određene površinske karakteristike koje omogućavaju specifične interakcije sa sluznicom. Za vezanje probiotičkih bakterija sa sluznicom odgovoran je Mub protein (engl. *mucus binding protein*) (Rojas, 2002). MacKenzie i sur. (2009) objasnili su da Mub protein stvara kovalentnu vezu s peptidoglikanskim slojem bakterija i na taj način čvrsto povezuje probiotičke bakterije sa sluznicom.

2.5.2. Lipoteihoična kiselina

Teihoična kiselina jedan je od glavnih sastojaka stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija. Sastoji se od poliolnih jedinica povezanih fosfodieterskim vezama (Lima i sur., 2019). Teihoične kiseline mogu biti pričvršćene za staničnu stijenku bakterija ili za staničnu membranu kada se nazivaju lipoteihoične kiseline. Prema Alp i Kuleaşan (2019) može se zaključiti da Gram-pozitivne bakterije za adheziju na epitelne stanice koriste veze uspostavljene između lipoteihoičnih kiselina prisutnih na njihovoj površini i receptorskih mjesta u proteinskoj strukturi životinjske stanice.

2.5.3. Flagele (bičevi) i pili (dlačice)

Flagele i pili karakteristične su za Gram-negativne bakterije, no u novije vrijeme pronađene su i kod određenih sojeva Gram-pozitivnih bakterija, odnosno u BMK. Većina BMK

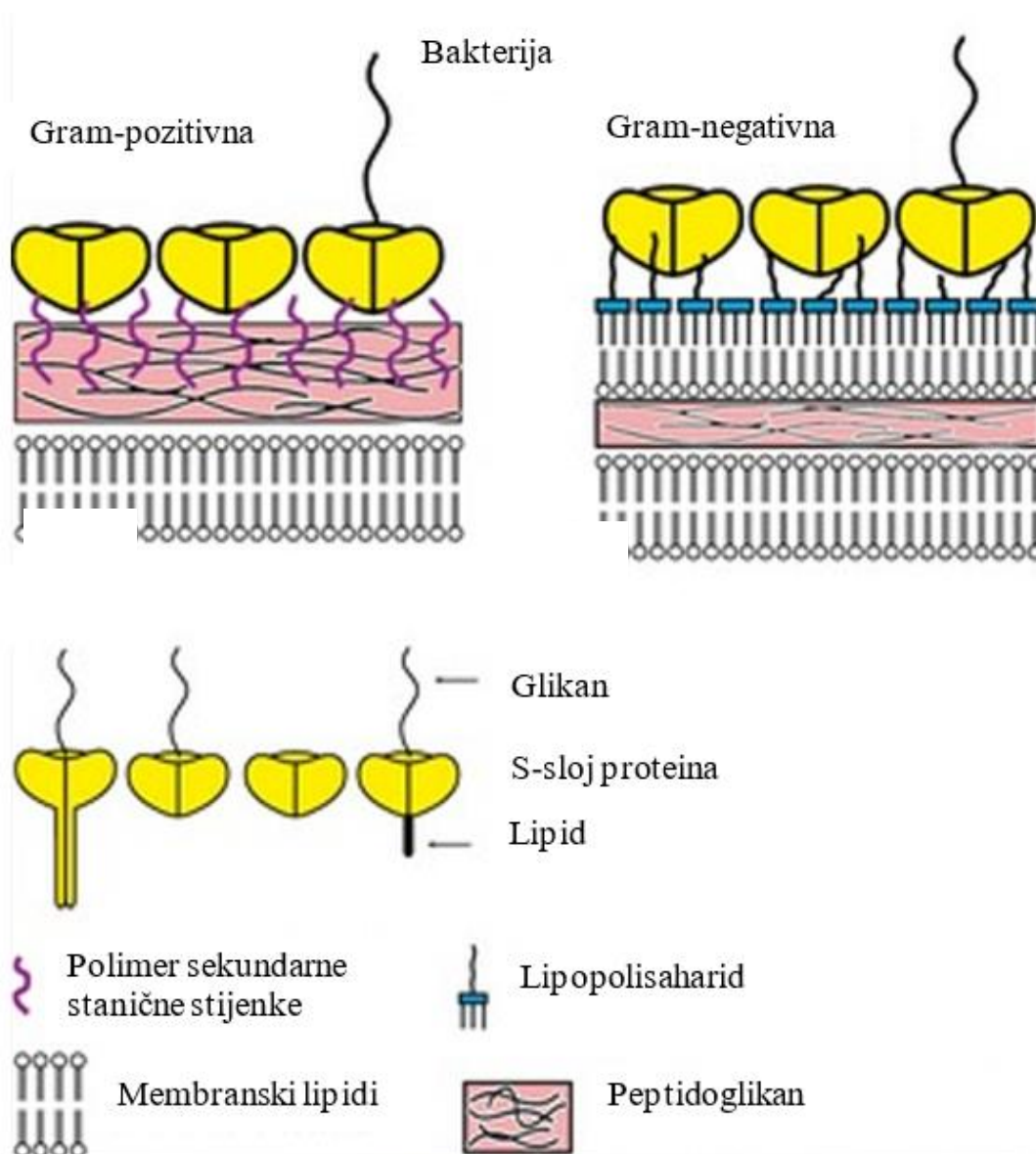
nema sposobnost pokretanja, no u nekim vrstama, *Ligilactobacillus ruminis* (Neville i sur., 2012) i *Ligilactobacillus agilis* (Kajikawa i sur., 2016) pronađene su flagele. Međutim, iz dobivenih podataka zaključeno je da flagele nemaju značajniju ulogu u vezanju bakterija na stanice. S druge strane, pili su otkrivene kod rodova *Bifidobacterium* (Piepenbrink i Sundberg, 2016) i *Lactobacillus* (Toh i sur., 2013). Monteagudo-Mera i sur. (2019) zaključuju da pili omogućavaju lakšu adheziju bakterija na intestinalnu sluznicu.

2.5.4. Ekstracelularni polisaharidi

Ekstracelularni polisaharidi su visokomolekularni prirodni polimeri sastavljeni od monomera. Sastoje se od D-glukoze, D-galaktoze, L-ramnoze te rjeđe od N-acetilglukozamina, N-acetilgalaktozamina i glukuronske kiseline. Ekstracelularni polisaharidi mikroorganizmima služe kao zaštitni sloj u nepovoljnim uvjetima kao što su jake kiseline, žučne soli i enzimi gastrointestinalnog trakta (Castro-Bravo i sur., 2018). Alp i Kuleaşan (2019) zaključili su iz dostupnih istraživanja da ekstracelularni polisaharidi imaju značajnu ulogu u adheziji, kolonizaciji i adaptaciji na uvjete GIT-a.

2.5.5. S-sloj

S-slojevi su parakristalni dvodimenzionalni nizovi koji prekrivaju staničnu površinu određenih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih vrsta te arheja. Molekulska masa S-sloja iznosi 40-200 kDa, a debljina mu je 5-25 nm. Sastoje se od identičnih proteinskih ili glikoproteinskih podjedinica koje tvore pravilne i visoko porozne nizove kose, kvadratne ili heksagonalne simetrije i potpuno pokriva površinu mikroorganizma tijekom svih faza rasta (Sleytr i sur., 2001). U Gram-pozitivnim bakterijama, S-sloj povezan je s peptidoglikanom ili pseudomureinom, a u Gram-negativnim bakterijama vezan je na lipopolisaharide (slika 3). Interakcija između podjedinica proteina S-sloja sa staničnom površinom odvija se preko nekovalentnih veza. Proteinske podjedinice obično su bogate kiselim i hidrofobnim aminokiselinama, ali siromašne aminokiselinama koje sadrže sumpor te općenito imaju niske vrijednosti izoelektričnih točaka (Sara i Sleytr, 2000).

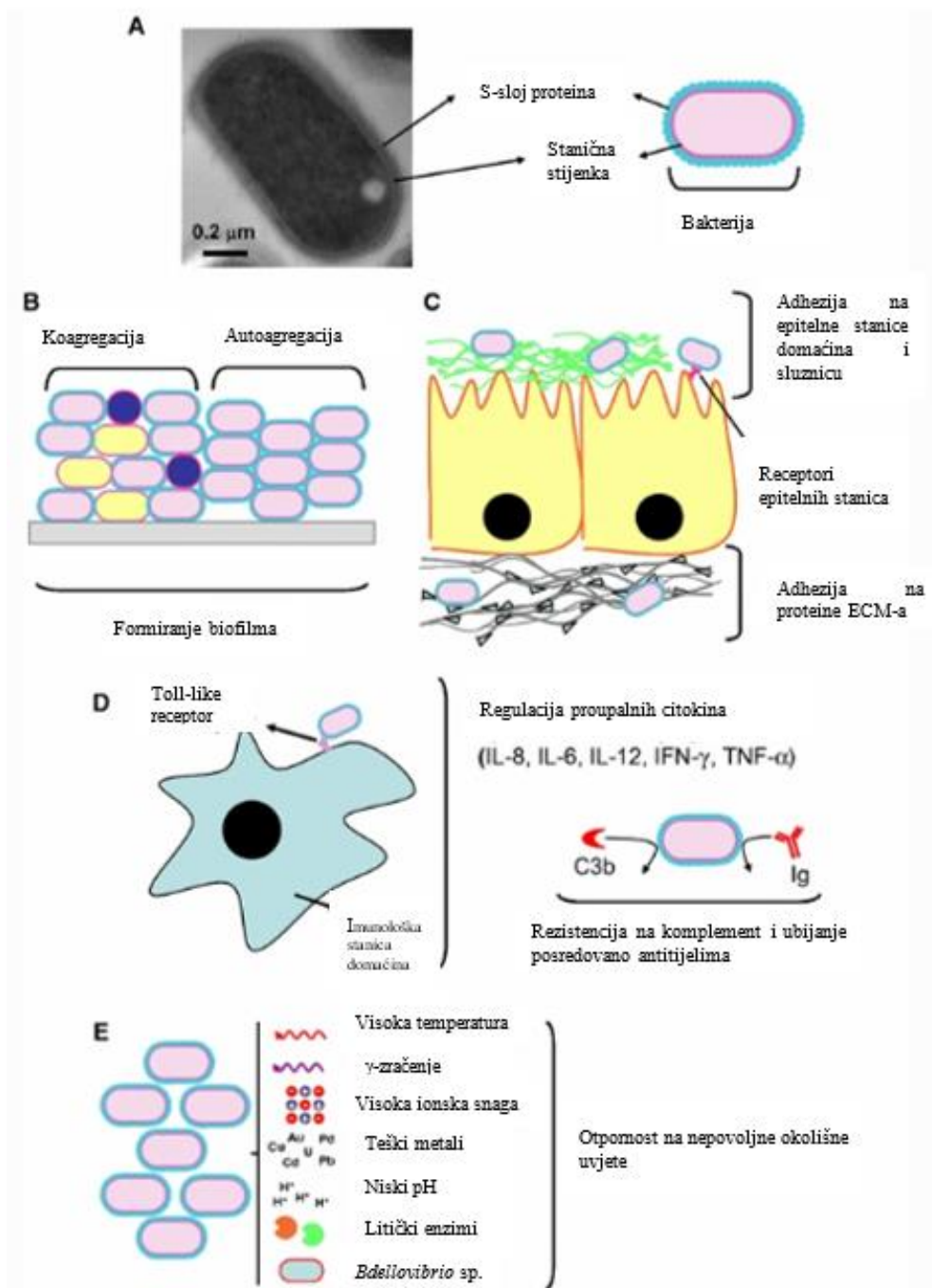


Slika 3. Položaj S-sloja kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (prilagođeno prema Sleytr i sur., 2014)

Prisutnost S-sloja proteina potvrđena je u određenim vrstama BMK, a radi se o vrstama *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus crispatus*. Općenito se smatra da laktobacili proizvode ove proteine tijekom svoje proliferacije i koriste ih za vezanje za crijevni kolagen. Također se smatra da proteini koji vežu kolagen povećavaju sposobnost mikroorganizama da se vežu i imaju važnu ulogu u kompeticiji s patogenima za mjesto vezanja (Yadav i sur., 2013).

2.5.5.1. Funkcije S-sloja proteina

Gerbino i sur. (2015) napravili su pregledni članak u kojem su saželi sve dokazane učinke S-sloja te su oni prikazani i na slici 4. Funkcije i uloge S-sloja proteina mogu se podijeliti u dvije glavne skupine. Prvu skupinu čini njihova uloga u bakterijskoj adheziji na različite površine i supstrate, dok je druga skupina njihova zaštitna uloga od nepovoljnih okolišnih uvjeta. S-sloj ima važnu ulogu u održavanju oblika stanice i funkciju vezne skele za velike molekule, ione i bakteriofage, a najznačajnija mu je uloga medijatora u bakterijskoj adheziji. Međutim, S-sloj također doprinosi i patogenosti mikroorganizma na način da omogućava vezanje na stanice domaćina, koagregaciju s drugim mikroorganizmima, stvaranje biofilma i sprječavanje imunološkog odgovora domaćina modulacijom signala T-stanica. Na kraju, S-sloj štiti bakterijsku stanicu od nepovoljnih uvjeta iz okoline kao što su promjena pH, mehanički i osmotski stres. Također, S-sloj štiti bakteriju i od djelovanja antimikrobnih peptida i bakteriolitičkih enzima, radijacije i napada bakteriofaga.



Slika 4. Prikaz uloga površinskog sloja S-proteina (prilagođeno prema Gerbino i sur., 2015)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu korišteno je 5 sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka i jedan test-mikroorganizam (tablica 2). Svi korišteni sojevi dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 2. Sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su korišteni u ovom radu

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB13	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB20	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MC1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	MC19	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	KR19	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurim	FP1	BHI , 37 °C, aerobno

3.1.2. Stanične linije

U ovom radu za ispitivanje adhezije BMK i kompetitivne ekskluzije test-mikroorganizma korištena je Caco-2 stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela. Caco-2 stanice čuvaju se u EMEM mediju (Eagle's minimal essential medium) na -80 °C uz dodatak 10 % glicerola koji ima krioprotektivnu ulogu.

3.1.3. Hranjive podloge

U ovom radu korištene su sljedeće podloge:

a) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj BMK

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L⁻¹ destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 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.

- MRS bujon („Biolife“, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodatka agara.
- b) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj patogenih test-mikroorganizama
- BHI (Brain Heart Infusion) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L⁻¹ destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
 - BHI bujon („Biolife“, Italija) istog je sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.
- c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju patogenog mikroorganizma *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1
- XLD (ksiloza-lizin-deoksiholat) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L⁻¹ destilirane vode): ksiloza 3,75; L-lizin 5; laktoza 7,5; saharoza 7,5; natrijev klorid 5; kvašičev ekstrakt 3; natrijev deoksikolat 1; natrijev tiosulfat 6,8; amonij željezo (III) citrat 0,8; fenol crveno 0,08; agar 14,5. pH vrijednost podloge je 7,4; Podloga se sterilizira na plameniku do vrenja uz povremeno miješanje.
- d) hranjive podloge za kultivaciju staničnih linija
- Eagle's minimal essential medium (EMEM) s 10 % fetalnog goveđeg seruma („Thermo Fisher Scientific“, SAD) za kultivaciju Caco-2 stanične linije.

3.1.4. Kemikalije

- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol 70 %, „Kemika“, Hrvatska
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- gvanidin hidroklorid (GHCl), „Sigma-Aldrich“, SAD
- klorovodična kiselina (HCl), „Sigma-Aldrich“, SAD
- kristal violet, „Sigma-Aldrich“, SAD
- limunska kiselina, „T.T.T. d.o.o.“, Hrvatska
- mikrotitarske pločice presvučene fibronektinom, lamininom i kolagenom, Corning® BioCoat™, „Corning Inc.“, SAD

- Na-citrat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijeva lužina (NaOH), „Kemika“, Hrvatska
- pankreatin, „Fluka“, Švicarska
- pepsin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Triton X-100, „AppliChem“, Njemačka
- Tween 20, „Fisher Scientific“, SAD
- žučne soli, „Difco“, SAD

3.1.5. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- fluorescencijski mikroskop EVOS FLc Cell Imager, „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje 15 mL i 50 mL, „Falcon“, Engleska
- magnetna mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrotitarske pločice s 96 i 24 jažice, „Falcon“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- plastične tubice (1,5 i 2 mL), „Eppendorf“, SAD
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za kivete, „NeoLab“, Njemačka
- T-boca 25 cm³, „Corning“, SAD
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska

- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi BMK čuvani su na -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v v⁻¹) glicerola, a test-mikroorganizam na -80 °C u BHI bujonu uz dodatak 15 % (v v⁻¹) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježu hranjivu podlogu te inkubirani u optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 2.

3.2.2. Adhezija bakterijskih stanica na Caco-2 stanice

3.2.2.1. Priprema Caco-2 stanične linije

Caco-2 stanična linija je odmrznuta u vodenoj kupelji pri 37 °C te je centrifugiranjem uklonjen supernatant koji je sadržavao ostatke medija i glicerola. Zaostala biomasa stanica isprana je s 1 mL svježeg EMEM medija prethodno zagrijanog na 37 °C te su stanice nacijepljene u Petrijeve zdjelice promjera 5 cm. Nakon 24 h propagacije, Caco-2 stanice su iz Petrijevih zdjelica nacijepljene u T-bocu volumena 25 cm³ i održavane pri 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO₂, uz dodatak 10 % (v v⁻¹) toplinom inaktiviranog (56 °C tijekom 30 min) fetalnog goveđeg seruma uz izmjenu medija svakih 48 h. Stanice su u T-boci uzgajane do subkonfluentnog stanja nakon čega su isprane fosfatnim puferom da bi se uklonilo zaostali medij. Stanice su zatim inkubirane u 1-2 mL 0,25 % (w v⁻¹) tripsina pri 37 °C kako bi se odlijepile od podloge. Odljepljivanje stanica prati se pomoću mikroskopa pri čemu se proučava prelazak stanica iz vretenastog u okrugli oblik i pokretanje u smjeru tripsina. Tripsin je uklonjen nakon odljepljivanja stanica te su stanice potom resuspendirane u mediju sa serumom. Nakon toga je provedeno brojanje stanica u Bürken-Türk komorici volumena 10⁻⁴ mL, iz čega je zatim izračunata koncentracija stanica u uzorku te je pripravljena suspenzija Caco-2 stanica koncentracije 10⁵ stanica mL⁻¹. 1 mL pripravljene suspenzije je dodan u svaku jažicu na pločici s 24 jažice. Nakon toga je uslijedila inkubacija u mediju sa serumom pri 37 °C tijekom tjedan dana u 5 %-tnoj atmosferi CO₂, uz izmjenu medija svakih 48 h. Caco-2 stanice su prije provođenja eksperimenta adhezije bakterijskih stanica isprane tri puta fosfatnim puferom.

3.2.2.2. Priprema bakterijskih stanica

Prekonoćne kulture bakterijskih stanica, čija se sposobnost adhezije ispituje, prikupljene su centrifugiranjem 5 min pri 4200 o min^{-1} i isprane dva puta u fosfatnom puferu ($\text{pH} = 7,4$). Suspenzije svakog soja BMK podijeljene su u dvije kivete te je stanicama u jednoj kiveri uklonjen S-sloj inkubacijom u 3 M otopini GHCl -a tijekom 1 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, dok je stanicama u drugoj kiveri sloj S-proteina ostao netaknut. Nakon inkubacije, stanice se centrifugiraju i dvaput isperu s fosfatnim puferom. Zatim je 100 mL suspenzije svih sojeva, sa i bez S-sloja, uzeto za mjerenje apsorbancije nakon čega se izračunao volumen EMEM medija koji je potreban za resuspendiranje bakterijskih stanica da bi se vrijednost OD (optičke gustoće) podesila na 1. Suspenzije su zatim ponovno centrifugirane i talog stanica je resuspendiran u izračunatom volumenu EMEM medija. Iz dobivenih suspenzija uzeto je po 100 μL za određivanje broja živih stanica indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.

3.2.2.3. Ispitivanje utjecaja S-proteina na sposobnost adhezije sojeva *producenata na Caco-2 staničnu liniju*

U pripremljene jažice s Caco-2 stanicama dodan je 1 mL pripremljenih bakterijskih suspenzija stanica sojeva BMK resuspendiranih u EMEM mediju. Nakon 1 h inkubacije pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, Caco-2 stanice su isprane 3 puta s 1 mL fosfatnog pufera kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu vezale. Caco-2 stanice su potom lizirane dodatkom 1 mL 0,05 %-tne otopine Triton X-100 pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 10 min. Nakon provedenog liziranja, sadržaj prikupljen iz jažica je centrifugiran kako bi se prikupile adhezirane bakterijske stanice. Talog stanica je zatim resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera te je broj adheziranih stanica (izražen u CFU jedinicama) provjeren indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7. Postotak adhezije izračunat je prema sljedećoj jednažbi:

$$\% \text{ adhezije} = \left(\frac{\text{CFU mL}^{-1} \text{ adheziranih bakterija}}{\text{CFU mL}^{-1} \text{ dodanih bakterija}} \right) \cdot 100$$

3.2.3. Adhezija bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa (ECM-a)

3.2.3.1. Priprema mikrotitarskih pločica presvučenih fibronektinom, kolagenom i lamininom

Adhezija bakterijskih stanica na proteine ECM-a ispitana je na Corning®BioCoat™ pločicama s 96 jažica presvučenih lamininom, kolagenom, odnosno fibronektinom prema protokolu Antikainen i sur. (2002) s modifikacijama opisanim u Uroić i sur. (2016). Jažice su

isprane tri puta fosfatnim puferom ($\text{pH} = 7$) i blokirane tijekom 1 h fosfatnim puferom s dodatkom 1 % Tween 20.

3.2.3.2. Priprema bakterijskih stanica

Bakterijske stanice uzgojene do kasne eksponencijalne faze prikupljene su centrifugiranjem tijekom 5 min na 4200 o min^{-1} da bi se dobio talog stanica koji je zatim dvaput ispiran fosfatnim puferom. Potom se svaki soj podijeli u dvije kivete; stanicama u jednoj kiveti je uklanjen S-sloj jednosatnom inkubacijom u 3 M GHCl -u pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a u drugoj kiveti su bile intaktne stanice. Nakon inkubacije, stanice su odvojene centrifugiranjem i isperane dva puta u fosfatnom puferu. Tako pripremljenim suspenzijama stanica, sa i bez S-sloja, izmjerena je apsorbancija, te su stanice, nakon centrifugiranja, resuspendirane u volumenu fosfatnog pufera da bi se OD_{620} vrijednost podesila na 1.

3.2.3.3. Ispitivanje utjecaja S-proteina na sposobnost adhezije sojeva producenata na proteine ECM-a

Iz jažica koje sadrže imobilizirane proteine ECM-a nakon 1 h inkubacije uklonjen je fosfatni pufer s 1 % Tween 20 te je u svaku jažicu dodano po $100 \text{ }\mu\text{L}$ pripremljenih bakterijskih kultura. Nakon što su dodane bakterijske suspenzije u sve jažice, slijedila je prekonoćna inkubacija na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Također, pripremljena je i slijepa proba, odnosno samo fosfatni pufer, bez bakterijskih stanica. Nakon prekonoćne inkubacije, sadržaj svake jažice je ispran tri puta s 200 mL fosfatnog pufera koji sadrži 0,05 % Tween 20 kako bi se uklonile neadhezirane bakterijske stanice. Nakon ispiranja, pločice s imobiliziranim proteinima ECM-a su ostavljene sat vremena kako bi se osušile. Bakterijske stanice koje su se vezale su detektirane bojanjem sa $100 \text{ }\mu\text{L}$ otopine kristal violeta koncentracije 1 mg mL^{-1} tijekom 45 min. Jažice su zatim isperane fosfatnim puferom čime se uklanja nevezana boja, a bojilo koje se vezalo na adhezirane bakterijske stanice je otpušteno dodavanjem po $100 \text{ }\mu\text{L}$ citratnog pufera koncentracije 50 mmol L^{-1} i pH vrijednosti 4,0. Nakon dodavanja citratnog pufera, određena je apsorbancija pri 620 nm na čitaču mikrotitarskih ploča Infinite® F Plex. Apsorbancija slijepe probe oduzeta je od apsorbancija jažica koje sadrže bakterijske stanice čime je dobivena apsorbancija adheziranih stanica.

3.2.4. Preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

3.2.4.1. Priprema simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g L^{-1}) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,5 i 3,0 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom.

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g L^{-1}) i žučnih soli ($3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ goveđe žuči) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

3.2.4.2. Priprema bakterijskih stanica

Prekonoćne kulture bakterijskih stanica sojeva BMK su centrifugirane tijekom 5 minuta pri 4200 o min^{-1} te je talog stanica dva puta ispran u fiziološkoj otopini. Nakon toga je suspenzija svakog soja podijeljena u dvije kivete te je jednoj paraleli svakog soja uklonjen S-sloj jednosatnom inkubacijom u 3 M GHCl-u pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$, dok su drugu paralelu činili sojevi koji su na površini stanica imali prisutne S-proteine. Nakon inkubacije provedeno je centrifugiranje i talog stanica je dva puta ispran u fiziološkoj otopini kako bi se uklonio zaostali GHCl. Nakon resuspendiranja u fiziološkoj otopini, dio suspenzija je odvojen za određivanje broja živih stanica prije inkubacije u simuliranim uvjetima GIT-a indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.

3.2.4.3. Uloga S-proteina u preživljavanju stanica sojeva *producenata* u simuliranim uvjetima GIT-a

Pripremljene suspenzije bakterijskih stanica centrifugirane su pri 4200 o min^{-1} tijekom 5 min, a dobiveni talog je resuspendiran u simuliranom želučanom soku i inkubiran 2 h pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije, dio suspenzije je odvojen za određivanje broja živih stanica indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7., a ostatak je centrifugiran 5 min pri 4200 o min^{-1} . Dobiveni talog je resuspendiran u simuliranom soku tankog crijeva te inkubiran pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 4 sata, nakon čega je dio suspenzije korišten za određivanje broja živih indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.

3.2.5. Kompetitivna ekskluzija patogene bakterije *S. enterica* serovar Typhimurium FP1 sa sojevima BMK

3.2.5.1. Priprema Caco-2 stanične linije

Caco-2 stanice su uzgojene u minimalnom esencijalnom mediju (MEM mediju) u T-boci volumena 25 cm³ i održavane uz izmjenu medija svakih 48 h, pri 37 °C i 5 %-tnoj atmosferi CO₂ u minimalnom esencijalnom mediju s dodatkom 10 % (v v⁻¹) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma pri 56 °C tijekom 30 min.. U T-boci stanice su uzgajane do subkonfluentnog stanja te im je tada pipetom uklonjen medij. Nakon toga su stanice isprane fosfatnim puferom da bi se uklonilo zaostali medij. Stanice su zatim inkubirane u 1-2 mL 0,25 % (w v⁻¹) tripsina pri 37 °C da bi se odlijepile od podloge što se prati pomoću mikroskopa jer mijenjaju oblik iz vretenastog u okrugli. Tripsin je uklonjen nakon odljepljivanja stanica i stanice su potom resuspendirane u mediju sa serumom. Nakon toga, stanice su izbrojane u Bürken-Türk komorici volumena 10⁻⁴ mL i određena im je koncentracija te je iz dobivenih podataka pripremljena suspenzija Caco-2 stanica koncentracije 10⁵ stanica mL⁻¹. 1 mL pripremljene suspenzije je dodan u svaku jažicu na pločici s 24 jažice. Nakon toga je uslijedila inkubacija u mediju sa serumom na 37 °C tijekom tjedan dana u 5 %-tnoj atmosferi CO₂ te je medij izmjenjivan svakih 48 h. Caco-2 stanice su prije provođenja eksperimenta kompetitivne ekskluzije patogene bakterije isprane tri puta fosfatnim puferom.

3.2.5.2. Priprema bakterijskih stanica BMK i patogenog mikroorganizma *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Prekonoćne kulture stanica sojeva BMK i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, uzgojene u optimalnim uvjetima opisanim u tablici 2, prikupljene su centrifugiranjem kako bi se uklonio višak hranjive podloge, a talog stanica je potom resuspendiran u fosfatnom puferu. Nakon ispiranja stanica u fosfatnom puferu, sojevi *L. brevis* MB13 i MB20 su podijeljeni u dvije kivete; stanicama u jednoj kiveti je uklanjen S-sloj jednosatnom inkubacijom u 3 M GHCl-u pri 37 °C, a u drugoj kiveti su intaktne stanice. Nakon inkubacije, stanice svih sojeva su prikupeljene centrifugiranjem te su dvaput isperane fosfatnom puferu. Svim sojevima je zatim izmjerena apsorbancija pri 620 nm, suspenzije stanica su centrifugirane te je talog stanica resuspendiran u volumenu EMEM medija da bi OD₆₂₀ iznosio 1.

3.2.5.3. Kompetitivna ekskluzija sojevima BMK

U svaku jažicu koja sadrži Caco-2 stanice dodano je po 1 mL suspenzije bakterijskih stanica koje su inkubirane 1 h na 37 °C. Caco-2 stanice su zatim isperane fosfatnim puferom te je u jažice dodano po 1 mL suspenzije bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 i nastavljena je inkubacija tijekom 1 h na 37 °C. Nakon završene inkubacije, stanice su ispirane 3 puta s 1 mL fosfatnog pufera kako bi se uklonile neadhezirane bakterijske stanice. Adhezirane stanice inkubirane su 10 min s 1 mL 0,05 %-tne otopine Triton X-100, pri čemu su lizirane Caco-2 stanice. Sadržaj svake jažice je zatim centrifugiran 5 min pri 4200 o min⁻¹ kako bi se dobio talog stanica, koji je zatim resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera te je određen broj bakterijskih stanica indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.

3.2.6. Vizualizacija adhezije bakterija mliječne kiseline na Caco-2 stanični monosloj

U svrhu ispitivanja adhezijskih svojstava odabranih sojeva BMK, izoliranih iz uzoraka majčinog mlijeka, na Caco-2 staničnu liniju, stanice su nakon nacjepljivanja na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica, u konačnom volumenu od 100 µL DMEM F-12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, obojene u suspenziji s Incucyte Rapid Red bojom. Caco-2 stanice su zatim, nakon ispiranja sa 100 µL DMEM F-12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, inokulirane bakterijskom suspenzijom s podešenim multiplicitetom infekcije (engl. *multiplicity of infection, MOI*) od 50 bakterija po stanici (MOI 50), 10 bakterija po stanici (MOI 10) i 2 bakterije po stanici (MOI 2). Bakterijske stanice probiotičkih sojeva su prethodno dva puta isprane s PBS puferom centrifugiranjem pri 3000 x g tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja supernatanta, talozi su suspendirani u 200 µL PBS pufera te je dodana VioFluor 488 boja do konačne koncentracije od 5 µM, nakon čega su inkubirani pri 37 °C tijekom 15 min. Obojanim bakterijskim stanicama se dodalo 2 mL zagrijanog DMEM F-12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, nakon čega je slijedila inkubacija 5 min na sobnoj temperaturi. Suspenzije bakterijskih stanica su centrifugirane pri 3000 x g tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi, talozi su suspendirani u 80 µL DMEM F-12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom te su odgovarajući volumeni pripremljenih koncentracija probiotičkih sojeva dodani u svaku jažicu. Nakon inkubacije od 1, 4, i 12 sati, neadhezirane bakterijske stanice su isprane tri puta s PBS puferom i fiksirane preko noći pri 37 °C dodatkom 4 %-tnog paraformaldehida. Nakon fiksiranja i ispiranja s PBS puferom, stanice su obojane s DAPI ((4',6-diamidino-2-phenylindole), a detekcija adheziranih stanica je provedena na EVOS FLc Cell

Imager uređaju pri povećanju od 20x.

3.2.7. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Broj živih bakterija određen je indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u sterilnoj fiziološkoj otopini na odgovarajuće selektivne hranjive podloge u obliku kapi (10 μ L) u dvije paralele. Nakon 48 h inkubacije (aerobne za test-mikroorganizam, anaerobne za BMK) pri 37 °C izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica (engl. *colony-forming units*, *CFU*) po mililitru uzorka. Za određivanje broja poraslih bakterijskih stanica *Salmonella* Typhimurium FP1 korištena je selektivna podloga XLD agar, a za određivanje broja poraslih bakterijskih stanica BMK sojeva MRS agar.

3.2.8. Obrada rezultata

Svi pokusi provedeni su u 3 paralele nakon čega je u programu Microsoft Excel napravljena statistička analiza čime je određena srednja vrijednost te standardna devijacija koja je prikazana na grafovima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

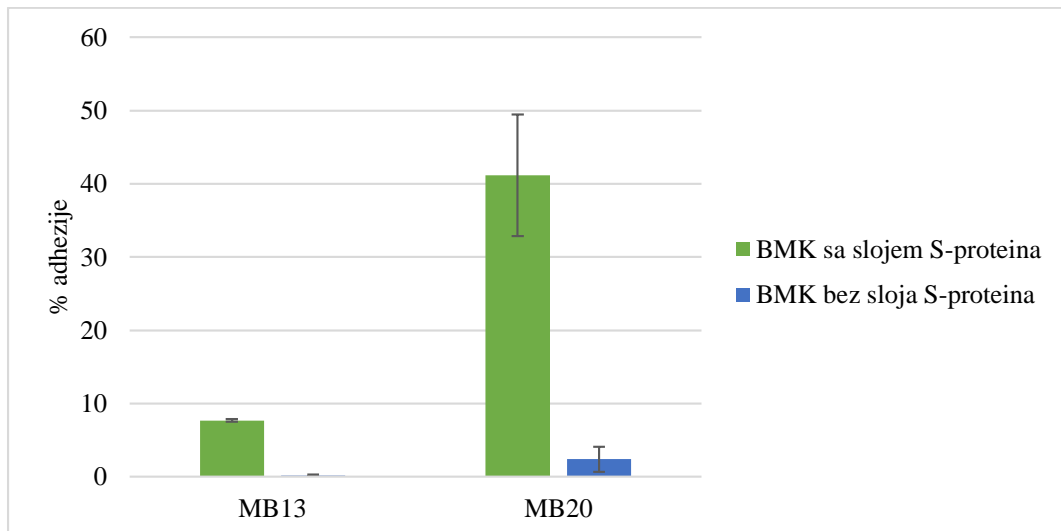
4.1. ADHEZIJA BAKTERIJSKIH STANICA

Najvažniji kriteriji za karakterizaciju probiotičkih sojeva obuhvaćaju sposobnost preživljavanja stresnih uvjeta u ljudskom tijelu, ulazak u interakciju s ljudskim epitelnim stanicama, kompeticiju s patogenim mikroorganizmima i antimikrobno djelovanje tih sojeva (Fonseca i sur., 2021). Ulazak u interakciju s ljudskim epitelnim stanicama, odnosno, adhezija na epitelna i subepitelna tkiva jedan je najvažnijih koraka za uspješnu kolonizaciju crijeva sisavaca. Bakterijska adhezija temelji se na nespecifičnim fizičkim interakcijama između dviju površina koje zatim omogućavaju specifične interakcije između adhezina i komplementarnih receptora. Također, autoagregacija bakterijskih stanica omogućava bolju adheziju na epitelne stanice, dok koagregacijska svojstva omogućavaju stvaranje barijere koja štiti od kolonizacije crijeva patogenim bakterijama.

U ovom radu ispitana su adhezijska svojstva sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 u *in vitro* uvjetima na Caco-2 stanice. Caco-2 stanice su humane tumorske stanične linije adenokarcinoma debelog crijeva. Također, ispitana je i uloga proteinskog S-sloja na adheziju bakterijskih stanica. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 5 te je vidljivo da se kod soja *L. brevis* MB13 adheziralo $7,7 \pm 0,22$ % bakterijskih stanica od početnog broja što iznosi rang veličine od 10^7 CFU mL⁻¹, dok adhezija soja *L. brevis* MB20 iznosi $41,13 \pm 8,4$ % početnih stanica, odnosno rang veličine od 10^8 CFU mL⁻¹.

Ovi rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Zielińska i sur. (2019). U njihovom istraživanju također su dobiveni dobri rezultati adhezije *L. brevis* sojeva u iznosu od 4 do 8 % što odgovara rezultatu za soj *L. brevis* MB13, dok soj *L. brevis* MB20 pokazuje značajno veću sposobnost adhezije.

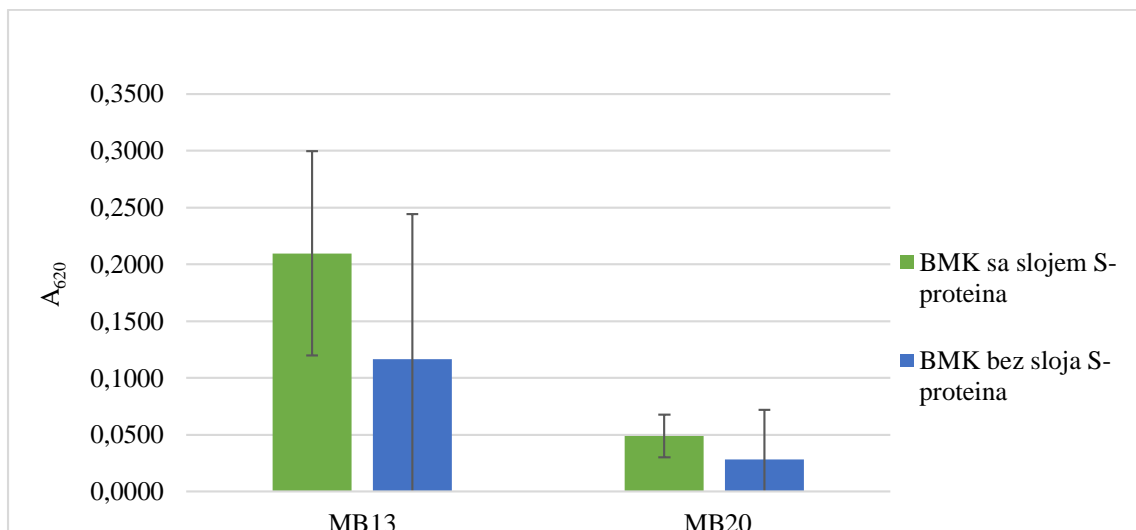
Nakon što su sojevima uklonjeni S-proteini došlo je do značajnog smanjenja adhezije na $0,2 \pm 0,09$ % za soj *L. brevis* MB13 što iznosi 10^5 CFU mL⁻¹ i $2,4 \pm 1,7$ % za soj *L. brevis* MB20, odnosno također 10^5 CFU mL⁻¹. Iz ovih podataka jasno je vidljivo da S-sloj proteina bakterijskih stanica ima značajnu ulogu u adheziji bakterija na stanice crijevnog epitela. Uloga S-sloja u adheziji poznata je već otprije te su dobiveni rezultati u skladu s dostupnim istraživanjima o adheziji probiotičkih sojeva. Frece i sur. (2005) dokazali su da uklanjanje S-sloja proteina ima negativan učinak na adheziju zbog adhezina koji su sadržani u tom sloju te omogućavaju interakciju bakterijama s humanim stanicama.



Slika 5. Adhezija bakterijskih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 na Caco-2 stanice

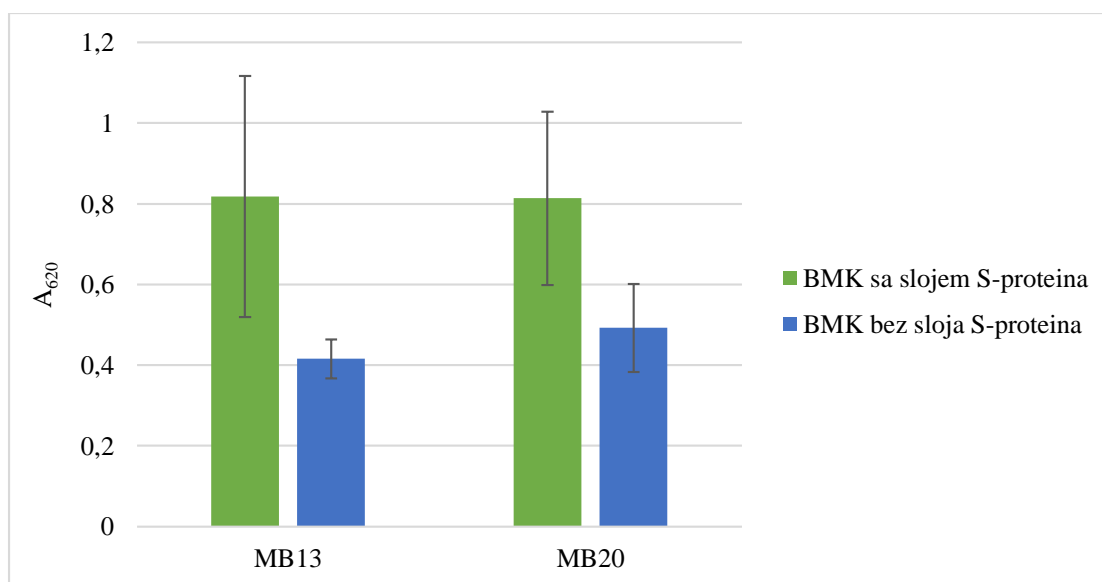
Intestinalne epitelne stanice obložene su ekstracelularnim matriksom koji čine različiti proteini, a među njima se nalaze i laminin, kolagen i fibronektin. Na ove proteine adheziraju se mikroorganizmi u intestinalnom traktu. S obzirom da patogeni mikroorganizmi imaju ligande za vezanje upravo na ove proteine, za probiotičke sojeve bitno je utvrditi imaju li i oni sposobnost adhezije kako bi se mogli natjecati s patogenim mikroorganizmima za vezanje. Ispitana je adhezija probiotičkih bakterijskih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20. Za ove sojeve poznato je da eksprimiraju S-sloj za koji se smatra da ima značajnu ulogu u adheziji bakterijskih stanica. Za svaki soj je eksperiment proveden na dva načina. Prvi način je da su korištene bakterijske stanice s netaknutim površinskim S-slojem, a drugi način je da je površinski S-sloj skinut inkubacijom u gvanidin hidrokloridu. Na taj način dobiveni su rezultati o sposobnosti adhezije sojeva *L. brevis* MB13 i MB20 na proteine ECM-a te o utjecaju S-sloja bakterijskih stanica na adheziju na proteine ECM-a.

Adhezija na laminin promatrana je kod sojeva *L. brevis* MB13 i MB20, sa i bez proteinskog S-sloja. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 6. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se soj *L. brevis* MB13 u nešto većoj mjeri veže za laminin od soja *L. brevis* MB20, međutim oba soja pokazuju dobro vezanje. Također, kod oba soja vidljiva je slabija adhezija bakterijskih stanica kojima je uklonjen S-sloj u odnosu na stanice koje imaju netaknut S-sloj. Iz ovih rezultata, vidljivo je da S-sloj bakterijskih stanica ima ulogu u adheziji probiotičkih sojeva na laminin.



Slika 6. Adhezija sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 na laminin

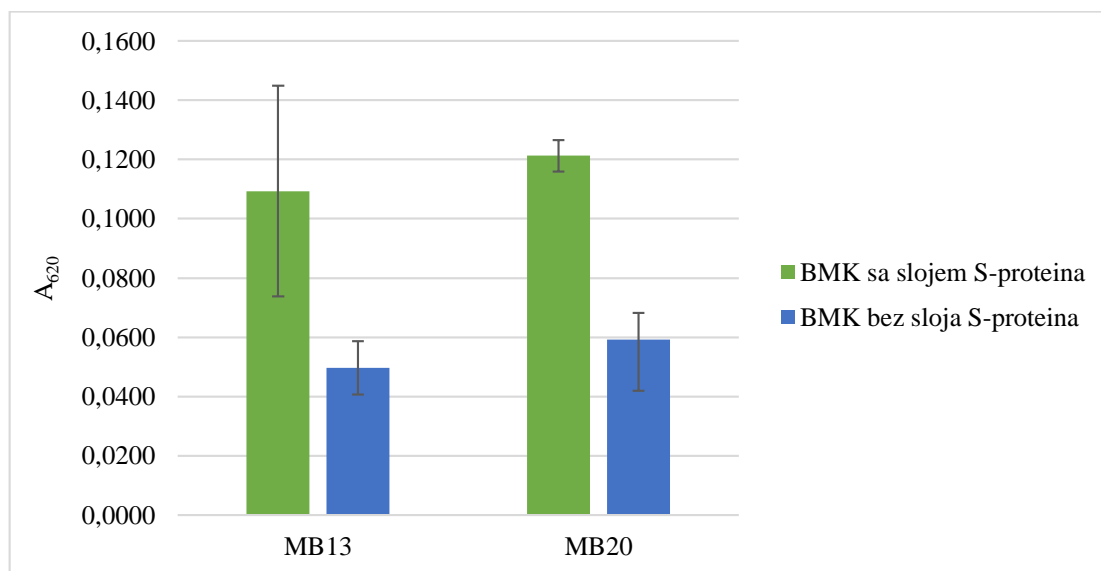
Adhezija na kolagen također je provedena sa sojevima *L. brevis* MB13 i *L. brevis* MB20, u jednoj paraleli s netaknutim S-slojem, a u drugoj paraleli sa skinutim S-slojem. Iz dobivenih podataka prikazanih na slici 7, vidljivo je da se oba soja prilično dobro vežu na kolagen kada posjeduju S-sloj. Međutim, skidanje S-sloja ponovno smanjuje adheziju čime se ponovno dokazuje uloga S-sloja bakterijskih stanica u adheziji na proteine ekstracelularnog matriksa, u ovom slučaju, kolagena.



Slika 7. Adhezija sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 na kolagen

Treći korišteni protein bio je fibronektin. Također su korištena oba soja, *L. brevis* MB13 i *L. brevis* MB20, u varijantama sa i bez S-sloja. Oba soja ponovno pokazuju dobru adheziju na protein kao što je i vidljivo na slici 8. Također, ponovno je uklanjanje S-sloja utjecalo na

adheziju na fibronektin te je ona, kao što je i očekivano, smanjena kod bakterijskih stanica kojima je S-sloj skinut.



Slika 8. Adhezija sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 na fibronektin

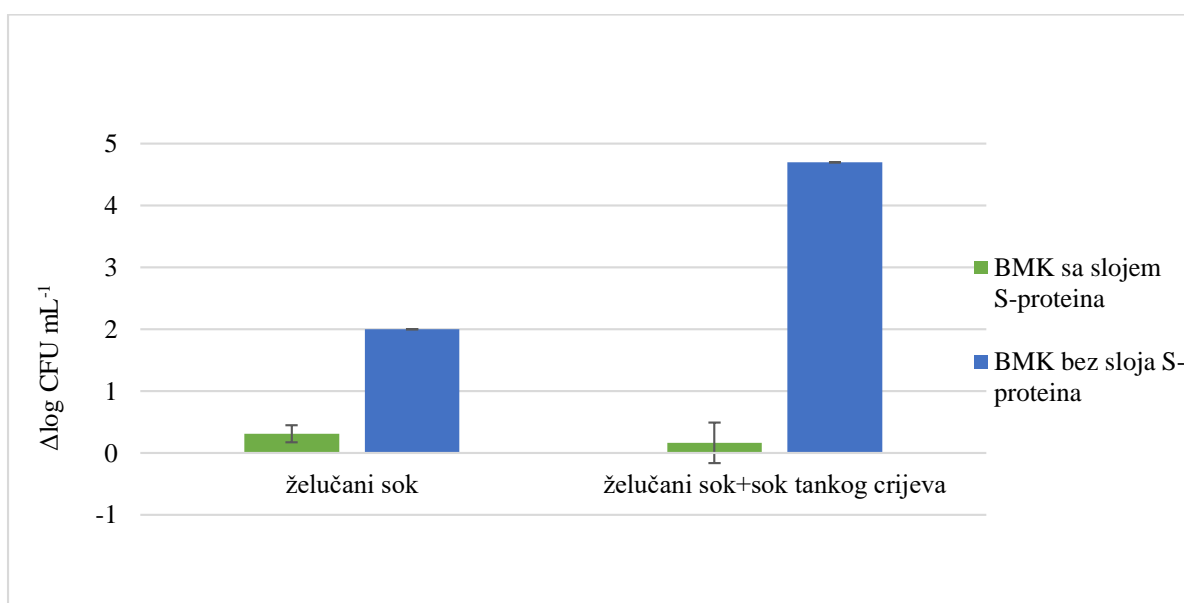
Iz dobivenih rezultata adhezije na proteine ekstracelularnog matriksa – laminin, kolagen i fibronektin može se zaključiti da sojevi *L. brevis* MB13 i MB20 pokazuju dobru adheziju na ove proteine što im omogućava iskazivanje funkcionalnih probiotičkih svojstava. Međutim, adhezija na kolagen puno je veća kod oba soja *L. brevis* u odnosu na adheziju na laminin i fibronektin. Soj *L. brevis* MB13 ima nešto veću adheziju na fibronektin u odnosu na soj *L. brevis* MB20, a soj *L. brevis* MB20 ima nešto veću adheziju na laminin u odnosu na soj *L. brevis* MB13. Također, vidljivo je da S-sloj proteina ima određenu ulogu u adheziji na proteine ECM-a te njegov izostanak adheziju na proteine ECM-a smanjuje za oko 50 %. Rezultati dobre adhezije sojeva *L. brevis* na proteine ECM-a te smanjenje adhezije prilikom uklanjanja S-sloja proteina u skladu je s rezultatima istraživanja Banić i sur. (2018) koje je također potvrdilo da je upravo S-sloj proteina bakterijskih stanica odgovoran za adheziju na proteine ECM-a. Također, Muscariello i sur. (2020) ispitivali su ulogu S-sloja proteina kod različitih vrsta bakterija roda *Lactobacillus* te su također došli do rezultata da je S-sloj najodgovorniji za uspješnu adheziju na proteine ECM-a.

4.2. PREŽIVLJAVANJE U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

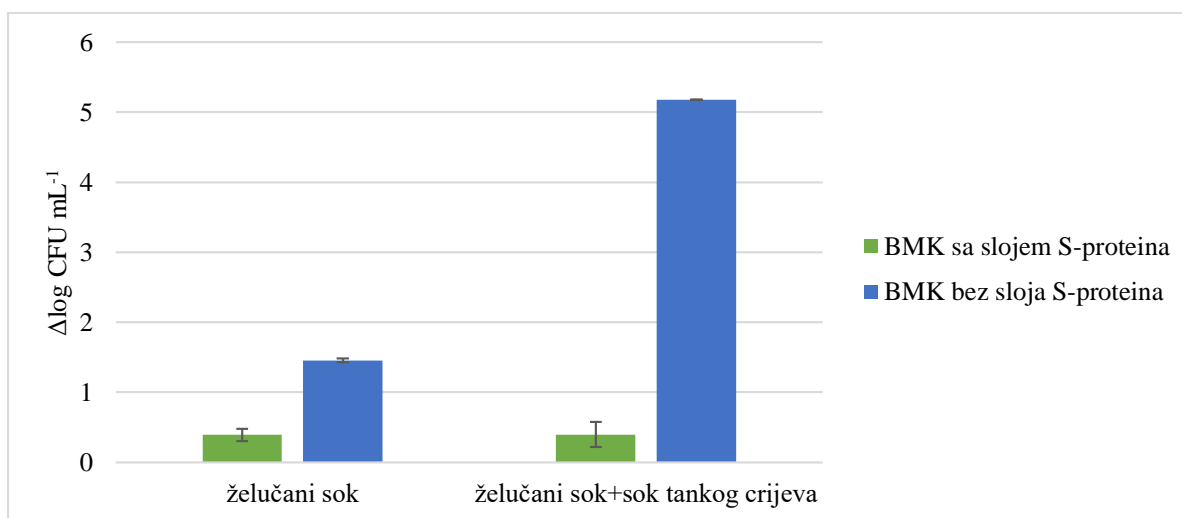
Gastrointestinalni trakt je ciljno mjesto djelovanja probiotičkih sojeva. Međutim, u GIT-u prevladavaju nepovoljni uvjeti kao što su niski pH i djelovanje toksičnih žučnih soli. Zbog

toga je neophodno da probiotički sojevi imaju sposobnost preživljavanja ovih uvjeta kako bi mogli iskazati svoje pozitivno djelovanje na zdravlje domaćina.

U ovom radu ispitana je sposobnost preživljavanja probiotičkih bakterijskih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 za koje je poznato da posjeduju S-sloj proteina u simuliranim uvjetima GIT-a. Također, ispitan je i utjecaj površinskog S-proteina na preživljavanje u uvjetima GIT-a. U eksperimentu je praćeno preživljavanje sojeva sa i bez S-proteina nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku i nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 9 i 10 kao promjena broja živih stanica, odnosno na grafovima je prikazana smrtnost bakterijskih stanica tijekom provođenja eksperimenta.



Slika 9. Smrtnost stanica soja *Levilactobacillus brevis* MB13 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta



Slika 10. Smrtnost stanica soja *Levilactobacillus brevis* MB20 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

L. brevis sojevi MB13 i MB20 koji posjeduju sloj S-proteina pokazuju dobro preživljavanje u simuliranim uvjetima GIT-a jer je njihovo preživljavanje iznad 10^6 CFU mL⁻¹, a to je minimalan potreban broj bakterijskih stanica za iskazivanje probiotičkih svojstava. S druge strane, uklanjanje S-proteina sojevima *L. brevis* MB13 i MB20 uzrokuje znatno veću smrtnost već kod djelovanja simuliranog želučanog soka, a nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva nije preživjela nijedna bakterijska stanica.

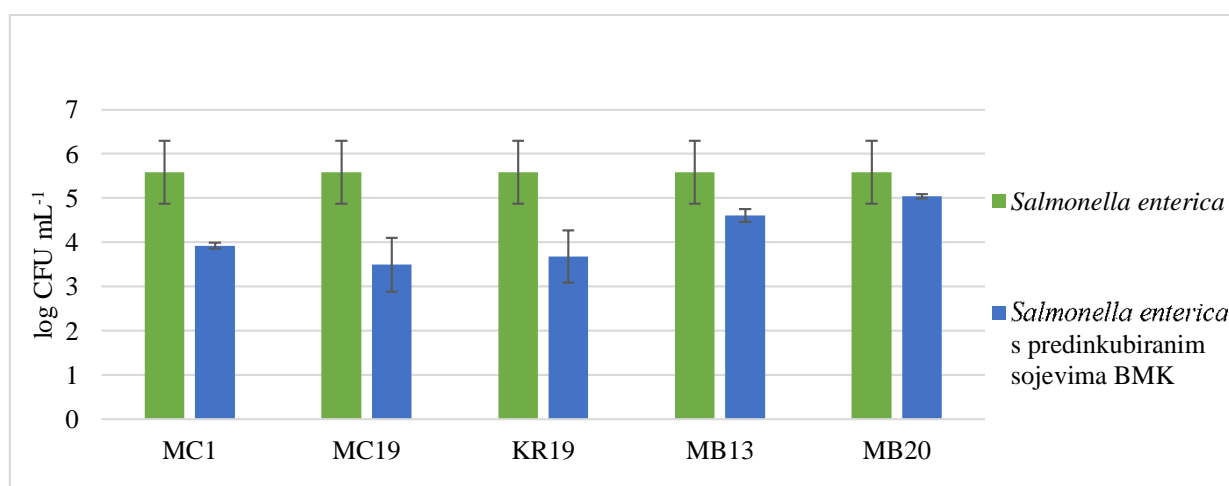
Iz dobivenih rezultata vidljivo je da oba ispitivana bakterijska soja *L. brevis*, MB13 i MB20, imaju dobro preživljavanje u uvjetima GIT-a i kao takvi se mogu koristiti kao probiotički sojevi. Također, ovi rezultati ukazuju na to da S-sloj bakterijskih stanica ima značajnu ulogu u preživljavanju nepovoljnih uvjeta GIT-a što je u skladu s dosad poznatim istraživanjima o zaštitnoj ulozi S-sloja proteina kod bakterijskih stanica (Alp i sur., 2020; Banić i sur., 2018). Također, s obzirom da su ispitivani sojevi izolirani iz majčinog mlijeka na ovaj način je potvrđeno da je majčino mlijeko odgovorno za kolonizaciju GIT-a novorođenog djeteta te da ima značajnu ulogu u stvaranju mikrobiote novorođenčeta te razvoju njegovog imunološkog sustava (Jakaitis i Denning, 2014).

4.3. KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA PATOGENA *S. enterica* serovar Typhimurium s BMK

Otkriće antibiotika jedno je od najvažnijih postignuća u medicini, međutim s vremenom je upotreba antibiotika postala sve raširenija te su se bakterije prilagodile takvim uvjetima u okolini i postale rezistentne na sve veći broj antibiotika što stvara velike probleme u medicini.

Antibiotska rezistencija bakterija roda *Salmonella*, a posebice patogene bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium predstavlja značajnu prijetnju zdravlju i sigurnosti hrane s obzirom da je najčešći uzročnik infekcija kod ljudi i životinja diljem svijeta (Wang i sur., 2019). Međutim, da bi enteropatogeni mikroorganizmi izazvali infekciju, oni moraju prijeći barijeru crijevne sluznice prije kolonizacije GIT-a (Lièvin-Le Moal i Servin, 2006). Nakon što patogeni mikroorganizmi prodru u sloj sluznice koja prekriva crijevni epitel, vežu se na mjesta vezanja na epitelnim stanicama i zatim slijedi kolonizacija crijeva i infekcija (van Zyl i sur., 2020). Probiotici s adhezijskim sposobnostima štite crijeva od enteričkih infekcija sprječavajući vezanje patogena te su rezultati *in vitro* studija sposobnost probiotičkih BMK kompetitivne ekskluzije patogena.

S obzirom na dosad poznate činjenice o potencijalu BMK u suzbijanju adhezije patogenih mikroorganizama, u ovom radu je ispitano antimikrobno djelovanje probiotičkih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13, *Levilactobacillus brevis* MB20, *Limosilactobacillus fermentum* MC1, *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 i *Lactiplantibacillus plantarum* KR19 prema test-mikroorganizmu *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1. Kompetitivna ekskluzija sojevima *L. brevis* MB13 i MB20 ispitana je na dva načina pri čemu su u jednom eksperimentu korišteni intaktni sojevi, a u drugom je sojevima skinut S-sloj te je ispitana uloga S-sloja u kompetitivnoj ekskluziji patogene bakterije. Sojevi *L. plantarum* MC19 i KR19 te *L. fermentum* MC1 ne posjeduju S-sloj proteina. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 11 i 12.



Slika 11. Kompetitivna ekskluzija bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 sa sojevima *L. brevis* MB13 i MB20, *L. plantarum* MC19 i KR19 te *L. fermentum* MC1

Na slici 11 prikazani su rezultati kompetitivne ekskluzije test-mikroorganizma *S. enterica* serovar Typhimurium s različitim sojevima BMK. Rezultati su prikazani kao

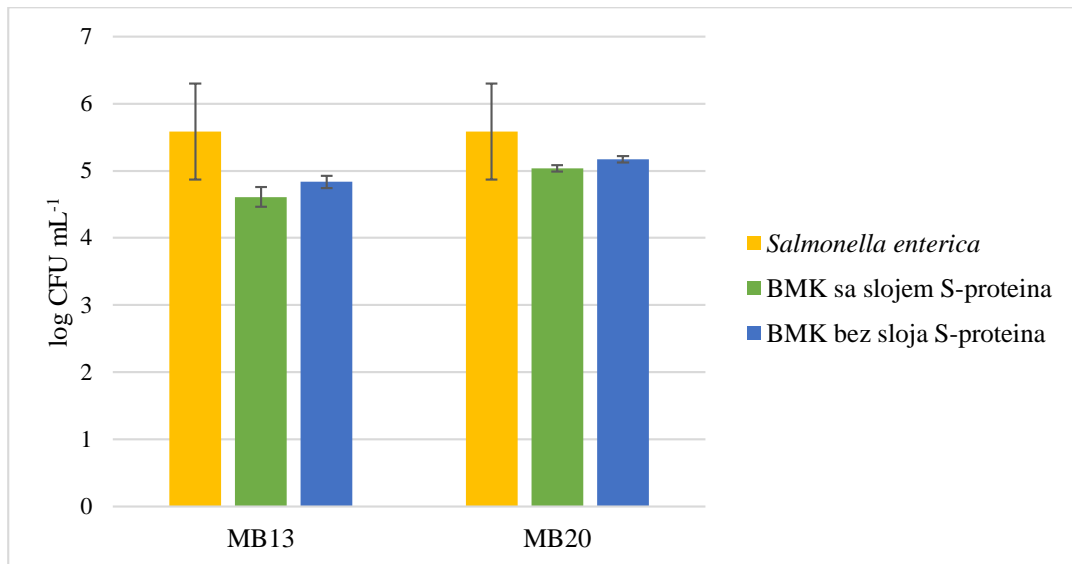
usporedba adhezije *S. enterica* serovar Typhimurum na Caco-2 stanice bez prisutnosti BMK i adhezije *S. enterica* serovar Typhimurum u slučaju kad je provedena predinkubacija Caco-2 stanica s pojedinim sojevima BMK. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je najveće smanjenje adhezije bakterije *S. enterica* serovar Typhimurum u prisutnosti sojeva *L. plantarum* MC19 i KR19, nešto manji je utjecaj soja *L. fermentum* MC1, dok sojevi *L. brevis* MB13 i MB20 imaju za jednu logaritamsku jedinicu više adheziranih stanica *S. enterica* serovar Typhimurum što znači da imaju nešto slabiji učinak na sprječavanje adhezije *S. enterica* serovar Typhimurum. Kod sojeva *L. plantarum* MC19 i KR19 adhezija je smanjena za 99,17 % i 98,98 %, a kod *L. fermentum* MC1 za 98,84 %. S druge strane, kod sojeva *L. brevis* MB13 i MB20 adhezija patogene bakterije smanjena je za 94,2 %, odnosno za 86,24 %. Iz ovih podataka vidljivo je da *L. brevis* MB13 i MB20 sojevi imaju nešto slabiji učinak kompetitivne ekskluzije *S. enterica* serovar Typhimurium od sojeva *L. plantarum* MC19 i KR19 te *L. fermentum* MC1.

Rezultati dobiveni za sojeve *L. plantarum* u skladu su s rezultatima istraživanja koje su proveli Potočnjak i sur. (2017) pri čemu je broj stanica bakterije *S. enterica* serovar Typhimurium u prisutnosti BMK (10^4 CFU mL⁻¹) značajno manji od broja adheziranih stanica bez prisutnosti BMK (10^5 CFU mL⁻¹). U ovom istraživanju broj stanica *S. enterica* serovar Typhimurium u prisutnosti sojeva *L. plantarum* MC19 i KR19 smanjen je čak na 10^3 CFU mL⁻¹ što ukazuje na značajnu antibakterijsku aktivnosti ovih sojeva prema ispitivanom test-mikroorganizmu. Također, Luz i sur. (2021) su izolirali sojeve *L. plantarum* iz majčinog mlijeka i sojevi su iskazali značajnu antimikrobnu aktivnost i to ne samo prema *S. enterica* serovar Typhimurium, nego i prema drugim patogenim bakterijama kao što su *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Clostridium perfringens*. Smatra se da *L. plantarum* sojevi posjeduju specifične adhezijske proteine na svojoj površini koji se vežu na manozu koja se nalazi u mukoznom gelu (Lebeer i sur., 2008).

L. fermentum MC1 također pokazuje značajni inhibicijski efekt prema bakteriji *S. enterica* serovar Typhimurium što je u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Sophatha i sur. (2020) gdje su također dokazani značajni antimikrobni učinci bakterija vrste *L. fermentum* prema patogenim vrstama bakterija. Smatra se da je za adheziju *L. fermentum* odgovorna ekspresija mub (engl. *mucus binding protein*), fbp (engl. *fibronectin binding protein*) i sor (sortaza) gena (Archer i sur., 2018).

Rezultati dobiveni za sojeve *L. brevis* MB13 i MB20 također su u skladu s dosad provedenim istraživanjima kompetitivne ekskluzije *S. enterica* serovar Typhimurium s vrstama *L. brevis* (Butorac i sur., 2020; Yu i sur., 2011) pri čemu ova vrsta BMK iskazuje inhibicijski

učinak prebakteriji *S. enterica* serovar Typhimurium.



Slika 12. Kompetitivna ekskluzija bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 sa sojevima *L. brevis* MB13 i MB20 sa i bez S-sloja

Ekspiriment kompetitivne ekskluzije patogene bakterije *S. enterica* serovar Typhimurium FP1 za sojeve *L. brevis* MB13 i MB20 kao što je već spomenuto proveden je na dva načina. U jednoj paraleli korišteni su normalni sojevi dok je u drugoj paraleli sojevima skinut S-sloj kako bi se ispitao učinak S-sloja na kompetitivnu ekskluziju patogenih vrsta. Dobiveni rezultati, prikazani na slici 12, ukazuju na to da uklanjanje S-sloja smanjuje inhibicijski učinak BMK prema *S. enterica* serovar Typhimurium FP1. Ovakvi rezultati su u skladu s očekivanjima s obzirom da je uloga S-sloja u adheziji na Caco-2 stanice ispitana i dokazana u mnogim istraživanjima (Klotz i sur., 2020; Banić i sur., 2018). Također, Lau i Chye (2018) te Meng i sur. (2017) dokazali su da uklanjanje S-sloja *Lactobacillus* spp. smanjuje njihovu sposobnost sprječavanja adhezije patogenih mikroorganizama na crijevne stanice.

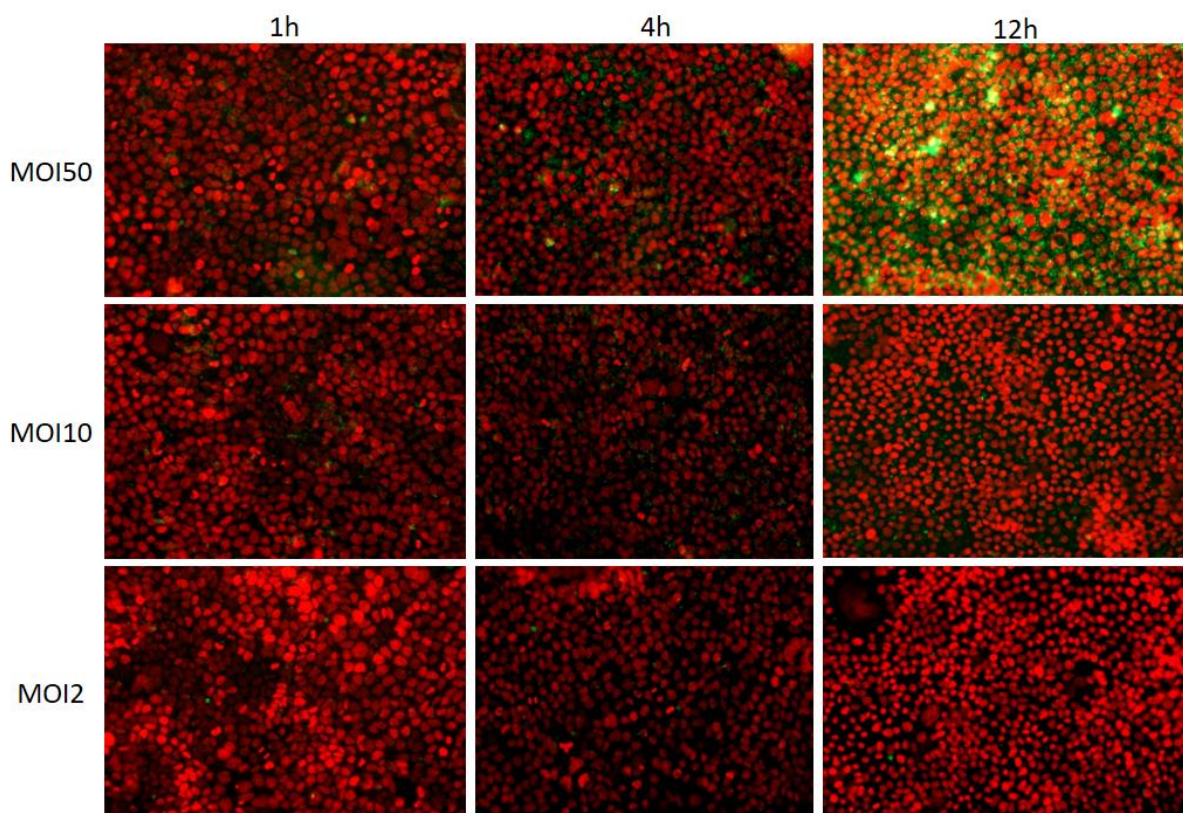
4.4. VIZUALIZACIJA ADHEZIJE BMK NA CACO-2 STANIČNI MONOSLOJ

Vizualizacija adhezije provedena je na fluorescentnom mikroskopu za sojeve ispitivane i kod kompetitivne ekskluzije, a obuhvaća sojeve *Lactiplantibacillus plantarum* KR19 i MC19 te soj *Limosilactobacillus fermentum* MC1 i to za MOI 50, 10 i 2 u vremenskim razmacima od 1 h, 4 h i 12 h inkubacije.

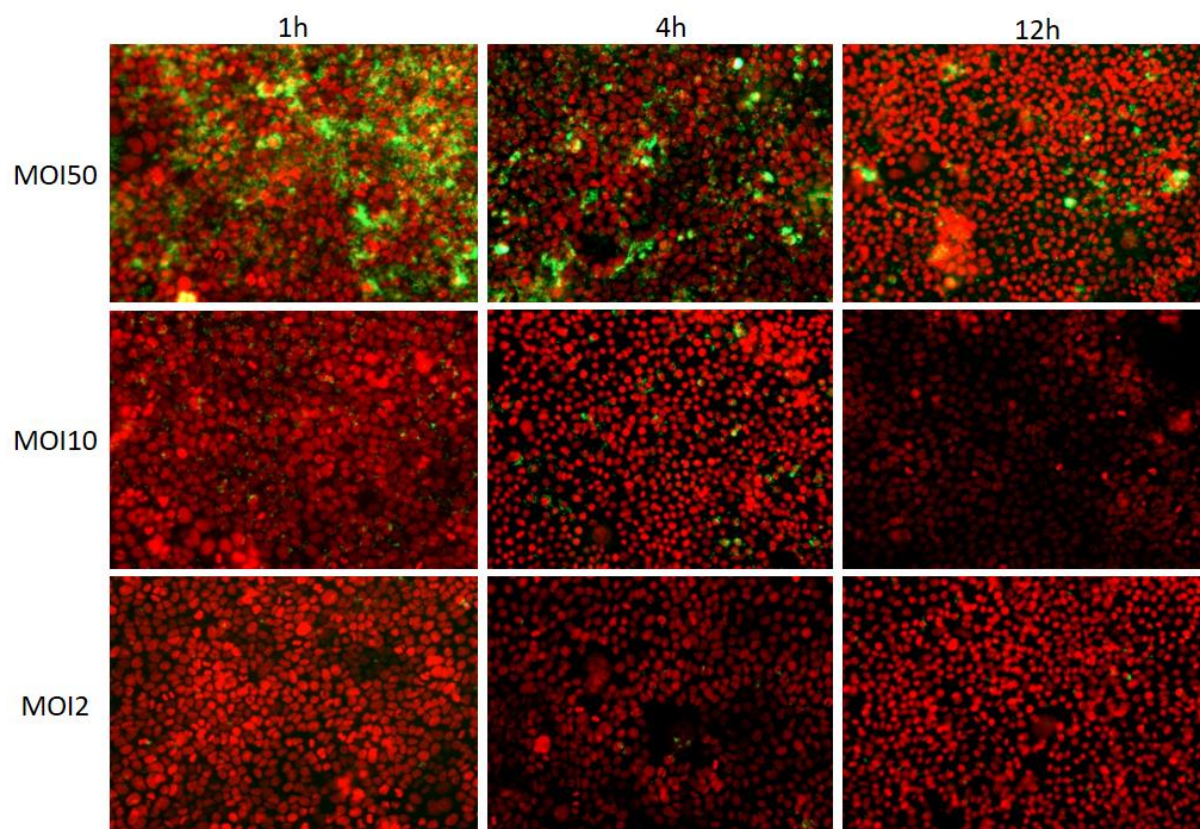
Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 13-15. Rezultati ukazuju na to da sojevi *L. plantarum* KR19 i MC19 iskazuju značajniju adheziju na Caco-2 stanice u odnosu na soj *L. fermentum* MC1 kod kojeg je adheziran izuzetno mali broj stanica. Ovi rezultati mogu se

povezati s rezultatima dobivenim kod kompetitivne ekskuzije patogena *S. enterica* serovar Typhimurium s obzirom da je kod soja *L. fermentum* MC1 vidljiva značajno manja adhezija na Caco-2 stanice što je u skladu i s njegovom slabijom kompetitivnom ekskluzijom patogena u odnosu na sojeve *L. plantarum* MC19 i KR19.

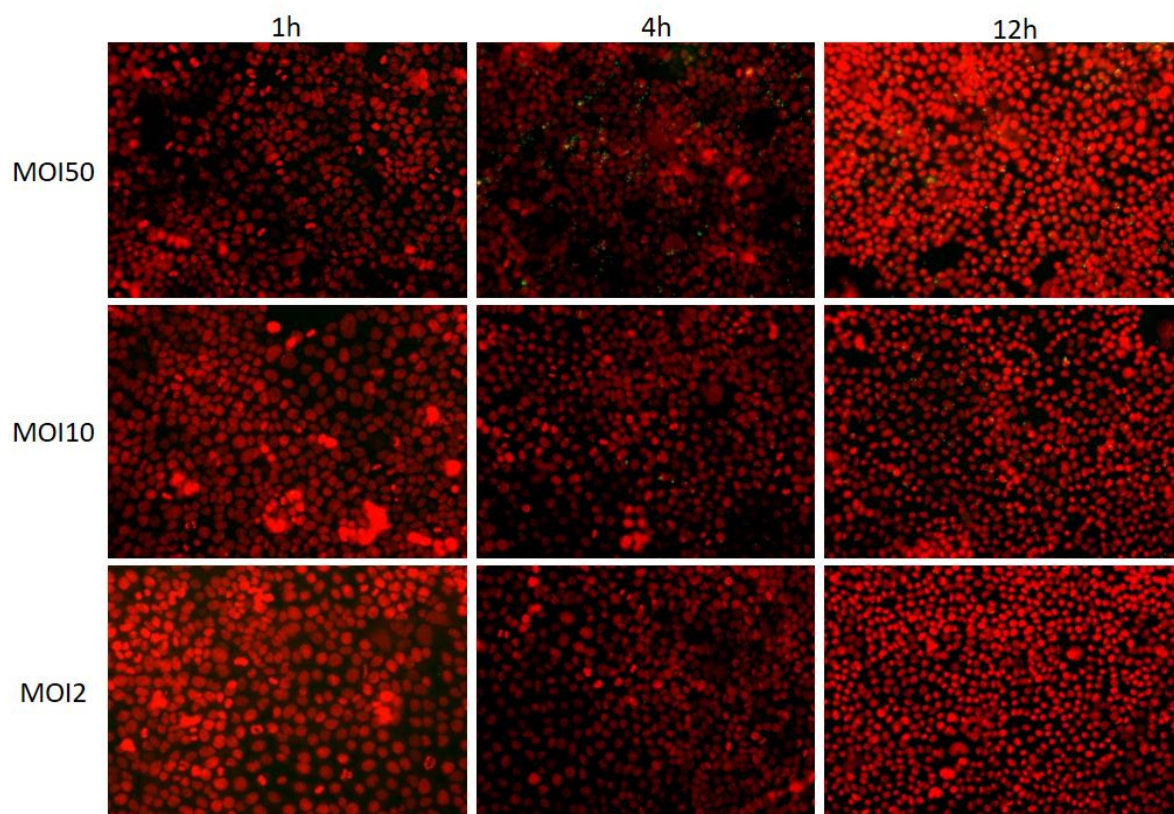
Također, vidljivo da soj *L. fermentum* MC1 ne stvara agregate stanica što je u skladu s istraživanjem koje su proveli Archer i sur. (2018) za sojeve vrste *L. fermentum*. S druge strane, sojevi *L. plantarum* MC19 i KR19 stvaraju agregate stanica što je jasno vidljivo na slikama te je u skladu s poznatim rezultatima istraživanja autora Janković i sur. (2012) koji su dokazali stvaranje agregata stanica kod vrsta *L. plantarum*. Međutim, između ta dva soja *L. plantarum*, KR19 i MC19, također je vidljiva razlika u stvaranju agregata. Naime, soj *L. plantarum* KR19 agregate ne stvara odmah, nego je značajna agregacija stanica vidljiva s vremenom, a najviše tek nakon 12 h inkubacije, dok soj *L. plantarum* MC19 najznačajniju agregaciju ima već nakon 1 h inkubacije te s vremenom dolazi do raspadanja agregiranih stanica na pojedinačne.



Slika 13. Vizualizacija adhezije soja *Lactiplantibacillus plantarum* KR19 na Caco-2 stanice s MOI 50, 10 i 2 nakon 1 h, 4 h i 12 h



Slika 14. Vizualizacija adhezije soja *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 na Caco-2 stanice s MOI 50, 10 i 2 nakon 1 h, 4 h i 12 h



Slika 15. Vizualizacija adhezije soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 na Caco-2 stanice s MOI 50, 10 i 2 nakon 1 h, 4 h i 12 h

5. ZAKLJUČCI

1. Ispitivanjem adhezije sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 na Caco-2 stanice te ispitivanjem uloge S-sloja proteina u adheziji dokazano je da sojevi *L. brevis* MB13 i MB20 imaju dobra adhezijska svojstva te da je za sposobnost adhezije ovih sojeva BMK odgovoran S-sloj proteina.

2. Rezultati dobiveni u eksperimentu ispitivanja adhezije sojeva *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 na proteine ekstracelularnog matriksa – laminin, fibronektin i kolagen te uloge S-sloja proteina u adheziji pokazuju da se ovi sojevi dobro vežu na proteine ECM-a te je ponovno dokazana značajna uloga S-sloja i u adheziji na proteine ECM-a.

3. Sojevi *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20 uspješno preživljavaju u nepovoljnim uvjetima GIT-a. Smanjenjem preživljavanja nakon uklanjanja S-sloja proteina dokazana je zaštitna uloga S-sloja od nepovoljnih uvjeta.

4. Dokazana je sposobnost kompetitivne ekskluzije test-mikroorganizma *S. enterica* serovar Typhimurium FP1 sojevima *Levilactobacillus brevis* MB13 i MB20, *Limosilactobacillus fermentum* MC1 te *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 i KR19. Također, dokazano je i da uklanjanje S-sloja proteina smanjuje sposobnost kompeticije s patogenom za vezna mjesta.

5. Vizualizacijom adhezije sojeva *Limosilactobacillus fermentum* MC1 te *Lactiplantibacillus plantarum* MC19 i KR19 na Caco-2 stanice dokazano je da se ovi sojevi adheziraju na Caco-2 stanice pri čemu *L. fermentum* MC1 ne stvara agregate stanica dok sojevi *L. plantarum* MC19 i KR19 stvaraju agregate stanica, odnosno imaju sposobnost autoagregacije.

6. LITERATURA

Ahmed E, Holmström SJ (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol* **7**, 196–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117>

Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM (2000) Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microb* **66**, 2001–2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>

Alp D, Kuleaşan H (2019) Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World J Microb Biot* **35**, 156. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2730-x>

Alp D, Kuleaşan H, Korkut Altıntaş A (2020) The importance of the S-layer on the adhesion and aggregation ability of Lactic acid bacteria. *Mol Biol Rep* **47**, 3449–3457. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05430-6>

American Academy of Pediatrics (AAP) (2012) Breastfeeding and the use of human milk section on breastfeeding. *Pediatrics* **129**, 827–841. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>

Antikainen J, Anton L, Sillanpää J, Korhonen TK (2002) Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Mol Microbiol* **46**, 381–394. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03180.x>

Archer AC, Kurrey NK, Halami PM (2018) In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *J Appl Microbiol* **125**, 243–256. <https://doi.org/10.1111/jam.13757>

Asnicar F, Manara S, Zolfo M, Truong DT, Scholz M, Armanini F i sur. (2017) Studying Vertical Microbiome Transmission from Mothers to Infants by Strain-Level Metagenomic Profiling. *mSystems* **2**, e00164-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00164-16>

Banić M, Uroić K, Leboš Pavunc A, Novak J, Zorić K, Durgo K i sur. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT-Food Sci Technol* **93**, 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.054>

Bemena LD, Mohamed LA, Fernandes AM, Lee BH (2014) Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *Int J Curr Microbiol App Sci* **3**, 924-949.

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A (2012) Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* **61**, 160-174. <https://doi.org/10.1159/000342079>

Bintsis T (2018) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology* **4**, 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>

Butorac K, Banić M, Novak J, Leboš-Pavunc A, Uroić K, Durgo K i sur. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microb Cell Fact* **19**, 106. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01365-6>

Castro-Bravo N, Wells JM, Margolles A, Ruas-Madiedo P (2018) Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Front Microbiol* **9**, 2426. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426>

Chikindas ML., Weeks R, Drider D, Chistyakov VA, Dicks LM (2018) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr Opin Biotech* **49**, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.011>

Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S (2005) Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *J Food Protect* **68**, 2672–2678. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.12.2672>

D'Amelio P, Sassi F (2018) Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcified Tissue Int* **102**, 415-425. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>

Dicks LM, Botes M (2010) Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Benef Microbes* **1**, 11-29. <https://doi.org/10.3920/BM2009.0012>

Dieterich W, Schink M, Zopf Y (2018) Microbiota in the Gastrointestinal Tract. *Med Sci (Basel)* **6**, 116. <https://doi.org/10.3390/medsci6040116>

Duarte C, Gudiña EJ, Lima CF, Rodrigues LR (2014) Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells. *AMB Express* **4**, 40. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0040-0>

Fonseca HC, de Sousa Melo D, Ramos CL, Dias DR, Schwan RF (2021) Probiotic Properties of Lactobacilli and Their Ability to Inhibit the Adhesion of Enteropathogenic Bacteria to Caco-2 and HT-29 Cells. *Probiotics Antimicro* **13**, 102–112. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09659-2>

Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrša V, Šušković J (2005) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **98**, 285- 292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02473.x>

Gavin A, Ostovar K (1977) Microbiological characterization of human milk. *J Food Protect* **40**, 614–616. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-40.9.614>

Gerbino E, Carasi P, Mobili P, Serradell MA, Gómez-Zavaglia A (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World J Microb Biot* **31**, 1877–1887. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1952-9>

González-Rodríguez I, Sánchez B, Ruiz L, Turróni F, Ventura M, Ruas-Madiedo P, i sur. (2012) Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl Environ Microb* **78**, 3992–3998. <https://doi.org/10.1128/AEM.08024-11>

Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A (2018) Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health (A Review), *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research* **5**, 411-424.

Heikkilä MP, Saris PE (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* **95**, 471-478. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02002.x>

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* **291**, 881–884. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.291.5505.881>

Hurley WL, Theil, PK (2011) Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* **3**, 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>

Jakaitis BM, Denning PW (2014) Human breast milk and the gastrointestinal innate immune system. *Clinic Perinatol* **41**, 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2014.02.011>

Janković T, Frece J, Abram M, Gobin I (2012) Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research* **6**, 19-24. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:942933>

Jara S, Sánchez M, Vera R, Cofré J, Castro E (2011) The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. *Anaerobe* **17**, 474-477. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.07.008>

Kajikawa A, Midorikawa E, Masuda K (2016) Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. *BMC Microbiol* **16**, 49. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0667-x>

Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM (2013) Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr* **2013**, 481651. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>

Kim JY, Woo HJ, Kim YS, Kim KH, Lee HJ (2003) Cell cycle dysregulation induced by cytoplasm of *Lactococcus lactis* ssp *lactis* in snuc2a, a colon cancer cell line. *Nutr Cancer* **46**, 197–201. https://doi.org/10.1207/S15327914NC4602_13

Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S (2004) Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **80**, 1342–1352. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1342>

Klotz C, Goh YJ, O’Flaherty S, Barrangou R (2020) S-layer associated proteins contribute to the adhesive and immunomodulatory properties of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *BMC Microbiol* **20**, 248. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01908-2>

Knaus UG, Hertzberger R, Pircalabioru GG, Yousefi SP, Branco Dos Santos F (2017) Pathogen control at the intestinal mucosa - H₂O₂ to the rescue. *Gut microbes* **8**, 67–74. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1279378>

Kramer MS, Guo T, Platt RW, Sevkovskaya Z, Dzikovich I, Collet JP, et al. (2003) Infant growth and health outcomes associated with 3 compared with 6 mo of exclusive breastfeeding. *Am J Clin Nutr* **78**, 291–295. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.2.291>

Ladomenou F, Moschandreas J, Kafatos A, Tselentis Y, Galanakis E (2010) Protective effect of exclusive breastfeeding against infections during infancy: A prospective study. *Arch Dis Child* **95**, 1004–1008. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.2009.169912>

Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodriguez JM, Boza J, Xaus J (2007) Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Brit J Nutr* **98**, 96–100. <https://doi.org/10.1017/S0007114507832910>

Lau LY, Chye FY (2018) Antagonistic effects of *Lactobacillus plantarum* 0612 on the adhesion of selected foodborne enteropathogens in various colonic environments. *Food Control* **91**, 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.001>

Law BA (1999) Cheese ripening and cheese flavour technology. U: Law BA (ured.) Technology of Cheesemaking, Sheffield Academic Press, Sheffield, str. 163–192.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol R* **72**, 728–764. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00017-08>

Liévin-Le Moal V, Servin AL (2006) The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiol Rev* **19**, 315–337. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.315-337.2006>

Lima BP, Kho K, Nairn BL, Davies JR, Svensäter G, Chen R (2019) Streptococcus gordonii Type I Lipoteichoic Acid Contributes to Surface Protein Biogenesis. *mSphere* **4**, e00814-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00814-19>

Łubiech K, Twarużek M (2020) *Lactobacillus* Bacteria in Breast Milk. *Nutrients*, **12**, 3783. <https://doi.org/10.3390/nu12123783>

Luz C, Calpe J, Quiles JM, Torrijos R, Vento M, Gormaz M (2021) Probiotic characterization of Lactobacillus strains isolated from breast milk and employment for the elaboration of a fermented milk product. *J Funct Food* **84**, 104599. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104599>

Lyons KE, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C (2020) Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients* **12**, 1039. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>

Mackenzie DA, Tailford LE, Hemmings AM, Juge N (2009) Crystal structure of a mucus-binding protein repeat reveals an unexpected functional immunoglobulin binding activity. *J Biol Chem* **284**, 32444–32453. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040907>

Markande AR, Patel D, Varjani S (2021) A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technol* **330**, 124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>

Martín R, Heilig G, Zoetendal E, Smidt H, Rodríguez J (2007) Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol* **103**, 2638–2644. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03497.x>

Mathur H, Beresford TP, Cotter PD (2020) Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients* **12**, 1679. <https://doi.org/10.3390/nu12061679>

Meng J, Zhang Q, Lu R (2017) Surface layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM inhibit intestinal pathogen-induced apoptosis in HT-29 cells. *Int J Biol Macromol* **96**, 766–774. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.085>

Milani C, Mancabelli L, Lugli GA, Duranti S, Turrone F, Ferrario C i sur. (2015) Exploring vertical transmission of bifidobacteria from mother to child. *Appl Environ Microb* **81**, 7078–7087. <https://doi.org/10.1128/AEM.02037-15>

Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A (2019) Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biot* **103**, 6463–6472. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>

Murphy K, Curley D, O’Callaghan TF, O’Shea CA, Dempsey EM, O’Toole PW i sur. (2017) The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Sci Rep - UK* **7**, 40597. <https://doi.org/10.1038/srep40597>

Muscariello L, De Siena B, Marasco R (2020) *Lactobacillus* Cell Surface Proteins Involved in Interaction with Mucus and Extracellular Matrix Components. *Curr Microbiol* **77**, 3831–3841 <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02243-5>

Neville BA, Forde BM, Claesson MJ, Darby T, Coghlan A, Nally K, i sur. (2012) Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by *Lactobacillus ruminis* and related motile *Lactobacilli*. *PLoS One* **7**, 40592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040592>

Ohland CL, Macnaughton WK (2010) Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol - Gastr L* **298**, 807–819. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00243.2009>

Ojo-Okunola A, Nicol M, du Toit E (2018) Human Breast Milk Bacteriome in Health and Disease. *Nutrients* **10**, 1643. <https://doi.org/10.3390/nu10111643>

Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J (2006) Antimicrobial potential of four lactobacillus strains isolated from breast milk. *Appl Microbiol* **101**, 72–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02981.x>

O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C (2012) Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol* **152**, 189-205. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025>

Ouwehand AC, Salminen S, Tölkö S, Roberts P, Ovaska J, Salminen E (2002) Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin Diag Lab Immun* **9**, 184–186. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.1.184-186.2002>

Perez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P (2010) In vitro immunomodulatory activity of lactobacillus fermentum cect5716 and lactobacillus salivarius cect5713: Two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* **215**, 996–1004. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.01.004>

Piepenbrink KH, Sundberg EJ (2016) Motility and adhesion through type IV pili in gram-positive bacteria. *Biochem Soc T* **44**, 1659–1666. <https://doi.org/10.1042/BST20160221>

Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A (2019) Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr* **10**, 49-66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa042>

Potočnjak M, Pušić P, Frece J, Abram M, Janković T, Gobin I (2017) Three New *Lactobacillus plantarum* Strains in the Probiotic Toolbox against Gut Pathogen *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Food Technol Biotech* **55**, 48–54. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.01.17.4693>

Rajoka MSR, Mehwish HM, Siddiq M, Haobin Z, Zhu J, Yan L, i sur. (2017) Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *Lebensm Wiss Technol* **84**, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.055>

Rojas M, Ascencio F, Conway PI (2002) Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl Environ Microb* **68**, 2330–2336. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2330-2336.2002>

Rolfe RD (1991) Population dynamics of the intestinal tract. U: Blankenship LC (ured.) Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry, Academic Press, San Diego, str. 59–75.

Sara M, Sleytr UB (2000) S-layer proteins. *J Bacteriol* **182**, 859–868. <https://doi.org/10.1128/JB.182.4.859-868.2000>

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>

Sleytr UB, Pum D, Schuster B, Sara M (2001) Molecular Nanotechnology and Nanobiotechnology with Two-Dimensional Protein Crystals (S-Layers) U: Rossof M (ured.) Nano-Surface Chemistry, Marcel Dekker, New York, str. 333-389.

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D (2014) S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 823-64. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12063>

Sophatha B, Piwat S, Teanpaisan R (2020) Adhesion, anti-adhesion and aggregation properties relating to surface charges of selected *Lactobacillus* strains: study in Caco-2 and H357 cells. *Arch Microbiol* **202**, 1349–1357. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01846-7>

Toh H, Oshima K, Nakano A, Takahata M, Murakami M, Takaki T, i sur. (2013) Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One* **8**, 75073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075073>

Turroni F, Ventura M, Butto LF, Duranti S, O'Toole PW, Motherway MO, Sinderen D (2014) Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cell Mol Life Sci* **71**, 183–203. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1318-0>

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>

Vaca DJ, Thibau A, Schütz M (2020) Interaction with the host: the role of fibronectin and extracellular matrix proteins in the adhesion of Gram-negative bacteria. *Med Microbiol Immun* **209**, 277–299. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00644-3>

van Zyl WF, Deane SM, Dicks L (2020). Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut microbes*, **12**, 1831339. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1831339>

Victoria CG, Bahl R, Barros AJ, França GV, Horton S, Krasevec J, Murch S, Sankar MJ, Walker N, Rollins NC, Lancet Breastfeeding Series Group (2016) Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* **387**, 475-490. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)

Walker WA, Iyengar RS (2015) Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Res* **77**, 220–228. <https://doi.org/10.1038/pr.2014.160>

Wang X, Biswas S, Paudyal N, Pan H, Li X, Fang W, Yue M (2019) Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016. *Front Microbiol* **10**, 985. doi: 10.3389/fmicb.2019.00985

Yadav AK, Tyagi A, Kaushik JK, Saklani AC, Grover S, Batish VK (2013) Role of surface layer collagen binding protein from indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen. *Microbiol Res* **168**, 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.05.003>

Yan F, Polk DB (2011) Probiotics and immune health. *Curr Opin Gastroen* **27**, 496–501. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32834baa4d>

Yu Q, Wang Z, Yang Q (2011) Ability of *Lactobacillus* to inhibit enteric pathogenic bacteria adhesion on Caco-2 cells. *World J Microb Biot* **27**, 881–886. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0530-4>

Zielińska D, Długosz E, Zawistowska-Deniziak A (2019) Functional Properties of Food Origin *Lactobacillus* in the Gastrointestinal Ecosystem—In Vitro Study. *Probiotics Antimicro* **11**, 820–829. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9458-z>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja VALENTINA RIBIĆ 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.

Valentina Ribić

Vlastoručni potpis