

S-proteini kao medijatori adhezijskih svojstava *Lactobacillus paraplantarum* SF9B

Vešligaj, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:159:712062>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Martina Vešligaj

615/MB

**S-PROTEINI KAO MEDIJATORI
ADHEZIJSKIH SVOJSTAVA SOJA
Lactobacillus paraplantarum SF9B**

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici, dr. sc. Blaženki Kos, red.prof. na stručnom vodstvu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Jagodi Šušković, red. prof. na divnom odnosu prema studentima i trudu, te na prezentacijama i seminarima kojima se trudila približiti nam nastavni sadržaj.

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

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno biotehnološki fakultet
Zavod za bioproceno inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski rad

S-PROTEINI KAO MEDIJATORI ADHEZIJSKIH SVOJSTAVA SOJA *Lactobacillus paraplantarum* SF9B

Martina Vešligaj, 615/MB

Sažetak: Bakterijska adhezija na crijevni epitel i kolonizacija gastrointestinalnog trakta su vrlo važne odlike probiotičkih bakterija. S-proteini koji se nalaze na površini probiotičkih bakterija uvelike doprinose tom procesu. Cilj ovog rada bio je ispitati ulogu S-proteina kao medijatora adhezijskih svojstava soja *Lactobacillus paraplantarum* SF9B, pri čemu je kao pozitivna kontrola korišten soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji eksprimira S-proteine, a kao negativna soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine na svojoj površini. Osim S-proteina, na površini stanica soja *L. paraplantarum* SF9B nalaze se i proteini koji su na njih vezani (eng. SLAP - Surface-Layer Associated Proteins). Dokazano je da S-proteini soja *L. paraplantarum* SF9B pozitivno utječu na sposobnost adhezije na mucin, kao i na adheziju na stanice Caco-2 stanične linije. Stanice navedenog soja bile su pokazale uspješnost kompetitivne ekskluzije sa test-mikroorganizmima *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 i *Escherichia coli* 3014. Turbidimetrijskim određivanjem brzine rasta u različitim uvjetima ustanovljeno je da soj *L. paraplantarum* SF9B bolje preživljava u nepovoljnim uvjetima u odnosu na soj *L. plantarum* D13. Na kraju, stanice soja *L. paraplantarum* SF9B pokazuju značajnu proteolitičku aktivnost.

Glavne riječi: S-proteini, SLAP, *Lactobacillus paraplantarum*, adhezija, kolonizacija.

Rad sadrži: 56 stranica, 23 slika, 5 tablica, 102 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: dr.sc. Blaženka Kos, red.prof.

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ksenija Uroić, viši asistent i dipl. ing. Martina Marijanović, asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Jasna Novak
2. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
3. Izv. prof. dr. sc. Ksenija Durgo
4. Prof.dr.sc. Jadranka Frece (zamjena)

Datum obrane: 23. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic
And Starter Culture Technologies
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate Thesis

S-PROTEINS MEDIATE ADHESION PROPERTIES OF THE STRAIN *Lactobacillus paraplantarum* SF9B

Martina Vešligaj, 615/MB

Abstract: Bacterial adhesion and colonization of the intestinal epithelium of the gastrointestinal tract are very important features of probiotic bacteria. S-layer proteins that are expressed on the surface of probiotic bacteria greatly contribute to this process. The aim of this study was to examine the S-layer proteins as mediators in adhesive properties of the strain *Lactobacillus paraplantarum* SF9B, while the strain *Lactobacillus helveticus* M92 which express S-layer proteins was used as a positive control, and the strain *Lactobacillus plantarum* D13 which does not express S-layer proteins was used as a negative control. In addition to S-layer proteins, on the cell surface of *L. paraplantarum* SF9B there are Surface-Layer Associated Proteins (SLAPs). It has been shown that S-layer proteins of *L. paraplantarum* SF9B positively influence the adhesiveness to mucin and the adhesion to cells of the Caco-2 cell line. Cells of that strain demonstrated success in competitive exclusion of test-microorganisms *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 and *Escherichia coli* 3014. Turbidimetric determination of the rate of growth in different conditions found that the strain *L. paraplantarum* SF9B survived better in adverse conditions with respect to the strain *L. plantarum* D13. Finally, strain *L. paraplantarum* SF9B showed significant proteolytic activity.

Keywords: S-layer proteins, SLAP, *Lactobacillus paraplantarum*, adhesion, colonization

Thesis contains: 56 pages, 23 figures, 5 tables, 102 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Blaženka Kos, Full professor*

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

Reviewers:

1. *PhD. Jasna Novak, Associate professor*
2. *PhD. Blaženka Kos, Full professor*
3. *PhD. Ksenija Durgo, Associate professor*
4. *PhD. Jadranka Frece, Full professor (substitute)*

Thesis defended: 23 September 2016

Sadržaj

| | |
|---|--|
| 1. UVOD | Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana. |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. ULOGA S-PROTEINA U ADHEZIJI BAKTERIJSKE STANICE NA RAZLIČITE SUPSTRATE I POVRŠINE | 2 |
| 2.1.1. Autoagregacija i koagregacija..... | 2 |
| 2.1.2. Adhezija na epitelne stanice, sluz gastrointestinalnog trakta i makromolekule izvanstaničnog sadržaja..... | 3 |
| 2.1.3. Formiranje biofilma | 5 |
| 2.1.4. Interakcije s imunološkim sustavom..... | 7 |
| 2.2. ZAŠTITNA ULOGA S-PROTEINA U NEPOVOLJNIM UVJETIMA | 8 |
| 2.2.1. Preživljavanje u uvjetima gastrointestinalnog trakta | 8 |
| 2.2.2. Otpornost na ostale stresne uvjete..... | 9 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 13 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 13 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizmi | 13 |
| 3.1.2. Stanična linija..... | 14 |
| 3.1.3. Hranjive podloge..... | 14 |
| 3.1.4. Kemikalije..... | 14 |
| 3.1.5. Aparatura i pribor..... | 15 |
| 3.2. METODE RADA | 16 |
| 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i stanične linije | 16 |
| 3.2.2. Denaturirajuća gradijentna gel elektroforeza (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) | 17 |
| 3.2.3. Ekstrakcija proteina vezanih na S-sloj (engl. S-layer associated proteins, SLAP) pomoću LiCl | 19 |
| 3.2.4. Adhezija na mucin | 20 |
| 3.2.5. Adhezija na Caco-2 stanice..... | 21 |
| 3.2.6. Kompetitivna ekskluzija s predinkubacijom BMK..... | 22 |
| 3.2.7. Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata u različitim uvjetima..... | 23 |
| 3.2.8. Analiza proteolitičke aktivnosti | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 25 |

| | |
|--|----|
| 4.1. USPOREDBA ISPITIVANIH <i>Lactobacllus</i> SOJEVA PRIMJENOM GEL ELEKTROFOREZE U DENAURIRAJUĆEM GRADIJENTU (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) | 25 |
| 4.2. EKSTRAKCIJA PROTEINA VEZANIH NA S-SLOJ (eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP) | 27 |
| 4.3. ADHEZIJA SOJA <i>L. paraplantarum</i> SF9B NA MUCIN..... | 30 |
| 4.4. ADHEZIJA SOJA <i>L. paraplantarum</i> SF9B NA Caco-2 STANICE..... | 32 |
| 4.5. KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA PATOGENA | 34 |
| 4.6. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE BRZINE RASTA <i>L. paraplantarum</i> SF9B U RAZLIČITIM UVJETIMA | 36 |
| 4.7. ANALIZA PROTEINAZNE AKTIVNOSTI..... | 41 |
| 5. ZAKLJUČCI | 44 |
| 6. LITERATURA | 45 |

1. UVOD

S-sloj je parakristalična dvodimenzionalna površina koja se sastoji od identičnih (gliko) proteinskih podjedinica koje oblažu površinu pojedinih stanica Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te *Arhea* (Sleytr i sur., 2001). Podjedinice S-proteina su nekovalentnim vezama vezane na površinu stanica. Proteinske podjedinice su bogate kiselim i hidrofobnim aminokiselinama, ali su siromašne aminokiselinama koje sadrže sumpor (Sára i Sleytr, 2000). Geni koji kodiraju za podjedinice koje čine S-proteine su visoko eksprimirani, ali je niska sveukupna sličnost u sekvencama i zbog tog razloga se potvrda o prisutnosti S-proteina i dalje zasniva na elektronskoj mikroskopiji (Sleytr i Beveridge, 1999).

Bakterijska adhezija na crijevni epitel i kolonizacija gastrointestinalnog trakta su vrlo važne odlike probiotičkih bakterija. Adhezija probiotičkih sojeva na crijevne epitelne stanice je najvažniji preduvjet uspješne kolonizacije. Na temelju dosadašnjih istraživanja biološke uloge S-proteina dokazano je da djeluju kao medijatori adhezije bakterijskih stanica (Sakakibara i sur., 2007; Hynönen i Palva, 2013; Shimotahira i sur., 2013; Zhang i sur., 2013). Također je dokazano da su S-proteini esencijalni za utvrđivanje i održavanje oblika i funkcije stanice na molekularnoj razini (Sleytr i Beveridge 1999), da sudjeluju u imunomodulaciji, kompetitivnoj ekskluziji patogena i antimikrobnom djelovanju. S-proteini su u direktnom kontaktu s okolišem te sudjeluju u adheziji na različite supstrate, kao što su mucin i eukariotske stanice, a agregiraju i koagregiraju s kvascem i ostalim bakterijama. Stoga su donesene dvije ključne funkcionalne i mehaničke uloge S-proteina: (A) uloga u bakterijskoj adheziji na različite supstrate i površine, (B) zaštitna uloga u nepovoljnim uvjetima.

Cilj ovog rada bio je ispitati ulogu S-proteina kao medijatora adhezijskih svojstava soja *Lactobacillus paraplantarum* SF9B. Stoga je provedena ekstrakcija S-proteina i proteina vezanih na S-proteine (eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP) koji imaju nepoznatu funkciju, ali mogu pomoći u razumijevanju djelovanja probiotika, biologije stanične stjenke i imunomodulacije (Goh i sur., 2009). Ispitana je uloga S-proteina u adheziji soja *L. paraplantarum* SF9B na mucin i Caco-2 stanice. Budući da je uspješna adhezija preduvjet za kompetitivnu ekskluziju patogena, ispitana je sposobnost soja *L. paraplantarum* SF9B u tom probiotičkom kriteriju. Osim toga, ispitana je njegova proteolitička aktivnost te brzina rasta u različitim nepovoljnim uvjetima. Pritom se kao pozitivna kontrola koristio probiotički soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji eksprimira S-proteine, dok je negativna kontrola bio soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji navedene proteine ne eksprimira.

2. TEORIJSKI DIO

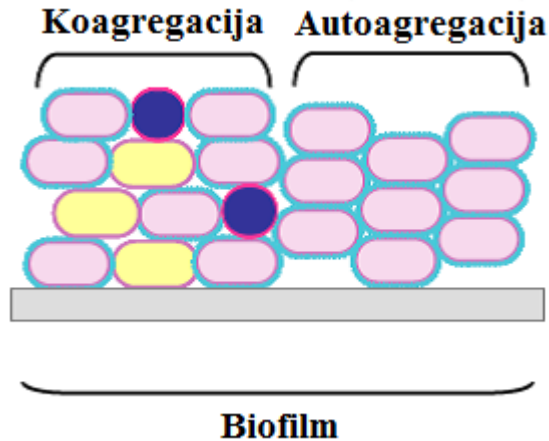
2.1. ULOGA S-PROTEINA U ADHEZIJI BAKTERIJSKE STANICE NA RAZLIČITE SUPSTRATE I POVRŠINE

Agregacija i adhezija su kompleksni procesi u kojima sudjeluju neke molekule koje su sastavni dio površine bakterijske stanice - teihoninska i lipoteihoninska kiselina te (gliko) proteini (Li i sur., 2015). S-proteini sudjeluju u autoagregaciji i koagregaciji bakterija, adheziji na različite supstrate i površine uključujući gastrointestinalni mucin, epitelne stanice i makromolekule izvastaničnog sadržaja (Sakakibara i sur., 2007; Hynönen i Palva, 2013; Shimotahira i sur., 2013; Zhang i sur., 2013).

2.1.1. Autoagregacija i koagregacija

Autoagregacijom se naziva agregacija stanica koje pripadaju istom bakterijskom soju i dio su crijevne mikroflore (Slika 1). Autoagregacija omogućava lakšu kolonizaciju na crijevni epitel i formiranje biofilma na sluznici stanice domaćina (Turroni i sur., 2013). Uloga S-proteina u autoagregaciji uočena je kod bakterijskih sojeva koji su potencijalni probiotici. Uklanjanje S-proteina s 5M LiCl smanjuje mogućnosti autoagregacije kod različitih laktobacila kao što su *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Kos i sur., 2003), *L. kefir* CIDCA 8321 (Garrote i sur., 2004) i *L. helveticus* M92 (Beganović i sur. 2011). U autoagregaciji soja *L. crispatus* ZJ001 osim S-proteina sudjeluju i ostale komponente na površini stanice, s obzirom da tretman s LiCl nije znatno utjecao na agregaciju tog soja (Chen i sur., 2007).

Sposobnost agregacije dvaju različitih bakterijskih sojeva naziva se koagregacija (Slika 1) i može se gledati kao isključivo kompetitivan mehanizam koji doprinosi smanjenju patogenosti tijekom infekcije. Uloga S-proteina u interakciji s bakterijom *Salmonella Typhimurium* FP1 je prikazana za soj *L. helveticus* M92 (Beganović i sur., 2011) budući da njihovo uklanjanje smanjuje koagregaciju s tom patogenom bakterijom. S-proteini koji su odgovorni za autoagregaciju bakterijske vrste *L. kefir* uključeni su i u koagregaciju sa kvascem *Saccharomyces lypolitica*, pri čemu navedena interakcija vjerojatno doprinosi očuvanju strukture i kompozicije kompleksnog mikrobnog ekosustava u zrnu kefira (Golowczyc i sur., 2009).



Slika 1. Uloga S-proteina u adheziji na različite supstrate i površine (autoagregacija, koagregacija i formiranje biofilma) (Preuzeto od Gerbino i sur., 2015).

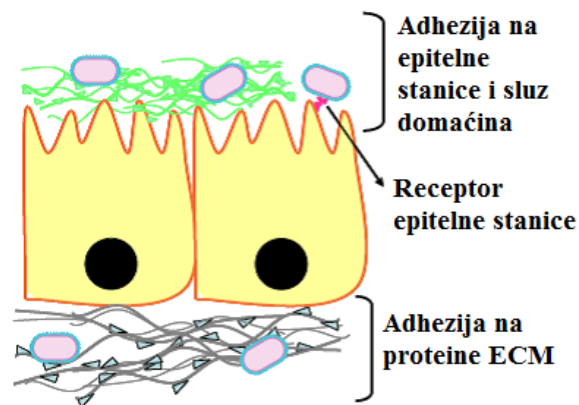
2.1.2. Adhezija na epitelne stanice, sluz gastrointestinalnog trakta i makromolekule izvanstaničnog sadržaja

Adhezija bakterijskih sojeva, koji čine dio crijevne mikroflore, na epitelna i subepitelna tkiva je ključan inicijacijski korak za uspješnu kolonizaciju gastrointestinalnog trakta i ostalih vrsta tkiva kod sisavaca (Slika 2). Okarakterizirano je nekoliko molekula koje su prisutne na površini probiotičkih bakterijskih sojeva, a koje sudjeluju u adheziji na patogene. Uloga S-proteina u procesu adhezije, uključujući patogene i nepatogene bakterije, ovisi o molekulama koje su prisutne na površini obje bakterijske stanice. Uklanjanje S-proteina s *L. acidophilus* M92 dovelo je do smanjenja adhezije bakterija u crijevnom epitelu svinje (Kos i sur., 2003) i epitelnim stanicama crijeva miša (Frece i sur., 2005), međutim adhezija na Caco-2 stanice nije se promijenila nakon tretiranja stanica s LiCl kod soja *L. acidophilus* BG2FO4 ili NCFM/N2 (Green i Klaenhammer, 1994). S druge strane soj *L. brevis* ATCC 8287 koji sadrži SlpA ima afinitet za vezanje na epitelne crijevne stanične linije (Caco-2 i Intestine 407), mokraćni mjehur (T24), endotelne stanice (EA-hy926), bez obzira na tretiranje stanica gvanidin hidrokloridom (Hynönen i sur., 2002). Uz to, sprječavanjem interakcija između bakterijskih stanica pomoću anti-SLP specifičnih antitijela pokazalo se da S-proteini sudjeluju u adheziju soja *L. crispatus* ZJ001 na HeLa stanice (Chen i sur., 2007) i *Clostridium difficile* na Hep-2 stanice (Calabi i sur., 2002). Prisutnost S-proteina kod *Bacillus cereus* je povezana s adhezijom na epitel HeLa stanica i neutrofila (Kotiranta i sur., 1998; Auger i sur., 2009).

Hynönen i sur. (2002) su koristili zanimljiv pristup kojim su odredili ulogu *SlpA* proteina u adheziji kod soja *L. brevis* ATCC 8287. Različite regije *slpA* gena su ekprimirane kao interne *in-frame* fuzije u varijabilnim regijama *fliCH7* gena kod bakterije *Escherichia coli*, koristeći konstrukcije kimernih bičeva koji su predstavljali pojedine dijelove S-proteina. Na sličan su način Åvall-Jääskeläinen i sur. (2003) konstruirali površinu sa *SlpA* receptor vezujućom domenom, koja je eksprimirana kod soja *Lactococcus lactis* NZ9000. *In vitro* test adhezije pokazao je da su rekombinantne stanice laktokoka stekle mogućnost adhezije na staničnu liniju Intestine 407 i na fibronektin. Adhezija je posredovana prisutnošću N-terminalnog kraja *SlpA* proteina.

Mogućnost adhezije različitih sojeva laktobacila na proteine izvanstaničnog matriksa kao što je kolagen, laminin, fibronektin i fibrinogen pokazala je važnu ulogu kod uklanjanja i kompeticije s patogenima (Muñoz-Provencio i sur., 2009). Proučavano je nekoliko sojeva *L. crispatus* te je dokazano da su SLP domene odgovorne za adheziju na kolagen (Toba i sur., 1995; Sillanpää i sur., 2000; Sun i sur., 2013). Horie i sur. (2002) su dokazali da soj *L. crispatus* CbsA zahvaljujući SLP domeni inhibira adheziju enterotoksičnog soja *E. coli* na laminin. De Leeuw i sur. (2006) utvrdili su da soj *L. brevis* ATCC 8287, koji eksprimira *SlpA* protein, ima veći afinitet vezanja na fibronektin i laminin nego na kolagen. Slične rezultate dobili su i Jakava-Viljanen i Palva (2007) s laktobacilima izoliranim iz crijeva i fecesa svinje, a na čijoj površini stanica su eksprimirani S-proteini, koristeći različite ekperimentalne pristupe.

Bakterijska adhezija na mucin koji prekriva unutrašnjost gastrointestinalnog trakta je prvi korak u kontaktu mikroorganizama sa stanicama domaćina (van Tassell i Miller 2011). Prisutnost vezujuće domene S-proteina na mucin opisana je samo za soj *L. acidophilus* NCFM (Buck i sur. 2005). Carasi i sur., (2014) su objavili da sojevi *L. kefir*i tretirani s NaOH i LiCl imaju manji kapacitet adhezije na mucin kod svinja i komponente mucina izolirane iz tankog i debelog crijeva svinje. Dodatak topivog S-proteina povećava adheziju bakterije *L. kefir*i na spomenute komponente, sugerirajući da prisutnost tih proteina u gastrointestinalnom traktu može povećati adheziju bakterija na mucin, čime se postiže interakcija s epitelom (Carasi i sur. 2014).



Slika 2. Uloga S-proteina u adheziji na epitelne stanice, sluz gastrointestinalnog trakta i proteine izvanstaničnog matriksa (Preuzeto od Gerbino i sur., 2015).

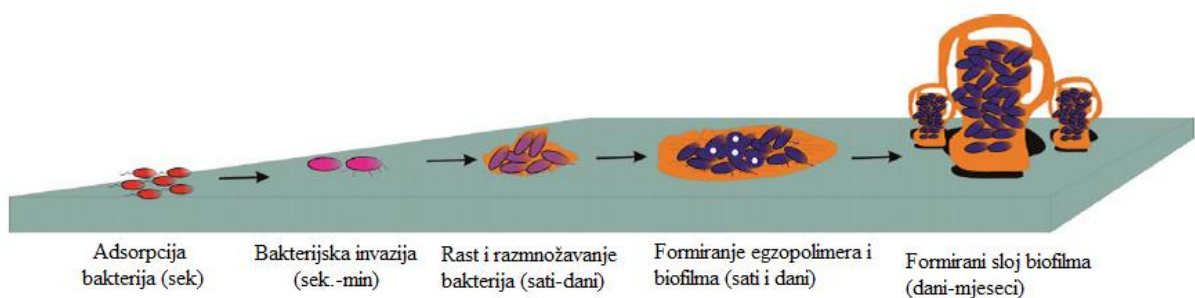
2.1.3. Formiranje biofilma

U prirodi, bakterije uglavnom preživljavaju u obliku biofilma, formirajući mikrobnu zajednicu međusobnim interakcijama između različitih vrsta. Bakterije koje mogu tvoriti biofilm su otpornije na stresne uvjete od svojih planktonskih srodnika (Marsh i sur., 2011). Kod bakterijskog biofilma, stanice su međusobno združene i zajedničkim snagama stvaraju sloj i ugrađuju se u vlastiti matriks izgrađen od egzopolimera, uključujući različite egzopolisaharide, (gliko) proteine, (gliko) lipide i izvanstaničnu DNA (Flemming i Wingerder, 2010). Proces formiranja biofilma je kompleksan proces koji počinje adsorpcijom bakterija na površinu stanica, nakon čega slijedi bakterijska invazija, rast i izlučivanje izvanstaničnih polisaharida (Slika 3).

Poželjan način života bakterija (planktoni ili biofilm) ovisi o komponentama na površini stanica. S-protein je jedna od najvažnijih struktura koji ima ključnu ulogu u vezanju mnogih bakterija na različite površine (Kotiranta i sur., 1998; Schneitz i sur. 1993; Sakakibara i sur., 2007), a također je istražena i njegova uloga u formiranju biofilma kod različitih bakterijskih vrsta kao što su *Clostridium difficile*, *Bacillus cereus* i *Tannerella forsythia*.

S-proteini kod *Clostridium difficile* se sastoje od dvije podjedinice. Podjedinice se proteolitički cijepaju djelovanjem *Cwp84* proteaze, a prekursor za sintezu podjedinica je *SlpA*. *SlpA* mutanti ne pokazuju razlike u sintezi S-proteina, za razliku od *cwp84* mutanata gdje su razlike uočene (Kirby i sur., 2009). Soj mutanta *swp84* ne utječe na planktonski rast, ali ima negativan utjecaj na formiranje biofilma u odnosu na soj R20291. Nedostatak biofilma kod mutanta *swp84* je u potpunosti nadopunjen obnavljanjem gena divljeg tipa na kromosomima,

predlažući da je potpuno sintetizirani S-sloj esencijalan za formiranje biofilma kod *C. difficile*. *Cwp84* proteaza je uključena u sazrijevanje različitih površinskih proteina, stoga efekt mutanta *cwp84* u formiranju biofilma predstavlja veći nedostatak od nemogućnosti sinteze S-proteina. Kod bakterije *Bacillus cereus* prisutnost S-proteina je negativno povezivana s formiranjem biofilma (Kotiranta i sur. 1998; Auger i sur., 2009). *Tannerella forsythia* ima S-sloj građen od dva glikoproteina, *TfsA* i *TfsB* (Lee i sur., 2006). U toj bakteriji ekspresija S-proteina je značajno veća u stanicama u kojima je zamijećeno formiranje biofilma od stanica planktonskog rasta, dok je transkripcija *wecC* gena, koji kodira za protein koji sudjeluje u glikolizaciji nekoliko različitih površinskih proteina, smanjena kod stanica koje formiraju biofilm (Pham i sur., 2010). Kod mutanata koji nemaju funkcionalni *wecC* gen povećava se površinska hidrofobnost i formiranje biofilma u odnosu na divlji soj (Honma i sur., 2007). *WecC* mutanti nemaju normalan S-sloj, već se on sastoji od *TfsA* i *TfsB* manjih molekulskih masa, zbog malog stupnja glikolizacije (Posch i sur., 2011). Određeni SLP glikani štite kiselinske ostatke i potvrđuju tezu da ti kiselinski ostaci doprinose uspostavljanju odbojnih sila koje narušavaju formiranje biofilma u usnoj šupljini. Također su provedena istraživanja na mutantima koji imaju nedostatak sekrecijskog sistema tip IX. Naime, oni također nemaju S-sloj i ekprimiraju manji broj glikoliziranih proteina *TfsA* i *TfsB*, a imaju veću sklonost formiranju biofilma nego stanice divljeg tipa (Narita i sur. 2014). Ove tvrdnje sugeriraju da na funkciju i održavanje biofilma kod oralnog patogena *T. forsythia* utječe stupanj glikolizacije pojedinih proteina i tip glikana, bez obzira što ti mikroorganizmi nemaju prisutan S-sloj.



Slika 3. Faze formiranja biofilma (Preuzeto od Thallinger i sur., 2013)

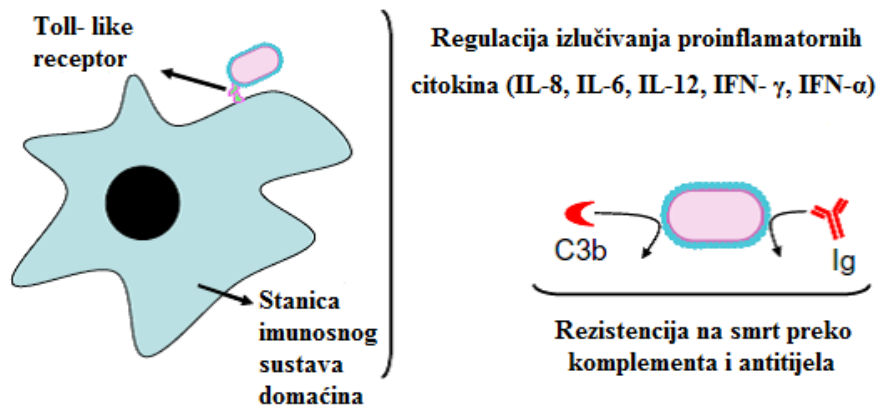
2.1.4. Interakcije s imunološkim sustavom

S-proteini patogenim bakterijama služe kao pomoć za vješto izbjegavanje imunskog odgovora domaćina. S-protein na površini *Compylobacter fetus* doprinosi rezistentnosti bakterije sprječavajući vezanje komplementa C3b na njegovu površinu. *Compylobacter fetus* je također razvio način na koji izbjegava antitijela visokom frekvencijom antigenskih varijacija S-proteina (Thompson 2002). Istraživanja rađena na izogenetičkim mutantima koji nemaju S-protein su pokazala da S-protein parodontalnog patogena *C. rectus* pokazuje indukciju regulacije proinflammatoryh citokina kao što su IL8, IL6 i TNF- α (Wang i sur., 2000). Pokazalo se da je uloga S-sloja kod *Tannerella forsythia*, čija je srž glikan, modulacija efektorske funkcije dendritičkih stanica da spriječe odgovor Th17, pri čemu patogeni na taj način jačaju otpornost prema imunskom odgovoru domaćina (Slika 4). *SlpA* protein kao najveći antigen na površini bakterije *Clostridium difficile*, ima vrlo važnu ulogu u otpuštanju proinflammatoryh citokina iz humanih monocita i dozrijevanju humanih dendritičkih stanica (Ausiello i sur., 2006), tako da prepoznaje TLR4 (Toll-like receptor) i inducira odgovor T stanica (Slika 4) (Ryan i sur., 2011).

Uloga S-proteina također je proučavana kod nekih potencijalnih probiotičkih bakterija koje sudjeluju u imunskom odgovoru. Dokazano je da *SlpA* kod soja *L. acidophilus* NCFM stupa u interakcije s DC-SING na površini dendritičkih stanica (DC), dok je kod mutanata kojem nedostaje *SlpA* uočen manji afinitet vezanja na DC-SING (Konstantinov i sur., 2008). Kod ovog S-protein B-dominantnog soja, prirodna interakcija s DC se uvelike promijenila, što je dovelo do povećanja koncentracija proinflammatoryh citokina (npr. IL-12p70, TNF- α i IL-1 β). Taverniti i sur. (2013) su pokazali da pročišćen *SlpA* kod soja *L. helveticus* MIMLh5 djeluje protuupalno, reducirajući aktivnost NF- κ B kod crijevnih epitelnih Caco-2 stanica, međutim ponaša se kao stimulator prirodnog imuno sustava aktivacijom ekspresije proinflammatoryh faktora kod stanica makrofaga linije U937, prepoznavanjem TLR2 (Toll-like receptor 2). Sličan odgovor je primjećen prilikom praćenja stimulacije izoliranih makrofaga iz koštane srži miša.

S-proteini koji prekrivaju površinu bakterije *Propionibacterium freudenreichii*, imaju ulogu imunomodulatora. *P. freudenreichii* je djelotvorna bakterija koja se koristi u prehrambenoj industriji za proizvodnju vitamina, bioprezervativa, startera za zrenje sireva i probiotika. Ekstrakt površinskog proteina iz soja *P. freudenreichii* ITG P20 uvelike smanjuje izlučivanje citokina IL-12, IFN- γ i TNF- α kad se primjenjuje u kombinaciji s proinflammatorym bakterijskim sojem *Lactococcus lactis* GM1363 (Le Maréchal i sur., 2015). Utjecaj S-proteina,

koji je izoliran iz bakterije *L. kefir*, na aktivaciju antigena korištenih stanica (makrofagi i dendritičke stanice), ovisi o prisutnosti i odsutnosti TLR.



Slika 4. Regulacija izlučivanja proinflammatoryh citokina uslijed interakcije S-proteina patogenih ili nepatogenih bakterija preko Toll-like receptora sa stanicama imunskog sustava domaćina (Preuzeto od Gerbino i sur., 2015).

2.2. ZAŠTITNA ULOGA S-PROTEINA U NEPOVOLJNIM UVJETIMA

2.2.1. Preživljavanje u uvjetima gastrointestinalnog trakta

Gastrointestinalni trakt predstavlja okoliš u kojem prevladavaju stresni uvjeti za preživljavanje mikroorganizama zbog niskog pH, djelovanja proteolitičkih enzima, želučanog soka, itd. Međutim, u stanovljeno je da S-proteini imaju važnu ulogu u zaštiti mikroorganizama u navedenim uvjetima gastrointestinalnog trakta (Slika 5).

Stanice soja *L. helveticus* M92 koji nema S-protein ima manju mogućnost preživljavanja u stimuliranom želučanom soku niske pH vrijednosti i žučnom soku uz dodatak soli (Frece i sur., 2005), dok su intaktne stanice istog soja otporne na pepsin i pankreatin. Ovi rezultati ukazuju na zaštitnu ulogu S-proteina kad su mikroorganizmi izloženi gastrointestinalnim uvjetima (Slika 5).

Nadalje, soj *L. acidophilus* ATCC4356 koji eksplicira S-proteine stabilan je u rigoroznim gastrointestinalnim uvjetima. Dodatno, Eslami i sur. (2013) su istražili i dokazali stabilnost izoliranog S-proteina u *in vitro* uvjetima kojeg su izložili djelovanju želučanog soka sa i bez pepsina.

Meng i sur. (2014) su izvijestili da se preživljavanje stanica tri soja *L. acidophilus* i *L. helveticus* u simuliranom želučanom soku i soku tankog crijeva, nakon uklanjanja S-proteina s njihove površine, smanjilo 2-3 puta u odnosu na preživljavanje stanica koje imaju S-protein.

Proučavana je ekspresija gena koji kodiraju za S-proteine soja *L. acidophilus* NCC2628 u različitim fermentacijskim uvjetima (Schar-Zammaretti i sur., 2005). Ukupni sadržaj proteina na površini stanice, uslijed nedostatka peptona, je bio značajno manji nego nakon uzgoja stanica u potpunom mediju, dok je ekspresija gena koji kodiraju za S-proteine bila značajno povećana. To upućuje na to da je ekspresija gena koji kodiraju za S-proteine prioritetna u uvjetima koji nisu optimalni za rast bakterija. Ekspresija *slpA* gena se mijenja s obzirom na stresne uvjete kod probiotičkog soja *L. acidophilus* ATCC 4356. Naime, količina S-proteina se povećala u prisutnosti 0,01-0,1 % žuči, a *slpA* je gen koji kodira za protein sličnih karakteristika (Khaleghi i sur., 2010).

2.2.2. Otpornost na ostale stresne uvjete

Velika otpornost bakterija koje imaju S-proteine na ekstremne uvjete (npr. visoka temperatura, niska pH-vrijednost, visoki ionski naboj) predstavlja potencijalnu ulogu ovih proteina u zaštiti i stabilizaciji stanica (Engelhardt i Peters, 1998; Claus i sur., 2002; Engelhardt, 2007). To se najviše odnosi na Gram negativne ekstremofile iz skupine *Arhea*, kod kojih je S-protein direktno usidren u citoplazminu membranu.

Kao i većina ostalih bakterijskih struktura, S-sloj je direktno izložen ekstremnim okolišnim uvjetima, čime se potvrđuje uloga molekularnog mehanizma koji omogućuje stabilnost proteina pri visokim temperaturama (Slika 5). Termostabilnost S-proteina se pripisuje posttranslacijskim modifikacijama (npr. glikolizacija), kovalentnim preinakama i nekovalentnim interakcijama (Engelhardt i Peters, 1998).

Kod soja *Deinococcus radiodurans* R1, dva proteina su uključena u održavanje i integritet S-proteina: *Hpi* (eng. hexagonally packed intermediate) protein i *SlpA* (DR2577). Delecija *hpi* gena ima mali utjecaj na strukturu stanične ovojnice, dok delecija gena *slpA* dovodi do značajnih promjena strukture stanične ovojnice i uzrokuje manju otpornost na stres uslijed trenja stanica u odnosu na stanice divljeg tipa. Ultrastrukturalna analiza *slpA* mutanta ukazuje na gubitak većeg dijela ugljikohidrata *Hpi* proteina i membranskog sloja koji stanici daje čvrstoću (Rothfuss i sur., 2006).

Butler i sur. (2013) su istražili simbiotske bakterije mliječne kiseline (BMK) iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* koje su dio mikrobiote pčela *Apis mellifera*. Ova mikrobiota stupa u simbiozu s domaćinom te brani pčelu od ostalih bakterija i kvasca s kojom dođu u kontakt tijekom traganja za hranom. Zbog selektivnog pritiska uzrokovanog okolišnim promjenama, BMK su razvile odgovor na stres i obranu koja im omogućuje rast i preživljavanje u teškim uvjetima. Med sa svojim konstantnim cvjetnim nektarom, velikim osmotskim pritiskom i prisutnošću mikroorganizma koji dospiju u med, predstavlja idealne uvjete za simbiozu. U takvim uvjetima, BMK mogu proizvoditi velike količine bakteriocina, enzima, lipoproteina, chaperona i S-proteina. Kod ovih bakterija, zaštitna uloga S-proteina se hipotetski pripisuje njegovoj sposobnosti da inhibira lizozim koji narušava staničnu stjenku bakterija.

Također se pokazalo da su S-proteini odgovorni za otpornost *Deinococcus radiodurans* na visoku koncentraciju NaCl-a (Slika 5). Izloženost *D. radiodurans* pri koncentraciji od 0.3M NaCl aktivira transkripciju gena koji kodiraju za proteine koji imaju ulogu u zaštiti od osmotskog pritiska: pstSCAB operon koji sadrži gen koji kodira za transporter fosfata te gene koji kodiraju za proteine *Dra0135* i *Dr1438*, koji sudjeluju u transportu trehaloze i glicin betaina. Analize sojeva mutanata koji nemaju *Dr0392* (vezni protein na površini membrane) i *Dr1115* (S-protein), čija ekspresija gena se aktivira u prisutnosti NaCl, ukazuje na smanjenu toleranciju na NaCl (Ime i sur., 2013).

Kod Gram-negativnih bakterija kao što je *Aquaspirillum serpens* i *Claulobacter crescentus* S-protein ima važnu zaštitnu ulogu prema parazitskim bakterijama *Bdellovibrio bacterovirus* (Slika 5) (Koval i Hynes, 1991).

Ključna uloga u uklanjanju metala iz kontaminiranih soli i taloga se također pripisuje S-proteinima. Soli, talozi i voda u rudarskim područjima, kontaminiranim visokom koncentracijom metala i radionukleotida, predstavljaju stanište za specifične bakterijske vrste koje posjeduju različite mehanizme za biotransformaciju metala i radionuklotida, uključujući biosorpciju i bioakumulaciju, kako bi preživjele u takvim teškim uvjetima (Slika 5) (Hennig i sur., 2001; Merroun i Selenska-Pobell, 2001; Merroun i sur., 2003).

Jedan od najbolje istraženih mikroorganizama, koji ima veliki kapacitet vezanja dragocjenih i toksičnih metala, je *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. Taj soj izoliran je iz golemog odlagališta rude uranija blizu Jahanngeorgenstandt (Saxony, Njemačka) (Raff i sur. 2002; Pollmann i sur. 2006). Zbog izloženosti soja izrazito visokoj koncentraciji uranija, on se tijekom vremena prilagodio na navedene uvjete i postao tolerantan na radioaktivne komponente

(Selenska- Pobell i sur., 1999; Pollmann i sur., 2005). Također može vezati ione uranija visokom specifičnošću (Gupta i sur. 2002). Te spoznaje dovele su do razvoja S-protein-biosenzora koji su specifični za ione uranija (Conroy i sur., 2010).

Osim uranija, *Lys. Sphaericus* JG-A12 također može apsorbirati ostale metale uključujući Al, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Mn, Ni, Rb, Si, Sn, Sr, Ti, U i Zn (Merroun i sur. 2005; Jankowski i sur., 2010). Utječe i na biosorpciju, najvjerojatnije pružajući zaštitnu funkciju stanici sprječavajući upijanje teških metala i radionukleotida (Fahmy i sur., 2006).

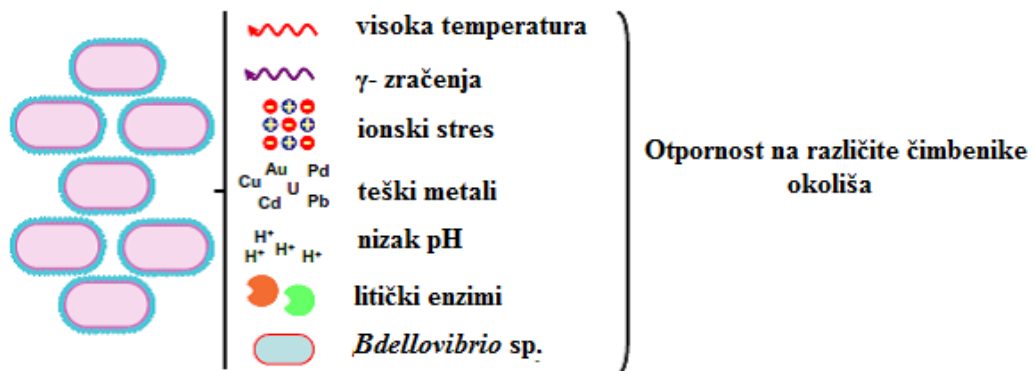
Predstavnici ostalih vrsta mikroorganizama koji ekspimiraju S-proteine, a izolirani su iz ruda uranija te rastu između 55 i 80°C, su *Arhea Metallosphaera prunae*, sp. nov. (Fuchs i sur. 1995) i *Lys. Sphaericus* JG-B53. Esencijalni elementi u tragovima mogu proći kroz filter sloj i dospjeti u unutrašnjost ovih sojeva, koji imaju mogućnost rekristalizacije i vezanja metala. Genom *Lys. Sphaericus* JG-B53 kodira za najmanje osam S-proteina koji su vidno različiti. Prisutnost višestrukih kopija S-proteina može omogućiti bakterijskim vrstama brzu prilagodbu i preživljavanje u nepovoljnim uvjetima.

Aravindh i sur. (2015) su izolirali šest različitih bakterijskih sojeva iz uzoraka rude torija u Indiji. Izolirani mikroorganizam koji je pokazao najveću rezistentnost na različite pH-vrijednosti i povećanu koncentraciju uranija i gama zračenja je bio *Bacillus* spp. *Bacillus* sp. HKG 112 izoliran iz slanog izvora u Indiji je također otporan na visoku količinu gama zračenja (do 12,5 kGy) (Gupta i sur., 2011). Postoji velika mogućnost da su S-proteini odgovorni za rezistenciju na radijaciju u oba slučaja. Različita ekspresija nekih gena u uvjetima zračenja može doprinijeti fiziološkoj raznolikosti te pomoći cjelokupnom razumijevanju mehanizma kojeg bakterijska stanica aktivira u stresnim uvjetima.

Cijanobakterija *Synechococcus* spp. GL24, izolirana iz meromističnog jezera Fayetteville Green Lake (NY, SAD) s visokom koncentracijom iona kalcija i sumpora, ima heksagonalni S-protein koji se može ponašati kao nosač za sulfate i karbonate na površini bakterije (Schultzelam i Beveridge, 1994a, b).

Konačno, iako se utvrdila mogućnost interakcija BMK s različitim metalima, uloga S-proteina u biosorpciji metala je utvrđena samo kod *L. kefir*. Gerbino i sur. (2015) su istraživali svojstvo soja *L. kefir* da izlučuje Pb^{2+} prije i nakon uklanjanja S-proteina pomoću protein kinaze K. Pronašli su da bakterije bez S-proteina izlučuju više Pb^{2+} . Uklanjanje S-proteina nema

značajan utjecaj na preživljavanje bakterija u kontroliranim uvjetima, ali mikroorganizmi bez S-proteina su skloniji štetnom učinku Pb^{2+} .



Slika 5. Uloga S-proteina u otpornosti bakterijske stanice na različite stresne čimbenike (Preuzeto od Gerbino i sur., 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu u *in vitro* eksperimentima su korištena tri soja bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* prikazana u Tablici 1 i dva test-mikroorganizma prikazan u Tablici 2. Soj čija svojstva ispitujemo je *L. paraplantarum* SF9B. Kao pozitivna kontrola korišten je soj *L. helveticus* M92 koji eksprimira S-proteine, a kao negativna kontrola korišten je soj *L. plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine. Navedeni sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Sojevi se čuvaju pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola te su neposredno prije eksperimenta inokulirani u svježju tekuću podlogu i inkubirani prekočno pri optimalnoj temperaturi rasta.

Tablica 1. Bakterijski sojevi korišteni u ovom diplomskom radu

| Bakterijski sojevi | Oznaka soja | Hranjive podloge i uvjeti rasta |
|------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | M92 | MRS, 37 °C, anaerobno |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | SF9B | MRS, 37 °C, anaerobno |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | D13 | MRS, 37 °C, anaerobno |

Tablica 2. Test-mikroorganizmi korišteni u ovom diplomskom radu

| Test-mikroorganizmi | Oznaka soja | Hranjive podloge i uvjeti rasta |
|------------------------------|-------------|---------------------------------|
| <i>Escherichiae coli</i> | 3014 | HA, 37 °C anaerobno |
| <i>Salmonella typhiurium</i> | FP1 | HA, 37 °C anaerobno |

3.1.2. Stanična linija

- Caco-2 stanična linija – kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene humane tumorske stanice kolorektalnog epitela; Caco-2 stanice su priređene u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

3.1.3. Hranjive podloge

a) hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline iz roda

Lactobacillus:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je jednakog sastava kao MRS agar, samo bez dodatka agara.

b) hranjive podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj test-mikroorganizama

- HA (hranjivi agar), sastava (g/l destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3; agar 18. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao hranjivi agar, ali bez dodatka agara

c) hranjive podloge za kultivaciju stanične linije

- Reduced Serum Medium 1x (MEM) medij za kultivaciju Caco-2 stanične linije (Gibco)

3.1.4. Kemikalije

U ovom eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- agaroz, „Appligane“, Strasbourg, Francuska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- APS, "Kemika", Hrvatska
- citratna kiselina, Sigma“, SAD
- Dcode dye solution, "Biorad", SAD
- dNTP mix, 10 mM, „Promega“, SAD

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

3.1.5. Aparatura i pribor

U ovom eksperimentalnom radu korištena je sljedeća aparatura i pribor:

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec Nano, "Shimatzu", Japan
- centrifuga CENTAUR 2, „Sanyo“, Engleska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija

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

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanja i čuvanje mikroorganizama i stanične linije

Probiotički sojevi su čuvani pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta probiotički sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u Tablici 1.

Test-mikroorganizmi su čuvani pri -80°C u HA tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta test-mikroorganizmi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u Tablici 2.

Stanice Caco-2 stanične linije su čuvane u MEM mediju pri 37°C u 5%-tnoj atmosferi CO₂, u minimalnom esencijalnom mediju te s dodatkom 10% (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma.

3.2.2 Gel elektroforeza u denaturirajućem gradijentu (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Koncentracija DNA se mjeri pomoću BioSpec Nano uređaja (valna duljina 0.2 mm za 1 μ L ili 0.7 mm za 2 μ L), pri čemu se kao slijepa proba koristi TE pufer. Nakon toga se provodi PCR (eng. Polymerase Chain Reaction) za DGGE s HDA1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') i HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') početnicama. Kao negativna kontrola da fragment dobiven na gelu nije dimer početnica koristi se uzorak koji ne sadrži DNA.

Nakon toga se provodi DNA elektroforeza dobivenih PCR produkata na agaroznom gelu u 1x TAE puferu. Kao standard se koristi 0,5 μ L Gene Rulera (100 bp Ladder) i 0,25 μ L λ HindIII. DNA elektroforeza se provodi pri 200 V i 80 mA kroz 30 min u kadici za elektroforezu. Nakon završene elektroforeze gel se boja sa otopinom etidijevog bromida koncentracije 0,5 μ g/mL kroz 10 min. Nakon toga se gel prebaci na UV transiluminator te se pomoću programa Gel Capture snimi slika gela pri valnoj duljini od 254 nm.

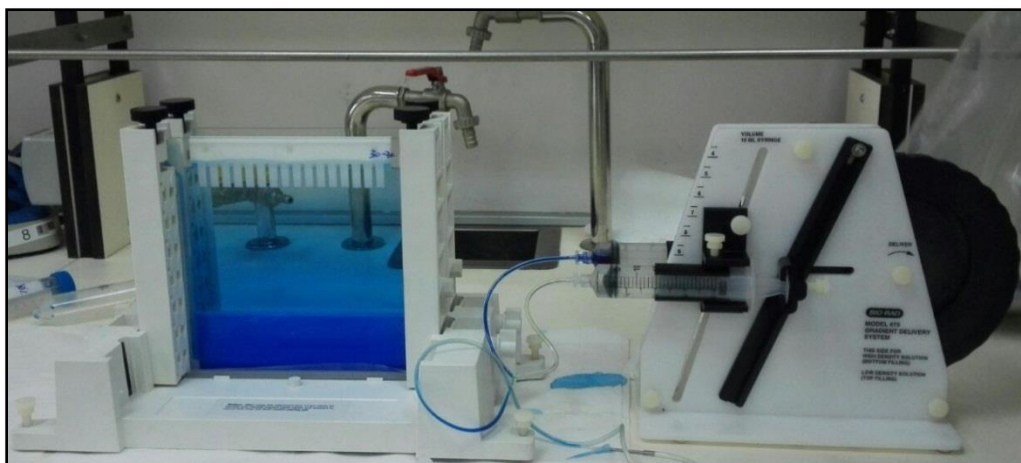
Prikaz aparature za pripravu gela za DGGE je prikazan na Slici 6. Gel za DGGE se priprema tako da se pomiješaju reagensi prema proračunu za različite gradijente kako je prikazano u Tablici 3. Ukupni volumen 100%-tne i 0%-tne otopine se izračuna zbrajanjem potrebnog volumena tih otopina prema željenom gradijentu (postotku) zaokruženom na prvi cijeli broj, čiji rezultati su prikazani u Tablici 4. Neposredno prije nanošenja gela u suspenziju se doda 130 μ L APS-a (stock 0,1g/mL) i 5,8 μ L TEMED-a. U suspenziju gela višeg postotka dodaje se plava boja Dcode dye solution (100 μ L na 5mL - 300 μ L) kako bi se te dvije suspenzije razlikovale. Kao uzorci se koriste PCR produkti svakog soja, a kao standard se koriste pomiješani sojevi jer DGGE nema komercijalne standarde. Nanošenje uzoraka započinje kod postignutih 58°C, a sama elektroforezu započinje kod postignutih 60°C. Nakon elektroforeze provodi se bojanje gela u etidijevom bromidu i skeniranje. DGGE elektroforeza se provodi pri 220 V kroz 3 sata, a nakon završene elektroforeze gel se tretira na isti način kao kod DNA elektroforeze.

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

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

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

| Volumen 100 % | Volumen 0 % | % | Ukupni volumen | Broj gela |
|----------------------|--------------------|----------|-----------------------|------------------|
| 3,4 | 13,6 | 20 | 17 | |
| 5,1 | 11,9 | 30 | 17 | Gel 1 |
| 6,8 | 10,2 | 40 | 17 | Gel 2 |
| 8,5 | 8,5 | 50 | 17 | |
| 10,2 | 6,8 | 60 | 17 | Gel 2 |
| 11,9 | 5,1 | 70 | 17 | Gel 1 |



Slika 6. Prikaz aparature za pripravu gela za DGGE

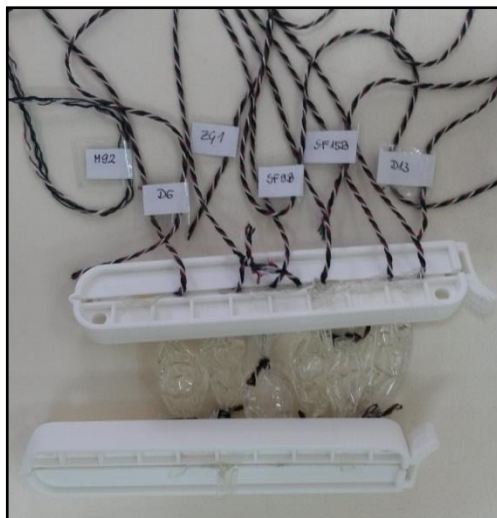
3.2.3. Ekstrakcija proteina vezanih na S-sloj (engl. S-layer associated proteins, SLAP) pomoću LiCl

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

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

Na gel se nanose i uzorci nakon prve dijalize kako bi se provjerila učinkovitost provedene metode. Ostatak sadržaja membrane nakon 1. dijalize se centrifugira pri 20 000 o/min 30 min. Pomiješa se 15 µL supernatanta s 5 µL reducirajućeg reagensa, a talog se resuspendira s 10 µL

reducirajućeg reagensa. Uzorci se prokuhaju 10 min na 80°C i nanose na gel, također Hamiltonovom iglom.



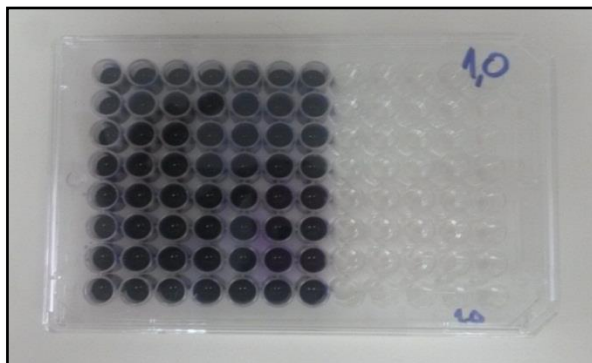
Slika 7. Prikaz pripremljenih ispitivanih uzoraka prije dijalize koji se nalaze u Spectra/Por poroznoj membrani pričvršćeni na krajevima vezicom.

3.2.4. Adhezija na mucin

Adhezija probiotičkih sojeva navedenih u Tablici 1 na mucin u *in vitro* uvjetima provedena je na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica (Slika 8). Mikrotitarska pločica je prethodno pripremljena na način da se jažice tretiraju otopinom mucina koncentracije 10 mg/mL u karbonat/bikarbonatnom puferu (50 mmol/L, pH 9,6) te inkubiraju preko noći pri 4°C. Jažice se ispiru tri puta sa fosfatnim puferom i nakon toga se dodaje po 100 µL fosfatnog pufera (PBS) sa 1% Tween 20 i inkubira se 1 sat pri sobnoj temperaturi kako bi se mucin imobilizirao. Iz jažica se pažljivo izvadi PBS sa Tweenom i nakon toga u svaku jažicu se dodaje po 100 µL prethodno pripremljene suspenzije sojeva u tri paralele. Izrasle kulture sojeva navedenih u Tablici 1. se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, a apsorbancija im je podešena tako da se dobiju uzorci koncentracije $A_{620} = 0,5$ za svaki od ispitivanih sojeva. Stanice se resuspendiraju u 4 mL fiziološke otopine, odnosno u otopini 5 M gvanidin hidroklorida ($M=95,53$ g/mol) za skidanje S-proteina. Osim u jažice sa mucinom, suspenzije sojeva se također dodaju u jažice bez mucina što služi kao kontrola adhezije. U slijepu probu umjesto stanica se dodaje fosfatni pufer. Tako pripremljene pločice se inkubiraju preko noći pri 37 °C.

Neadhezirane stanice se uklanjaju uzastopnim ispiranjem sa 0,05 % Tween 20 u fosfatnom puferu. Adhezirane stanice se detektiraju dodatkom kristal violeta u svaku jažicu,

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



Slika 8. Prikaz mikrotitarske pločice sa 96 jažica u kojoj je provedeno ispitivanje adhezije probiotičkih sojeva na mucin

3.2.5. Adhezija na Caco-2 stanice

Caco-2 stanična linija je kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela, prikladne za provjeru sposobnosti adhezije bakterija. Stanice Caco-2 stanične linije uzgoje se na 2 pločice s 24 jažice u Reduced Serum Medium (MEM) u T-boci volumena 25 cm³ i održavaju se pri 37 °C i u 5 %-tnoj atmosferi CO₂, u minimalnom esencijalnom mediju te s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (56 °C tijekom 30 min). Caco-2 stanice porasle u monosloju u T-boci se odlijepe dodatkom tripsina. Zbog α₂-makroglobulina, serum u mediju ima antitripsinsku aktivnost pa se prije dodatka tripsina ukloniti medij. Nakon dodatka tripsina, slijedi inkubacija pri 37°C 10 min tripsin se uklanja i dodaje se medij. Za brojanje poraslih Caco-2 stanica koristi se Bürken-Türk komorica volumena 10⁻⁴ mL i izračuna se koncentracija stanica u uzorku. U staničnu suspenziju se dodaje potreban volumen medija. Tako pripremljene Caco-2 stanice se ispiru tri puta u fosfatnom puferu.

Sojevi bakterija mliječne kiseline se uzgoje dva dana prije ispitivanja adhezije u 3 paralele po 5 mL MRS bujona za svaki soj. Prekonoćne kulture stanica se centrifugiraju 5 min pri 4200 o/min. Potom se talog ispere s 10 mL fiziološke otopine i centrifugira se 5 min. Stanice se resuspendiraju u 10 mL fiziološke otopine, podijele se na dva dijela i centrifugiraju. Jednoj paraleli pojedine kulture stanice se ukloni S-sloj s 10 mL GHCl-a, a druga se resuspendira u

10ml fiziološke otopine. Tako pripremljene kulture stanica se inkubiraju 1h na sobnoj temperaturi na tresilici. Nakon inkubacije suspenzije se centrifugiraju, talog se ispiru s 10 mL fiziološke otopine, a zatim se talog još jednom resuspendira u 10 ml fiziološke otopine. Tako pripremljenoj suspenziji se izmjeri A_{620} u mikrotitarskim pločicama. Nakon toga se suspenzija centrifugira, a talog resuspendira u DMEM mediju kako bi se dobio OD=1.

U svaku jažicu s uzgojenim i ispranim stanicama Caco-2 stanične linije dodaje se 1 mL suspenzije pripremljenih sojeva BMK. U jednu pločicu dodaje se soj *Lactobacillus paraplantarum* SF9B sa S-slojem, a u drugu bez S-sloja. *Lactobacillus helveticus* M92 je pozitivna kontrola jer sigurno ima S-sloj, dok je *Lactobacillus plantarum* D13 negativna kontrola jer sigurno nema S-sloj. Inkubacija traje 60 min pri 37°C. Nakon inkubacije, stanice se ispiru tri puta s 1 mL fosfatnog pufera radi uklanjanja svih bakterijskih stanica koje se nisu adhezirale. Potom se stanice inkubiraju 10 min u 1ml 0,05 % (v/v) otopini Triton X-100 kako bi se uništile stanice Caco-2 stanične linije i resuspendirale sve bakterijske stanice adhezirane na Caco-2 stanične linije. Sadržaj svake jažice prebaci se u epice i centrifugira se 5 min na 13 000 rpm. Talog stanica se resuspendira u fosfatnom puferu i suspenzije se nacijepe u Petrijeve zdjelice s Man-Rogosa-Sharpeovim agarom. Nakon dvodnevne anaerobne inkubacije pri 37°C izbroje se porasle kolonije, a broj stanica se izrazi kao CFU/mL

3.2.6. Kompetitivna ekskluzija s predinkubacijom BMK

Kompetitivna ekskluzija je pojam koji označava svojstvo pojedinih bakterija da spriječe adheziju nepoželjnih mikroba u probavnom sustavu. Takve značajke imaju i bakterije mliječne kiseline. Pri istraživanju kompetitivne ekskluzije s pomoću tih bakterija primjenjuju se suspenzije potencijalno patogenih sojeva bakterija *Salmonella* Typhimurium i *Escherichia coli* (indikatorske bakterije)

BMK se uzgoje u MRS bujonu preko noći pri 37°C u anaerobnim uvjetima. Nakon inkubacije preonoćne kulture stanica se centrifugiraju 5 min pri 4200 o/min te se resuspendiraju u fiziološkoj otopini. Izmjeri se optička gustoća pri A_{620} u mikrotitarskoj pločici, centrifugira se i talozi se resuspendiraju u odgovarajućim volumenima medija kako bi se dobio OD=1. *Salmonella* Typhimurium i *Escherichia coli* uzgoje se u hranjivom bujonu (jer patogeni sojevi slabo rastu). Daljnja priprema patogenih sojeva je ista kao i kod BMK. Jažice s Caco-2 epitelnim stanicama isperu se 3 puta u fosfatnom puferu te se jažicu dodaje 0.5 mL suspenzije bakterija mliječne kiseline i stanice se inkubiraju 30 min pri 37 °C. Nakon inkubacije u jažice se dodaje 0.5 mL suspenzije patogenih bakterija i ponovo se inkubira 30 min pri 37 °C. Jažice se nakon

inkubacije ispiru 3 puta s 1 mL PBS-a kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu adhezirale te se inkubiraju 10 min u 0,05% (v/v) u otopini Triton X-100 kako bi se uništile Caco-2 stanice. Sadržaj svake jažice se prebaci u epicu i centrifugira 5 min. Potom se talog stanica resuspendira u 1 mL fosfatnog pufera u mikrotitarskim pločicama, a broj adheziranih stanica se određuje indirektnom metodom, u Petrijevim zdjelicama s Man- Rogosa- Sharpeovim agarom. Nakon dvodnevne anaerobne inkubacije pri 37°C izbroje se porasle kolonije. Za određivanje broja stanica bakterije Salmonella Typhimurium upotrebljava se XLD, a za određivanje broja stanica vrste Escherichia coli Rapid agar.

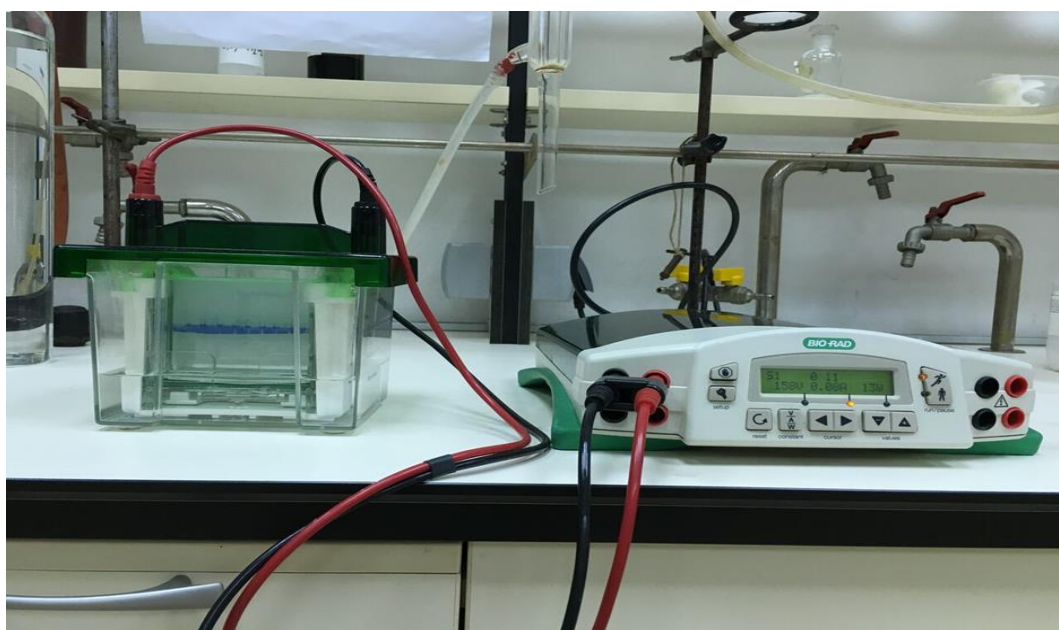
3.2.7. Turbidimetrijsko određivanje brzine rasta kultura odabranih izolata u različitim uvjetima

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

3.2.8. Analiza proteolitičke aktivnosti

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

SDS-PAGE (eng. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (4% gel za sabijanje i 12% gel za razdvajanje) se provodi pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min u kadici za elektroforezu (Slika 9). Nakon završene elektroforeze, gel se boji u 0,1%-tnom metilenskom modrilu R-250 s 50% metanola i 7% octene kiseline kroz najmanje 3 sata. Nakon bojanja, gel se odbojava u 7%-tnoj octenoj kiselini. Nakon završene elektroforeze SDS-PAGE proteinski gelovi se skeniraju (Scanjet 3800; Hewlett Packard, CA, SAD).



Slika 9. Prikaz aparature za provođenje SDS- PAGE

4. REZULTATI I RASPRAVA

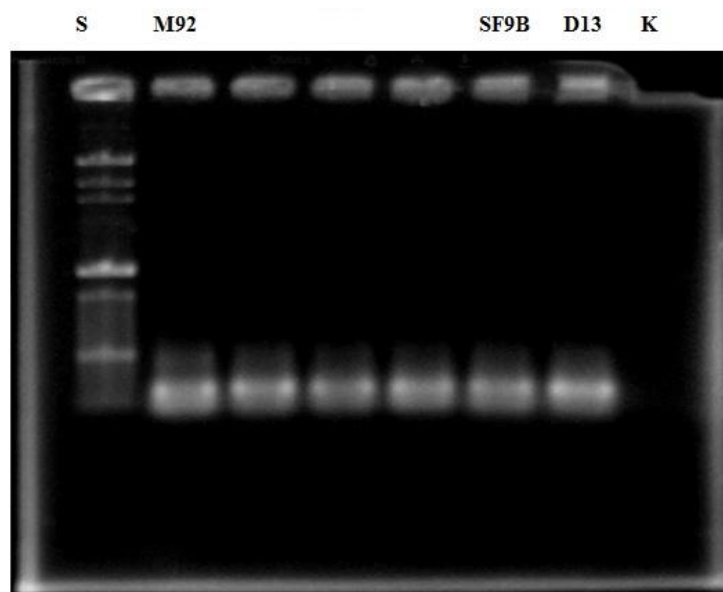
4.1. USPOREDBA ISPITIVANIH *Lactobacllus* SOJEVA PRIMJENOM GEL ELEKTROFOREZE U DENAURIRAJUĆEM GRADIJENTU (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Provođenjem gel elektorofreze u denaturirajućem gradijentu (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) uspoređeni su bakterijski sojevi koji pripadaju rodu *Lactobacillus* budući da je tom metodom moguće razlikovati bakterijske sojeve unutar iste bakterijske vrste. Kako bi identificirali ispitivane bakterijske sojeve najprije je provedena izolacija DNA.

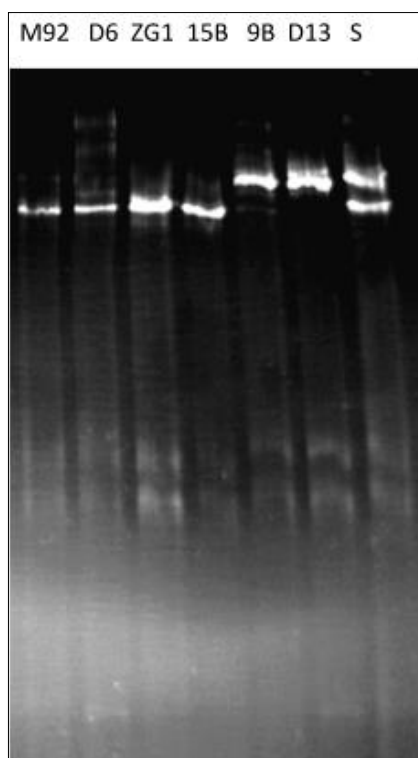
Rezultati koncentracije DNA izmjerene pomoću BioSpec Nano uređaja prikazani su u Tablici 5. Nakon izolacije i mjerenja koncentracije DNA provedena je PCR za DGGE s početnicama HDA1 i HDA2 kako bi se umnožili željeni fragmenti koje omeđuju ove dvije početnice i kako bi se omogućila vizualizacija DNA vrpce na gelu. Produkti PCR reakcije nanose se na agarozni gel te se provodi elektroforeza da se potvrdi uspješnost PCR reakcije. Kao negativna kontrola korišten je uzorak koji ne sadrži DNA, kako bi potvrdili da fragment dobiven na gelu nije dimer početnica. Rezultati DNA elektroforeze sa produktima PCR reakcije su prikazani na slici 10. Potom je provedena DGGE elektroforeza sa gelovima dvaju različitih gradijenata (30 do 70% i 40 do 60%). Gelovi su obojani etidijevim bromidom i skenirani, a rezultati su prikazani na slici 11.

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

| Uzorak | Koncentracija (ng/ μ L) |
|--------|-----------------------------|
| M92 | 47,07 |
| SF9B | 17,29 |
| D13 | 366,86 |



Slika 10. Prikaz gela nakon provedene DNA elektroforeze sa produktima PCR reakcije; S- standard; M92 - *Lactobacillus helveticus*; SF9B - *Lactobacillus paraplantarum*; D13 - *Lactobacillus plantarum*; K – negativna kontrola



Slika 11. Prikaz produkata PCR reakcije na 30% do 70% gelu nakon provedene DGGE; S- standard; M92 - *Lactobacillus helveticus*; D6 - *Lactobacillus brevis*; ZG1 - *Lactobacillus brevis*; SF15B - *Lactobacillus brevis*; SF9B - *Lactobacillus paraplantarum*; D13 - *Lactobacillus plantarum*

Prema rezultatima koji su dobiveni gel elektroforezom vidljivi su bendovi svih analiziranih sojeva te je time potvrđena uspješno provedena PCR reakcija. Negativnom kontrolom je utvrđeno da fragment dobiven na agaroznom gelu nije dimer početnica HDA1 i HDA2 jer u zadnjoj jažici nema benda (Slika 10).

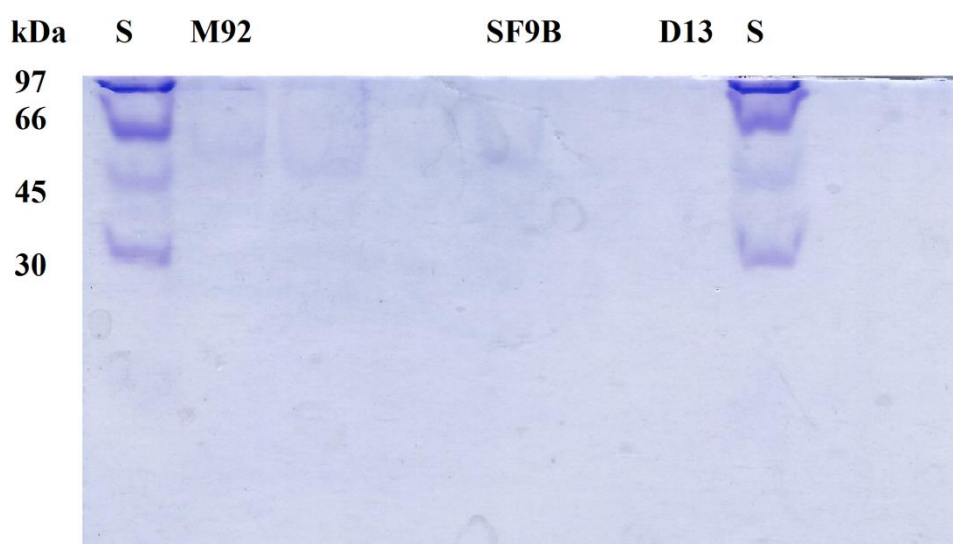
DGGE elektroforeza provodila se sa gelovima dvaju različitih gradijenata (30 do 70% i 40 do 60%). Bolji rezultati postignuti su koristeći 30% do 70%-tni gel te su stoga prikazani na slici 11. DGGE metodom se mogu razlikovati sojevi unutar iste bakterijske vrste te su uzeti dodatni sojevi za analizu (D6-*L. brevis*; SF15B- *L. brevis*; ZG1- *L. brevis*) radi usporedbe rezultata. Uspoređujući bendove na gelu nakon provedene DGGE metode vidi se da sojevi *L. brevis* D6, *L. brevis* ZG1 i *L. brevis* SF15B imaju bend u istoj ravnini, dok soj *L. helveticus* M92 ima regiju sličnu *L. brevis* vrstama. Bendovi sojeva *L. paraplantarum* SF9B i *L. plantarum* D13 su u drugoj razini u odnosu na *L. brevis* vrste (D6, ZG1, SF15B) (Slika 11). U zadnjem stupcu vide se dva benda, jer je to standard u kojem su pomiješani svi sojevi.

4.2. EKSTRAKCIJA PROTEINA VEZANIH NA S-SLOJ (eng. Surface-Layer Associated Proteins, SLAP)

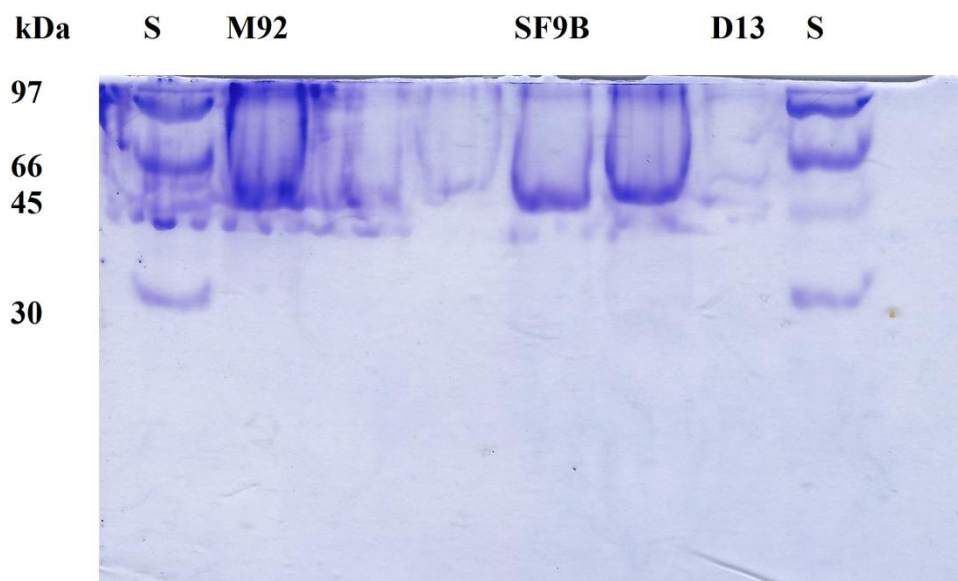
Površina nekih bakterija prekrivena je kristalnim slojem proteinskih podjedinica koje se nazivaju S-proteini (Slps), a čija je molekulska masa u rasponu od 40 do 200 kDa (Sára i Sleytr, 2000). Bakterije mliječne kiseline koje pripadaju *Lactobacillus* rodu, koljeno *Firmicutes*, su Gram-pozitivne, anaerobne ili mikroaerofilne, nesporogene te s niskim udjelom GC parova (Pot i sur., 1994). Neke *Lactobacillus* vrste formiraju S-sloj, uključujući *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus kefiranofaciens* (Åvall-Jääskeläinen i Palva, 2005; Hynönen i Palva, 2013). S-proteini eksprimirani na površini laktobacila pokazuju odgovarajući stupanj sličnosti u usporedbi s S-proteinima nekih drugih Gram- pozitivnih bakterija (Boot i Pouwels, 1996).

S-proteini se ekstrahiraju s površine stanica Gram-pozitivnih bakterija tretmanom LiCl ili GHCl, koji dovodi do kidanja vodikovih veza između S-proteina i sekundarnih polisaharida na staničnoj površini (Sára i Sleytr, 2000). Provođenjem standardne metode ekstrakcije S-proteina s LiCl, željela se ispitati prisutnost S-proteina i SLAP proteina kod soja *L. paraplantarum* SF9B, čiji rezultati su uspoređivani sa rezultatima soja *L. helveticus* M92 kao pozitivnom kontrolom te sa onima kod negativne kontrole, soja *L. plantarum* D13.

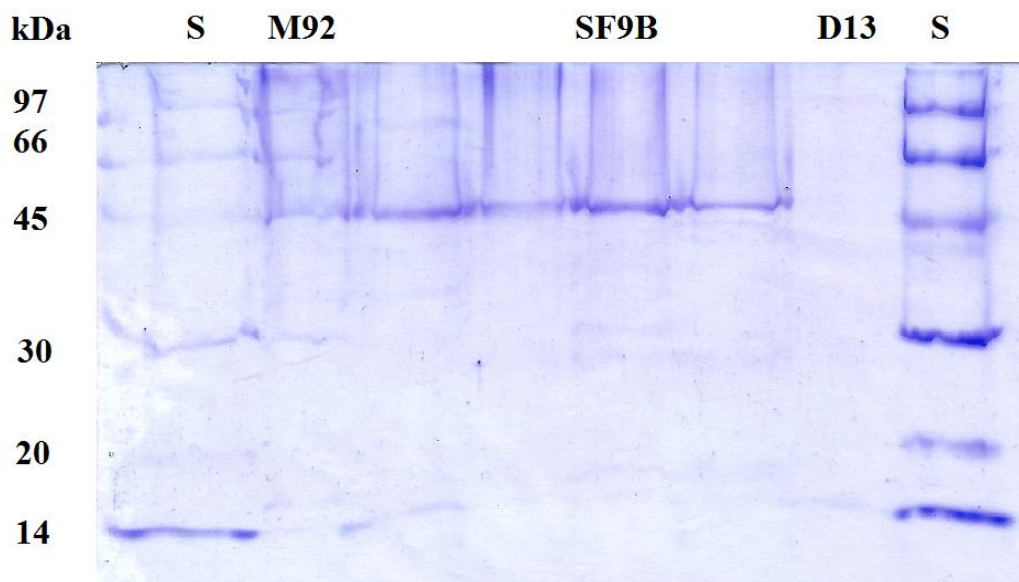
Prekonočne kulture stanica su tretirane s 5M LiCl kako bi se pokidale vodikove veze između S-proteina i sekundarnih polisaharida na površini stanice. Ekstrahirani S-proteini zajedno sa SLAP proteinima koji su na njih vezani nalazili su se u supernatantu koji je nakon toga dijaliziran kroz 24h. Nakon dijalize provedena je SDS-PAGE elektroforeza s uzorkom supernatanta kako bi potvrdili učinkovitost metode (Slika 12). Sadržaj membrane se nakon 1. dijalize centrifugira, te se talog resuspendira u 1M LiCl kako bi došlo do razdvajanja SLAP proteina od S-proteina koji nisu topivi u 1M LiCl. Prisutnost S-proteina je potvrđena SDS-PAGE elektroforezom, nanošenjem taloga na gel (Slika 13). Nakon druge dijalize ponovno je provedena SDS-PAGE elektroforeza kako bi potvrdili prisutnot SLAP proteina (Slika 14).



Slika 12. Ispitivanje prisutnosti S-proteina i SLAP proteina provođenjem SDS-PAGE elektroforeze supernatanta nakon prve dijalize; S-standard; M92- *L. helveticus*; SF9B- *L. paraplantarum*; D13 – *L. plantarum*



Slika 13. Ispitivanje prisutnosti S-proteina i SLAP proteina provođenjem SDS-PAGE elektroforeze taloga nakon prve dijalize; S-standard; M92- *L. helveticus*; SF9B- *L. paraplantarum*; D13 – *L. plantarum*



Slika 14. Ispitivanje prisutnosti SLAP proteina u uzorku supernatanta nakon tretmana 1M LiCl provođenjem SDS-PAGE elektroforeze nakon druge dijalize; S-standard; M92- *L. helveticus*; ZG1 – *L. brevis*; D13 – *L. plantarum*.

Rezultati dobiveni provođenjem SDS- PAGE elektroforeze nanošenjem supernatanta i taloga na gel nakon prve dijalize potvrđuju uspješno provedenu metodu. Na gelu na koji je nanešen supernatant nema vidljivih bendova (Slika 12) što dokazuje da u supernatantu nisu prisutni proteini, dok se na gelu na koji je nanešen talog (Slika 13) jasno vide bendovi proteina soja *L. helveticus* M92 i ispitivanog soja *L. paraplantarum* SF9B. Bend kod soja koji služi kao pozitivna kontrola je izraženiji u odnosu na bend ispitivanog soja. Kod soja *L. plantarum* D13 kojeg koristimo kao negativnu kontrolu, nema benda na gelu nakon provođenja SDS- PAGE elektroforeze jer ne ekprimira S-proteine. Ovi rezultati sugeriraju da je provođenje metode taloženja proteina s LiCl bilo uspješno s obzirom na to da su uzorci taloga nanešeni na gel dali odgovarajuće bendove koji prema svojoj molekularnoj masi odgovaraju S-proteinima i SLAP proteinima.

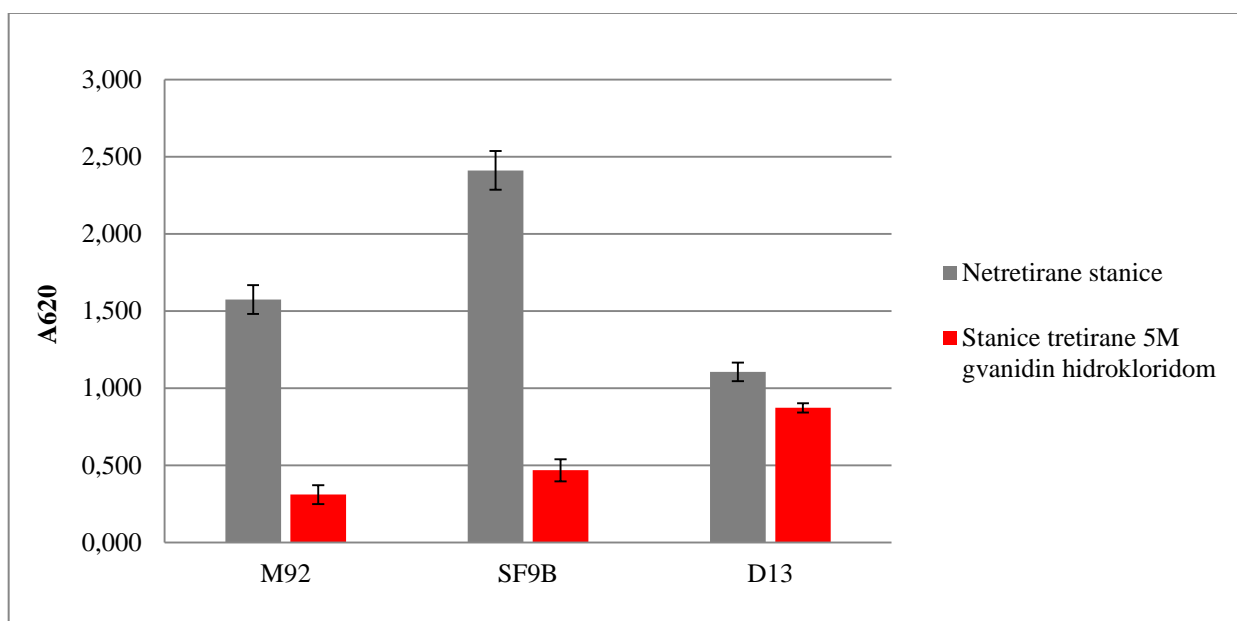
Rezultati na slici 14 potvrđuju prisutnost SLAP proteina nakon druge dijalize kod soja *L. helveticus* M92 i *L. paraplantarum* SF9B jer se na gelu nakon provedene SDS-PAGE elektroforeze vide bendovi u rasponu od 46-97 kDa, što odgovara molekularnoj masi SLAP proteina. Za razliku od pozitivne kontrole i ispitivanog soja, soj *L. plantarum* D13 nema S-proteine i SLAP proteina, što se također vidi na slici 14 jer na gelu nisu vidljive proteinske vrpce.

4.3. ADHEZIJA SOJA *L. paraplantarum* SF9B NA MUCIN

Crijevne epitelne stanice prekriva zaštitna sluz, koju čine glikoproteini i glikolipidi zajedno sa glikoproteinom mucinom kao glavnom komponentom tog zaštitnog sloja. Preduvjet za kolonizaciju bakterija na površinu epitelnih stanica gastrointestinalnog trakta je adhezija na mucin (Berg, 1996). Sposobnost laktobacila da se vežu na komponente epitelnih crijevnih stanica varira s obzirom na vrstu i soj (Jacobsen i sur., 1999.), pri čemu mnogi eksprimiraju velike površinske proteine s velikim ponavljajućim strukturama koji su uključeni u adheziju na mucin. Iako sam mehanizam nije još potpuno jasan, sugerira se važnost glikoliziranih proteina koji imaju glavnu ulogu u adheziji tih proteina na vezujuće domene mucina (oligosaharidi). Jedan od faktora koji pokazuje veliku sposobnost i važnost u adheziji laktobacila je sloj S-proteina (Buck i sur., 2005). Istraživanja koja su provedena na soju *L. kefir* koji tretiran sa NaOH ili LiCl ukazuju na manji kapacitet tako tretiranih stanica u adheziji na mucin i ostale komponente sluzi u tankom i debelom crijevu, u odnosu na stanice istog soja s čije površine nije uklonjen sloj S-proteina (Carasi i sur., 2014). Rezultati tog istraživanja potvrđuju teoriju da S-proteini na površini bakterija mliječne kiseline imaju važnu ulogu u adheziji, čime se postiže

interakcija s epitelom te se posljedično omogućava kolonizacija, autoagregacija i koagregacija stanica.

S obzirom da adhezija laktobacila na mucin ovisi o vrsti i soju, a prethodnom metodom je potvrđena prisutnost S-proteina kod ispitivanog soja, ovo istraživanje je provedeno kako bi se utvrdila mogućnost adhezije soja *L. paraplantarum* SF9B i uloga prisutnih S-proteina u adheziji na mucin. Kao pozitivna kontrola korišten je soj *L. helveticus* M92 za koji je dokazano da eksprimira S-proteine na svojoj površini, dok je soj *L. plantarum* D13 korišten kao negativna kontrola, budući da se radi o srodnom soju laktobacila koji ne eksprimira S-proteine.



Slika 15. *In vitro* ispitivanje adhezije stanica sa i bez S-proteina na mucin; M92 - *Lactobacillus helveticus*; SF9B *Lactobacillus paraplantarum*; D13 – *Lactobacillus plantarum*

Stanice soja *L. helveticus* M92 koje nisu tretirane gvanidin hidrokloridom pokazale su veću apsorbanciju u odnosu na stanice tretirane s gvanidin hidrokloridom (Slika 15). Takvi rezultati potvrđuju teoriju da se tretmanom sa GHCl-om uklanjaju S-proteini koji imaju ulogu u adheziji na mucin.

Soj *L. paraplantarum* SF9B čija smo svojstva ispitivali je pokazao slične rezultate kao i pozitivna kontrola, soj *L. helveticus* M92. Došlo je do značajnog smanjenja apsorbancije nakon tretmana sa gvanidin hidrokloridom u odnosu na netretirane stanice (Slika 15). Ovi rezultati ukazuju na to da S-proteini soja *L. paraplantarum* SF9B također imaju ulogu u adheziji na mucin, jer je njihovim uklanjanjem sposobnost adhezije znatno smanjena.

Kod soja *L. plantarum* D13, koji je služio kao negativna kontrola, nije primijećena značajna razlika u adheziji prije i nakon tretiranja stanica GHCl-om (Slika 15). Dodatno, sposobnost adhezije netretiranih stanica tog soja bila je manja nego sposobnost adhezije netretiranih stanica sojeva koji eksprimiraju S-proteine, što ukazuje na selektivnu prednost sojeva koji na svojoj površini imaju sloj S-proteina u adheziji na mucin. U adheziji stanica soja *L. plantarum* D13 na mucin sudjeluju neki drugi adhezijski faktori.

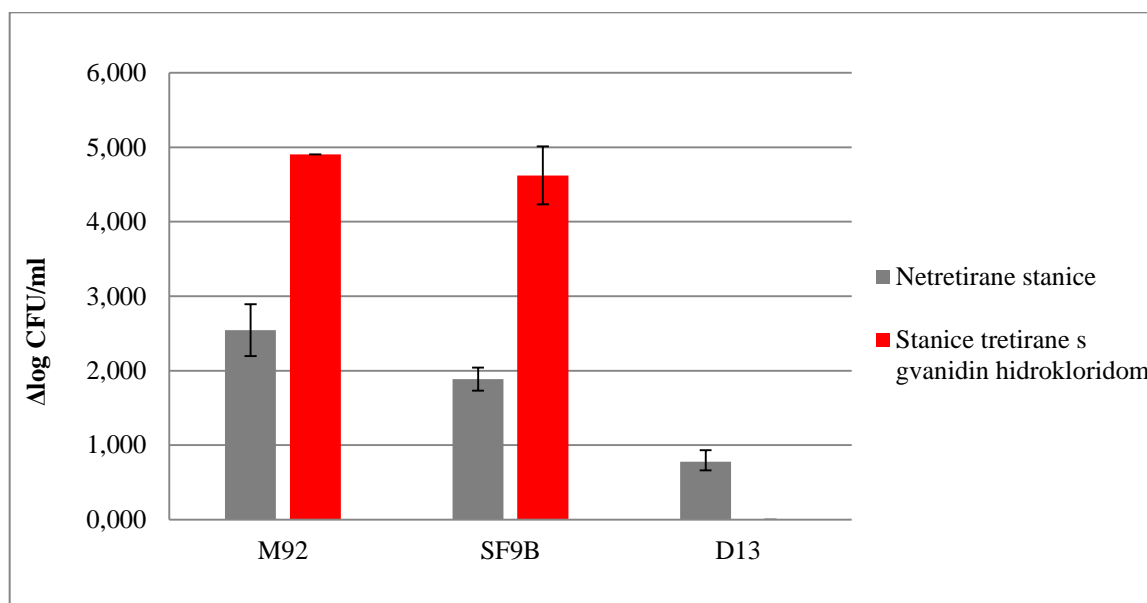
4.4. ADHEZIJA SOJA *L. paraplantarum* SF9B NA Caco-2 STANICE

Uravnoteženu crijevnu mikrofloru čine različite vrste Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, uključujući bakterije koje pripadaju vrsti *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Fusobacter* i *Escherichia coli* (Savage, 1977; Tannock 1988). *Lactobacillus* vrste su izolirane iz dijelova gastrointestinalnog trakta čovjeka i od tada postoji veliki interes za njihovo istraživanje i primjenu, zbog tvrdnji o blagotvornom učinku na zdravlje domaćina. Laktobacili su najvažniji sudionici uravnotežene crijevne mikroflore, a proučavanje mehanizama pomoću kojih koloniziraju intestinalni trakt pomaže u razumijevanju utjecaja uravnotežene mikroflore na zdravlje domaćina.

In vivo istraživanja mehanizama kojima se bakterije vežu na površinu crijevnih stanica su vrlo zahtjevna, stoga su razvijeni *in vitro* modeli pomoću kojih se istražuje adhezija bakterija na humane epitelne crijevne stanice. Razvijen je velik broj staničnih linija humanog adenokarcinoma, koje posjeduju svojstva različitih tipova stanica tkiva crijevnog epitela (Dharmasathaphorn i sur., 1984; Fogh i sur., 1977; Huet i sur., 1987; Pinto i sur., 1983). Jedna od staničnih linija koja se koristi u istraživanjima adhezije bakterija je Caco-2 stanična linija (Fogh i sur., 1977; Pinto i sur. 1983). Caco-2 stanice eksprimiraju proteinske markere koji su jednaki onima koje eksprimiraju stanice crijevnih resica i stoga imaju vrlo važnu ulogu u istraživanju adhezije BMK.

Rezultati koje su 1994 godine dobili Greene i Klaenhammer provodeći istraživanje u kojem su htjeli dokazati ulogu S-proteina u adheziji na Caco-2 stanice koristeći sojeve *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 i NCFM/N2, pokazali su da S-proteini koji se eksprimiraju na površini ispitivanih sojeva ne utječu na adheziju na Caco-2 stanice. S-proteini eksprimirani na površini ovih sojeva su slični, ali ne i identični S-proteinima koji se nalaze na površini drugih laktobacila (Lortal i sur., 1992) te se pretpostavilo da na adheziju ovih sojeva na Caco-2 stanice utječu druge komponente prisutne na površini proteina (Greene i Klaenhammer, 1994).

Stoga je ispitana uloga S-proteina u adheziji na Caco-2 staničnu liniju, koje eksprimira soj *Lactobacillus paraplantarum* SF9B, pri čemu je kao pozitivna kontrola korišten soj *L. helveticus* M92, a kao negativna kontrola soj *L. plantarum* D13.



Slika 16: Ispitivanje adhezije odabranih bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju;

M92- *Lactobacillus helveticus*; SF9B- *Lactobacillus paraplantarum*; D13 - *Lactobacillus plantarum*.

Indirektnom metodom provjeren je broj adheziranih stanica na Caco-2 staničnu liniju. Iz dobivenih rezultata vidi se da je $\Delta\log$ CFU/mL kod soja *L. helveticus* M92 koji ima S-sloj manji, dok je kod istog soja koji ne sadrži S-sloj $\Delta\log$ CFU/mL značajno veći. Iz tih vrijednosti proizlazi da su se stanice soja *L. helveticus* M92 sa S-slojem adhezirale na površinu Caco-2 stanica u većoj mjeri od stanica istog soja bez S-sloja (Slika 16).

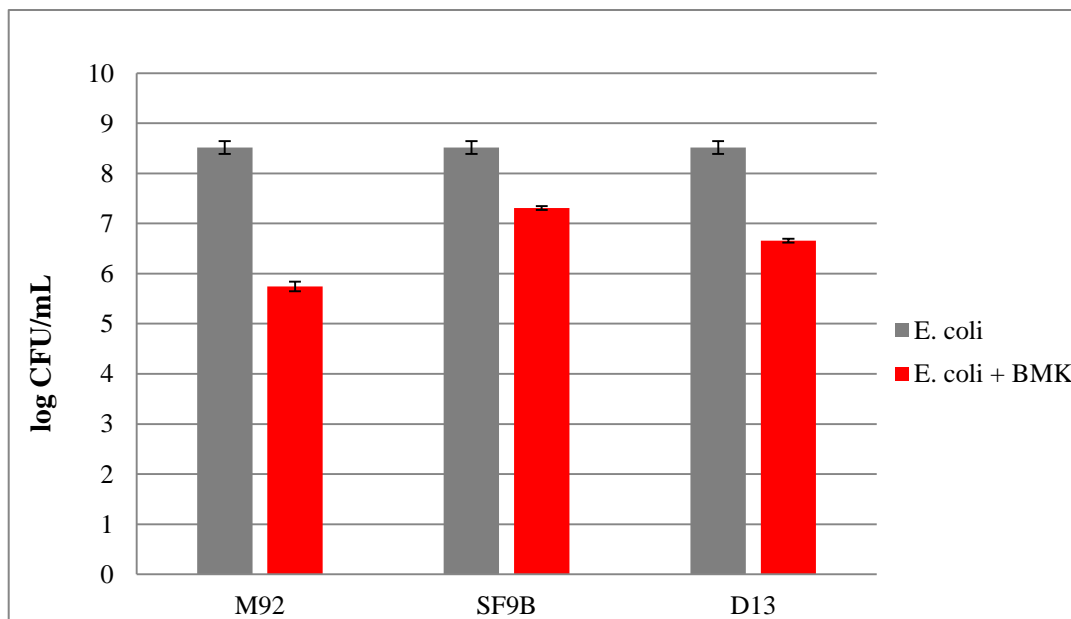
Rezultati dobiveni za ispitivani soj *L. paraplantarum* SF9B slažu se sa rezultatima pozitivne kontrole, što potvrđuje na prisutnost S-proteina na površini stanice i njihovu ulogu S-proteina u adheziji na Caco-2 staničnu liniju (Slika 16). Stanice soja *L. plantarum* D13 veoma su se uspješno adhezirale na Caco-2 stanice, dok zbog pogreške tijekom izvođenja eksperimenta, nema rezultata za stanice soja *L. plantarum* D13 nakon tretmana sa GHCl.

4.5. KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA PATOGENA

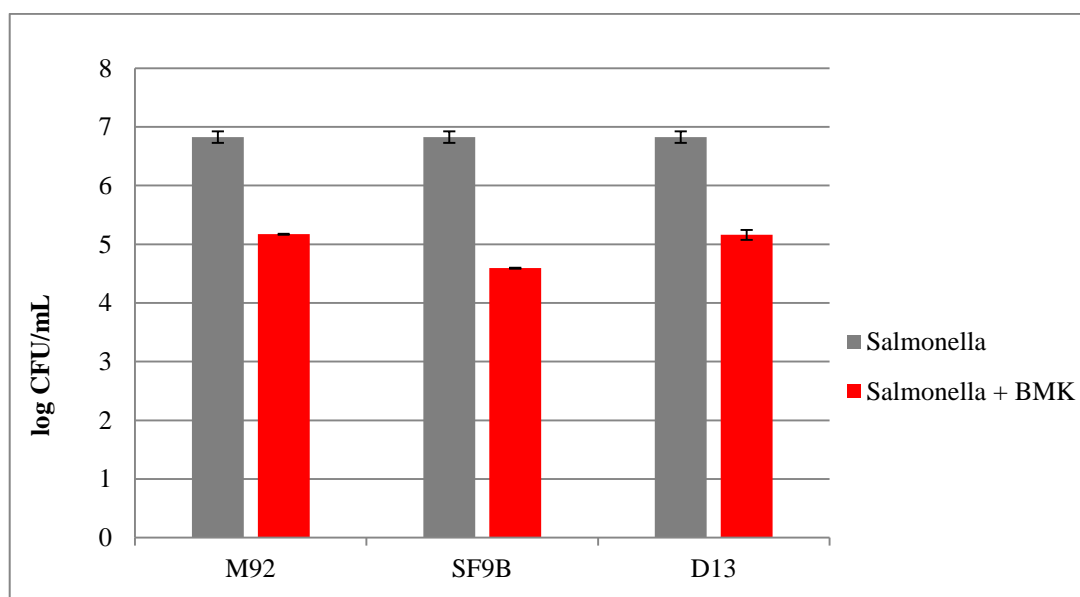
Ključan faktor u preživljavanju i kolonizaciji bakterija u gastrointestinalnom traktu je adhezija na crijevne epitelne stanice. Za patogene bakterije, adhezija na epitel je kritičan korak, sve dok otpuštanje enzima i toksina inicira nekrotični proces direktno u ciljanu stanicu čime se olakšava invazija. Epitelne stanice gastrointestinalnog trakta su zaštićene od patogenih bakterija mnogim mehanizmima. Jedan od njih je redukcija infekcija izazvanih patogenima kompeticijom prisutne mikrobiote za vezna mjesta u ekosustavu i izlučivanje komponenti koje imaju antimikrobnu aktivnost (Ouweland i sur., 2003; Baccigalupi i sur., 2005).

Caco-2 stanice, osim što se koriste za proučavanje mehanizama pomoću kojih se bakterije koje čine uravnoteženu crijevnu mikrofloru adheziraju na crijevne epitelne stanice, imaju vrlo važnu ulogu u istraživanju mehanizama koji su odgovorni za interakcije patogenih bakterija i bakterija mliječne kiseline koje konkuriraju za isti ekosustav. Neke od patogenih bakterija koje konkuriraju crijevnoj mikroflori za vezanje na Caco-2 stanice su *Salmonella typhimurium* (Finlay i Falkow., 1990; Gahring i sur., 1990), *Listeria monocytogenes* (Gaillard i sur., 1987; Mounier i sur., 1990), enteropatogenu (Knutton i sur., 1989) i enterotoksičnu *Escherichia coli* (Darfeuille-Michaud i sur., 1990) i *Vibrio cholerae* (Panigrahi i sur., 1990).

Kako bi se ispitala kompetitivna ekskluzija s predinkubacijom bakterija mliječne kiseline (*Lactobacillus helveticus* M92; *Lactobacillus paraplantarum* SF9B; *Lactobacillus plantarum* D13) korištene su suspenzije potencijalno patogenih sojeva bakterija *Salmonella* Typhimurium FP1 i *Escherichia coli* 3014, uzgojene na hranjivom bujonu. Prvo se u jažice s Caco-2 stanicama dodaju suspenzije bakterija mliječne kiseline i inkubiraju 30 min. Nakon inkubacije dodaju se suspenzije patogenih bakterija i ponovi se inkubacija od 30 min. Da bi se nakon inkubacije uklonile stanice koje nisu adhezirale na Caco-2 stanice, jažice se ispiru 3 puta s PBS puferom, dok se poslije toga Caco-2 stanice unište dodatkom otopine Triton X-100. Broj adheziranih stanica patogenih bakterija se odredi indirektnom metodom, pri čemu se za određivanje broja stanica bakterije *Salmonella* Typhimurium FP1 upotrebljava se XLD, a za određivanje broja stanica vrste *Escherichia coli* 3014 Rapid agar.



Slika 17. Kompetitivna ekskluzija *E. coli* 3014 s BMK; M92- *Lactobacillus helveticus*; SF9B- *Lactobacillus paraplantarum*; D13 - *Lactobacillus plantarum*.



Slika 18. Kompetitivna ekskluzija *S. Typhiurium* FP1 s BMK; M92- *Lactobacillus helveticus*; SF9B- *Lactobacillus paraplantarum*; D13 - *Lactobacillus plantarum*.

Soj *L. helveticus* M92 nakon inkubacije s patogenom bakterijom *E. coli* u jažicama s Caco-2 stanicama pokazuje rezultate prikazane na slici 17. Iz priloženih rezultata vidi se da soj

L. helveticus M92 u određenoj mjeri sprječava adheziju *E. coli* 3014 na površinu Caco-2 stanica, jer je broj adheziranih stanica *E. coli* 3014 na Caco-2 stanice veći u odnosu na broj stanica koje su inkubirane sa sojem *L. helveticus* M92.

Ispitivani soj *L. paraplantarum* SF9B također pokazuje svojstvo kompetitivne ekskluzije (Slika 17). Nakon inkubacije uočen je manji broj adheziranih stanica *E. coli* 3014 u prisutnosti soja *L. paraplantarum* SF9B u odnosu na broj poraslih stanica nakon inkubacije u odsutnosti soja *L. paraplantarum* SF9B.

Negativna kontrola, soj *L. plantarum* D13, koji ne eksplicira S- proteine, prema dobivenim rezultatima također pokazuje sposobnost inhibicije adhezije *E. coli* 3014 na Caco-2 stanicama (Slika 17). Stoga možemo reći u procesu kompetitivne ekskluzije osim S-proteina sudjeluju i neke druge komponente stanične stjenke.

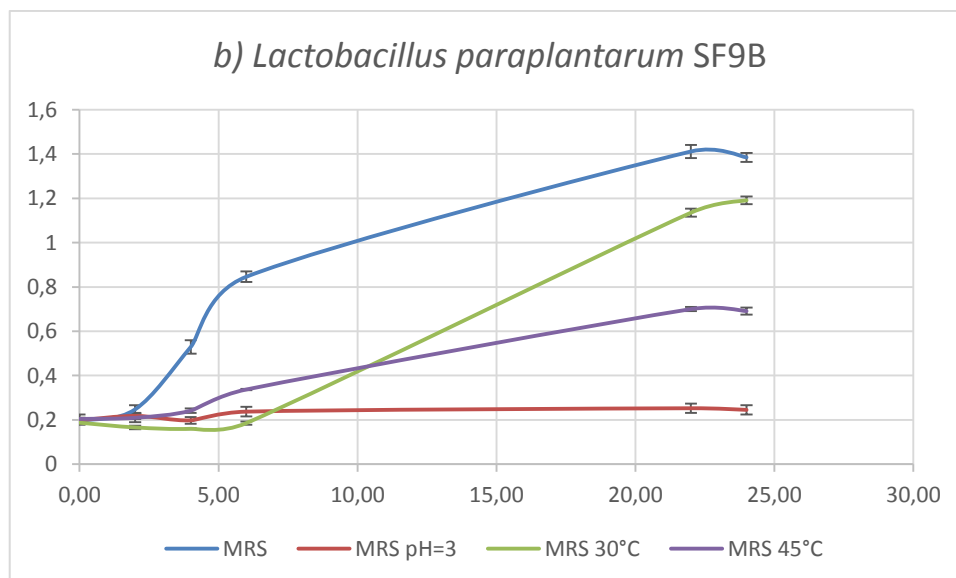
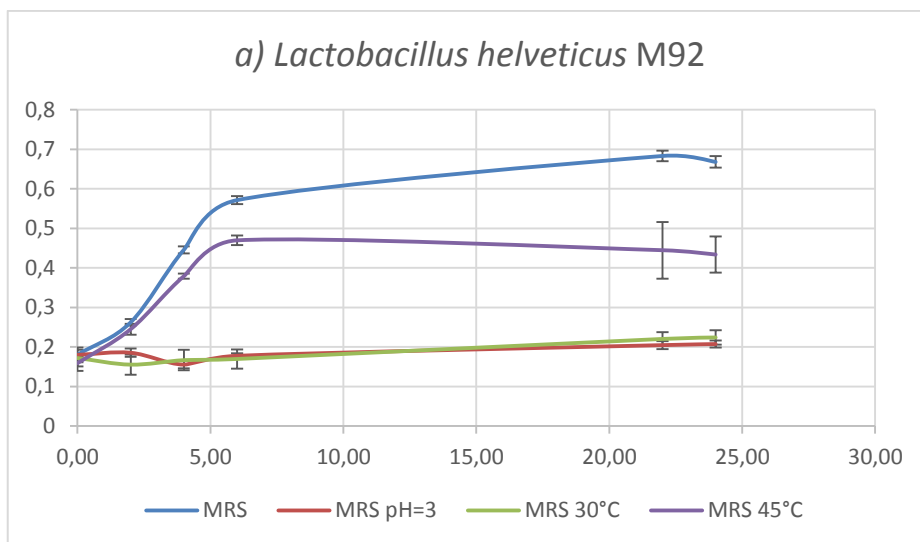
Slični rezultati dobiveni su u ispitivanju kompetitivne ekskluzije potencijalno patogene bakterije *S. Typhiurium* FP1. Prema rezultatima (Slika 18) vidi se da sva tri soja (*L. paraplantarum* SF9B, *L. helveticus* M92 i *L. plantarum* D13) pokazuju svojstvo kompetitivne ekskluzije, jer je broj adheziranih stanica patogene bakterije *S. typhiurium* na Caco-2 stanice manji u usporedbi s brojem adheziranih stanica patogene bakterije *S. typhiurium* na Caco-2 stanice u odsutnosti odabranih sojeva BMK.

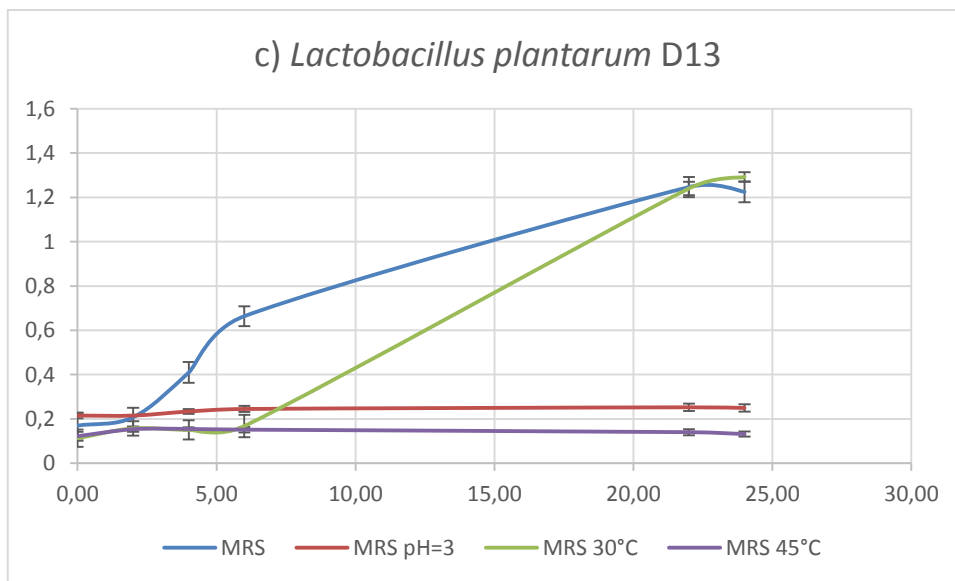
4.6. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE BRZINE RASTA *L. paraplantarum* SF9B U RAZLIČITIM UVJETIMA

Glavnu prepreku pri prolasku mikroorganizama kroz gastrointestinalni trakt čine niska pH-vrijednost, prisutnost proteolitičkih enzima, probavnih sokova itd. Kada se želučani sok izluči, pH-vrijednost mu je oko 2, a udjel soli oko 0,5% . Nadalje, sok tankoga crijeva sadržava relativno veliku koncentraciju žučnih soli koje inhibiraju rast mnogih Gram-pozitivnih bakterija. Zbog toga je otpornost prema žučnim solima glavni kriterij pri odabiru probiotičkih sojeva. Potencijalni probiotički sojevi trebaju preživljavati i rasti u prisutnosti 0,15 – 0,30% žučnih soli tj. pri koncentracijama koje odgovaraju onima u duodenumu čovjeka. S-proteini imaju važnu ulogu u zaštiti mikroorganizama u teškim gastrointestinalnim uvjetima.

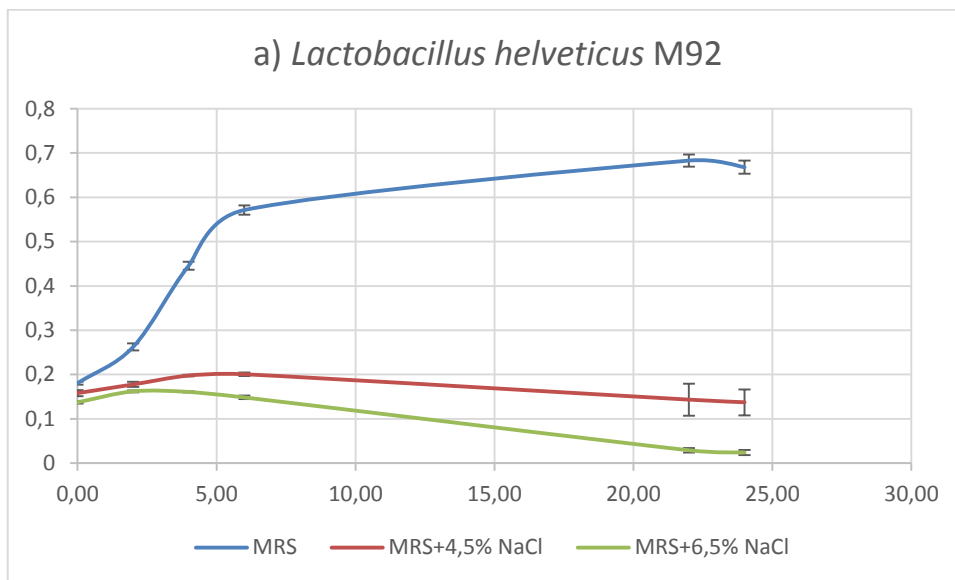
Cilj ovog ekperimenta je ispitati preživljavanje soja u stresnim uvjetima. Ispitana je brzina rasta soja *L. paraplantarum* SF9B pri temperaturi od 30°C i 45°C, pri pH vrijednosti 3 te u prisutnosti različitih koncentracija NaCl (4,5% i 6,5 %) i žučnih soli (0,5%, 1% i 1,5%). Brzina rasta ispitivanog soja usporedila se s brzinom rasta sojeva koji su korišteni kao pozitivna i negativna kontrola, koji su kultivirani pri istim uvjetima. Kao kontrola rasta u optimalnim

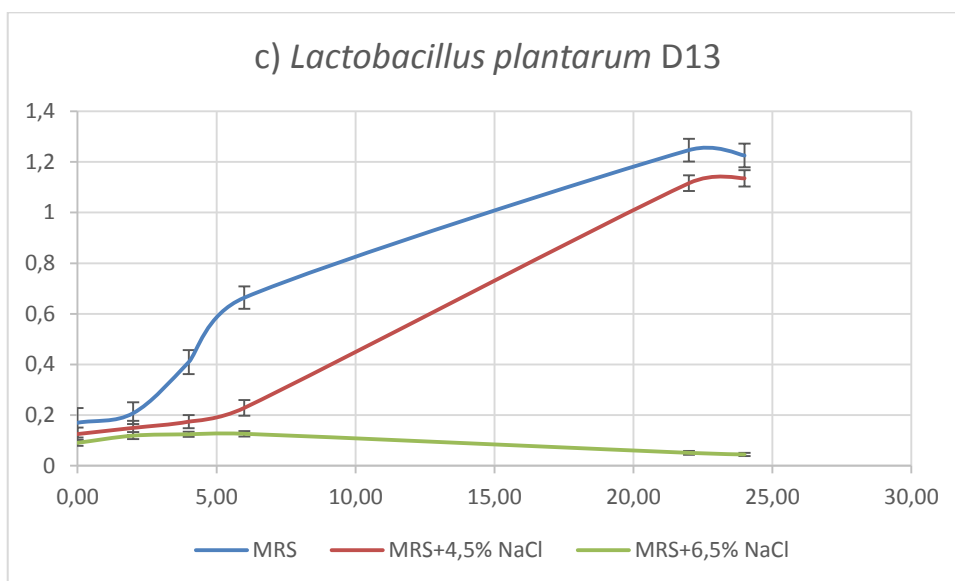
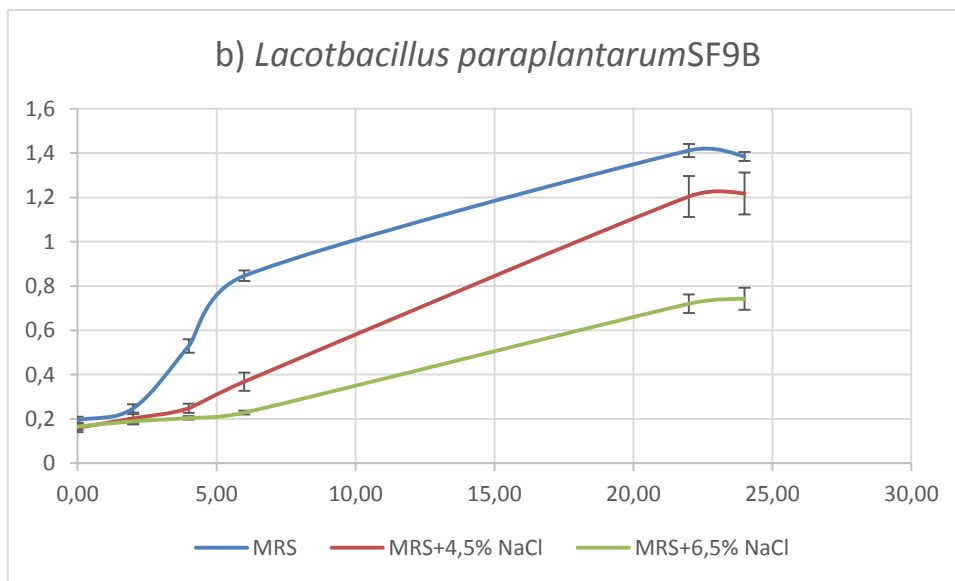
uvjetima, svi su sojevi uzgajani i u čistom MRS bujonu pri 37°C. Na kraju eksperimenta izračunate su srednje vrijednosti i standardna devijacija te na osnovu dobivenih rezultata nacrtane krivulje rasta svakog bakterijskog soja (Slika 19, 20, 21).



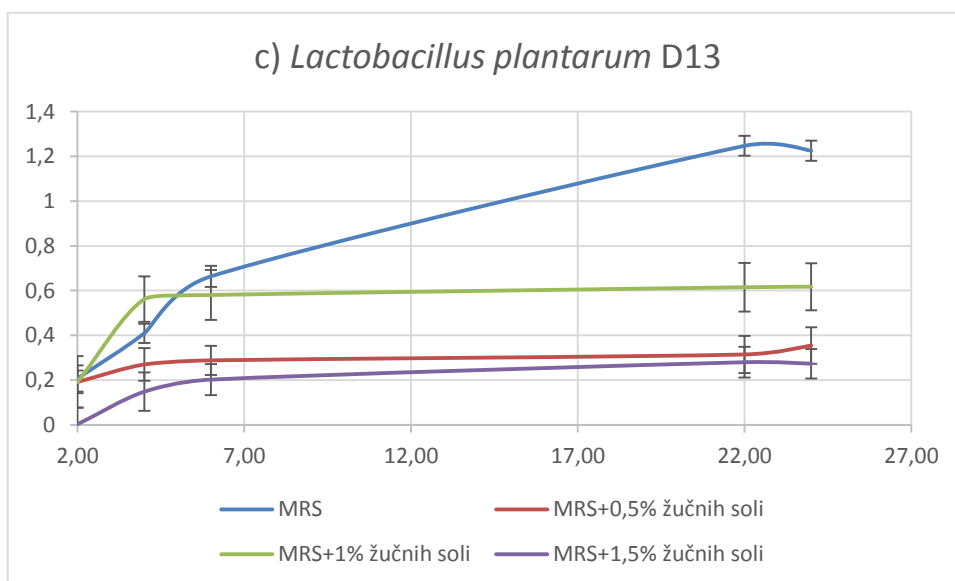
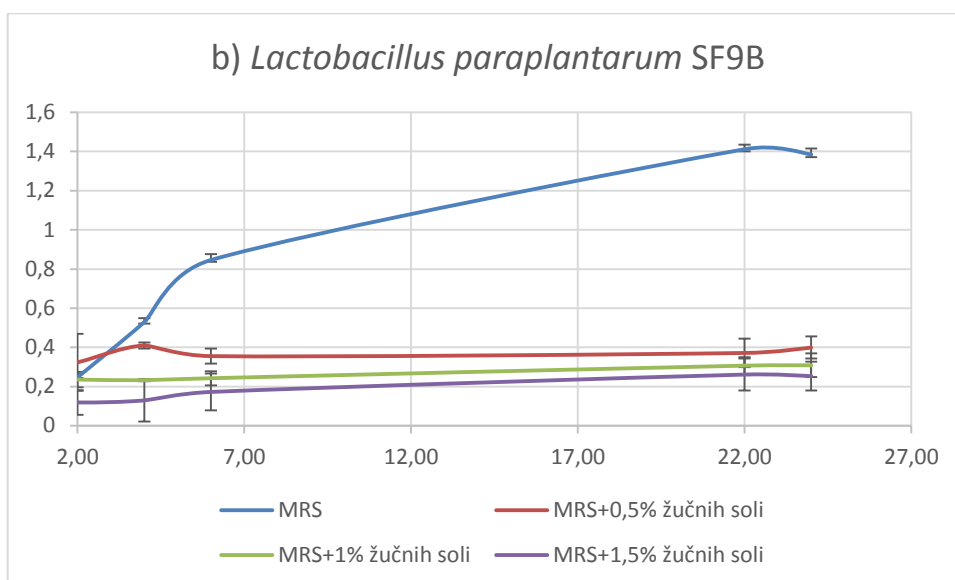
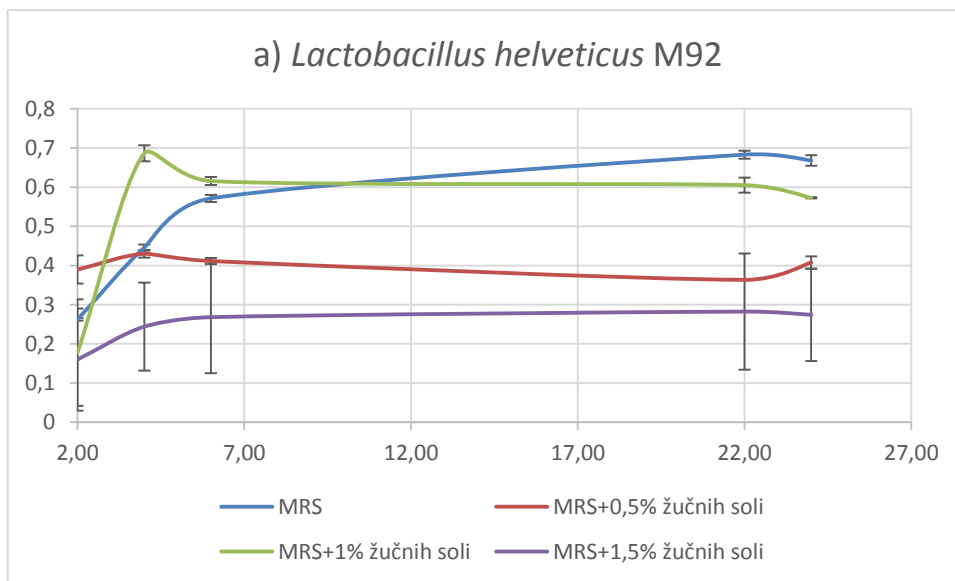


Slika 19. Rast probiotičkih sojeva a) M92 - *Lactobacillus helveticus*; b) SF9B- *Lactobacillus paraplantarum*; c) D13 - *Lactobacillus plantarum* u MRS tekućoj podlozi, u MRS tekućoj podlozi u kojoj je pH=3, te u MRS tekućoj podlozi pri 30°C i 45°C





Slika 20. Rast probiotičkih sojeva a) M92 - *Lactobacillus helveticus*; b) SF9B- *Lactobacillus paraplantarum*; c) D13 - *Lactobacillus plantarum* u MRS tekućoj podlozi, te u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 4,5 % i 6,5 % NaCl



Slika 21. Rast probiotičkih sojeva a) M92 - *Lactobacillus helveticus*; b) SF9B- *Lactobacillus paraplantarum*; c) D13 - *Lactobacillus plantarum* u MRS tekućoj podlozi te u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 0,5 %, 1 % i 1,5 % žučnih soli

Usporedbom grafova a, b i c sa slike 19 soj *L. helveticus* M92 pokazuje nešto manju sposobnost rasta pri pH= 3, u odnosu na ostala dva soja. Na MRS podlozi pri temperaturi od 45°C najbolje preživljava soj *L. paraplantarum* SF9B, zatim *L. helveticus* M92, dok soj *L. plantarum* D13 pokazuje znatno slabije preživljavanje. Unatoč tome, soj *L. plantarum* D13 najbolje preživljava na MRS podlozi pri temperaturi od 30°C, a soj *L. helveticus* M92 najslabije.

Soj *L. paraplantarum* SF9B pokazuje najbolju sposobnost rasta na MRS podlozi sa 4,5 % i 6,5 % NaCl-om (Slika 20b) u odnosu na druga dva ispitivana soja (Slika 20a i c). Dok su sojevi *L. helveticus* M92 (Slika 20a) i *L. plantarum* D13 (Slika 20c) u MRS podlozi sa 4,5 % NaCl pokazali jednak rast.

Rezultati istraživanja na slici 21a, b i c pokazuju da sva tri soja (M92, SF9B i D13) imaju najbolju sposobnosti rasta na MRS podlozi bez dodatka soli, što je i za očekivati. S povećanjem koncentracije žučnih soli na MRS podlozi (0,5 %, 1 % i 1,5%) opada sposobnost rasta za sva tri ispitivana soja (Slika 21a, b i c).

Rezultati koje su dobili Grosu-Tudor i sur. (2016) se djelomično podudaraju s ovim rezultatima, jer se pokazalo da u nekim određenim nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta S-proteini eksprimirani na površini sojeva M92 i SF9B imaju zaštitnu ulogu.

Grosu-Tudor i sur. (2016) su dokazali dobru izdržljivost stanica u nepovoljnim uvjetima, bez obzira na to što se povećanjem nepovoljnih uvjeta ukupan broj stanica smanjivao. Ustanovili su povećanu ekspresiju S-proteina soja *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 u uvjetima u kojima su stanice izložene 0,6% i 3%-tnom NaCl-u te žučnim solima u rasponu od 0,05% do 0,2% pri temperaturi od 42 °C. Za usporedbu rezultata, korištena je kontrolna skupina koja je uzgajana u optimalnim uvjetima pri 37 °C.

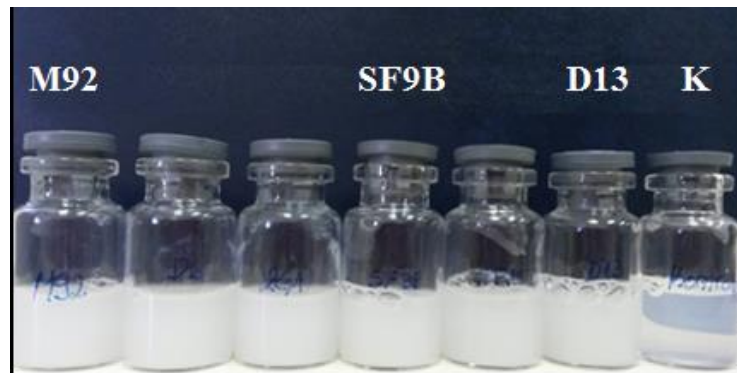
4.7. ANALIZA PROTEINAZNE AKTIVNOSTI

Bakterije mliječne kiseline (BMK) mogu sintetizirati proteinaze niske aktivnosti, koje primarno razgrađuju kazein. Navedena proteolitička aktivnost omogućuje brz rast BMK u mlijeku. Važnost proteinaza, koje sudjeluju u razgradnji kazeina, se očituje u primjeni u

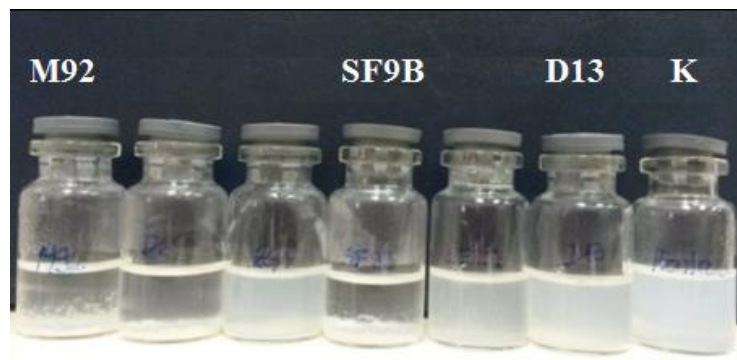
prehrambenoj industriji zbog postizanja bolje teksture i arome fermentiranih mliječnih proizvoda (Zhang i sur., 2015) .

Odabrani sojevi BMK inkubirani su preko noći u otopini obranog mlijeka kako bi se utvrdila njihova proteolitička aktivnost. Nakon prekononoćne inkubacije uzorci su analizirani SDS-PAGE metodom koja omogućuje vizualizaciju proteina u određenom uzorku. Kao kontrola u ovom eksperimentu koristila neinokulirana otopina obranog mlijeka.

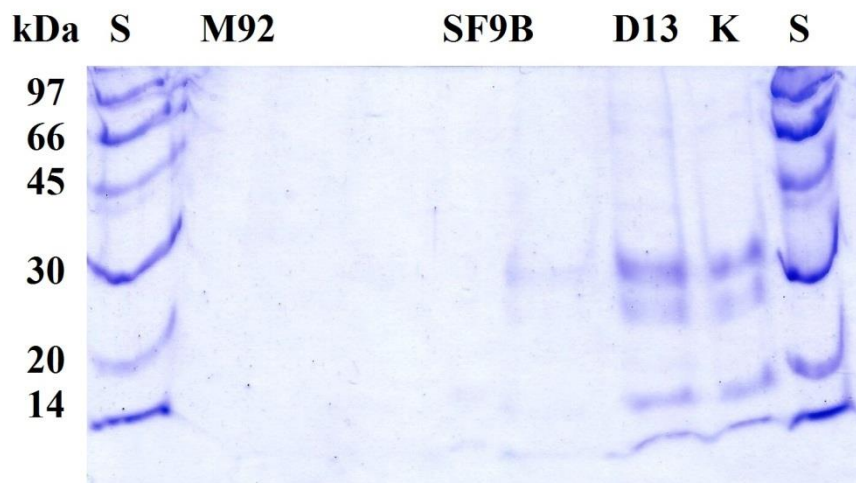
a)



b)



Slika 22. Određivanje proteolitičke aktivnosti u obranom mlijeku uspoređivanjem uzoraka prije (a) i nakon inkubacije (b) preko noći pri 37 °C; M92 – *L. helveticus*; SF9B *L. paraplantarum*; D13 – *L. plantarum*; K – kontrola - otopina obranog mlijeka.



Slika 23. Ispitivanje hidrolize kazeina pomoću odabranih sojeva BMK SDS-PAGE metodom; S- standard proteina niske molekulske mase; M92- *L. helveticus*; SF9B- *L. paraplantarum*; D13 – *L. plantarum*; K – kontrola - otopina obranog mlijeka

Iz dobivenih rezultata se vidi da soj *L. helveticus* M92 pokazuje proteolitičku aktivnost jer je došlo do bistrenja otopine uslijed djelovanja proteolitičkih enzima (Slika 22). Naime, u proteinskom profilu uzorka obranog mlijeka nakon inkubacije stanica tog soja ne nalazi se proteinska vrpca koja odgovara kazeinu (Slika 23).

Soj *L. paraplantarum* SF9B također ima proteolitičku aktivnost, na što ukazuje bistra otopina nakon prekonoćne inkubacije stanica tog soja u obranom mlijeku (Slika 22), a što je potvrđeno izostankom proteinske vrpce koja odgovara kazeinu nakon provođenja SDS-PAGE metode (Slika 23).

Nakon prekonoćne inkubacije soja *L. plantarum* D13 nije došlo do bistrenja otopine što upućuje na nedostatak proteolitičke aktivnosti (Slika 22), što je potvrđeno SDS-PAGE metodom. Naime, proteinska vrpca koja odgovara molekularnoj masi kazeina vidljiva je kod uzorka *L. plantarum* D13 na gelu nakon provedene elektroforeze (Slika 23). Time je dokazano da soj nema sposobnost razgradnje kazeina u obranom mlijeku.

5. ZAKLJUČCI

1. Soj *L. paraplantarum* SF9B srodan je soju *L. plantarum* D13, ali se od njega značajno razlikuje jer na površini stanica eksprimira S-proteine te proteine koji su vezani na sloj S-proteina.
2. S-proteini soja *L. paraplantarum* SF9B imaju ulogu u adheziji stanica tog soja na mucin.
3. Stanice soja *L. paraplantarum* SF9B tretirane sa gvanidin hidrokloridom, koji uklanja S-proteine s površine, su pokazale manju sposobnost adhezije na Caco-2 staničnu liniju u odnosu na netretirane stanice, što je dokaz da S-proteini sudjeluju u adheziji na crijevne epitelne Caco-2 stanice.
4. Stanice soja *L. paraplantarum* SF9B imaju svojstvo kompetitivne ekskluzije test-mikroorganizama *E. coli* 3014 i *S. Typhiurium* FP1 u *in vitro* uvjetima koristeći Caco-2 staničnu liniju.
5. Turbidimetrijskim određivanjem brzine rasta u različitim uvjetima dokazano je da soj *L. paraplantarum* SF9B pokazuje najbolju sposobnost rasta na MRS podlozi pri temperaturi od 45°C i na MRS podlozi sa dodatkom 4,5% i 6,5% NaCl-a u odnosu na kontrolne sojeve, dok je dodatak žučnih soli negativno utjecao na rast stanica ispitivanog soja. Stanice ispitivanog soja sposobne su rasti pri veoma niskim pH vrijednostima (pH=3) kakve vladaju u pojedinim dijelovima ljudskom gastrointestinalnog trakta.
6. Provođenjem analize proteolitičke aktivnosti, dokazano je da sojevi *L. paraplantarum* SF9B te *L. helveticus* M92 kao pozitivna kontrola, imaju proteolitičku aktivnost, dok za soj *L. plantarum* D13 navedeno svojstvo nije dokazano.

6. LITERATURA

- Aravindh, S., Selvakumar, R., Ravichandran, J., Kamachi Mudali, U., Anandbabu, C., Raj, B. (2015) Extremophilic *Bacillus cereus* MVK04 Isolated from thorium ore sample possesses self-assembled surface layer protein on cell wall to resist extreme environments. *Geomicrobiol. J.* **32**, 445–452.
- Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., Gohar, M. (2009) Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 6616–6618.
- Ausiello, C.M., Cerquetti, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, M., Frezza, S., Mastrantonio, P. (2006) Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes Infect.* **8**, 2640–2646.
- Åvall-Jääskeläinen, S., Lindholm, A., Palva, A. (2003) Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2230–2236.
- Åvall-Jääskeläinen, S., Palva, A. (2005) *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 511–529.
- Baccigalupi, L., Di Donato, A., Parlato, M., Luongo, D., Carbone, V., Rossi, M., Ricca, E., De Felice, M. (2005) Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Microbiology* **156**, 830–836.
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanić, K., Šušković, J. (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek* **100**, 43–53.
- Berg, R. D. (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**, 430–435.

- Boot, H. J., Pouwels, P. H. (1996) Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. *Mol. Microbiol.* **21**, 1117–1123.
- Brassart, D. i Schiffrin, E. J. (1997) The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 321–326.
- Buck, B., Altermann, E., Svingerud, T., Klaenhammer, T.R. (2005) Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8344–8351.
- Butler, E., Alsterfjord, M., Olofsson, T.C., Karlsson, C., Malmström, J., Vásquez, A. (2013) Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: an insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiol.* **13**, 235–246.
- Calabi, E., Calabi, F., Phillips, A.D., Fairweather, N. (2002) Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues. *Infect. Immun.* **70**, 5770–5778.
- Carasi, P., Ambrosio, N.M., De Antoni, G.L., Bressollier, P., Urdaci, M.C., Serradell Mde, L. (2014) Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *J. Dairy Res.* **81**, 16–23.
- Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., Fang, W. (2007) The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 307–331.
- Claus, H., Akca, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J.P., König, H. (2002) Primary structure of selected archaeal mesophilic and extremely thermophilic outer surface layer proteins. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 3–12.
- Conroy, D.J.R., Millner, P.A., Stewart, D.I., Pollmann, K. (2010) Biosensing for the environment and defence: aqueous uranyl detection using bacterial surface layer proteins. *Sensors.* **10**, 4739–4755.

Darfeuille-Michaud, A., Aubel, D., Chauviere, G., Rich, C., Bourges, M., Servin, A., Joly, B. (1990) Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Infect. Immun.* **58**,893-902.

De Leeuw, E., Li, X., Lu, W. (2006) Binding characteristics of the *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 surface layer to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**, 210–215.

Dharmasathaphorn, K.I., McRoberts J. A., Mandel K. G., Tisdale L. D., Masui, H. (1984) A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* **246**,204- 208.

Engelhardt, H. (2007) Mechanism of osmoprotection by archaeal S-layers: a theoretical study. *J. Struct. Biol.* **160**, 190–199.

Engelhardt, H., Peters, J. (1998) Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interactions. *J. Struct. Biol.* **124**, 276–302.

Eslami, N., Kermanshahi, R.K., Erfan, M. (2013) Studying the stability of S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in simulated gastrointestinal fluids using SDS-PAGE and circular dichroism. *Iran J. Pharm. Res.* **12**, 47–56.

Fahmy, K., Merroun, M., Pollmann, K., Raff, J., Savchuk, O., Hennig, C., Selenska-Pobell, S. (2006) Secondary structure and Pd(II) coordination in S-layer proteins from *Bacillus sphaericus* studied by infrared and X-ray absorption spectroscopy. *Biophys J.* **91**, 996–1007.

Finlay, B. B., Falkow, S. (1990) *Salmonella* interactions with polarized intestinal Caco-2 epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **162**, 1096-1106.

Flemming, H.C., Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633.

Fogh, J., Fogh, J.M., Orfeo, T., (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cells lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 221–226.

- Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušković, J. (2005) Importance of S layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 285–292.
- Fuchs, T., Huber, H., Teiner, K., Burggraf, S., Stetter, K. (1995) *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a novel metal-mobilizing, *Thermoacidophilic archaeum*, isolated from a uranium mine in Germany. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 560–566.
- Gahring, L. C., Hefron, F., Finlay, B. B., Falkow, S. (1990) Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.* **58**, 443-448.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P. (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **55**, 2822-2829.
- Garrote, G., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A.G., Pe´rez, P., Semorile, L., De Antoni, G. (2004) Heterofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: evidence for the presence of S-layer proteins. *J Dairy Res.* **71**, 222–230.
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Seeeadell, M.A., Gómez-Zavaglia, A. (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 1877-1887.
- Goh, Y. J., Azcarate-Peril, M. A., O'Flaherty, S., Durmaz, E., Valence, F., Jardin, J., Lortal, S., Klaenhammer, T. R. (2009) Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 3093-3105.
- Golowczyc, M.A., Mobili, P., Garrote, G.L., Serradell, M.A., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. (2009) Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *J. Dairy Res.* **76**, 1–6.
- Greene, J. D., Klaenhammer, T.R. (1994) Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4487-4494.

- Grosu-Tudor, S.S., Brown, L., Hebert, E.M., Brezeanu, A., Brinzan, A., Fadda, S., Mozzi, F., Zamfir, M. (2016) S-layer production by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 under environmental stress conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 4573-4583.
- Gupta, A.K., Pathak, R., Singh, B., Gautam, H., Kumar, R., Kumar, R., Arora, R., Gautam, H.K. (2011) Proteomic analysis of global changes in protein expression during exposure of gamma radiation in *Bacillus* sp. HKG 112 isolated from saline soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 574–581.
- Gupta, R.K., Dobritsa, S.V., Stiles, C.A., Essington, M.E., Liu, Z.Y., Chen, C.H., Serpersu, E.H., Mullin, B.C. (2002) Metallothistins: a new class of plant metal-binding proteins. *J. Protein Chem.* **21**, 529–536.
- Hennig, C., Panak, P.J., Reich, T., Roßberg, A., Raff, J., Selenska-Pobell, S., Matz, W., Bucher, J.J., Bernhard, G., Nitsche, H. (2001) EXAFS investigation of uranium(VI) complexes formed at *Bacillus cereus* and *Bacillus sphaericus* surfaces. *Radiochim. Acta*, **89**, 625–631.
- Honma, K., Inagaki, S., Okuda, K., Kuramitsu, H.K., Sharma, A. (2007) Role of a *Tannerella forsythia* exopolysaccharide synthesis operon in biofilm development. *Microb. Pathog.* **42**, 156–166.
- Horie, M., Ishiyama, A., Fujihira-Ueki, Y., Sillanpää, J., Korhonen, T.K., Toba, T. (2002) Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 396–403.
- Huet, C., Sahuquillo M. C., Coudrier E., Louvard, D. (1987) Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J. Cell Biol.* **105**, 345-357.
- Hynönen, U., Palva, A. (2013) *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225–5543.

Hynönen, U., Westerlund-Wikström, B., Palva, A., Korhonen, T.K. (2002) Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* **184**, 3360–3367.

Im, S., Joe, M., Kim, D., Park, D.H., Lim, S. (2013) Transcriptome analysis of salt-stressed *Deinococcus radiodurans* and characterization of salt-sensitive mutants. *Res. Microbiol.* **164**, 923–932.

Jacobsen, C.N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., and Jakobsen, M. (1999) Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4949-4956.

Jakava-Viljanen, M., Palva, A. (2007) Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *Vet. Microbiol.* **124**, 264–273.

Jankowski, U., Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S., Fahmy, K. (2010) S-Layer protein from *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 as matrix for AuIII sorption and Au-nanoparticle formation. *Spectroscopy*, **24**, 177–181.

Khaleghi, M., Kermanshahi, R.K., Yaghoobi, M.M., Zarkesh-Esfahani, S.H., Baghizadeh, A. (2010) Assessment of bile salt effects on S-layer production, slp gene expression, and some physicochemical properties of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 749–756.

Kirby, J.M., Ahern, H., Roberts, A.K., Kumar, V., Freeman, Z., Acharya, K.R., Shone, C.C. (2009) Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. *J. Biol. Chem.* **284**, 34666–34673.

Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P. H., McNeish, A. S. (1989) Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **57**, 1290-1298.

Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., van Kooyk, Y. (2008) S-layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 19474–19479.

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

Kotiranta, A., Haapasalo, M., Kari, K., Kerosuo, E., Olsen, I., Sorsa, T., Meurman, J.H., Lounatmaa, K. (1998) Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis, and adherence to matrix proteins of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer. *Infect. Immun.* **66**, 4895–4902.

Koval, S.F., Hynes, S.H. (1991) Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Bacteriol.* **173**, 2244–2249.

Le Maréchal, C., Peton, V., Plé, C., Vroland, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., Durant, G., Chuat, V., Loux, V., Foligné, B., Deutsch, S.M., Falentin, H., Jan, G. (2015) Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *J. Proteomics.* **113**, 447-461.

Lee, S.W., Sabet, M., Um, H.S., Yang, J., Kim, H.C., Zhu, W. (2006) Identification and characterization of the genes encoding a unique surface (S-) layer of *Tannerella forsythia*. *Gene.* **371**, 102-111.

Li, Q., Liu, X., Zhou, J., Wang, Y. (2015) Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *Int. J. Agric. Policy. Res.* **3**, 84–92.

Lortal, S., van Heijenoort, J., Gruber, K., Sleytr, U. B. (1992) Slayer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 : isolation, chemical characterization and reformation after extraction with lithium chloride. *J Gen Microbiol* **138**, 611-618.

- Marsh, P.D., Moter, A., Devine, D.A. (2011) Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000* **55**, 16–35.
- Meng, J., Zhu, X., Gao, S.M., Zhang, Q.X., Sun, S., Lu, R. (2014) Characterization of surface layer proteins and its role in probiotic properties of three *Lactobacillus* strains. *Int. J. Biol. Macromol.* **65**, 110–114.
- Merroun, M.L., Geipel, G., Nicolai, R., Heise, K-H., Selenska-Pobell, S. (2003) Complexation of uranium (VI) by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* studied using time-resolved laserinduced fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy. *Biometals*, **16**, 331–339.
- Merroun, M.L., Raff, J., Rossberg, A., Hennig, C., Reich, T., Selenska-Pobell, S. (2005) Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5532–5543.
- Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S. (2001) Interactions of three ecotypes of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with U(VI). *Biometals*, **14**, 171–179.
- Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M., Sansonetti, P. J. (1990) Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **58**, 1048-1058.
- Muñoz-Provencio, D., Llopis, M., Antolín, M., de Torres, I., Guarner, F., Pérez-Martínez, G., Monedero, V. (2009) Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch. Microbiol.* **191**, 153–161.
- Narita, Y., Sato, K., Yukitake, H., Shoji, M., Nakane, D., Nagano, K., Yoshimura, F., Naito, M., Nakayama, K. (2014) Lack of a surface layer in *Tannerella forsythia* mutants deficient in the type IX secretion system. *Microbiology*, **160**, 2295–2303.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Roberts, P.J., Ovaska, J., Salminen, E. (2003) Disease-dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* **10**, 643-646.

Panigrahi, P., Tall, B. D., Russell, R. G., Detolla, L. J., Morris, J. G., (1990) Development of an in vitro model for study of non-O1 *Vibrio cholerae* virulence using Caco-2 cells. *Infect. Immun.* **58**,3415-3424.

Pham, T.K., Roy, S., Noirel, J., Douglas, I., Wright, P.C., Stafford, G.P. (2010) A quantitative proteomic analysis of biofilm adaptation by the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Proteomics* **10**, 3130–3141.

Pinto, M., Robine-Léon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. Zweibaum, A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **47**, 323-330.

Pollmann, K., Raff, J., Merroun, M., Fahmy, K., Selenska-Pobell, S. (2006) Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnol. Adv.* **24**, 58–68.

Pollmann, K., Raff, J., Schnorpfeil, M., Radeva, G., Selenska-Pobell, S. (2005) Novel surface layer protein genes in *Bacillus sphaericus* associated with unusual insertion elements. *Microbiology* **151**, 2961–2973.

Posch, G., Pabst, M., Brecker, L., Altmann, F., Messner, P., Schäffer, C. (2011) Characterization and scope of S-layer protein O-glycosylation in *Tannerella forsythia*. *J. Biol. Chem.* **286**, 38714–38724.

Pot. B., Ludwig, W., Kersters, K., Schleifer, K. H. (1994) Taxonomy of lactic acid bacteria. U: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (Vuyst, L., Vandamme, E. J.,ured.) Chapman & Hall, Glasgow, str. 13–90.

Raff, J., Soltmann, U., Matys, S., Schnorpfeil, M., Böttcher, H., Pompe, W., Selenska-Pobell, S. (2002) Bacterial-based bioremediation of uranium mining waste waters by using sol-gel ceramics. U: Uranium in the aquatic environment. (Merkel, B.J., Planer-Friedrich, B., Wolkersdorfer, C., ured.) Springer, Freiberg, str. 615–622.

Rothfuss, H., Lara, J.C., Schmid, A.K., Lidstrom, M.E. (2006) Involvement of the S-layer proteins Hpi and SlpA in the maintenance of cell envelope integrity in *Deinococcus radiodurans* R1. *Microbiology* **152**, 2779–2787.

Ryan, A., Lynch, M., Smith, S.M., Amu, S., Nel, H.J., McCoy, C.E., Dowling, J.K., Draper, E., O'Reilly, V., McCarthy, C., O'Brien, J., Eidhin, D.N., O'Connell, M.J., Keogh, B., Morton, C.O., Rogers, T.R., Fallon, P.G., O'Neill, L.A., Kelleher, D., Loscher, C.E. (2011) A role for TLR4 in *Clostridium difficile* infection and the recognition of surface layer proteins. *PLoS Pathog.* (objavljeno online 30. lipnja 2011.). doi: 10.1371/journal.ppat.1002076

Sakakibara, J., Nagano, K., Murakami, Y., Higuchi, N., Nakamura, H., Shimosato, K., Yoshimura, F. (2007) Loss of adherence ability to human gingival epithelial cells in S-layer protein-deficient mutants of *Tannerella forsythensis*. *Microbiology* **153**, 866–876.

Sára, M., Sleytr, U.B. (2000) S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 859–868.

Savage, D. C. (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 107-133.

Schar-Zammaretti, P., Dillmann, M-L, D'Amico, N., Affolter, M., Ubbink, J. (2005) Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8165–8173.

Schneitz, C., Nuotio, L., Lounatma, K. (1993) Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 290–294.

Schultzelam, S., Beveridge, T.J. (1994a) Nucleation of celestite and strontianite on a cyanobacterial S-layer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 447–453.

Schultzelam, S., Beveridge, T.J. (1994b) Physicochemical characteristics of the mineral-forming Slayer from the *Cyanobacterium synechococcus* strain G124. *Can. J. Microbiol.* **40**, 216–223.

Selenska-Pobell, S., Panak, P., Miteva, V., Boudakov, I., Bernhard, G., Nitsche, H. (1999) Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**, 59–67.

Shimotahira, N., Oogai, Y., Kawada-Matsuo, M., Yamada, S., Fukutsuji, K., Nagano, K., Yoshimura, F., Noguchi, K., Komatsuzawa, H. (2013) The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. *Infect. Immun.* **81**, 1198–1206.

Sillanpaa, J., Martinez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., Lounatmaa, K., Jaakko, Keränen, J., Höök, M., Westerlund-Wikström, B., Pouwels, P.H., Korhonen, T.K. (2000) Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J. Bacteriol.* **182**, 6440–6450.

Sleytr, U.B., Beveridge T.J. (1999) Bacterial S-layers. *Trends Microbiol.* **7**, 253–260.

Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B. (2001) Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog. Surf. Sci.* **68**, 231–278.

Sun, Z., Kong, J., Hu, S., Kong, W., Lu, W., Liu, W. (2013) Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1941–1952.

Tannock, G. W. (1988) The normal microflora: new concepts in health promotion. *Microbiol. Sci.* **5**, 4-8.

Taverniti, V., Stuknyte, M., Minuzzo, M., Arioli, S., De Noni, I., Scabiosi, C., Cordova, Z.M., Junttila, I., Hämäläinen, S., Turpeinen, H., Mora, D., Karp, M., Pesu, M., Guglielmetti, S. (2013) S-layer protein mediates the stimulatory effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1221–1231.

Thallinger, B., Prasetyo, E.N., Nyanhongo, G.S., Gubitez, G.M. (2013) Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* **8**, 97-109.

Thompson, S.A. (2002) Campylobacter surface-layers (S-layers) and immune evasion. *Ann. Periodontol.* **7**, 43–53.

Toba, T., Virkola, R., Westerlund, B., Bjorkman, Y., Sillanpaa, J., Vartio, T., Kalkkinen, N., Korhonen, T.K. (1995) A collagen-binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2467–2471.

Turrone, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O’Connell Motherway, M., Taverniti, V., Mangifesta, M., Milani, C., Viappiani, A., Roversi, T., Sánchez, B., Santoni, A., Gioiosa, L., Ferrarini, A., Delledonne, M., Margolles, A., Piazza, L., Palanza, P., Bolchi, A., Guglielmetti, S., van Sinderen, D., Ventura, M. (2013) Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 11151–11156.

van Tassell, M.L., Miller, M.J. (2011) *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* **3**, 613–636.

Wang, B., Kraig, E., Kolodrubetz, D. (2000) Use of defined mutants to assess the role of the *Campylobacter rectus* S-layer in bacterium-epithelial cell interactions. *Infect. Immun.* **68**, 1465–1473.

Zhang, S., Zhang, L., Han, X. (2015) Lactic acid bacteria proteinase and quality of fermented dairy product. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **55**, 1530-1536.

Zhang, W., Wang, H., Liu, J., Zhao, Y., Gao, K., Zhang, J. (2013) Adhesive ability means inhibition activities for *Lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe* **22**,1–7.