

Identifikacija sojeva i analiza prisutnosti S-proteina bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

Bošković, Anđelina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:509355>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2021.

Anđelina Bošković
1266/BPI

**IDENTIFIKACIJA SOJEVA I
ANALIZA PRISUTNOSTI S-
PROTEINA BAKTERIJA
MLIJEČNE KISELINE
IZOLIRANIH IZ MAJČINO
G MLIJEKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Martine Banić, mag. ing. biotechn.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta *Hrvatske zaklade za znanost* „*Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini*“ (IP-2014-09-7009).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

IDENTIFIKACIJA SOJEVA I ANALIZA PRISUTNOSTI S-PROTEINA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA

Anđelina Bošković, 1266/BPI

Sažetak: *Probiotici su živi mikroorganizmi, koji u dovoljnom broju, mogu povoljno utjecati na zdravstveno stanje potrošača. Bakterije mliječne kiseline, osobito one iz rodova Lactobacillus i Bifidobacterium, imaju velike predispozicije za probiotičko djelovanje. S-proteini dokazano poboljšavaju probiotički učinak stoga je cilj ovog rada bio ispitati posjeduju li na svojoj površini S-proteine bakterije izolirane iz majčinog mlijeka. Majčino mlijeko je izvor brojnih nutritivnih i biološki aktivnih tvari pa kao takvo predstavlja pogodno prirodno stanište bakterijama mliječne kiseline. Identifikacijom se ustvrdilo da su najzastupljeniji mikroorganizmi majčinog mlijeka bakterije iz roda Staphylococcus, ali i bakterije iz rodova Lactobacillus i Bifidobacterium su bile značajno zastupljene (24 %). Također je eksperimentalno dokazano da izolirani bakterijski sojevi ne posjeduju S-proteine na svojoj površini odnosno ne posjeduju gene koji bi kodirali za S-proteine.*

Gljučne riječi: *probiotici, bakterije mliječne kiseline, S-proteini, majčino mlijeko*

Rad sadrži: 49 stranica, 12 slika, 10 tablica, 47 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc*

Pomoć pri izradi: *Martina Banić, mag. ing. biotechn.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. *Jasna Novak*
2. doc. dr. sc. *Andreja Leboš Pavunc*
3. izv. prof. dr. sc. *Jurica Žučko*
4. doc. dr. sc. *Janko Diminić (zamjena)*

Datum obrane: 4. ožujka 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF THE PRESENCE OF S-LAYER PROTEINS ON THE LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM MOTHER'S MILK

Anđelina Bošković, 1266/BPI

Abstract: *Probiotics are living microorganisms, which in sufficient number can have a beneficial effect on the health of the consumer. Lactic acid bacteria, especially genera Lactobacillus and Bifidobacterium, have a big predisposition for probiotic action. S-proteins have been shown to improve probiotic effect so the aim of this study was to examine whether bacteria isolated from breast milk, possess S-proteins. Breast milk is a source of man nutrients and biologically active substances and as such, it is suitable natural habitat for lactic acid bacteria. The identification established that the most common microorganisms in breast milk are bacteria from the genus Staphylococcus but also bacteria from the genera Lactobacillus and Bifidobacterium were present in higher abundance (24 %). It has also been experimentally proven that isolated bacteria do not possess S-proteins on their surface respectively they do not possess genes that would encode S-proteins.*

Keywords: *probiotics, lactic acid bacteria, S-proteins, breast milk*

Thesis contains: 49 pages, 12 figures, 10 tables, 47 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. Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor*

Technical support and assistance: *Martina Banić, mag. ing. biotechn.*

Reviewers:

1. PhD. *Jasna Novak*, Full professor
2. PhD. *Andreja Leboš Pavunc*, Assistant professor
3. PhD. *Jurica Žučko*, Associate professor
4. PhD. *Janko Diminić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 4 March 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1. Metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline	3
2.1.2. Nutritivne potrebe bakterija mliječne kiseline	4
2.1.3. Majčino mlijeko	5
2.2. PROBIOTICI	6
2.2.1. Klinička primjena probiotika	8
2.2.2. Mehanizmi djelovanja probiotika.....	9
2.3. S-PROTEINI.....	12
2.3.1. Funkcije S-proteina	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI	15
3.1.1. Uzorci majčinog mlijeka	15
3.1.2. Mikroorganizmi	16
3.1.3. Hranjive podloge.....	16
3.1.4. Kemikalije.....	16
3.1.5. Aparatura i pribor.....	17
3.2. METODE RADA.....	18
3.2.1. Izolacija bakterija iz roda <i>Lactobacillus</i> iz majčinog mlijeka	18
3.2.2. Pohranjivanje bakterijskih sojeva.....	18
3.2.3. Održavanje i čuvanje bakterijskih sojeva.....	18
3.2.4. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva	19
3.2.5. Mjerenje koncentracije DNA	19
3.2.6. RAPD-PCR	19
3.2.7. Amplifikacija 16S rDNA bakterijskih sojeva PCR metodom	20
3.2.8. Sekvenciranje PCR produkata.....	21
3.2.9. Ekstrakcija površinskih proteina	22
3.2.10. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) površinskih proteina.....	23
3.2.11. PCR s početnicama za S-proteine	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ UZORAKA MAJČINOG MLIJEKA	26
4.2. ANALIZA PRISUTNOSTI S-PROTEINA U IZOLIRANIM I IDENTIFICIRANIM SOJEVIMA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	38
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Probiotici su živi mikroorganizmi najčešće pojedinačne ili mješovite kulture bakterija mliječne kiseline, čijim pravilnim doziranjem se može pozitivno, preventivno ili terapijski utjecati na zdravlje domaćina. Koncept probiotika polako se formira sa svojim prvim službenim definicijama krajem 90-ih godina prošlog stoljeća. Tržište probiotika od tada se neprestano nalazi u uzlaznoj putanji, paralelno s povećanjem svijesti ljudi o zdravom načinu života i dijetalnoj ishrani. Globalna dobit probiotičkog tržišta 2018. godine iznosila je 48,38 bilijuna USD, a predviđa se rast po prosječnoj godišnjoj stopi rasta od 6,9 % do 2025, što znači da bi dobit postigla vrijednost od oko 77,09 bilijuna USD (GVR, 2021). Tržište uključuje probiotičke proizvode funkcionalne hrane i pića, dodataka prehrani i stočne hrane (ne uključuje plasman probiotika kao lijeka budući se to strogo regulira od strane odgovarajućih institucija).

Probiotici se intenzivno istražuju i koriste zbog njihovog potencijalnog terapijskog učinka, prevenciju nekih bolesti te ublažavanja simptoma. Do sada su dovedeni u pozitivnu korelaciju s određenim bolestima gastrointestinalnog sustava čovjeka, bolesti kod dojenčadi, alergijskih bolesti te drugih (infekcije urinarnog trakta, infekcije gornjeg dijela dišnog sustava, encefalopatija jetre) (WGO, 2017). Gore navedeno posljedica je mehanizama djelovanja probiotika koji ni do danas nisu do kraja odgonetnuti, a u radu će se navesti i objasniti njih par. S-proteini su proteinske strukture na površini stanice koje imaju veliki doprinos kod probiotičkog djelovanja tako što omogućuju preživljavanje stanici u nepovoljnim životnim uvjetima i vezanje stanice na supstrat (Gerbino i sur., 2015).

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati eksprimiraju li bakterije mliječne kiseline izolirane iz majčinog mlijeka S-proteine. Majčino mlijeko je izvor brojnih nutritivnih i biološki aktivnih tvari pa kao takvo predstavlja pogodno prirodno stanište bakterijama mliječne kiseline (Lyons i sur., 2020; Jost i sur., 2015). Izolirane bakterije će se podvrgnuti RAPD-PCR te hijerarhijskoj klaster analizi kako bi se eliminirali istovjetni izolati. Za uspješnu identifikaciju izolata provest će se 16S rDNA sekvenciranje sojeva. SDS-PAGE analiza površinskih proteina omogućit će uvid posjeduju li bakterije mliječne kiseline izolirane iz majčinog mlijeka S-proteine na svojoj površini. Kao referentni soj koristit će se soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji eksprimira S-proteine, a kao negativna kontrola poslužiti će soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina fermentativnih bakterija koje svojim metabolizmom ugljikohidrata proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji produkt. BMK se općenito smatraju nepatogenim organizmima pa imaju GRAS status (eng. *Generally Recognized as Safe*). Prema bojenju po Gramu pripadaju gram-pozitivnim mikroorganizmima, prema potrebi za kisikom su anaerobni, ili mikroaerofilni organizmi što podrazumijeva rast u uvjetima smanjene koncentracije kisika, u obliku su koka i štapića, a u nepovoljnim životnim uvjetima nemaju mogućnost tvorbe spora. G+C (gvanin + citozin) sadržaj im varira od 34 do 46 %, pri čemu je najmanji genom veličine 1,8 Mb, a najveći do 3,3 Mb (Pessione, 2012).

Identifikacija BMK uobičajeno se bazira na njihovim fiziološkim i biokemijskim karakteristikama, ali i specifičnim molekularnim karakteristikama. Metode molekularne karakterizacije uključuju analizu slučajno umnoženih fragmenata DNA (eng. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) za međusobno razlikovanje BMK, usporedbu sekvenci očuvanih regija 16S rRNA gena za filogenetsku sistematiku, PCR DNA (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) fingerprinting te lančane reakcije polimerazom (PCR) sa specifičnim *recA* izvedenim početnicama za diferencijaciju bakterijskih vrsta (Gupta i sur., 2018). Uz to, Mora-Villalobos i sur. (2020) navode elektroforezu u pulsirajućem polju (eng. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE), elektroforezu u denaturirajućem gradijentu (eng. *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*, DGGE) te sekvenciranje cijelog genoma.

Taksonomski BMK pripadaju koljenu *Firmicutes*, razredu *Bacilli*, redu *Lactobacillales*, porodici *Lactobacillaceae* kojoj pripadaju rodovi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium* i drugi. Najveći rod jest *Lactobacillus* koji broji preko 80 vrsta, a neke od njih su *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i drugi (Gupta i sur., 2018). Iako rod *Bifidobacterium* filogenetički pripada koljenu *Actinobacteria*, ubraja se u bakterije mliječne kiseline jer kao krajnji produkt metabolizma proizvodi mliječnu kiselinu (Mora-Villalobos i sur., 2020; Gupta i sur., 2018). Rodovi se međusobno razlikuju po svojoj morfologiji, staništu i uvjetima u kojima preživljavaju, a možda najbitnije za čovjeka je da se razlikuju po svojstvu (ne)patogenosti (Pessione, 2012). Tako se na primjer korisnim bakterijama smatraju one iz roda *Lactobacillus* i *Lactococcus* koje imaju GRAS status. Nasuprot tome, neke vrste iz roda *Streptococcus* su izrazito patogene

za čovjeka, ali i tu postoje iznimke kao što je *Streptococcus thermophilus*, koji se koristi kao jedna od dvije starter kulture u proizvodnji jogurta. Bolnice se bore protiv infekcija uzrokovane *Enterococcus faecium*, bakterijom koja je razvila rezistenciju na antibiotike i čiji je horizontalni transfer gena moguć na druge bakterije (Todar, 2020).

2.1.1. Metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline svojom metaboličkom aktivnošću, kataboličkim i anaboličkim reakcijama daju raznovrsne skupine spojeva korisne za ljudsko zdravlje: kratkolančane masne kiseline (eng. *Short-Chain Fatty Acids*, SCFA) (mliječna, octena, propionska i butirična kiselina), ugljikov dioksid, vodikov peroksid, bakteriocine, selenoproteine, egzopolisaharide, fruktooligosaharide, konjugiranu linolnu kiselinu (eng. *Conjugated Linoleic Acid*, CLA) i gama-aminomaslačnu kiselinu (eng. *Gamma-Aminobutyric Acid*, GABA) (Pessione, 2012). Budući da prije svega BMK, kao i svi drugi organizmi, moraju osigurati energiju potrebnu za životne funkcije, njihova primarna metabolička aktivnost je fermentacija ugljikohidrata (Saeed i Salam, 2013). Ovisno o metaboličkom putu razgradnje, BMK se klasificiraju kao homofermentativne (obligatno i fakultativno homofermentativne) ili heterofermentativne. Prva skupina bakterija fermentira ugljikohidrate glikolizom pri čemu obligatno homofermentativne bakterije kao krajnji proizvod stvaraju mliječnu kiselinu D- ili L- oblika što ovisi o prisutnosti enzima D- ili L- laktat dehidrogenaze (2 mola ATP-a iz 1 mola heksoze). Industrija je najviše usmjerena na dobivanje L-mliječne kiseline koja se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te za dobivanje biopolimera, dok je D-izomer toksičan za čovjeka (Papagianni, 2012). Fakultativno homofermentativne bakterije dio pirogroždane kiseline nastale glikolizom preusmjeravaju u format, acetat i etanol. Heterofermentativnim bakterijama nedostaje glikolitički enzim fruktoza 1,6 bifosfat aldolaza pa ugljikohidrate kataboliziraju pentoza fosfatnim putem, a krajnji proizvodi su mliječna kiselina, etanol ili acetat, ugljikov dioksid i 1 mol ATP-a (iz 1 mola heksoze). Dakle, homofermentativni put dobivanja laktata je energetski isplativiji od heterofermentativnog (Pessione, 2012).

Osim ugljikohidrata, BMK su sposobne metabolizirati i proteine. Budući da su im aminokiseline potrebne kao organski izvori dušika, uviđa se važnost proteolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline kako za bakterijski rast tako i za reološka i organoleptička svojstva fermentirane hrane. Bakterije su razvile složeni proteolitički sustav kojeg čine tri skupine proteina: i) ekstracelularne ili na membranu vezane proteinaze koje cijepaju ekstracelularne

proteine u oligopeptide, ii) transmembranski proteini koji prenose nastale peptide u stanicu i iii) intracelularne peptidaze koje cijepaju peptide na aminokiseline (Saeed i Salam, 2013; Pessione, 2012). Određeni sojevi mogu metabolizirati lipide rastavljajući ih na njihove sastavne dijelove, masne kiseline i glicerol. Također sojevi iz rodova *Lactobacillus* i *Streptococcus* mogu proizvesti CLA iz linolne kiseline koja ima brojne pozitivne učinke na zdravlje ljudi poput poticanja apoptoze kod stanica raka (Pessione, 2012).

2.1.2. Nutritivne potrebe bakterija mliječne kiseline

Osvrćući se na metaboličku aktivnost BMK nužno je prepoznati nutritivne potrebe bakterija za rastom. Poznato je da BMK ne mogu rasti na jednostavnim podlogama. Osim ugljikohidrata, koje koriste kao izvor ugljika i energije (preferencijalno glukozu iako to zavisi od soja), za rast su im potrebne aminokiseline i peptidi, masne kiseline, vitamini i minerali, polisorbati (eng. *Tween*) i pufere (Saeed i Salam, 2013). Neki od navedenih spojeva su esencijalni za rast bakterija mliječne kiseline, neki djeluju kao stimulatori, dok su neki neesencijalni tj. nemaju ni pozitivan ni negativan učinak na bakterijski rast. Izvori peptida i aminokiselina su nužni kako bi se zadovoljile potrebe za dušikom pa se najčešće u podlogu dodaju pepton, mesni ekstrakt govedine i kvašćev ekstrakt, čije su komponente, između ostalog, ugljik, vitamini i minerali. Ovi izvori sadržavaju veliki broj peptida i aminokiselina što zadovoljava potrebe velikog broja sojeva (različiti sojevi traže različite aminokiseline za svoj rast). Masne kiseline su prepoznate zbog svog antimikrobnog učinka, ali jako male količine stimuliraju bakterijski rast. Što se tiče vitamina, za većinu sojeva esencijalne su pantotenska (B5), nikotinska (B3) kiselina i riboflavin (B2). Minerali odnosno metalni ioni su važni za transport nutrijenata i metaboličku aktivnost. Pozitivno djeluju metalni ioni mangana, magnezija, kalcija, željeza, kalija i natrija. Teški metali žive, bakra, nikla, cinka i kobalta pak inhibiraju enzimsku aktivnost bakterija stoga se ne bi smjeli nalaziti u hranjivoj podlozi. Polisorbati su poznati emulgatori u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Za BMK značajan je *Tween* 80 koji stimulira rast bakterija, potiče njihov oporavak, poboljšava metaboličku aktivnost i toleranciju na žuč, što je vrlo važno u okviru probiotičkog koncepta. Glavni metabolički proizvod, mliječna kiselina snižava pH podloge stoga je bitno u hranjivu podlogu dodati pufere. Nizak pH (već oko 4,4) inhibira rast i metaboličku aktivnost BMK pa se u standarde podloge za uzgoj (MRS i M17) dodaju soli natrijeva acetata, natrijeva citrata i di-natrijev glicerofosfat (Saeed i Salam, 2013).

Prirodno su prisutne na supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, razgradni biljni materijali i u ljudskom gastrointestinalnom traktu. Vrste roda *Leuconostoc* mogu se pronaći u kiselom kupusu i kiselom tijestu, rod *Enterococcus* može se pronaći u kobasicama, rod *Lactococcus* u mliječnim proizvodima dok su neke vrste roda *Streptococcus* redovni uzročnici bakterijske upale grla, a mogu se pronaći i u kravljem mlijeku (Masood i sur., 2011). Pojedine vrste roda *Lactobacillus* prirodno obitavaju u gastrointestinalnom traktu čovjeka, koji je koloniziran s oko 100 bilijuna mikroorganizama i dio su humane mikrobiote (zajedno s mikroorganizmima koji koloniziraju kožu te respiratorni i urogenitalni sustav). Humani GIT čine probavni organi i probavne žlijezde (jetra i gušterača). Probavni organi su usta, ždrijelo, jednjak, želudac, tanko i debelo crijevo. Svaki organ probavnog sustava ima svoju vlastitu prepoznatljivu mikrobiotu. Želudac je tako nastanjen primarno aerobnim gram-pozitivnim organizmima u koncentraciji $<10^3$ CFU g⁻¹, tanko crijevo je uglavnom nastanjeno rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Streptococcus* u koncentraciji 10^3 - 10^4 CFU g⁻¹, a debelo crijevo je slično kao i tanko bogato rodovima *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* uz još *Fusobacterium* i *Eubacterium* u koncentraciji 10^{11} - 10^{12} CFU g⁻¹ (Quinto i sur., 2014). Na temelju navedenog, bakterije mliječne kiseline čine 0,01-1,8 % od cjelokupne bakterijske populacije u humanom intestinalnom traktu (Pessione, 2012).

2.1.3. Majčino mlijeko

Majčino mlijeko predstavlja prihvatljiv biokemijski okoliš za rast bakterija mliječne kiseline jer ono sadrži prethodno navedene potrebne nutrijente: ugljikohidrate, proteine, lipide, vitamine i minerale (Reis i sur., 2016; Jost i sur., 2015). Osim toga majčino mlijeko obiluje i biološki aktivnim tvarima poput antitijela, imunoglobulina, laktoferina, lizozima, antimikrobnih peptida, faktora rasta, bijelih krvnih stanica i mikroRNA, dakle tvarima koje osiguravaju imunitet (Lyons i sur., 2020; Jost i sur., 2015). Majčino mlijeko također obiluje oligosaharidima u koncentraciji 12-13 g L⁻¹ koji pak djeluju prebiotički i ostvaraju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje (Jost i sur., 2015). Najčešće izolirane bakterije iz majčinog mlijeka pripadaju rodovima fakultativno anaerobnih stafilokoka (koji nisu pripadnici BMK) i streptokoka, popraćeno još rodovima *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Lyons i sur., 2020; Reis i sur., 2016; Jost i sur., 2015; Solís i sur., 2010). Na mikrobiotu majčinog mlijeka utječu različiti faktori poput prehrambenih navika majke, zdravlja i težine, genetika, crijevna mikrobiota, upotreba antibiotika i interakcije s mikrobiotom kože, čiji su uobičajeni „stanovnici“ vrste rodova *Staphylococcus* i

Streptococcus stoga ne čudi da su upravo ti rodovi i najčešći izolirani (Reis i sur., 2016). Molekularnim metodama uspoređivala se majčina mikrobiota, majčino mlijeko i feces, s mikrobiotom i fecesom novorođenčeta pri čemu su pronađeni identični sojevi koji pripadaju rodovima *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Staphylococcus*, što daje za pretpostavku da su se BMK prenijele s majke na dijete putem dojenja (Jost i sur., 2015). Nadalje, promatrajući mikrobiotu novorođenčadi hranjenih majčinim mlijekom i hranjenih formulom, uviđa se razlika u sastavu BMK. Dok je crijevna mikroflora djeteta, kojeg je majka dojila, više nastanjena korisnim bakterijama (bifidobakterije i laktobacili), a manje nastanjena potencijalno patogenima vrstama iz reda klostridija i obitelji enterobakterija, popularno zvanim crijevnim bakterijama, mikroflora djeteta hranjenog formulom više je obogaćena upravo ovim potencijalno štetnim bakterijama (uključujući rodove *Enterococcus*, *Staphylococcus* i *Bacteroides*), a manje bogata korisnim bakterijama mliječne kiseline, koje potencijalno iskazuju probiotička svojstva i pozitivno doprinose ljudskom zdravlju (Jost i sur., 2015). Znanstveno još nije točno utvrđen put prijenosa bakterija od majčinih crijeva do mliječnih žlijezda, koje proizvode mlijeko, odnosno nije dokazano postojanje eng. *Entero-Mammary Pathway* (EMP). EMP je, za sada još uvijek hipotetski, put prijenosa nepatogenih bakterija iz crijeva majke preko dendritičkih stanica, koje služe kao svojevrsni prijenosnici, nošenih limfom ili krvlju do mliječnih žlijezda smještenih u grudima (Jost i sur., 2015; Rodríguez, 2014). Kao jaki dokaz za postojanje tog puta, Jost i sur. (2015) pronalaze u soju *Bifidobacterium breve*, izoliranom iz majčinog fecesa, njenog mlijeka te djetetova fecesa, što su eksperimentom potvrdili Solís i sur. (2010). Pripadnici roda *Bifidobacterium* su obligatno anaerobni organizmi, stoga je isključena mogućnost da su te bakterije u mlijeko dospjele s majčine kože ili oralne šupljine dojenčeta.

2.2. PROBIOTICI

Međunarodna znanstvena udruga za probiotike i prebiotike (eng. *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP*) sastala se 2014. godine kako bi ustvrdila još jednom što točno znači i što točno podilazi pojmu 'probiotik' te koji su to pozitivni učinci koje polučuju na ljudsko zdravlje (Hill i sur., 2014). Znanstvenici smatraju i dalje relevantnom definiciju, citiranu od strane mnogih istraživača i organizacija, iz 2002. godine da su probiotici „živi mikroorganizmi koji, kad se primjene u odgovarajućoj količini, ostvaraju pozitivne učinke na zdravlje domaćina“ (FAO/WHO, 2002). Pod te mikrobne, žive organizme, koji blagotvorno djeluju na zdravlje, uglavnom se podrazumijevaju najviše

izučavani rodovi bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Iz ovog se da zaključiti da većina probiotika jesu pripadnici BMK, no osim takozvanih *LAB probiotics* postoje i *non-LAB probiotics*, drugi mikroorganizmi koji nisu funkcionalno klasificirani kao BMK. Neki od njih su kvasac *Saccharomyces boulardii*, bakterija *Clostridium butyricum* i soj *Escherichia coli* Nissle 1917 (WGO, 2017), koji je jednako učinkovit u remisiji ulceroznog kolitisa kao i standardni lijek mesalazin (Soccol i sur., 2010; Ezendam i van Loveren, 2006). FAO/WHO (2002) je izdala dokument o smjernicama za upotrebu probiotika u hrani odnosno u četiri točke su dane karakteristike koje mikroorganizam mora posjedovati da bi se proglasio probiotikom:

- 1) Rod/vrsta/soj: za početak važno je genotipski i fenotipski okarakterizirati mikroorganizam, točno odrediti rod i vrstu probiotičkog soja što je važno jer određeni probiotički učinci su značajka točno određenog soja.
- 2) *In vitro* testovi za detekciju potencijalnih probiotika: otpornost na nizak pH želuca, otpornost na žučne kiseline, adhezija na mukus/ljudske epitelne stanice/stanične linije, antimikrobna aktivnost protiv potencijalnih patogena, kompetitivna ekskluzija patogena, hidrolazna aktivnost žučnih soli i otpornost na spermicide (kod probiotika za vaginalnu upotrebu). Mnogi autori smatraju preživljavanje u stresnim uvjetima GIT-a i adheziju na supstrat ključnim preduvjetima za ostvarivanje probiotičkog djelovanja.
- 3) Sigurnost korištenog probiotika: dokumentirano je svega nekoliko štetnih i nepoželjnih učinaka vezanih za konzumaciju probiotika kod imunokompromitiranih osoba. Zbog toga je nužno ispitati njihovu sigurnost kroz šest testova: antibiotska rezistentnost i mogući prijenos gena, određivanje metaboličkih aktivnosti, praćenje nuspojava tijekom ispitivanja na ljudima kao i epidemiološko praćenje nuspojava kod potrošača, provjeriti proizvodi li toksine te provjeriti posjeduje li hemolitičku aktivnost.
- 4) *In vivo* studije kod ljudi i životinja: u zadnjoj fazi bi se trebali uočiti pozitivni učinci na zdravlje domaćina. Dakle prate se simptomi, kvaliteta života, napredak u stanju pacijenta, brz oporavak od bolesti ili povlačenje bolesti na duže vrijeme kao i smanjeni rizik od obolijevanja. Potrebno je dokazati da je pozitivan učinak isključivo posljedica korištenja određenog probiotičkog mikroorganizma.

2.2.1. Klinička primjena probiotika

Marketing je ključan za informiranje javnosti o funkcionalnim učincima probiotika u uspostavljanju ravnoteže kod narušene crijevne mikrobiote između takozvanih „loših“ i „dobrih“ bakterija. Probiotici se konzumiraju dva sata nakon upotrebe antibiotika, koji inhibira rast i „loših“ i „dobrih“ bakterije, stoga se može zaključiti da je uravnotežen probavni ekosustav prvo pozitivno svojstvo probiotika. K tome je dokazano da se crijevna mikrobiota zdrave osobe i osobe u određenom stanju bolesti razlikuje u populaciji bakterija (WGO, 2017). Pretpostavlja se da su upravo probiotici ti koji pomažu u održavanju zdrave crijevne mikrobiote kod domaćina. Iako još nije u potpunosti definiran sastav takve jedne zdrave mikrobiote, ona bi trebala obavljati svoju metaboličku, trofičku i zaštitnu ulogu u sastavu GIT-a domaćina pa tako pomaže u razvoju imunološkog sustava i održavanju mukozne strukture, probavi hrane, proizvodnji SCFA i esencijalnih vitamina te sprečavanju kolonizacije crijevnog epitela patogenim mikroorganizmima (Jost i sur., 2015; Behnsen i sur., 2013; Soccol i sur., 2010). Hill i sur. (2014) navode i druge pozitivne strane probiotika, a to su uspostava zdravog probavnog trakta (probiotici svojim mehanizmima stvaraju poželjan okoliš u intestinalnom traktu što omogućuje kolonizaciju poželjne crijevne mikrobiote) i dobrog imuno sustava. Pri pregledu literature, izdvajaju se ostali pozitivni učinci na zdravlje, bilo u smislu liječenja i prevencije određenih bolesti ili ublažavanju tegoba. Neki od njih su: liječenje akutne dijareje uzrokovane rotavirusom kod djece (možda i najjači dokaz „ljekovitih“ svojstava probiotika pri čemu se kao najučinkovitiji soj spominje *Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG), prevencija dijareje uzrokovane uporabom antibiotika (učinkoviti LGG i *S. boulardii*), prevencija dijareje čiji je uzročnik *Clostridium difficile*, ublažavanje simptoma uzrokovanih uzimanjem antibiotika zbog infekcije *Helicobacter pylori* zajedno s prebioticima, ublažavanje abdominalne boli i nadutosti kod osoba koje boluju od sindroma iritabilnog crijeva, održavanje remisije kod *pouchitis*-a i ulcerativnog kolitisa (riječ je o upalnim bolestima crijeva, no nažalost nije pronađena poveznica između uporabe probiotika i remisije Crohnove bolesti), manje šanse za oboljenje od nekrotizirajućeg enterokolitisa kod nedonoščadi (dokazana manja mogućnost obolijevanja kod djece dojene majčinim mlijekom u odnosu na djecu hranjenu formulom), *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* poboljšavaju probavu laktoze, uspostavljanje normalne zdrave mikrobiote s laktobacilima kod bakterijske vaginoze (inače BMK doprinose zdravom okolišu zbog održavanja kiselog pH, proizvodnje bakteriocina i H₂O₂), redukcija patogena u usnoj šupljini pa posljedično znači redukciju zubnog karijesa (LGG sprječava nastanjanje *Streptococcus*

mutans – uzročnika karijesa), smanjenje kolesterola u krvnom serumu, prevencija metaboličkih poremećaja (dijabetesa, pretilosti i kardiovaskularnih bolesti), inhibicija dekalificiranja kostiju kod starih ljudi, prevencija atopijskog dermatitisa kod dojenčadi, ublažavanje anksioznosti i depresije i drugi (Gupta i sur., 2018; WGO, 2017; Thakur i sur., 2016; Douillard i de Vos, 2014; Quinto i sur., 2014; Nagpal i sur., 2012; Shinde, 2012; Hojsak, 2010; Williams, 2010). Djelovanje probiotika osim o upotrijebljenoj vrsti uvelike ovisi i o koncentraciji. Tako da bi se ostvario pozitivan učinak potrebno je dnevno unijeti 10^6 - 10^{10} CFU (eng. *Colony-Forming Units, CFU*) u organizam, za preventivne svrhe je potrebna slična koncentracija 10^6 - 10^9 CFU, dok terapijske svrhe traže veće doze 10^9 - 10^{10} CFU (Hojsak, 2010).

2.2.2. Mehanizmi djelovanja probiotika

Do danas je predloženo nekoliko mehanizama djelovanja koji omogućavaju gore navedena dobra svojstva probiotika, a i dalje se istražuju u eri „omika“. Jasno je da nemaju svi probiotici iste mehanizme djelovanja kojima ostvaraju poželjne učinke jer to ponajprije ovisi o metabolizmu probiotika, prisutnim molekulama na njihovoj površini te o spojevima koje luče (Oelschlaeger, 2010). Ovdje je prikazan pregled mehanizama prema nekoliko autora.

Williams (2010) u svom radu navodi četiri mehanizma: 1) kako su probiotici većinom bakterije mliječne kiseline, svojim metabolizmom proizvode organske kiseline (mliječnu, octenu i propionsku); te kiseline snižavaju pH u crijevima sprječavajući time rast patogenih bakterija; 2) probiotici osim organskih kiselina proizvode i druge molekule poput vodikovog peroksida, bakteriocina i biosurfaktanata, koji djeluju toksično na patogene mikroorganizme; 3) probiotici blokiraju adheziju patogenih mikroorganizama na epitel čime sprječavaju njihovu kolonizaciju GIT-a; 4) probiotici posjeduju imunomodulacijske učinke; određeni probiotički sojevi pojačavaju imunološki odgovor tako što stimuliraju fagocitozu limfocita i makrofaga; također probiotici mogu povećati proizvodnju sekretornog imunoglobulina A (glikoproteini/antitijela koja pomažu u očuvanju mukozne homeostaze u GIT-u, respiratornom i urogenitalnom sustavu) te proizvodnju citokina.

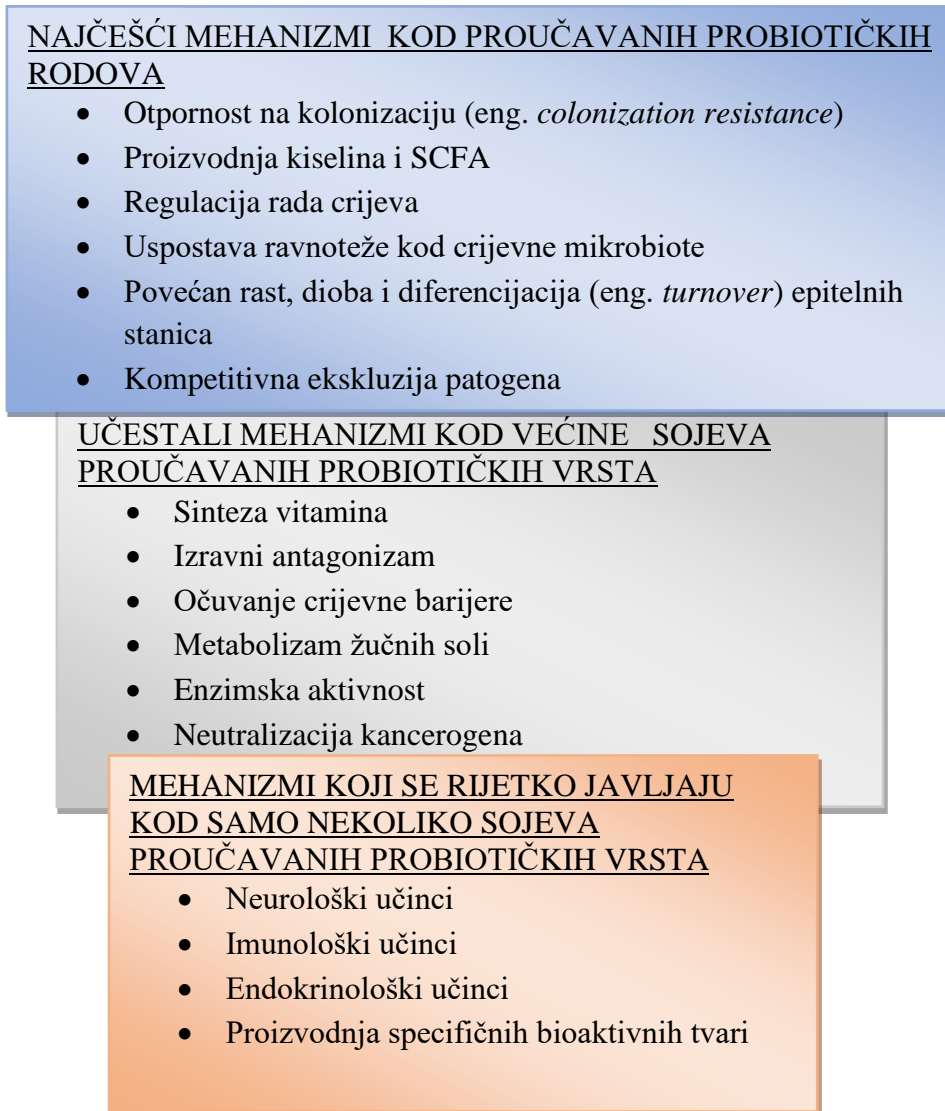
Drugi autori također navode iste mehanizme, samo vrše drugačije podjele. Na primjer, Oelschlaeger (2010) mehanizme dijeli u tri skupine ovisno o ciljnom mjestu. U prvoj skupini mehanizam djelovanja utječe na domaćinov obrambeni sustav tj. prirođeni i stečeni imunološki sustav gdje su ciljne stanice epitelne stanice crijeva i imunološke stanice u

crijevima, koje su opremljene receptorima za prepoznavanje i adheziju probiotika. Pretpostavlja se da sama interakcija probiotika sa stanicom domaćina može pokrenuti kaskadu signala što dovodi do modulacije imuno sustava. U drugoj skupini probiotici izravno utječu na druge komensalne ili patogene mikroorganizme bilo putem antimikrobnih supstanci (SCFA, vodikov peroksid, bakteriocini, dekonjugirane žučne kiseline), ili tako što se natječu za esencijalni element poput željeza (određeni laktobacili vežu željezov hidroksid na površinu stanice limitirajući ga patogenim organizmima). Probiotici ove skupine svojim mehanizmima djelovanja također ostvaruju protu-adhezivne (kompeticija za isti receptor tj. kompetitivna ekskluzija, indukcija proizvodnje mucina i biosurfaktanata, degradacija ugljikohidratnih receptora proizvedenim proteinima, uspostava biofilma) i protu-invazivne učinke. U trećoj skupini probiotici svojim mehanizmom utječu na produkte mikroorganizama (inhibicija ekspresije toksina), produkte samog domaćina (žučne soli) te na sastojke hrane.

Sherman i sur. (2009) pišu o mehanizmima vezanim za mjesto djelovanja. GIT odnosno lumen GIT-a omeđen je s četiri vrste sloja; od unutrašnjosti prema van to su mukoza, submukoza, muskularis i seroza pa se ovdje govori o učincima na području lumena, mukoze i submukoze. U lumenu crijeva probiotici lučenjem bakteriocina i organskih kiselina te *quorum sensing* (reduciraju virulentnost patogena) stvaraju poželjan mikrookoliš i uspostavljaju ravnotežu. Drugi probiotici se pak vežu na epitelne stanice i time sprečavaju vezanje patogena i njihove negativne učinke. Prednost tim probioticima daju S-proteini koji se vežu na površinu epitelnih stanica. Mukoza je prvi sloj koji oblaže lumen crijeva. Pod mukozne učinke probiotika podrazumijeva se poboljšana proizvodnja i sekrecija mucina – glikoproteina velike molekulske mase koji su sastavni dijelovi tjelesnih sluzi. Povećana proizvodnja mucina pospješuje mukozni omotač, koji se inače sastoji od mucina i anorganskih soli otopljenih u vodi, a koji služi kao antibakterijski štiti ne dopuštajući vezanje patogenih mikroorganizama na površinu mukoze. Određeni probiotici (*Lactobacillus fermentum*) stimuliraju proizvodnju antibakterijskih kationskih peptida – defenziva, čiji je mehanizam djelovanja sličan antibioticima. Probiotici na području mukoze pospješuju integritet epitelne barijere odnosno nastoje očuvati funkciju crijevne barijere osiguravajući funkcionalne *tight junction* proteine (okludine i kladine). Smanjena apoptoza (programirana smrt stanice) također poboljšava funkciju crijevne barijere, a LGG ima sposobnost sprječavanja citokinima potaknutu apoptozu (Hojsak, 2010). Pod submukozni učinak probiotika autori svrstavaju modulaciju urođenog i stečenog imunološkog sustava. Određeni sojevi mogu diferencirati B limfocite u plazma stanice, mogu povećati produkciju sekretornog imunoglobulina A (pojačavanje prirodnog imunološkog odgovora), koji se nalazi u mukoznom omotaču te se veže na patogene

organizme, uravnotežuju sekreciju antiinflamatornih i proinflamatornih citokina. Probiotici mogu spriječiti aktivaciju proinflamatornog nuklearnog transkripcijskog faktora – nuklear faktor-kappa B (NF-κB).

Hill i sur. (2014) su napravili klasifikaciju mehanizama ovisno o njihovoj učestalosti kod promatranog roda, vrste ili soja (slika 1).



Slika 1. Moguća raspodjela mehanizama djelovanja kod probiotičkih sojeva (prema Hill i sur., 2014)

2.3. S-PROTEINI

S-proteini (eng. *surface layer proteins*) su identične (gliko)proteinske jedinice koje imaju specifično svojstvo samostalnog formiranja u dvodimenzionalnu kristalnu strukturu koja se zove S-sloj (eng. *surface layer, S-layer*). S-sloj je prisutan kod mnogih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, a sveprisutan kod *Archaea*, u svim fazama staničnog rasta i diobe te pokriva čitavu staničnu površinu, vidljivo transmisijskim elektronskim mikroskopom (Sleytr i sur., 2011). Debljina S-sloja kod bakterija iznosi 5-25 nm, dok kod *Archaea* može biti debljine i do 70 nm. Zbog kristalne prirode sloja tvore se pore identične veličine, od 2 do 8 nm, i morfologije (jako važno svojstvo S-proteina koje omogućuje brojne primjene u nanobiotehnologiji). Proteinske jedinice mogu biti poravnate po kosoj, kvadratnoj ili heksagonalnoj simetriji, a udaljenost centara između dvije (gliko)proteinske jedinice iznosi 2,5-35 nm. Ove dvije karakteristike osiguravaju raznolikost S-slojevima. S-proteini su građeni od 40-60 mol % hidrofobnih aminokiselina, 15 mol % čine asparaginska i glutaminska kiselina, a preostalih 10 mol % lizin, a sadrže malo ili uopće ne sadrže aminokiseline sa sumporom. Dakle jedna četvrtina (~25 mol %) aminokiselina je nabijena što pretpostavlja važnu ulogu ionskih veza u međusobnom povezivanju proteinskih jedinica kao i u vezanju jedinica za samu stanicu (Sleytr i sur., 2011; Claus i sur., 2005). Kod S-proteina su uočene dvije strukturne regije; jedna konzervirana regija odgovorna za vezanje proteina za polimere stanične stijenke te druga varijabilna regija odgovorna za samostalno formiranje S-proteina u dvodimenzionalan kristalan visoko porozni S-sloj (Hynönen i Palva, 2013). Većina S-proteina posjeduje SLH (eng. *S-layer Homology, SLH*) domene, ponavljajuće ostatke od 50-60 aminokiselina u nizu na N-kraju proteina, uključene u vezanje na površinu stanice (Sleytr i sur., 2011). S-proteini *Lactobacillus* roda nemaju SLH domene već se za stanicu vežu konzerviranim vezujućim domenama (eng. *Cell Wall Binding Domain, CWBD*) (do Carmo i sur., 2018) po čemu se razlikuju od ostalih S-proteina. Također se izdvajaju po svojoj maloj molekularnoj masi, koja općenito iznosi 40-200 kDa dok kod *Lactobacillus* sojeva iznosi 25-71 kDa te po visokoj vrijednosti izoelektrične točke, čiji je uobičajeni raspon 3-6 dok kod *Lactobacillus* sojeva iznosi 9,4-10,4 (Hynönen i Palva, 2013).

2.3.1. Funkcije S-proteina

Na peptidoglikanskom sloju stanične stijenke probiotičkih gram-pozitivnih bakterija, se nalaze razne molekule s ulogom liganda, koje vezanjem na receptor domaćina pokreću

kaskadu signala rezultirajući probiotičkim učincima. Te molekule su lipoteihonska kiselina usidrena u citoplazmatsku membranu, teihonska kiselina usidrena u peptidoglikan, pili, polisaharidi, transmembranski proteini, glikoproteini, proteini koji nisu vezani na stanicu već se nalaze u njezinoj neposrednoj okolini te proteini koji su vezani na staničnu površinu, u koje se ubrajaju S-proteini. Navedene molekule, MAMP (eng. *Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPs*), rasprostranjene su među mikroorganizmima i visoko su konzervirane molekule. Da bi se ostvarila interakcija između stanice domaćina (crijevne epitelne stanice te dendritičke stanice) i probiotičkog mikroorganizma, nužno je da receptori za prepoznavanje uzorka (eng. *Pattern Recognition Receptors, PRRs*) stanica domaćina prepoznaju određene probiotičke MAMP-ove. Kada se ostvari interakcija pokreće se kaskada signala te nastupa odgovor domaćina, koji može biti u obliku proizvodnje imunomodulatornih citokina, kemokina, antimikrobnih ili citoprotektivnih faktora te kostimulatornih molekula (Lebeer i sur., 2010). S-proteini također mogu biti MAMP-ovi za PRR stanice domaćina. Interakcija između dendritičkih stanica i divljeg tipa *Lactobacillus acidophilus* NCFM ostvaruje se upravo preko S-proteina, preko SlpA – dominantno eksprimiranog S-proteina i specifičnog C-tip lektin receptora (eng. *C-type Lectin Receptor, CLR*) na dendritičkoj stanici, koji se naziva DC-SIGN receptor (eng. *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-3-Grabbing Nonintegrin, DC-SIGN*) (Konstantinov i sur., 2008).

S-sloj ima mnogobrojne i značajne uloge, no znanstvenici nisu ustvrdili jednu, univerzalnu specifičnu funkciju koja bi bila zajednička svim mikroorganizmima koji ga eksprimiraju (Hynönen i Palva, 2013; Engelhardt, 2007). S-sloj se smatra najjednostavnijom proteinskom membranom nastala tokom evolucije za koju se pretpostavlja da je u prošlosti služila kao zaštitni omotač, dok danas obavlja i neke nove funkcije. Tako su funkcije S-sloja da sudjeluje u određivanju i održavanju staničnog oblika, obavlja funkciju molekularnog sita, služi kao mjesto vezanja ekstracelularnih enzima, iona, faga, virulentnih faktora (pripomaže virulentnosti patogenih organizama), sudjeluje u bakterijskoj adheziji, štiti stanicu od mehaničkih i osmotskih stresova, antimikrobnih peptida, radijacije, promjena u pH okolišu, bakteriofaga i bakterioličkih enzima (Hynönen i Palva, 2013; Claus i sur., 2005). Ukratko Engelhardt (2007) razlikuje primarne i sekundarne funkcije S-sloja. Primarne su one osnove; osiguravanje života organizmu inače te u nepovoljnim/ekstremnim životnim uvjetima. Štoviše, dokazana je povećana ekspresija S-proteina u uvjetima stresnim za stanicu. U uvjetima niskog pH, visoke temperature i izloženost žučnim solima, svi su djelovali kao stimulatori za povećanu proizvodnju S-proteina (do Carmo i sur., 2018). Dakle, primarna uloga S-sloja je osigurati mehaničku, termalnu i osmotsku stabilnost. Sekundarne funkcije su

stečene kroz evoluciju, dolaskom viših organizama i opasnosti za stanicu. Tu se podrazumijevaju ostale prethodno navedene funkcije.

Da bi probiotik ostvario svoje pozitivne učinke neophodno je preživljavanje nepovoljnih uvjeta GIT-a te vezanje na određeni supstrat/površinu. Stoga, u pogledu probiotičkih mikroorganizama, S-sloj obavlja dvije iznimno važne uloge: omogućava stanici preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (nizak pH, proteolitički enzimi, probavni sokovi, žučne soli) GIT-a to jest ima ulogu mehaničke prepreke te sudjeluje u bakterijskoj adheziji na stanicu domaćina i druge površine (Gerbino i sur., 2015). Ova dva svojstva je lako eksperimentalno dokazati tako da se s površine stanice uklone S-proteini odgovarajućim agensom, najčešće LiCl/EDTA/gvanidin hidroklorid/urea te se promatra je li došlo do gubitka određenog svojstva. Doista, uklanjanjem S-proteina s površine *Lactobacillus acidophilus* M92 pomoću 5 M LiCl, smanjila se autoagregacija među stanicama tog soja, kao i adhezija tih stanica na svinjske epitelne stanice tankog crijeva (područje ileuma), u odnosu na stanice koje nisu bile tretirane LiCl (Kos i sur., 2003). Osim za svinjske stanice dokazana je smanjena adhezivnost tretiranih stanica na mišje epitelne stanice tankog crijeva (Frece i sur., 2005). Ujedno su autori dokazali zaštitnu ulogu S-proteina, eksperimentom *in vitro*; uočena je smanjena vijabilnost tretiranih stanica u simuliranim uvjetima ljudskog GIT-a. Nadalje, nakon uklanjanja S-proteina s površine *Lactobacillus helveticus* M92, došlo je do smanjenje koagregacije probiotičkih stanica s patogenim stanicama *Salmonella typhimurium* FP1, što znači da je povećana vjerojatnost kompetitivne ekskluzije patogena (Beganović i sur., 2011). Osim toga, autori su potvrdili da S-proteini osiguravaju imunostimulatornu aktivnost probiotičkom soju. Naime, probiotički soj s intaktnim S-proteinima je izazvao veće koncentracije antitijela IgA, IgG i IgM u serumu miša, dok su uočene manje koncentracije antitijela kod miša kojeg se imuniziralo sojem s prethodno uklonjenim S-proteinima. Uroić i sur. (2016) su ispitali ulogu S-proteina u adheziji i imunomodulatornom djelovanju probiotičke starter kulture *Lactobacillus brevis* D6, izolirane iz tradicionalnog dimljenog sira, a autori Banić i sur. (2018) te Butorac i sur. (2020) su ispitali funkcionalnu ulogu S-proteina bakterije *Lactobacillus brevis* SF9B, izolirane iz kiselog kupusa.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci majčinog mlijeka

U sterilne posudice prikupljeno je po 3 uzorka mlijeka svake majke:

1. unutar 7 dana nakon poroda
2. mjesec dana nakon poroda
3. mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta

Ukupno je prikupljeno 15 uzoraka mlijeka. Za prikupljanje i rad s navedenim uzorcima, dobivena je dozvola etičkog povjerenstva (Br. 380-59-10106-17-100/99, Klasa 641-01/17-02/01) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su u smrznutom stanju prebačeni u Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i pohranjeni na -20 °C do daljnjih analiza.

Tablica 1. Uzorci mlijeka i fecesa korišteni u ovom radu

Oznaka dojilje	Vrijeme uzorkovanja	Oznaka uzorka mlijeka
KR	Unutar 7 dana nakon poroda	KRM1
	Mjesec dana nakon poroda	KRM2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	KRM3
MC	Unutar 7 dana nakon poroda	MCM1
	Mjesec dana nakon poroda	MCM2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	MCM3
AF	Unutar 7 dana nakon poroda	AFM1
	Mjesec dana nakon poroda	AFM2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	AFM3
MB	Unutar 7 dana nakon poroda	MBM1
	Mjesec dana nakon poroda	MBM2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	MBM3
RS	Unutar 7 dana nakon poroda	RSM1
	Mjesec dana nakon poroda	RSM2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	RSM3

3.1.2. Mikroorganizmi

U ovom radu ukupno je izolirano 100 bakterijskih sojeva, po 20 iz uzoraka mlijeka svake od 5 dojlja. Osim toga, korišteni su i sojevi bakterija mliječne kiseline prikazani u tablici 2. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 2. Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, korišteni u ovom radu

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

3.1.3. Hranjive podloge

U radu su korištene slijedeće podloge:

a) hranjiva podloga za održavanje i uzgoj BMK

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g L^{-1} destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

3.1.4. Kemikalije

- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „CarloErba“, Italija
- EDTA, „Sigma-Aldrich“, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletlen), „Sigma“, SAD
- β -merkptoetanol, „Sigma“, SAD

- bromfenol plavo, „Sigma“, SAD
- natrijev dodecilsulfat (sds), „Sigma“, SAD
- Coomassie Brilliant Blue, „Termo Fisher“, Velika Britanija
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- standard za elektroforezu proteina ProSieveQuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- početnice, „Invitrogen“, SAD
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Njemačka
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- Nuclease-Free Water, „Takara“, Japan
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- EmeraldAmp, Max HS PCR MasterMix (2x Premix), „Takara“, Japan
- GoTaq G2 Hot Start polimeraza, „Promega“, SAD

3.1.5. Aparatura i pribor

- epruvete
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- ependorfice
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- pinceta
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- komora za elektroforezu, „Sigma“, SAD
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija

- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- zamrzivač (-80 °C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- BioSpec Nano, „Shimadzu“, Japan
- elektroforetske kadice, „Cleaver, ScientificLtd“, Velika Britanija
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT
- Petrijeve zdjelice

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija bakterija iz roda *Lactobacillus* iz majčinog mlijeka

Volumen od 100 μ L svakog uzorka majčinog mlijeka je nacijepljen u 2 paralele na MRS agar i razmazan štapićem po Drigalskom. Nakon dvodnevne anaerobne inkubacije pri 37 °C, nasumično je odabrano po 20 kolonija poraslih iz mlijeka svake majke i pomoću sterilne ušice je svaka od njih, u cilju umnožavanja, u obliku tankih linija nacijepljena na svježi MRS agar. Nakon dvodnevne anaerobne inkubacije, bakterijska biomasa svake linije je nacijepljena u 1,5 mL MRS bujona te anaerobno inkubirana. Sutradan, napravljen je *streak plate* svake bakterijske kulture na svježem MRS agaru kako bi se provjerila čistoća kulture. Nakon anaerobne inkubacije, ponovno je odabrana jedna čista kolonija sa svake ploče i ponovljen je postupak uzgoja bakterijske biomase te je nakon prekončne inkubacije izvršena provjera pH supernatanata svih sojeva poraslih u MRS bujonu te su izolirani sojevi pohranjeni na -80 °C.

3.2.2. Pohranjivanje bakterijskih sojeva

Čista kultura željenog soja se prethodni dan precijepi u 5 mL MRS bujona te inkubira preko noći na 37 °C. Nakon prekončne inkubacije, u dvije paralele se pomiješa 0,26 mL 87 %-tnog sterilnog glicerola s 1,24 mL prekončne bakterijske kulture i tako pripremljeni sojevi se pohrane na -80 °C.

3.2.3. Održavanje i čuvanje bakterijskih sojeva

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju anaerobno pri 37 °C.

3.2.4. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva

Ekstrakcija genomske DNA iz bakterijskih sojeva se provodi pomoću Genomic Wizard DNA kita za izolaciju DNA. Po 5 mL prekonoćne kulture svake bakterije se centrifugira 2 minute na 13000-16000 g. Nakon uklanjanja supernatanta, talog stanica se resuspendira u 480 μL 50 mM EDTA i 120 μL otopine lizozima (10 mg mL^{-1}) te se inkubira u vodenoj kupelji na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 30-60 min. Nakon inkubacije, uzorak se centrifugira te se dobiveni talog stanica resuspendira u otopini za lizu jezgre koja je dio korištenog kita i inkubira u vodenoj kupelji na $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min. Nakon što se stanični lizat ohladi na sobnu temperaturu, doda mu se 3 μL otopine RNAze te se inkubira na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 15-60 min. Nakon ponovnog hlađenja na sobnoj temperaturi, uzorku se doda 200 μL otopine za taloženje proteina te se vorteksira 20 sekundi, inkubira 5 minuta na ledu i centrifugira na 13000-16000 g 3 minute. Supernatant koji sadrži DNA se prebaci u čistu epicu u koju je prethodno dodano 600 μL izopropanola sobne temperature te se izmiješa okretanjem epice dok niti DNA ne formiraju vidljivu masu. Nakon toga slijedi centrifugiranje, uklanjanje supernatanta i sušenje epice na čistom apsorberajućem papiru. Talog DNA se zatim ispire sa 600 μL 70 % etanola. Nakon sušenja uzorka 10-15 minuta na zraku, talogu se doda 100 μL otopine za rehidraciju DNA koja je dio kita za izolaciju te se talog rehidrira jednosatnom inkubacijom na $65 \text{ }^\circ\text{C}$ u vodenoj kupelji. Tako dobivena DNA se pohrani na $2-8 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.5. Određivanja koncentracije DNA

Mjerenje koncentracije DNA izolirane iz bakterijskih sojeva, provodi se iz 2 μL uzorka pomoću uređaja BioSpec-Nano pri valnoj duljini 0,7 nm, pri čemu se kao slijepa proba koristi otopina za rehidraciju DNA koja je dio kita za izolaciju.

3.2.6. RAPD-PCR

DNA izolirana iz bakterija mliječne kiseline kako je opisano u poglavlju 3.2.4., služi kao kalup za RAPD-PCR reakciju u kojoj dolazi do amplifikacije DNA korištenjem univerzalne M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') početnice. Sastav reakcijske smjese volumena 20 μL prikazan je u tablici 3. PCR reakcija se odvija prema uvjetima navedenim u tablici 4. Nakon završetka PCR reakcije, 17 μl reakcijske smjese se nanosi na 1 % agarozni gel i elektroforeza se provodi u kadici za elektroforezu pri naponu od 60 V. Standard se sastoji od 0,25 μL λ DNA HindIII i 0,5 μL 100bp DNA Ladder. Nakon završetka elektroforeze, gel se boji u etidijevom bromidu koncentracije $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ i vizualizira ultraljubičastim svjetlom na

transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture. Zatim je provedena hijerarhijska klaster analiza usporedbom dobivenih elektroforetskih profila pomoću softvera GelCompar II (Applied Maths, Belgija) te su rezultati prikazani u obliku dendrograma.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za provođenje RAPD-PCR reakcije

Sastojci reakcijske smjese	Volumen
EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix)	10 µL
Kalup (DNA)	1 µL
Početnica 1	0,04 µL
Početnica 2	0,04 µL
dH ₂ O	8,92 µL
Ukupno	20 µL

Tablica 4. Uvjeti provođenja RAPD-PCR reakcije

broj ponavljanja	T [°C]	vrijeme
1	94	1 min
	94	1 min
35	40	20 s
	72	80 s
1	72	5 min

3.2.7. Amplifikacija 16S rDNA bakterijskih sojeva PCR metodom

Sastav reakcijske smjese potreban za amplifikaciju 16S rDNA bakterijskih sojeva pomoću UNI16SF (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GC-3') i UNI16SR (5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3') početnica prikazan je u tablici 5. PCR reakcija se provodi prema uvjetima navedenim u tablici 6. Dobiveni PCR produkti su pročišćeni primjenom QIAquick kita za pročišćavanje DNA (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača, nakon čega je

izmjerena koncentracija dsDNA uređajem Biospec-Nano (Shimadzu, Japan). 30 μL pročišćenih PCR produkata poslano je na sekvenciranje u ovlaštenu instituciju Macrogen (Nizozemska).

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR metode primjenom početnica UNI16SF i UNI16SR

Sastojci reakcijske smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija
Pufer bez MgCl_2	10 x	1x
MgCl_2	25 mM	1,5 mM
Početnica UNI16SF	100 μM	1,5 μM
Početnica UNI16SR	100 μM	1,5 μM
dNTP	2.5 mM	0,2 mM
Taq polimeraza	5,00 $\text{U } \mu\text{l}^{-1}$	1 $\text{U } \mu\text{l}^{-1}$
DNA-kalup	100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$	1 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$

Tablica 6. Uvjeti PCR reakcije za amplifikaciju primjenom početnica UNI16SF i UNI16SR

broj ponavljanja	T [$^{\circ}\text{C}$]	vrijeme
1	96	5 min
	96	30 s
30	55	30 s
	72	30 s
1	72	5 min

3.2.8. Sekvenciranje PCR produkata

Sekvenciranje umnožene 16S rDNA je provedeno u ovlaštenoj instituciji Macrogen. Korišten je automatski četverokapilarni uređaj ABI 3730xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, SAD) čiji je rad temeljen na Sangerovoj dideoksi metodi zaustavljanja sinteze DNA ugradnjom 2', 3'-dideoksinukleotida (ddNTP). Za provođenje sekvenciranja je potrebna jednolančana DNA (kalup), DNA polimeraza, DNA početnice, deoksinukleotidi (dNTP-i) te ddNTP-i. Kao kalup za sintezu DNA koristi se denaturirana, jednolančana DNA, a oligonukleotidi komplementarni DNA služe kao početnice za započinjanje sinteze

komplementarnog lanca. Kad se u rastući lanac DNA ugradi ddNTP dolazi do zaustavljanja sinteze DNA jer ddNTP nema 3'-OH skupinu potrebnu za stvaranje fosfodiesterske veze između dva nukleotida zbog čega DNA polimeraza ne može nastaviti elongaciju lanca. Tako sinteza novih lanaca završava na različitim mjestima te nastaju fragmenti DNA različitih dužina. Prije početka sekvenciranja, uzorak DNA se podijeli za 4 različite reakcije sekvenciranja od kojih svaka sadrži sve potrebne deoksinukleotide (dATP, dGTP, dCTP i dTTP) i DNA polimerazu. U svaku od četiri reakcije se dodaje još jedan od različito fluorescentno ili radioaktivno obilježenih dideoksinukleotida (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP) u 100 puta manjoj koncentraciji od standardnog dNTP-a kako bi se omogućila transkripcija cijele sekvence, a u isto vrijeme i nastajanje dovoljno fragmenata. Korištenjem smjese sva četiri dNTP i jednog ddNTP dobije se u četiri odvojene reakcije kompletna informacija o slijedu nukleotida u analiziranoj DNA. Uzorci putuju kroz četiri kapilare pri čemu laser pobuđuje fluorescenciju, a detektor na osnovu različitih valnih duljina emitirane fluorescencije identificira boju tj. ddNTP koji se nalazi na kraju DNA fragmenta. Dobiveni rezultati sekvencioniranih DNA sekvenci se uspoređuju s poznatim sekvencama u NCBI bazi podataka primjenom BLASTn algoritma.

3.2.9. Ekstrakcija površinskih proteina

Mjerenjem vrijednosti absorbancije prekonoćnih bakterijskih kultura pri 600 nm, očitana je optička gustoća (eng. *Optical Density, OD*) stanica te je ujednačena na vrijednost 2 kod svih bakterijskih sojeva. Zatim je 1 mL svake suspenzije (OD=2) centrifugiran 2 min pri 16000 g te je dobiveni talog stanica ispran destiliranom vodom i resuspendiran u 50 μ L 2x koncentriranog Laemmli pufera (1,25 mL 1M Tris-HCl (pH=6,8), 4 mL 10 % (w/v) SDS, 2 mL 100 % glicerol, 0,5 mL 0,5 M EDTA, 4 mg bromfenol plavo, 0,2 mL β -merkaptoetanol). Priredene suspenzije su prokuhane 5 min i nanesene u jažice unaprijed pripremljenog poliakrilamidnog (10 % (v/v)) gela.

Priprema 2x koncentriranog Laemmli pufera (10 mL):

1,25 mL Tris-HCl (1M, pH 6,8)

4 mL SDS (10 % (w/v))

2 mL glicerol (100 %)

0,5 mL EDTA (0,5 M)

4 mg bromfenol plavo

0,2 mL β -merkaptoetanol

Nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL

3.2.10. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) površinskih proteina

Uzorci pripremljeni prema protokolu za ekstrakciju površinskih proteina su analizirani na poliakrilamidnom (10 % (v/v)) gelu u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 100 V tijekom 2,5 h. Korišten je standard ProSieveQuadColor Protein Marker (4,6-315 kDa). Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje koja sadrži 0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline kroz najmanje 2 h. Zatim je gel položen u otopinu octene kiseline (10 % (v/v)) do obezbojenja pozadine. Nadalje, provedena je hijerarhijska klaster analiza usporedbom dobivenih proteinskih profila pomoću softvera GelCompar II (Applied Maths, Belgija) te su rezultati prikazani u obliku dendrograma.

Priprema poliakrilamidnog gela (10 %):

donji gel za separaciju (100 mL):

Tris-HCl pufer pH 8: 82,5 mL

akrilamid: 2,5 mL

destilirana voda: 2,5 mL

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin): 5 μ L

APS (10 %): 38 μ L

gornji gel za sabijanje (100 mL):

Tris-HCl pufer pH 6: 82,13 mL

akrilamid: 0,3 mL

TEMED: 5 μ L

APS (10 %): 22,5 μ L

Priprema 10x koncentriranog pufera za elektroforezu (1000 mL):

30 g Tris

144 g glicin

10 g SDS

3.2.11. PCR s početnicama za S-proteine

PCR reakcija se provodi prema uvjetima prikazanim u tablici 7. U reakcijskoj smjesi se uz DNA i početnice Usl-1 (5'-GAATYGTKAGCGCTSCTGCTGC-3') i Usl-2 (5'-GTAAACGTAWGCGTTGTGCTTC-3') nalazi i pufer bez MgCl₂, MgCl₂, dNTP, voda i GoTaq G2 Hot Start polimeraza u koncentracijama navedenim u tablici 8. Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica koristi se uzorak koji ne sadrži DNA. Standard se sastoji od λ DNA HindIII i 100 bp DNA Ladder. Dobiveni PCR produkti se razdvajaju u 1 %-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 60 V. Nakon elektroforeze, gel se boja u etidijevom bromidu i vizualizira na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture.

Tablica 7. Uvjeti provođenja PCR reakcije sa specifičnim početnicama za S-proteine

Broj ponavljanja	T [°C]	vrijeme
1	94	5 min
	94	30 s
2	63	30 s
	72	1 min
	94	30 s
2	62	30 s
	72	1 min
	94	30 s
2	61	30 s
	72	1 min
	94	30 s
30	60	30 s
	72	1 min
1	72	7 min

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije

Reagensi	početna koncentracija	konačna koncentracija
pufer -MgCl ₂	5 x	1,00 x
MgCl ₂	25 mM	3,00 mM
Usl I	100 mM	1,00 mM
Usl II	100 mM	1,00 mM
dNTP	2 mM	0,20 mM
Taqpolimeraza	5 U mL ⁻¹	0,025 U μL ⁻¹

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ UZORAKA MAJČINOG MLIJEKA

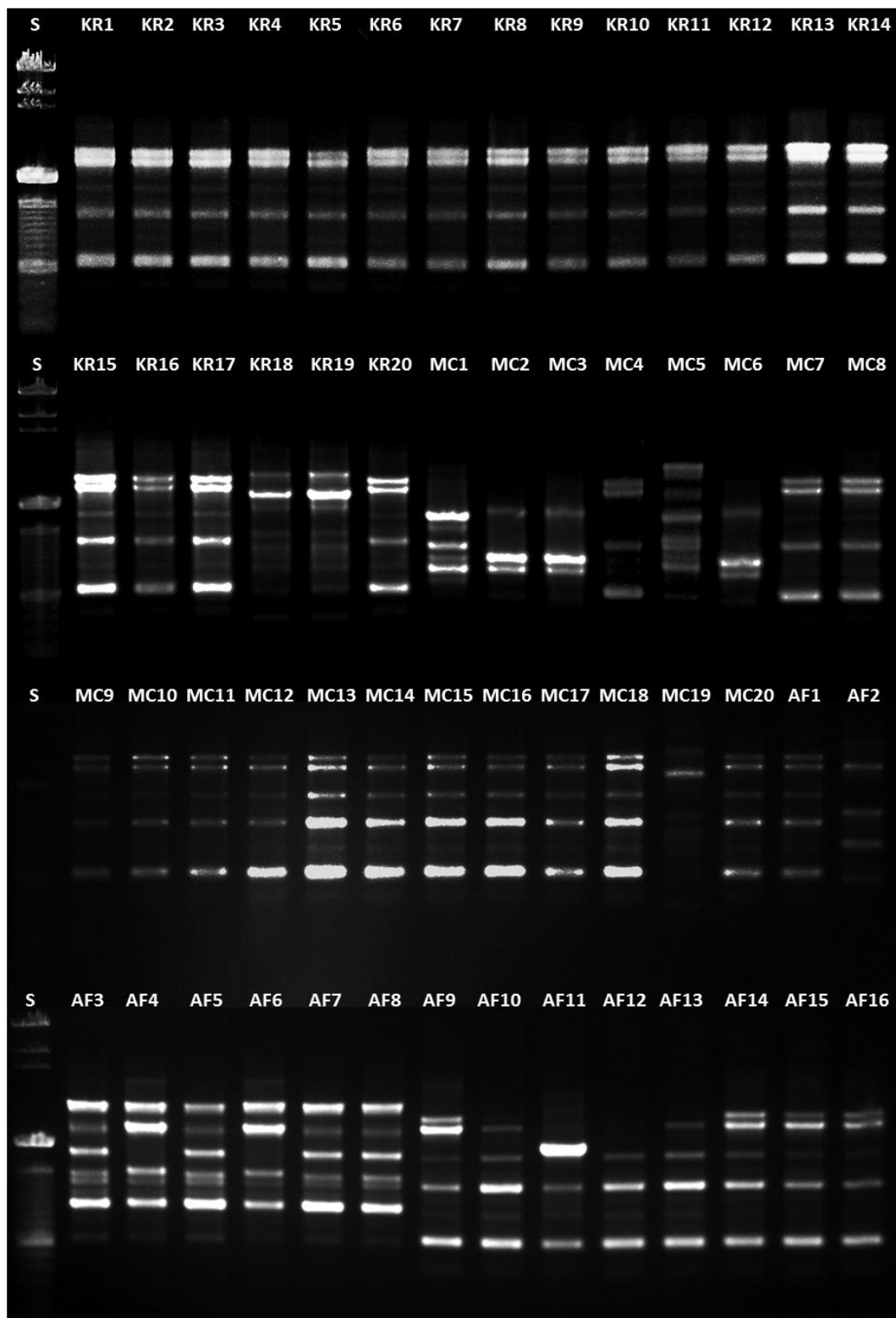
Po 20 sojeva je izolirano iz mlijeka svake majke te imenovano oznakom dojlje te brojem 1-20. Iz pet prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka, uspješno je izolirano ukupno 100 novih bakterijskih sojeva. Proveden je postupak ekstrakcije DNA iz uzoraka te je pomoću BioSpec-Nano spektrofotometra izmjerena koncentracija svih uzoraka (tablica 9).

Tablica 9. Prikaz rezultata mjerenja koncentracije dsDNA BioSpec-Nano uređajem

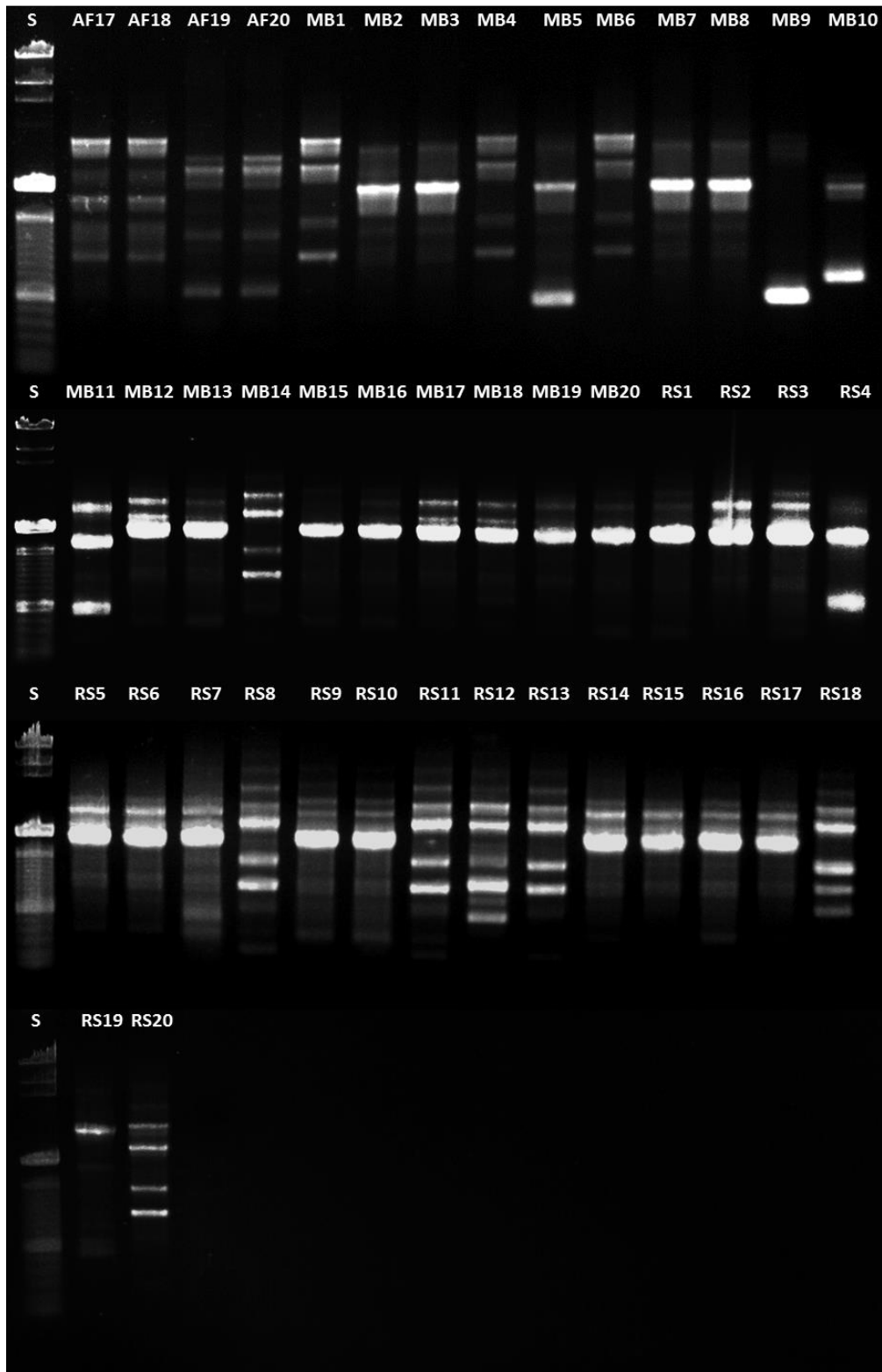
Sojevi 1. majke		Sojevi 2. majke		Sojevi 3. majke		Sojevi 4. majke		Sojevi 5. majke	
Soj	DNA (ng μL^{-1})	Soj	DNA (ng μL^{-1})	Soj	DNA (ng μL^{-1})	Soj	DNA (ng μL^{-1})	Soj	DNA (ng μL^{-1})
KR1	517,85	MC1	266,76	AF1	574,81	MB1	15,98	RS1	291,16
KR2	637,39	MC2	444,77	AF2	27,60	MB2	8,0	RS2	37,59
KR3	1042,59	MC3	458,61	AF3	5,68	MB3	49,04	RS3	304,75
KR4	972,51	MC4	555,16	AF4	32,19	MB4	5,77	RS4	153,96
KR5	615,45	MC5	18,73	AF5	15,25	MB5	118,79	RS5	31
KR6	640,64	MC6	480,58	AF6	25,54	MB6	10,9	RS6	34
KR7	578,92	MC7	822,17	AF7	1,69	MB7	307,92	RS7	119,74
KR8	580,27	MC8	616,60	AF8	11,18	MB8	282,13	RS8	81,02
KR9	565,58	MC9	446,25	AF9	437,92	MB9	247,94	RS9	207,74
KR10	512,36	MC10	340,12	AF10	334,42	MB10	16,52	RS10	126,36
KR11	585,02	MC11	462,80	AF11	491,16	MB11	171,09	RS11	54,92
KR12	658,52	MC12	391,55	AF12	276,60	MB12	352,69	RS12	10,66
KR13	322,19	MC13	533,81	AF13	370,92	MB13	165,73	RS13	10,49
KR14	347,63	MC14	854,42	AF14	294,65	MB14	18,94	RS14	63,25

KR15	439,82	MC15	651,78	AF15	408,47	MB15	258,03	RS15	45,85
KR16	681,52	MC16	673,75	AF16	391,34	MB16	246,05	RS16	79,40
KR17	490,25	MC17	658,13	AF17	6,13	MB17	32,72	RS17	48,62
KR18	664,60	MC18	573,59	AF18	4,10	MB18	6,87	RS18	6,07
KR19	640,01	MC19	605,28	AF19	542,26	MB19	29,27	RS19	685,8
KR20	549,81	MC20	669,36	AF20	283,84	MB20	117,45	RS20	13,87

Prije daljnjih analiza, bilo je potrebno smanjiti broj bakterijskih sojeva odnosno provesti redukciju broja sojeva eliminacijom istovjetnih izolata izoliranih iz mlijeka svake majke. Da bi brzo, jeftino i informativno dobili zaključak o srodnosti izoliranih bakterijskih sojeva iz mlijeka svake majke kao posebne matrice koristila se RAPD-PCR metoda. RAPD-PCR metoda omogućava razlikovanje genetički divergentnih jedinki bez poznavanja njihove sekvence. Polimorfizmi u sekvencama DNA različitih bakterija se mogu detektirati zahvaljujući varijacijama u mjestima vezanja početnica na DNA te na temelju razlika u duljinama umnoženih fragmenata. Elektroforezom RAPD-PCR produkata dobiveni su jedinstveni genetički profili svakog bakterijskog soja izoliranog iz majčinog mlijeka (slike 2 i 3).



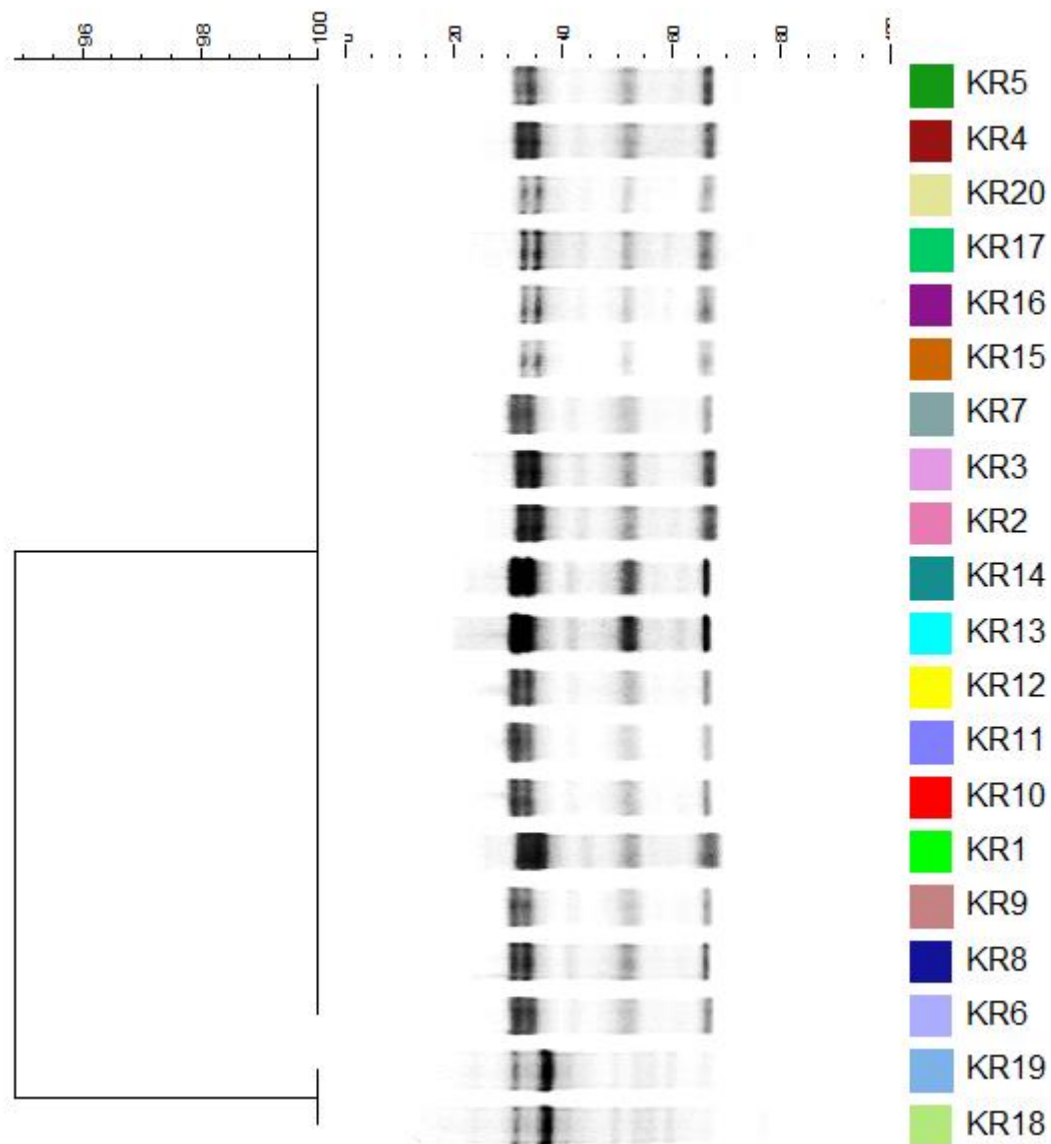
Slika 2. Elektroforetsko razdvajanje RAPD-PCR produkata dobivenih iz uzoraka DNA bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka dojlja s oznakama KR, MC i AF1-16



Slika 3. Elektroforetsko razdvajanje RAPD-PCR produkata dobivenih iz uzoraka DNA bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka dojilja s oznakama AF17-20, MB i RS

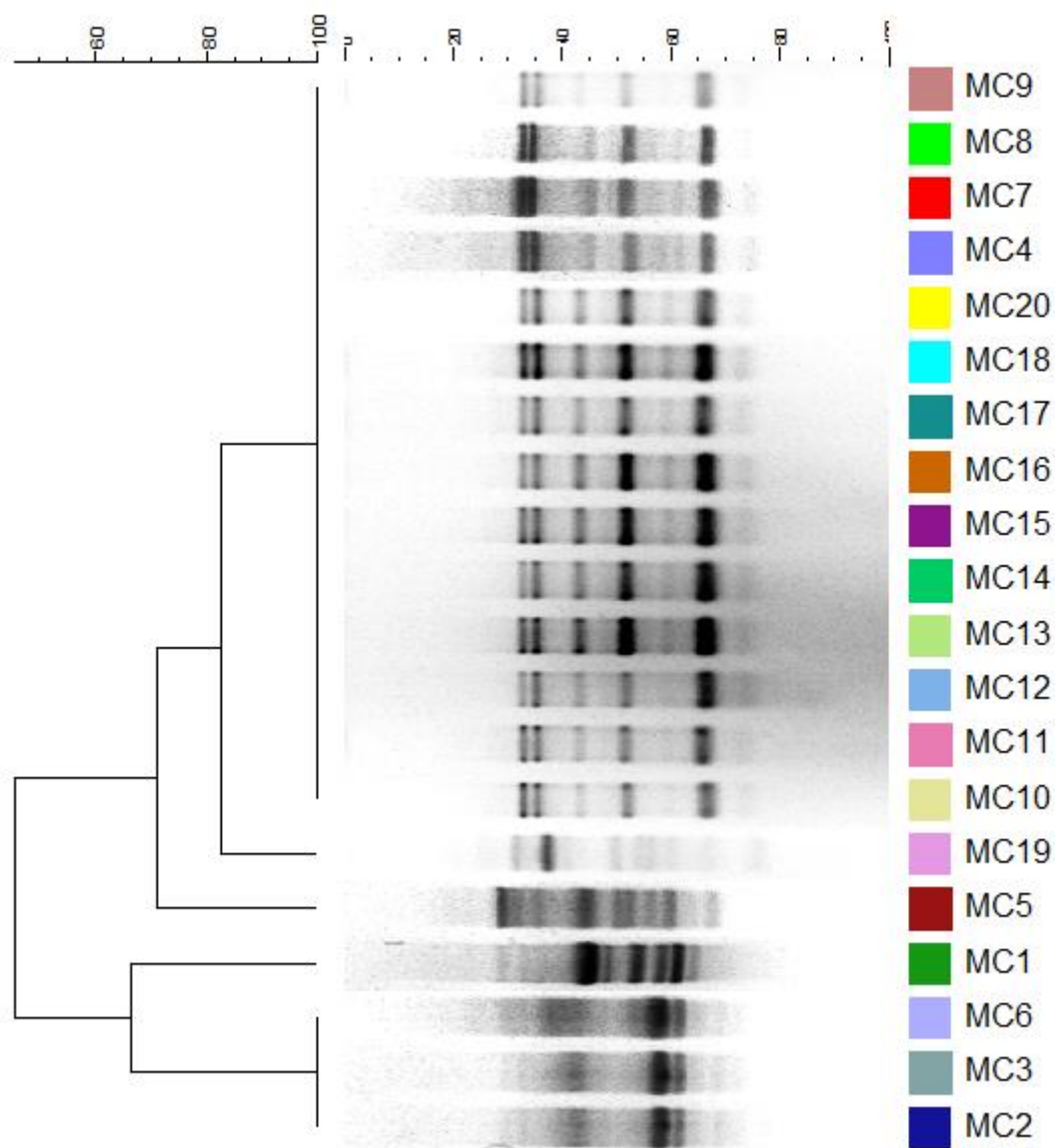
Iako se dobivene DNA vrpce vidno razlikuju, radi bolje točnosti (istovremena usporedba 20 „prelomljenih“ stupaca) provedena je hijerarhijska klaster analiza elektroforetskih profila pomoću softvera gel elektroforeze GelCompar II (<https://www.applied-maths.com/gelcompar-ii>). Klaster analiza je statistička metoda grupiranja zapaženih objekata u skupine/klastere (eng. *cluster*) i to tako da je svaki klaster sam za sebe homogen, a svi klasteri između sebe heterogeni. Kao rezultat hijerarhijskog pristupa analizi dobije se dendrogram – grafički prikaz klastera u obliku stabla povezivanja nastao na divizijski način (u ovom slučaju).

Hijerarhijskom klaster analizom provedena je usporedba elektroforetskih profila te je konstruiran zaseban dendrogram za bakterije izolirane iz mlijeka svake majke. Ukupno je konstruirano 5 dendrograma te je odabran po jedan predstavnik svakog klastera generiranog dendrogramom za daljnje analize jer se smatra da su bakterije identičnih RAPD profila izolirane iz istog izvora jednake. Kao što se može vidjeti na slici 4, iz uzoraka mlijeka majke označene identifikacijskom oznakom KR, izolirana su samo 2 genetički različita soja, te su za daljnje analize odabrani izolati KR19 i KR20. Hijerarhijskom klaster analizom RAPD-PCR elektroforetskih profila sojeva izoliranih iz mlijeka druge i treće majke (slike 5 i 6), generirano je po 5 različitih klastera te je od svakog odabran po jedan predstavnik (MC1, MC2, MC5, MC13 i MC19, odnosno AF2, AF4, AF5, AF12 i AF16). Analizom dendrograma sojeva izoliranih iz mlijeka četvrte majke, odabrano je čak 8 sojeva (MB5, MB6, MB7, MB9, MB10, MB11, MB12, MB15) (slika 7), dok je među sojevima izoliranim iz mlijeka pete majke uočeno 5 genetički različitih sojeva (RS4, RS8, RS10, RS17, RS19) (slika 8).



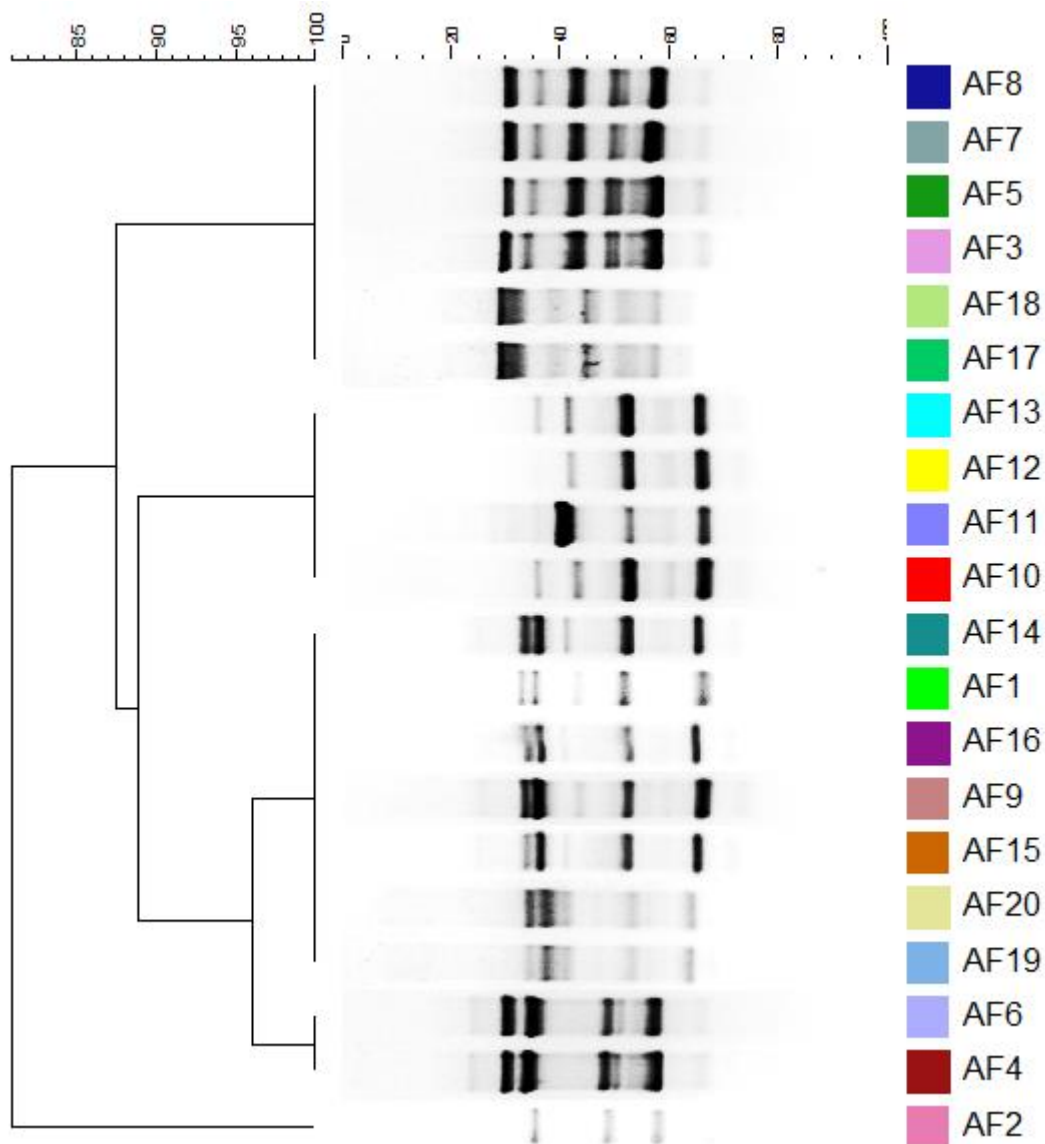
Slika 4. Dendrogram elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka 1. majke

Na slici 4, prikazani dendrogram ima samo dva klastera. Klaster koji uključuje više izolata, čini grupa bakterijskih sojeva KR1-KR17 te soj KR20, dok drugi manji klaster čine dva soja, KR18 i KR19. Dakle, iz uzoraka mlijeka majke označene identifikacijskom oznakom KR, izolirana su samo 2 genetički različita soja te su za daljnje analize odabrani izolati KR19 i KR20.



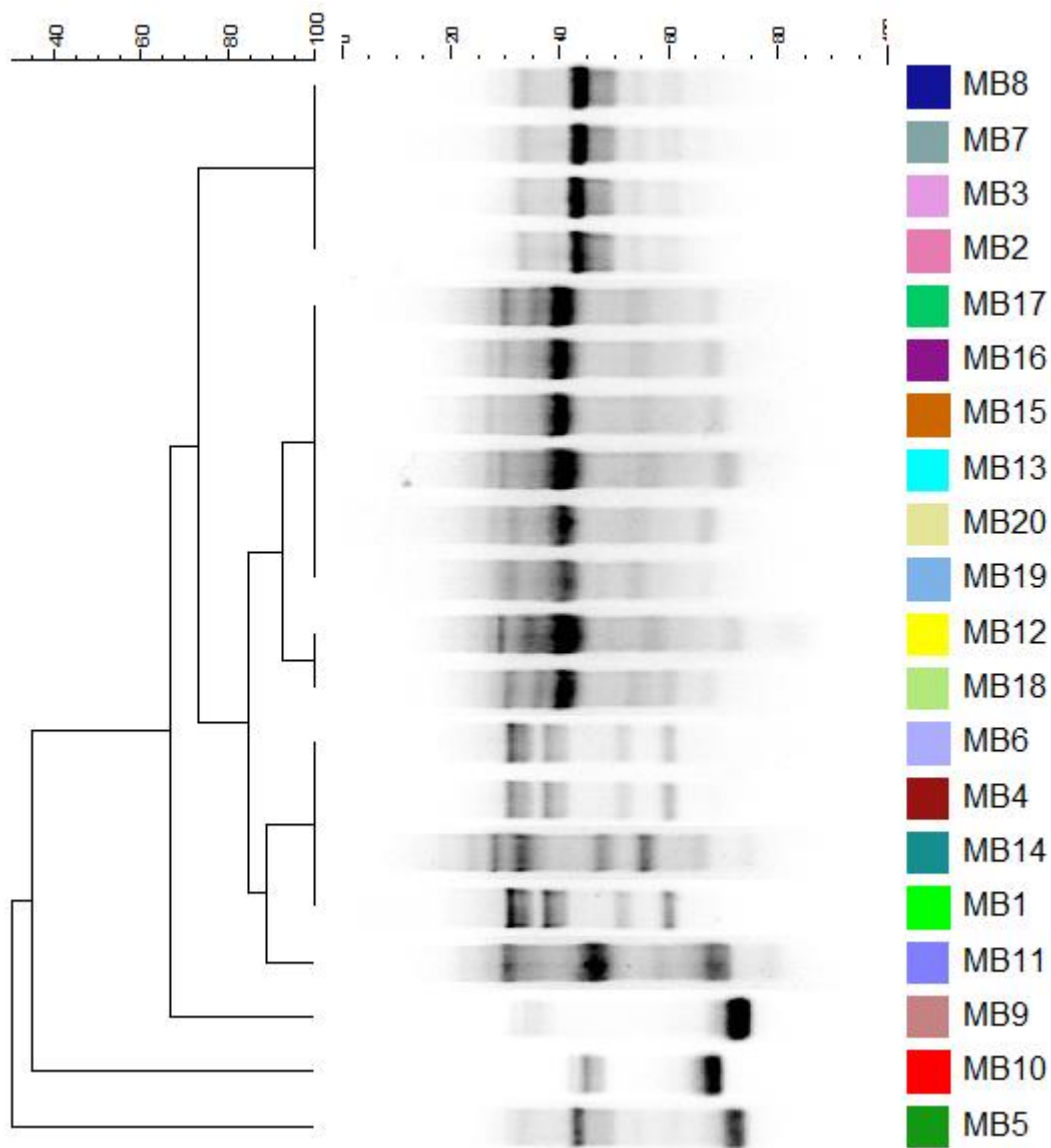
Slika 5. Dendrogram elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka 2. majke

Na slici 5, prikazani dendrogram ima 5 klastera tj. uočeno je 5 genetički različitih elektroforetskih profila izoliranih iz mlijeka 2. majke. Najveći klaster čini 14 sojeva označenih MC10-MC18, MC7-MC9, MC4 i MC20. Sljedeći veći klaster čine 3 soja, MC2, MC3 i MC6. Preostala 3 klastera svaki za sebe ima samo po 1 soj, riječ je o MC1, MC5 i MC19 koji su međusobno različiti. Iz uzoraka mlijeka majke označene identifikacijskom oznakom MC, izolirano je 5 genetički različitih sojeva te su za daljnje analize odabrani izolati MC1, MC2, MC5, MC13 i MC19.



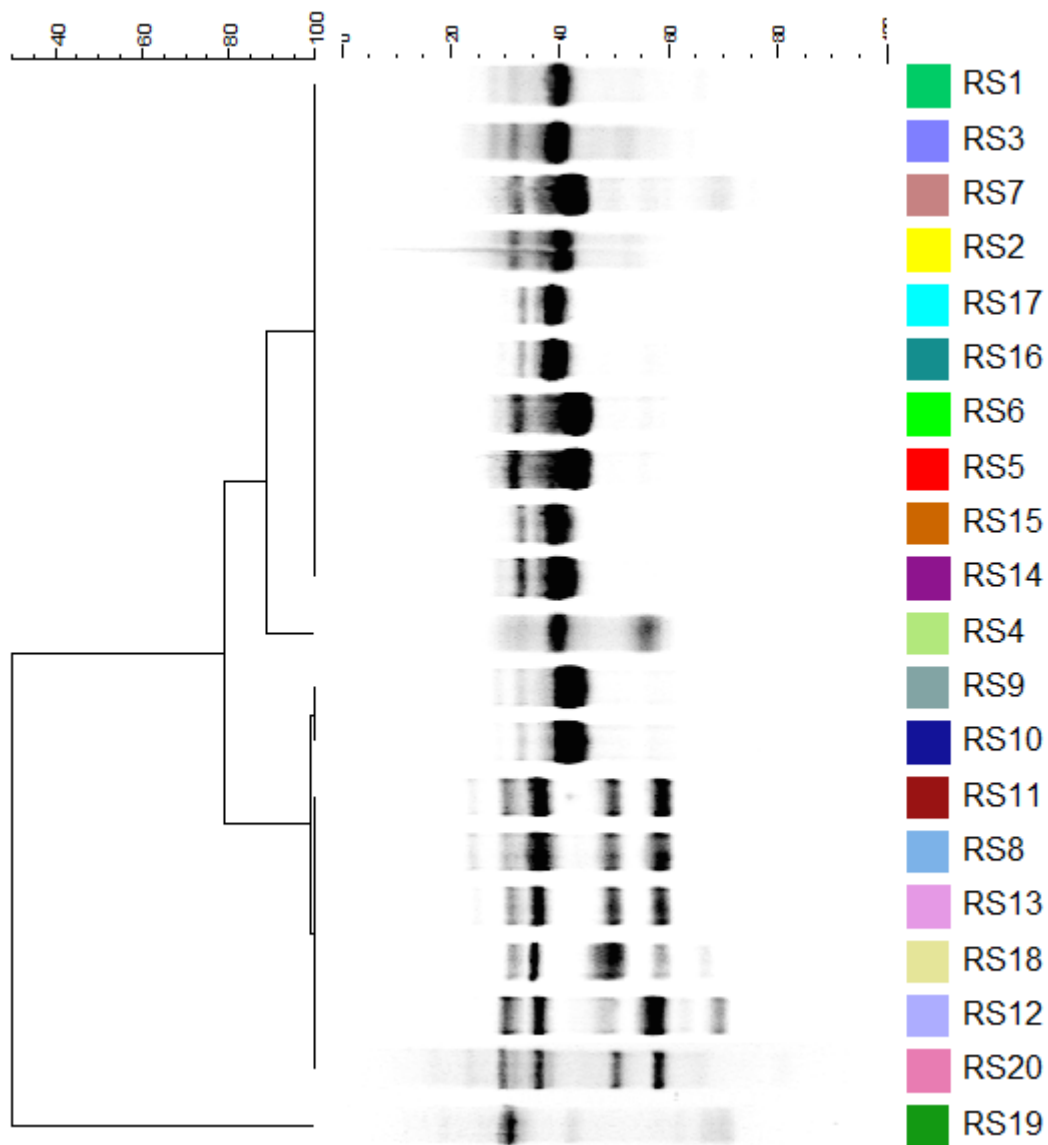
Slika 6. Dendrogram elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka 3. majke

Na slici 6, prikazani dendrogram ima 5 klastera. Najveći klaster ima 7 istih sojeva označenih AF1, AF9, AF14-AF16, AF19 i AF20. Sljedeći klaster ima 6 sojeva: AF3, AF5, AF7, AF8, AF17 i AF18. Sljedeći klaster ima 4 soja: AF10-AF13. Predzadnji klaster ima 2 soja: AF4 i AF6, a najmanji samo jednog predstavnika, AF2. Prema dobivenim rezultatima, iz uzoraka mlijeka majke označene identifikacijskom oznakom AF, izolirano je 5 genetički različitih sojeva, kao i u prethodnom slučaju te su za daljnje analize odabrani izolati AF2, AF4, AF5, AF12 i AF16.



Slika 7. Dendrogram elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka 4. majke

Na slici 7, prikazani dendrogram ima 8 klastera. U najvećem klasteru grupirano je 6 sojeva označenih MB13, MB15-MB17, MB19 i MB20. 2 klastera imaju grupirano po 4 soja; u jednom klasteru su to MB2, MB3, MB7 i MB8, a u drugom MB1, MB4, MB6 i MB14. Postoji klaster i s dva sloja, MB12 i MB18. Preostala 4 klastera imaju samo po 1 soj, svaki različit od drugoga, a to su MB5, MB9, MB10 i MB11. Iz uzoraka mlijeka majke označene identifikacijskom oznakom MB, izolirano je 8 genetički različitih sojeva te su za daljnje analize odabrani izolati MB5, MB6, MB7, MB9, MB10, MB11, MB12 i MB15.



Slika 8. Dendrogram elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka 5. majke

Na slici 8 prikazani dendrogram ima 5 klastera. Najveći klaster ima 10 sojeva označenih RS1-RS3, RS5-RS7, RS14-RS17. Sljedeći veći klaster čini grupa od 6 sojeva označenih RS8, RS11-RS13, RS18 i RS20. Klaster od dva soja čine RS9 i RS10, a klaster sa samo jednim sojem predstavljaju RS4 te RS19. Prema tome, iz uzoraka mlijeka majke označene identifikacijskom oznakom RS, izolirano je 5 genetički različitih sojeva te su za daljnje analize odabrani izolati RS4, RS8, RS10, RS17 i RS19.

Analizom dendrograma odabrano je 25 bakterijskih izolata različitih genetičkih profila. Provedena je amplifikacija njihove 16S rDNA pomoću univerzalnih UNI16SF i UNI16SR početnica te su dobiveni PCR produkti pročišćeni i poslani na 16S sekvenciranje Sangerovom metodom u Macrogen. Zatim je napravljena pretraga homologija među DNA sekvencama pohranjenim u NCBI bazi podataka primjenom BLASTn algoritma. Rezultati sekvenciranja prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Rezultati 16S DNA sekvenciranja 25 odabranih izolata iz majčinog mlijeka

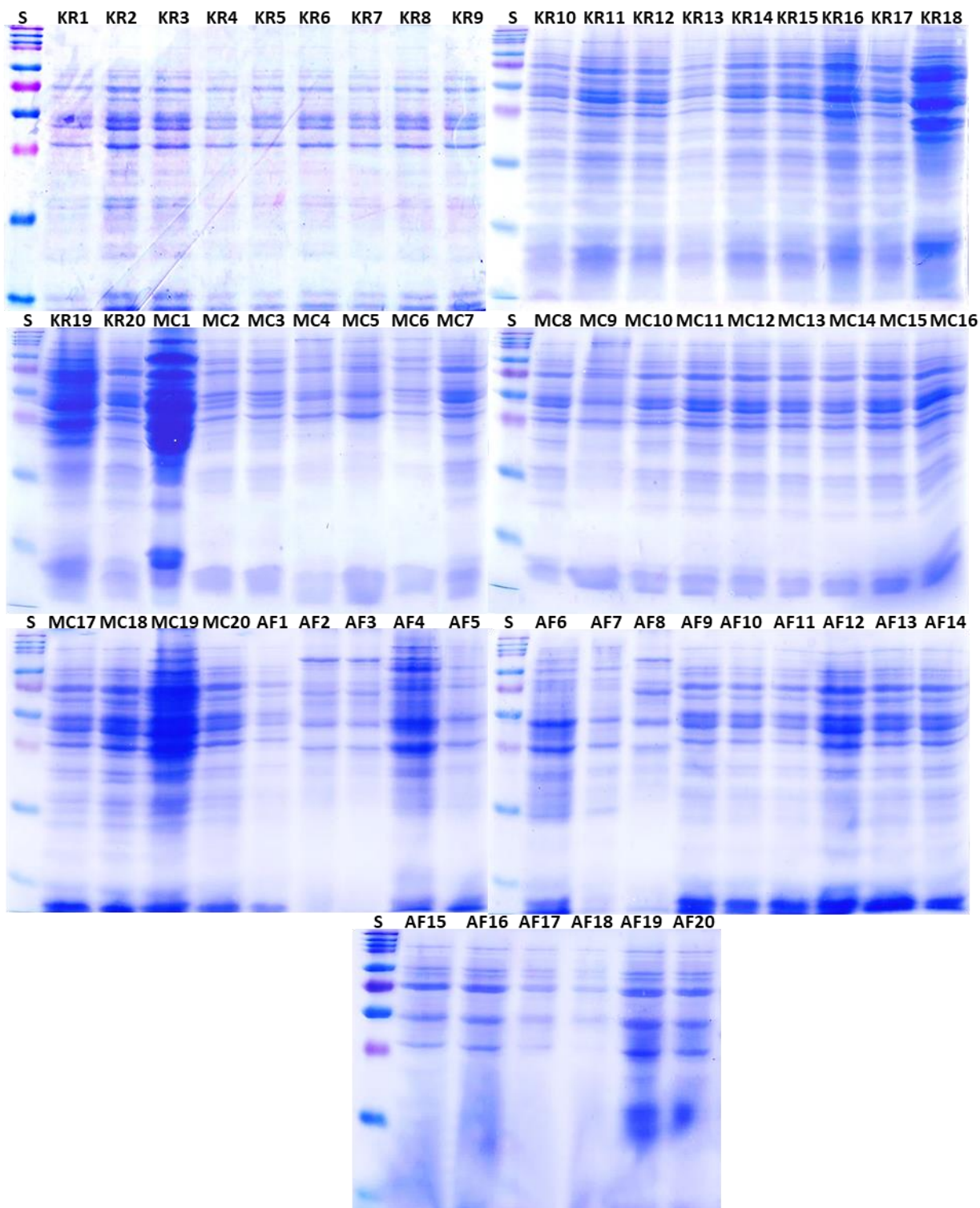
Šifra izolata iz majčinog mlijeka	Sličnosti sa sekvencama pohranjenim u NCBI banci gena Rezultat identifikacije	% sličnosti	Pristupni broj u NCBI banci gena	E- vrijednost
KR19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	MG550988,1	0,0
KR20	<i>Enterococcus faecium</i>	98	MN566092,1	0,0
MC1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	98	KY435712,1	0,0
MC2	<i>Enterococcus faecalis</i>	98	KC113205,1	0,0
MC5	<i>Staphylococcus epidermis</i>	98	CP035643,1	0,0
MC13	<i>Enterococcus faecium</i>	97	CP014529,1	0,0
MC19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	HM130542,1	0,0
AF2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	96	AY030340,1	0,0
AF4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97	CP014119,1	0,0
AF5	<i>Staphylococcus epidermis</i>	98	CP043804,1	0,0
AF12	<i>Enterococcus durans</i>	97	MF405179,1	0,0
AF16	<i>Enterococcus faecium</i>	98	JN560856,1	0,0
MB5	<i>Streptococcus oralis</i> subsp. <i>dentisani</i>	83	CP034442,1	0,0
MB6	<i>Staphylococcus epidermis</i>	98	CP043804,1	0,0
MB7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95	MF197402,1	0,0
MB9	<i>Streptococcus</i> sp.	81	CP007628,2	0,0
MB10	<i>Streptococcus salivarius</i>	97	CP014144,1	0,0
MB11	<i>Streptococcus oralis</i>	98	LR134336,1	0,0
MB12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	MN511770,1	0,0
MB15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	97	JQ801725,1	0,0
RS4	<i>Streptococcus oralis</i>	92	CP019562,1	0,0
RS8	<i>Staphylococcus epidermis</i>	98	AP019721,1	0,0

RS10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	AB362728,1	0,0
RS17	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	89	MG557813,1	0,0
RS19	<i>Streptococcus mitis</i>	98	KX880968,1	0,0

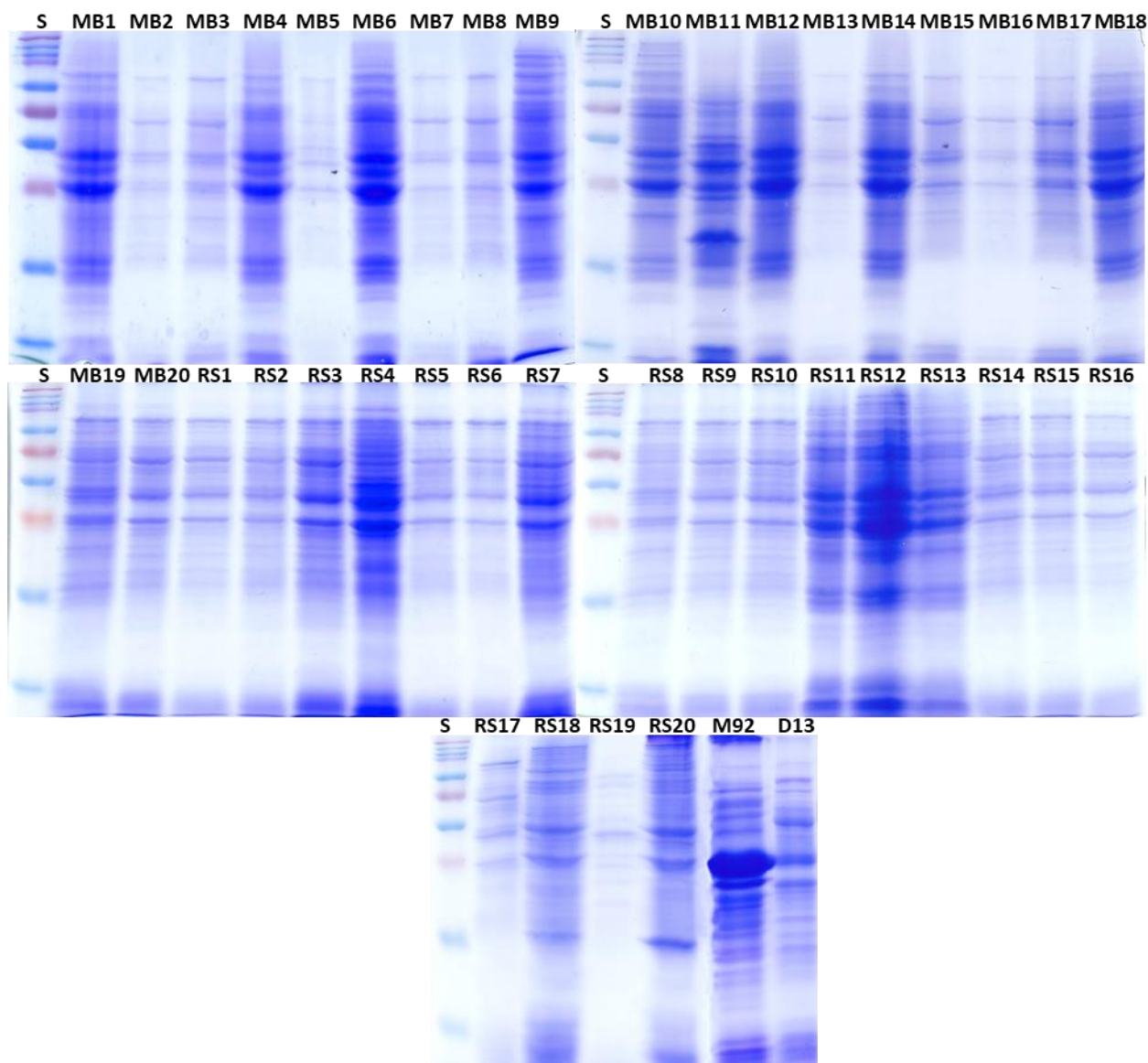
Prema rezultatima 32 % bakterija od odabranih 25 izolata pripada rodu *Staphylococcus*, koji je i po literaturi najzastupljeniji rod u majčinom mlijeku (Lyons i sur., 2020; Sakwinska i Bosco, 2019; Reis i sur., 2016; Jost i sur., 2015), dok ostale izolirane bakterije pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Streptococcus* (tablica 10). Solís i sur. (2010) su pak izolirali *Streptococcus* kao najzastupljeniji rod u majčinom mlijeku, a nakon toga je slijedio *Staphylococcus*. Razlike u dobivenim rezultatima mogu biti posljedica razlike socio-ekonomskog statusa, kulturne razlike, genetičke razlike, razlike u ishrani majki te uporabi antibiotika (Jeurink i sur., 2013). Solís i sur. (2010) kao najčešćeg predstavnika su izolirali vrstu *Streptococcus salivarius*, dok je ovdje najčešći predstavnik tog roda *S. oralis*. Nakon toga je slijedila vrsta *Staphylococcus epidermidis*, koja je ovdje podjednako zastupljena kao i *S. epidermis*.

4.2. ANALIZA PRISUTNOSTI S-PROTEINA U IZOLIRANIM I IDENTIFICIRANIM SOJEVIMA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Selektivnu prednost u različitim kompetitivnim staništima, poput ljudskog gastrointestinalnog trakta, određeni bakterijski sojevi osiguravaju sintezom S-proteina. Sloj S-proteina, kao najizloženiji sloj stanice u odsustvu kapsule i glikokaliksa, u izravnom je kontaktu s bakterijskim okolišem te štiti stanicu od nepovoljnih uvjeta okoliša poput osmotskog i mehaničkog stresa, antimikrobnih peptida i bakteriolitičkih enzima, radijacije te bakteriofaga i drugih mikrobnih predatora (Gerbino i sur., 2015). Ekspresija S-proteina je rijetka kod probiotičkih bakterija, ali ima važnu ulogu u iskazivanju probiotičkih svojstava soja producenta jer utječe na mnoga površinska svojstva stanice, preživljavanje stanice u nepovoljnim uvjetima, sposobnost autoagregacije i koagregacije te adhezije na različite epitelne i subepitelne strukture. Stoga je provedena ekstrakcija površinskih proteina svih bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka te njihova SDS-PAGE analiza. Kao pozitivna kontrola prisutnosti S-proteina korišten je soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji eksprimira S-proteine vidljive na elektroforetskom profilu soja na slici 10 u obliku dominantne proteinske vrpce veličine oko 45 kDa. Kao negativna kontrola korišten je soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine.



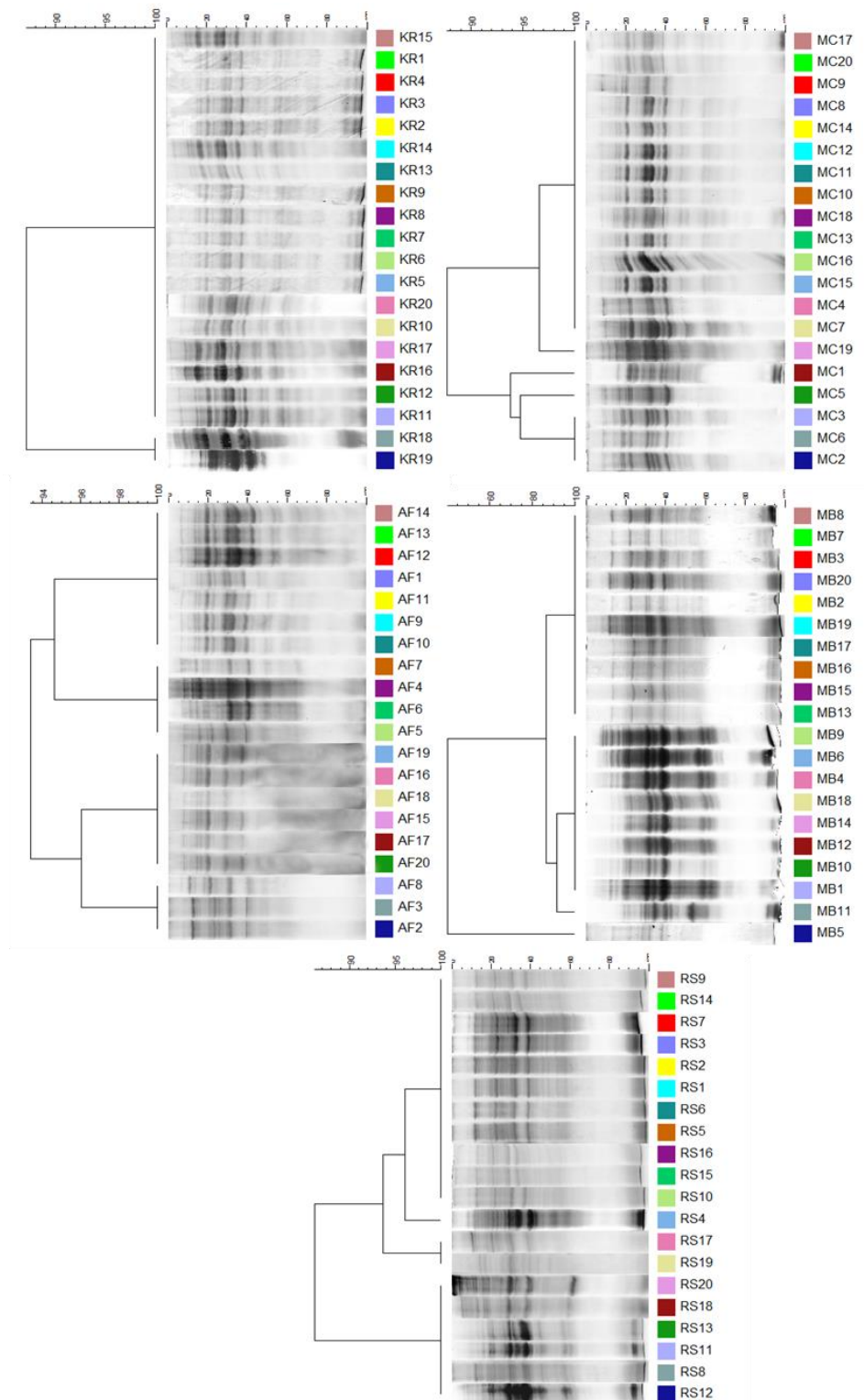
Slika 9. SDS-PAGE elektroforeza površinskih proteina sojeva izoliranih iz uzoraka mlijeka majki s oznakama KR, MC i AF



Slika 10. SDS-PAGE elektroforeza površinskih proteina sojeva izoliranih iz uzoraka mlijeka majki s oznakama MB i RS te standardnih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92 (pozitivna kontrola) i *Lactobacillus plantarum* D13 (negativna kontrola)

Na slikama 9 i 10 se može uočiti da su uspješno izolirani površinski proteini svih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, no nijedan soj ne sadrži dominantnu proteinsku vrpcu koja bi ukazala da eksprimiraju S-proteine, pa ni najzastupljeniji predstavnik BMK *Lactobacillus plantarum* za kojeg je iz literature već poznato da ne eksprimira S-proteine (Sanders i sur., 2018). Također je iz literature poznato da S-proteine, među rodnom *Lactobacillus*, ekspimiraju one vrste koje su homologne *L. acidophilus* (Sanders i sur., 2018; Johnson i sur., 2016).

Proteinski profili dobiveni SDS-PAGE analizom su međusobno uspoređeni hijerarhijskom klaster analizom te je analizom dendrograma na slici 11 uočeno da sojevi koji pripadaju istoj bakterijskoj vrsti imaju vrlo slične proteinske profile.



Slika 11. Hijerarhijska klaster analiza proteinskih profila sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka

Kako bi se potvrdilo da niti jedan bakterijski soj izoliran iz majčinog mlijeka ne sadrži S-proteine, napravljena je i PCR analiza sa specifičnim početnicama za gene S-proteina. Ponovno je kao pozitivna kontrola u PCR reakciji korištena DNA referentnog soja koji eksprimira S-proteine *L. helveticus* M92, a kao negativna kontrola DNA referentnog soja koji ne eksprimira S-proteine *L. plantarum* D13. Vrpca veličine 1,2 kb karakteristična za S-proteine, uočena je samo kod referentnog soja *L. helveticus* M92 (slika 12). Budući da je ekspresija S-proteina rijetko svojstvo probiotičkih bakterija te da u literaturi ne postoje podaci o soju izoliranom iz majčinog mlijeka koji sadrži S-proteine, dobiveni rezultati su očekivani (Sanders i sur., 2018; Johnson i sur., 2016).



Slika 12. Elektroforeza produkata PCR reakcije sa specifičnim Us1 početnicama za gene koji kodiraju za S-proteine

5. ZAKLJUČCI

1. Prema identifikaciji sekvenciranjem 16S rDNA sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka utvrđeno je da su najzastupljenije bile bakterije iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Enterococcus*.
2. Na temelju SDS-PAGE elektroforeze ekstrahiranih površinskih proteina te DNA elektroforeze produkata PCR reakcije sa specifičnim početnicama za S-proteine može se zaključiti da odabrane bakterije izolirane iz majčinog mlijeka ne posjeduju S-proteine na svojoj površini odnosno ne posjeduju gene koji bi kodirali za S-proteine.

6. LITERATURA

Banić, M., Uroić, K., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Zorić, K., Durgo, K., Petković, H., Jamnik, P., Kazazić, S., Kazazić, S., Radović, S., Scalabrin, S., Hynönen, U., Šušković, J., Kos, B. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT – Food Sci. Technol.* **93**, 257-267.

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

Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M. (2013) Probiotics: Properties, Examples, and Specific Applications. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, 1-15.

Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Durgo, K., Oršolić, N., Kukulj, M., Radović, S., Scalabrin, S., Žučko, J., Starčević, A., Šušković, J., Kos, B. (2020) The functional capacity of plantaracin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B withstand gastrointestinal transit. *Microb. Cell Fact.* **19**, 106.

Claus, H., Akça, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J.-P., Harris, J. R., Schlott, B., König, H. (2005) Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Can. J. Microbiol.* **51**, 731-743.

do Carmo, F. L. R., Rabah, H., De Oliveira Carvalho, R. D., Gaucher, F., Cordeiro, B. F., da Silva, S. H., Le Loir, Y., Azevedo, V., Jan, G. (2018) Extractable Bacterial Surface Proteins in Probiotic-Host Interaction. *Front. Microbiol.* **9**, 1-12.

Douillard, F. P., de Vos, W. M. (2014) Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb. Cell Fact.* **13**, 1-21.

Engelhardt, H. (2007) Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *J. Struct. Biol.* **160**, 115-124.

Ezendam, J., van Loveren, H. (2006) Probiotics: Immunomodulation and Evaluation of Safety and Efficacy. *Nutr. Rev.* **64**, 1-14.

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

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.

GelCompar II, Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgija; 2021. Dostupno na: <https://www.applied-maths.com/gelcompar-ii>.

Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M. A., Gómez-Zavaglia, A. (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 1877-1887.

Gupta, R., Jeevaratnam, K., Fatima, A. (2018) Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health (A Review). *J. Emerg. Technol. Innov. Res.* **5**, 411-424.

GVR (2021) Probiotics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product, By Ingredient, By End Use, By Distribution Channel, And Segment Forecasts, 2019-2025. GVR – Grand View Research, <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/probiotics-market>>. Pristupljeno 12. siječnja 2021.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., Sanders, M. E. (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 506-514.

Hojsak, I. (2010) *Lactobacillus* GG u prevenciji gastrointestinalnih i respiratornih infekcija u hospitalizirane djece i djece u kolektivu (doktorska disertacija), Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Hynönen, U., Palva, A. (2013) *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225-5243.

Jeurink, P. V., van Bergenhenegouwen, J., Jiménez, E., Knippels, L. M. J., Fernández, L., Garssen, J., Knol, J., Rodríguez, J. M., Martín, R. (2013) Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef. Microbes* **4**, 17-30.

Johnson, B. R., Hymes, J., Sanozky-Dawes, R., DeCrescenzo Henriksen, E., Barrangou, R., Klaenhammer, T. R. (2016) Conserved S-Layer-Associated Proteins Revealed by

Exoproteomic Survey of S-Layer-Forming Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 134-145.

Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., Chassard, C. (2015) Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr. Rev.* **73**, 426-437.

Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S. C. M., 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. *PNAS* **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.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J. (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 171-184.

Lyons, K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., Stanton, C. (2020) Breast Milk, a Source of Beneficial Microbes and Associated Benefits for Infant Health. *Nutrients* **12**, 1-29.

Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H., Khan, I. U. (2011) Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Crit. Rev. Microbiol.* **37**, 91-98.

Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J. P. (2020) Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation* **6**, 1-21.

Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S., Yadav, H. (2012) Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol. Lett.* **334**, 1-15.

Oelschlaeger, T. A. (2010) Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57-62.

Papagianni, M. (2012) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, 1-8.

- Pessione, E. (2012) Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1-15.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Girbés, T. (2014) Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr. Sci.* **5**, 1765-1775.
- Reis, N. A., Saraiva, M. A. F., Duarte, E. A. A., de Carvalho, E. A., Vieira, B. B., Evangelista-Barreto, N. S. (2016) Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. *J. Appl. Microbiol.* **121**, 811-820.
- Rodríguez, J. M. (2014) The Origin of Human Milk Bacteria: Is There a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? *Adv. Nutr.* **5**, 779-784.
- Saeed, H. A., Salam, I. A. (2013) Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr. Sci.* **4**, 73-87.
- Sakwinska, O., Bosco, N. (2019) Host Microbe Interactions in the Lactating Mammary Gland. *Front. Microbiol.* **10**, 1-13.
- Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D. J., Klaenhammer, T. R. (2018) Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr. Opin. Biotechnol.* **49**, 207-216.
- Sherman, P. M., Ossa, J. C., Johnson-Henry, K. (2009) Unraveling Mechanisms of Action of Probiotics. *Nutr. Clin. Pract.* **24**, 10-14.
- Shinde, P. B. (2012) Probiotic: an overview for selection and evaluation. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 14-21.
- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M., Pum, D., Horejs, C. M., Tscheliessnig, R., Ilk, N. (2011) Nanobiotechnology with S-Layer Proteins as Building Blocks. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **103**, 277-352.
- Soccol, C. R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Rigon Spier, M., Bianchi Pedroni Medeiros, A., Tiemi Yamaguishi, C., De Dea Lindner, J., Pandey, A., Thomaz-Soccol, V. (2010) The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 413-434.

Solís, G., de los Reyes-Gavilan, C. G., Fernández, N., Margolles, A., Gueimonde, M. (2010) Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* **16**, 307-310.

Thakur, N., Rokana, N., Panwar, H. (2016) Probiotics: Selection criteria, safety and role in health and disease. *J. Innov. Biol.* **3**, 259-270.

Todar, K. (2020) PhD. – Home Page, <http://textbookofbacteriology.net/lactics_4.html>. Pristupljeno 1. prosinca 2020.

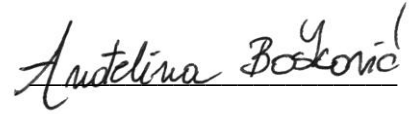
Uroić, K., Novak, J., Hynönen, U., Pietilä, T. E., Leboš Pavunc, A., Kant, R., Kos, B., Palva, A., Šušková, J. (2016) The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT – Food Sci. Technol.* **69**, 623-632.

WGO Global Guidelines. Probiotics and prebiotics, 2017.

Williams, N. T. (2010) Probiotics. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **67**, 449-458.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

A handwritten signature in black ink, reading "Anđelina Bošković". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

Potpis studenta