

# Ispitivanje probiotičkih svojstava bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

---

Vuletić-Antić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni 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:159:962119>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Lucija Vuletić-Antić**

0058214802

**ISPITIVANJE PROBIOTIČKIH SVOJSTAVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE  
IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

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

**Zagreb, 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Ispitivanje probiotičkih svojstava bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka**

**Lucija Vuletić-Antić, 0058214802**

**Sažetak:** Cilj ovog završnog rada bio je ispitati svojstva bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* KR19, *Enterococcus faecium* KR20, *L. fermentum* MC1, *E. faecium* MC13, *L. plantarum* MC19, *L. plantarum* MB7, *L. plantarum* MB15, *L. plantarum* MB18 i *L. plantarum* RS10, izoliranih iz majčinog mlijeka. Ispitana su svojstva preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta i tijekom procesa liofilizacije, sposobnost autoagregacije te adhezije na heksan. Ispitivanja tih svojstava važna su zbog moguće primjene ovih bakterija kao probiotičkih. Većina je sojeva postigla zadovoljavajući postotak preživljavanja tijekom izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta, a najbolji postotak preživljavanja u uvjetima simuliranog želučanog soka postignut je sa sojem MC1 i iznosio je 86,08 %, dok je najbolji postotak preživljavanja uvjeta simuliranog soka tankog crijeva postignut sa sojem MC19 te je iznosio 83,41 %. Većina sojeva u visokom broju preživljava uvjete liofilizacije s obranim mlijekom kao lioprotektorom, od kojih soj MB15 preživljava u najvećem broju. Najveću sposobnost autoagregacije pokazao je soj MB18, čiji je postotak autoagregacije iznosio 97,05 %. Sojevi KR19, MC19 i RS10 pokazuju hidrofilna svojstva površine, dok je površina ostalih sojeva hidrofobna.

**Ključne riječi:** majčino mlijeko, bakterije mliječne kiseline, probiotici

**Rad sadrži:** 26 stranica, 7 slika, 2 tablice, 36 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

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

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

**Datum obrane:** srpanj 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

**Investigation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from breast milk**  
**Lucija Vuletić-Antić, 0058214802**

**Abstract:** The aim of this work was to examine the properties of bacteria strains *Lactobacillus plantarum* KR19, *Enterococcus faecium* KR20, *L. fermentum* MC1, *E. faecium* MC13, *L. plantarum* MC19, *L. plantarum* MB7, *L. plantarum* MB15, *L. plantarum* MB18 and *L. plantarum* RS10 isolated from breast milk. The properties that were examined were the survival of bacteria in the simulated conditions of the gastrointestinal tract and during the freeze-drying process, as well as autoaggregation ability and adhesion ability to hexane. These properties are important for the potential use of these strains as probiotics. Most strains showed the significant ability of survival in the simulated conditions in the gastrointestinal tract, of which strain MC1 demonstrated the best result with 86.08 % survival rate in the simulated conditions in the stomach and strain MC19 demonstrated the best results with 83.41 % survival rate in the simulated conditions in the small intestine. Most strains survived the freeze-drying process better with skimmed milk as lyoprotectant, with strain MB15 surviving in the highest number. Strain MB18 exhibited the best autoaggregation ability with a percentage of autoaggregation of 97.05 %. The surface of strains KR19, MC19 and RS10 was shown to be hydrophilic, while the other strains have hydrophobic surfaces.

**Keywords:** breast milk, lactic acid bacteria, probiotics

**Thesis contains:** 26 pages, 7 figures, 2 tables, 36 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor

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

**Defence date:** July 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, a uz pomoć Martine Banić, mag. ing. biotechn. i Nine Čuljak, mag. ing. biotechn. Rad je izrađen u okviru projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Sastav majčinog mlijeka .....	2
2.2. Bakterijski sojevi iz majčinog mlijeka.....	4
2.3. Bakterije mliječne kiseline i probiotičko djelovanje .....	7
2.4. Važnost majčinog mlijeka.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	10
3.1. MATERIJALI.....	10
3.1.1. Radni mikroorganizmi .....	10
3.1.2. Hranjive podloge.....	10
3.1.3. Kemikalije.....	11
3.1.4. Aparatura i pribor.....	11
3.2. METODE.....	12
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama .....	12
3.2.2. Fenotipska identifikacija bakterija iz majčinog mlijeka pomoću API 50 CHL metode.....	12
3.2.3. Preživljavanje bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT) .....	13
3.2.4. Liofilizacija bakterijskih stanica .....	14
3.2.5. Ispitivanje svojstva autoagregacije bakterijskih stanica.....	14
3.2.6. Mikrobna adhezija na otapala ( <i>engl.</i> Microbial adhesion to solvents, MATS).....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. Identifikacija i proizvodnja odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline .....	16
4.2. Ispitivanje probiotičkih svojstava bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka .....	18
5. ZAKLJUČCI .....	22
6. LITERATURA.....	23

## 1. UVOD

Majčino mlijeko je kompleksna, fiziološka tekućina posebnih svojstava koja se smatra najboljim izvorom nutrijenata za novorođenčad. Sadrži ugljikohidrate, lipide, vitamine, minerale i proteine, ali i stanice, hormone, imunološke i imunomodulatorne faktore poput imunoglobulina A te molekule poput glikokonjugata (Ojo-Okunola i sur., 2018). Majčino mlijeko sadrži raznoliku mikrobiotu kojom dominiraju bakterije iz roda *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium* i *Enterococcus*, a sadrži i arheje, gljive i viruse (Zimmermann i Curtis, 2020). Na raznolikost mikrobiote majčinog mlijeka utječu razni faktori, a neki od njih su prehrana, način života, uzimanje lijekova, permeabilnost sluznice crijeva i zdravlje usne šupljine (Sánchez i sur., 2021).

Bakterije mliječne kiseline obuhvaćaju rodove *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* i *Streptococcus* koji metaboličkim procesima iz ugljikohidrata proizvode mliječnu kiselinu (Šušković i sur., 1997). Bakterije mliječne kiseline nađene u majčinom mlijeku inhibiraju rast patogenih bakterija tako što proizvode antimikrobne komponente poput bakteriocina, organskih kiselina i vodikovog peroksida (Zimmermann i Curtis, 2020).

Dojenčad hranjena majčinim mlijekom, u usporedbi s dojenčadi hranjenom pripravcima, ima stabilniju gastrointestinalnu mikrobiotu s dvostruko više bakterijskih stanica (Andreas i sur., 2015). Majčino mlijeko smatra se odlučujućim faktorom u razvoju mikrobiote crijeva novorođenčeta jer je ono izvor komensalnih bakterija zaslužnih za smanjenje rizika od raznih oboljenja i alergija kod novorođene djece (Olivares i sur., 2006). Ono direktno utječe na razvoj imunološkog sustava djeteta kroz mikrobne i imunološke faktore koji se prenose, poput imunoglobulina, citokina, kemokina, faktora rasta, hormona te laktoferina (Le Doare i sur., 2018).

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati svojstva bakterija *Lactobacillus plantarum* KR19, *Enterococcus faecium* KR20, *L. fermentum* MC1, *E. faecium* MC13, *L. plantarum* MC19, *L. plantarum* MB7, *L. plantarum* MB15, *L. plantarum* MB18 i *L. plantarum* RS10 izoliranih iz uzoraka majčinog mlijeka, identificiranih 16S rDNA sekvencioniranjem te okarakteriziranih fenotipskim i genotipskim metodama. Ispitana su svojstva preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta i uvjeta liofilizacije, sposobnost autoagregacije te adhezije na tri otapala različite polarnosti.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Sastav majčinog mlijeka

Majčino mlijeko je dinamična biološka tekućina čiji sastav varira ovisno o tijeku laktacije kako bi se zadovoljile sve potrebe djeteta koje raste. Sastoji se od vode, ugljikohidrata, proteina, lipida, vitamina i minerala (Lyons i sur., 2020). Sastav mlijeka varira između žena, ali ovisi i o stadiju laktacije. Mlijeko koje se izlučuje prva četiri do pet dana naziva se kolostrum i sadrži visoke koncentracije karotenoida, elektrolita poput kalcija i natrija te imunoglobulina i ostalih proteina, dok su koncentracije laktoze i masti niže. Nakon deset dana izlučuje se zrelo mlijeko, čiji sastav može varirati prema dobu dana u kojem se izlučuje, ishrani, trajanju laktacije te vremenu između hranjenja. Još nije istražena povezanost između volumena mlijeka i koncentracije nutrijenata, dok energetska vrijednost ovisi o udjelu masti u mlijeku, na koje možda utječe prehrana majke. Iako se smatra kako je kvantiteta i kvaliteta majčinog mlijeka tijekom dojenja ustaljena, neka stanja poput neuhranjenosti znatno utječu na varijabilnost sastava mlijeka. Slabo istraženi su i genetički i promjenjivi faktori od izloženosti toksinima i kemikalijama, alkohol, pušenje te upotrebe kontracepcijskih sredstava pa sve do načina života poput vegetarijanstva. Isto tako, pretilost može utjecati na početak i preuranjeni prestanak laktacije, dok se u mlijeku mogu povećati proinflammatorni citokinini koji mogu poremetiti metabolizam cinka i sintezu lipida (Christian i sur., 2021).

Većinu ugljikohidrata iz majčinog mlijeka čini laktoza, no i ostali ugljikohidrati igraju ključnu ulogu u zdravlju djeteta. To su primjerice oligosaharidi i fruktoza. Berger i sur. (2020) istraživali su utjecaj konzumiranja pića s dodanim šećerima, kao visokofruktoznog kukuruznog sirupa (*high-fructose corn syrup* ili HFCS), na koncentraciju laktoze, glukoze i fruktoze u majčinom mlijeku budući da su dodani šećeri u prehrani danas vrlo česti. Zaključeno je kako zaslađena pića nemaju utjecaj na koncentraciju laktoze i glukoze, ali značajno povećavaju koncentraciju fruktoze u majčinom mlijeku. Najveća koncentracija fruktoze u mlijeku bila je do tri sata nakon konzumiranja, a pet sati nakon konzumiranja je i dalje bila značajno povišena. Fruktoza interferira s hormonima koji reguliraju apetit, povećava koncentraciju markera oksidativnog stresa i upalnih medijatora koji infiltriraju adipozno tkivo, a još nije poznato kako ona utječe na razvoj novorođenčeta preko konzumiranja majčina mlijeka. Za razliku od odraslih, gastrointestinalni trakt novorođenčadi nije opremljen za metabolizam fruktoze te ne posjeduje transporter GLUT5 čija se ekspresija značajno povećava pri prvom doticaju s fruktozom. Budući da fruktoza nije dio



prirodnog sastava mlijeka nego je njena pojava u mlijeku rezultat prehrane majke, slučajna izloženost visokoj koncentraciji fruktoze može imati štetne posljedice na metabolizam djeteta, što još treba istražiti. Goran i sur. (2017) istraživali su utjecaj fruktoze na težinu i tjelesnu kompoziciju djeteta. Uočeno je da je porast od  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  fruktoze u majčinu mlijeku povezan s porastom težine i tjelesne kompozicije dojenčeta. Iako je takva količina fruktoze vrlo mala, mogla bi imati utjecaj na razvoj pretilosti kasnije u životu.

Majčino mlijeko sadrži preko 400 različitih proteina koji imaju brojne funkcije. Neki proteini poput amilaze,  $\beta$ -kazeina i laktoferina pomažu u probavi i apsorpciji mikro- i makronutrijenata iz majčinog mlijeka. Drugi pak, poput imunoglobulina,  $\kappa$ -kazeina i lizozima prolaze kroz gastrointestinalni trakt te doprinose obrani od patogenih bakterija i virusa. Proteini iz majčinog mlijeka mogu se podijeliti u tri skupine: proteini sirutke, kazein i mucinski proteini. Mucini su membranski proteini globula mlijeka i njihov udio u ukupnim proteinima iz mlijeka nije velik, ali je najvjerojatnije stalan tijekom laktacije. Koncentracije proteina sirutke i kazeina se značajno mijenjaju u prvim danima laktacije kada je koncentracija sirutke vrlo visoka, dok se koncentracija kazeina gotovo ne može detektirati. S vremenom, koncentracija kazeina raste, a koncentracija proteina sirutke smanjuje, djelomično zbog povećanja volumena mlijeka koje se proizvodi (Lönnerdal, 2003). Važna uloga proteina iz mlijeka je i oblikovanje imunološkog sustava dojenčeta koje još ne proizvodi vlastite imunoglobuline. U majčinu mlijeku najviše je sekretornog imunoglobulina A (sIgA) koji čini preko 90 % svih antitijela iz mlijeka. Imunoglobulini G i M su također prisutni, no u znatno manjim koncentracijama. Uočeno je kako nakon druge godine dojenja, majčino mlijeko sadrži značajno veće koncentracije proteina sIgA i IgG iz čega proizlazi kako bi i nakon uvođenja čvrste hrane trebalo nastaviti s dojenjem u svrhu očuvanja zdravlja djeteta (Czosnykowska-Łukacka i sur., 2020).





Lipidi iz majčinog mlijeka glavni su izvor energije i izvor esencijalnih nutrijenata kao polinezasićenih masnih kiselina. Dolaze u obliku globula s hidrofobnom unutrašnjosti bogatom trigliceridima koji čine 98 % ukupne količine masti iz majčinog mlijeka. Površina globula sastoji se od amfipatskih fosfolipida i kolesterola pomoću kojih se masti mogu raspršiti u vodenom okruženju majčinog mlijeka. Udio masti u majčinom mlijeku povećava se tijekom prva četiri tjedna laktacije, veličina globula masti raste, a omjer površinskih lipida (fosfolipida i kolesterola) naspram lipida u unutrašnjosti (triglicerida) se smanjuje (Koletzko i sur., 2001). Fosfolipidi s površine globula su izvor kolina, esencijalnog nutrijenta koji sudjeluje u raznim biološkim procesima, najviše u metabolizmu, ali i u stvaranju membrana u mozgu i u živčanom tkivu, što je neophodno

za novorođenčad zbog brzog rasta organa i biosinteze membrana. Gangliozidi, koji se također nalaze u membrani lipidnih globula mlijeka, imaju važnu ulogu u razvoju tkiva djeteta, naročito u tankom crijevu gdje sudjeluju u procesima proliferacije, aktivacije i diferencijacije imunoloških stanica te imaju imunomodulatorni efekt, a potiču i rast bakterija iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (Sánchez i sur., 2021).

## 2.2. Bakterijski sojevi iz majčinog mlijeka

U dvadesetim godinama prošlog stoljeća već se znalo da majčino mlijeko sadrži bakterije, no za njih se smatralo kako potječu s majčine kože, iz djetetove usne šupljine ili s posuđa s kojim mlijeko dođe u dodir. Pojavom novih metoda, poput PCR-a (engl. *polymerase chain reaction*), PCR-DGGE-a (*PCR-denaturing gradient gel electrophoresis*), MALDI-TOF-MS-a (engl. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*), 16S rRNA sekvencioniranja i *shotgun* sekvencioniranja, omogućen je uvid u raznolikost mikrobiote majčinog mlijeka (Sánchez i sur., 2021). No, molekularna dijagnostika detektira i nežive bakterije, budući da bakterije u majčinom mlijeku mogu biti slobodne ili vezane na imunološke stanice. Isto tako, rezultati se mogu razlikovati ovisno o korištenoj metodi. Moguće je kako primjerice 16S rRNA metoda umanjuje broj Gram-negativnih bakterija ili kako univerzalne početnice nisu učinkovite u umnožavanju sekvenci s velikim G+C (gvanidin + citozin) udjelom baza čime umanjuju broj bakterija iz roda *Bifidobacterium*. Uz to, velika je mogućnost kontaminacije uzorka jer majčino mlijeko sadrži vrlo malu količinu mikrobne biomase (Zimmermann i Curtis, 2020).

Smatra se kako bakterije iz majčinog mlijeka potječu iz gastrointestinalnog trakta i usne šupljine otkud se translociraju, najčešće u kasnim stadijima trudnoće. Tome u prilog idu prisutnost mikrobiote u kolostrumu i prije prvog dojenja, vertikalni prijenos patogenih bakterija i virusa preko dojenja te prisutnost probiotičkih sojeva u mlijeku majki koje su ih tijekom laktacije uzimale oralno (slika 1) (Moosavi i Azad, 2020).

Mikrobiota majke		Egzogena mikrobiota	
Kolonizacija dojke		Inokulacija mlijeka unutar dojke	Inokulacija ekspimiranog mlijeka
<p><b>Crijeva – dojke</b> <b>Usna šupljina – dojke</b></p>  <p><b>Utjecaj majke</b> Prehrana &amp; stil života Medicinska povijest Permeabilnost crijeva Indeks tjelesne mase Zdravlje usne šupljine</p>	<p><b>Mikrobiota dojke</b></p>  <p><b>Lokalni faktori</b> Mastitis Prethodne trudnoće Rak dojke</p>	<p><b>Retrogradno</b></p>  <p><b>Usta djeteta</b> Spol djeteta, način poroda <b>Majčina koža</b> Ekcem, topične kreme <b>Pumpica za izdvajanje mlijeka</b></p>	<p><b>Kontaminacija</b></p>  <p><b>Rukovanje mlijekom</b> Izdvajanje pumpicom Hranjenje na bočicu Način čišćenja</p>

**Slika 1.** Porijeklo mikrobiote majčinog mlijeka. Pretpostavlja se da postoje dva puta kojima bakterije dospiju u majčino mlijeko: put crijeva – dojke te retrogradna translokacija. Bakterije se mogu translocirati i iz usne šupljine (put usna šupljina – dojke). Na mikrobiotu majčinog mlijeka može utjecati i način dojenja, odnosno dojenje direktno iz dojke i izdvajanje mlijeka pumpicom te se pumpica za izdvajanje može smatrati dodatnim izvorom retrogradne inokulacije ili kontaminacije. Ovisno o porijeklu bakterija, različiti se faktori mogu pripisati sastavu mikrobiote majčinog mlijeka (prema Moosavi i Azad, 2020)

U majčinom mlijeku se može naći 820 vrsta bakterija koje većinom pripadaju koljenima Firmicutes, Gram-pozitivne *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Veillonella*, *Gemella*, *Clostridium* i druge te Proteobacteria, Gram-negativne *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* i druge. Majčino mlijeko još može sadržavati bakterije iz koljena Actinobacteria, poput *Actinomyces*, *Corynebacterium* i *Propionibacterium*, Fusobacteria poput *Leptotrichia* te Bacteroidetes poput *Prevotella*. Smatra se kako srž bakterijske mikrobiote u mlijeku uključuje devet rodova: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* i *Bradyrhizobium* te oni predstavljaju polovicu

ukupne mikrobiote mlijeka, iako njihov broj može varirati. Najviše je vrsta iz rodova *Streptococcus* i *Staphylococcus*, bez obzira na varijabilnosti u geografskom položaju ili metodi analiziranja mlijeka. Nakon toga slijede *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* i ostali članovi porodice Enterobacteriaceae. U kasnijim stadijima laktacije, bakterijska raznolikost se smanjuje u usporedbi s kolostrumom (Moubareck, 2021).



**Slika 2.** Faktori koji mogu imati utjecaj na sastav mikrobiote majčinog mlijeka. Oznake: ↑ - broj se povećava, ↓ - broj se smanjuje, ? – potrebna su daljnja istraživanja (prema Zimmermann i Curtis, 2020)

Smatra se kako na kompoziciju mikrobiote majčinog mlijeka utječu prehrana, indeks tjelesne mase, infekcije HIV-om, spol djeteta, gestacijska dob, stadij laktacije, način poroda, broj poroda, intraabdominalni tlak, kompozicija mlijeka, geografska lokacija te način dojenja (slika 2) (Zimmermann i Curtis, 2020). Moossavi i Azad (2020) su pokazali kako način dojenja, dojenje direktno iz dojke ili izdvajanje mlijeka pumpicom, utječe na mikrobiotu majčinog mlijeka te da egzogene bakterije u inokulaciji mlijeka igraju veliku ulogu. Uz bakterije s površine majčine kože i usne šupljine djeteta, egzogene bakterije mogu doći i s površine pumpice za izdvajanje mlijeka,

ovisno o njihovom namještanju, korištenju te pranju. Daljnja istraživanja su prijeko potrebna uzimajući u obzir da je upotreba pumpica za izdvajanje mlijeka u porastu diljem svijeta. U istom istraživanju, pokazano je kako na mikrobiotu majčinog mlijeka utječe spol djeteta pa tako indeks tjelesne mase majke igra veću ulogu kod mlijeka proizvedenog za kćeri, dok način dojenja znatno više utječe na mlijeko proizvedeno za sinove.

Još jedan faktor koji može utjecati na raznolikost mikrobiote majčinog mlijeka jest postporođajni psihosocijalni stres, koji može uključivati anksioznost, stres ili depresiju, a proživljava ga više od 25 % žena. Istraživanje koje su proveli Browne i sur. (2019) pokazalo je kako se raznolikost mikrobiote povećala od drugog do dvanaestog tjedna kod žena s niskom razinom psihosocijalnog stresa, dok je kod žena s visokom razinom psihosocijalnog stresa raznolikost mikrobiote u tom razdoblju bila stabilna. Razlika u raznolikosti postala je značajna tri mjeseca nakon porođaja, kada se kod žena s visokom razinom psihosocijalnog stresa raznolikost bakterija u mikrobioti mlijeka pokazala manjom nego kod žena s niskom razinom stresa.

### **2.3. Bakterije mliječne kiseline i probiotičko djelovanje**

Iz majčinog mlijeka mogu se izolirati bakterije mliječne kiseline iz rodova *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* kao i pripadnici rodova *Propionibacterium* i *Bifidobacterium* (Jamyuang i sur., 2019). Najznačajnije pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium*. Iz roda *Lactobacillus* mogu se izolirati vrste *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. gastricus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* i *L. vaginalis*, a dominiraju vrste *L. salivarius*, *L. fermentum* i *L. gasseri* (Łubiech i Twarużek, 2020). Bakterije mliječne kiseline nađene u majčinom mlijeku inhibiraju rast patogenih bakterija *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *E. faecalis*, *E. sakazakii*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium i *Shigella sonnei* te povećavaju nutritivnu vrijednost hrane i stimuliraju imunološki sustav (Zimmermann i Curtis, 2020).

Majčino mlijeko jedan je od najvažnijih faktora koji oblikuje mikrobiološku ravnotežu probavnog trakta novorođenčeta. Kvantitativna i kvalitativna kompozicija probiotičke mikroflore majčinog mlijeka je varijabilna. Faktori koji utječu na količinu probiotičkih bakterija u mlijeku uključuju prehranu tijekom trudnoće i dojenja, majčino zdravstveno stanje, terapiju antibioticima te okolišne uvjete u kojima se majka nalazi (Łubiech i Twarużek, 2020). Pojam probiotici odnosi se na mikroorganizme koji doprinose zdravlju domaćina kada se u organizam unesu u dovoljnim količinama, nisu toksični niti patogeni, mogu preživjeti uvjete u gastrointestinalnom traktu koji

uključuju niski pH, prisutnost enzima i žučnih soli, antagonistički djeluju protiv patogena i stimuliraju imunološki sustav te mogu zadržati aktivnost, vijabilnost i sposobnost rasta nakon tehnološke obrade (Plaza-Diaz i sur., 2019). Probiotici su u majčinom mlijeku prisutni u koncentracijama do  $1 \cdot 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>. Oni utječu na sazrijevanje i razvijanje imunološkog sustava, integritet sluznice gastrointestinalnog trakta te proizvodnju sIgA antitijela. Uz to, preveniraju gastrointestinalne infekcije i eliminiraju ili smanjuju broj patogene mikroflore zbog antimikrobnog djelovanja tako što se natječu za adhezijska mjesta na epitelu i za nutrijente. Inhibiraju rast patogenih bakterija tako što proizvode antimikrobne supstancije poput bakteriocina, organskih kiselina i vodikovog peroksida. Smanjuju rizik oboljenja od dijabetesa, pretilosti, hipertenzije i hiperkolesterolemije. Kod novorođenčadi smanjuju rizik od nekrotizirajućeg enterokolitisa, kojeg uzrokuje nerazvijeni gastrointestinalni trakt, poremećaji u opskrbi krvlju, umjetna prehrana te poremećaji kompozicije intestinalne mikroflore (Łubiech i Twarużek, 2020).

Osim dobrobiti za novorođenče, mikrobiota majčinog mlijeka mogla bi se koristiti u razne svrhe. U prehrambenoj industriji, primjerice, može služiti za očuvanje namirnica kao alternativa postojećim konzervansima poput sulfita i nitrita koji su povezani s nepovoljnim učincima na ljudsko zdravlje. Lamas i sur. (2021) istraživali su antimikrobnu aktivnost bakterija izoliranih iz majčinog i kravljeg mlijeka. Izolirane bakterije pokazale su antimikrobnu aktivnost protiv čestih kontaminanata u hrani bakterija *Stapylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens* i *Clostridium difficile*. Riaz Rajoka i sur. (2018) istraživali su antitumorsku aktivnost sojeva *L. casei* i *L. paracasei* izoliranih iz majčinog mlijeka. Antitumorska aktivnost bakterija iz roda *Lactobacillus* uključuje različite mehanizme poput induciranja apoptoze, antiproliferacijske aktivnosti i diferencijacije staničnih linija raka. Izolirani sojevi pokazali su antiproliferacijsku aktivnost protiv HeLa stanica raka vrata maternice sa stopama inhibicije rasta stanica preko 80 %.

#### **2.4. Važnost majčinog mlijeka**

Važnost mikrobiote majčinog mlijeka može se vidjeti u razlici između crijevne mikrobiote novorođenčadi hranjene samo majčinim mlijekom, čija mikrobiota sadrži više bakterija iz rodova *Bifidobacterium*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*, te one hranjene dojenačkim formulama, čija mikrobiota sadrži više bakterija iz rodova *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* i *Lachnospiraceae* (Zimmermann i Curtis, 2020). Kolonizacija bakterijama počinje i prije rođenja, budući da su u mekoniju, posteljici i amnionskoj tekućini pronađene brojne vrste

bakterija. Pri normalnom porodu, kolonizacija tijela djeteta nastavlja se kroz rodnicu, dodiranjem kože te dojenjem. Uz to, neki sojevi potječu i iz bolničkog okruženja. Međutim, pri porodu carskim rezom, najviše je prisutna kolonizacija nepoželjnim bolničkim mikroorganizmima. Uočeno je da prijevremeno rođena djeca imaju drugačiju mikrobiotu, kojom dominiraju bakterije iz porodice Enterobacteriaceae te one iz roda *Clostridium*, od djece koja su rođena u terminu, kod kojih je najviše bakterija iz rodova *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Faktori koji mogu poremetiti kolonizaciju crijeva su mala težina pri rođenju, fiziološka nezrelost, upotreba antibiotika i produljeni boravak u bolnici. U mlijeku majki koje su rodile prijevremeno, koncentracija oligosaharida je puno viša naspram mlijeka majki koje su rodile u terminu, zbog čega je majčino mlijeko za preuranjeno rođenu djecu ujedno i lijek (Łubiech i Twarużek, 2020).

Kratkoročna dobrobit majčinog mlijeka očituje se u smanjenoj smrtnosti uzrokovanoj zaraznim bolestima poput infekcija gastrointestinalnog i respiratornog trakta. Dojenjem je smrtnost od dijareje smanjena 80 – 90 %, dok se rizik od smrti uzorkovane respiratornim infekcijama ili upalom srednjeg uha smanjuje za 60 %. U jeku pandemije koronavirusa, preporučeno je dojenje majkama zaraženim SARS-CoV-2 virusom dok to zdravlje majke i djeteta dopušta, budući da prednosti dojenja nadmašuju potencijalni rizik prijenosa virusa (Moubareck, 2021). Neke od dugoročnih prednosti dojenja uključuju smanjeni rizik oboljenja od astme, atopija, dijabetesa, pretilosti i upalnih bolesti crijeva, a poboljšava se i kognitivni razvoj djeteta (Le Doare i sur., 2018).

Dojenje ne doprinosi samo zdravlju djeteta, nego i zdravlju majke. Ono smanjuje rizik od raka dojke, pogotovo u dobi nakon menopauze, što se pripisuje diferencijaciji stanica dojke, smanjenom broju ovulacijskih ciklusa te izlučivanju estrogena u mlijeku čime se smanjuje izloženost tom hormonu. Uz rak dojke, smanjuje se i rizik od raka jajnika jer se dojenjem smanjuje broj ovulacija čime se umanjuje mogućnost genetskih mutacija i prekomjerna stimulacija jajnika zbog povećane koncentracije gonadotropina koja može potaknuti proliferaciju s malignom transformacijom. Produženo dojenje smanjuje rizik od ateroskleroze i srčanih bolesti te pomaže u regulaciji tlaka, smanjuje razinu triglicerida i povećava razinu HDL kolesterola. Uz to, smanjuje se i rizik od hipertenzije i dijabetesa tipa 2 (Moubareck, 2021).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Bakterije izolirane iz majčinog mlijeka, korištene u ovom radu, prikazane su u tablici 1. 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 1.** Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu

<b>Bakterijski sojevi</b>	<b>Oznaka soja</b>	<b>Hranjive podloge i uvjeti rasta</b>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KR19	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	KR20	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus fermentum</i>	MC1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	MC13	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MC19	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MB7	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MB15	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MB18	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	RS10	MRS, 37 °C, anaerobno

##### 3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

a) za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L<sup>-1</sup> destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašičev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- MRS bujon („Biolife“, Italija) istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.



### 3.1.3. Kemikalije

- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Kemika“, Hrvatska
- etil-acetat, „Sigma-Aldrich“, SAD
- heksan, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kloroform, „Sigma-Aldrich“, SAD
- pankreatin ( $165 \text{ U mg}^{-1}$ ) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- pepsin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- žučne soli, „Difco“, SAD
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijeva lužina, „Kemika“, Hrvatska

### 3.1.4. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- centrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- zamrzivač ( $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), „New Brunswick Scientific“, SAD
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- plastične tubice od 1,5 i 2 ml, „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- kivete za centrifugiranje (15 i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za tubice, „neoLab“, Njemačka

- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- mikrotitarske pločice (96 jažica), „Falcon“, Engleska
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija

## **3.2. METODE**

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

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u odgovarajuću svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 1.

### **3.2.2. Fenotipska identifikacija bakterija iz majčinog mlijeka pomoću API 50 CHL metode**

Pomoću mikrobiološke ušice, biomasa bakterije porasle u obliku kolonija nakon 24 h uzgoja pri optimalnim uvjetima na krutoj hranjivoj podlozi, dodana je u API 50 CHL medij dok gustoća inokuluma mjerena denzitometrom (BioMérieux, Francuska) nije postigla vrijednost od 2 McF. Tako pripremljenom suspenzijom su napunjene ampule API 50 CH stripa u koje je zatim nakapano mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C, očitani su rezultati. Pozitivnim rezultatom se smatra rezultat u kojem je u ampuli uslijed fermentacije šećera došlo do zakiseljenja koje se detektira promjenom boje medija koji sadrži bromkrezol purpurni indikator iz ljubičaste u žutu. U ampuli broj 25, koja sadrži eskulin, pozitivnim rezultatom se smatra promjena boje iz ljubičaste u crnu. Rezultati su analizirani pomoću Api-web™ (V 5.0) identifikacijskog softvera (BioMerieux, Francuska) u svrhu identifikacije bakterija iz roda *Lactobacillus* i srodnih rodova (slika 3).



**Slika 3.** Fermentacijski profil KR19 izolata iz majčinog mlijeka dobivenog API CHL 50 testom (vlastita fotografija)

### **3.2.3. Preživljavanje bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT)**

#### **3.2.3.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva**

Simulirani sokovi gastrointestinalnog sustava pripremljeni su prema Kos (2001). Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,5 i 3,0 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom.

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

#### **3.2.3.2. Ispitivanje preživljavanja bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka u simuliranom soku želuca i tankog crijeva**

Ispitivanje preživljavanja BMK u simuliranim uvjetima GIT-a provedeno je prema Kos (2001). Prekonoćne bakterijske kulture centrifugirane su pri  $4200 \text{ o min}^{-1}$  tijekom 5 min i dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom.  $100 \mu\text{L}$  suspenzije je korišteno za određivanje broja živih stanica prije inkubacije indirektnom metodom, a ostatak je centrifugiran 5 min pri  $4200 \text{ o min}^{-1}$ .

Talog stanica je resuspendiran u 3 mL simuliranog želučanog soka i suspenzija stanica je inkubirana 2 h pri 37 °C. Nakon inkubacije, talog stanica dobiven centrifugiranjem 5 min pri 4200 o min<sup>-1</sup>, resuspendiran je u 3 mL fiziološke otopine. 100 µL suspenzije je korišten za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u želučanom soku, a ostatak je centrifugiran 5 min pri 4200 o min<sup>-1</sup>. Dobiveni talog resuspendiran je u 3 mL simuliranog soka tankog crijeva te je suspenzija inkubirana pri 37 °C tijekom 4 h, nakon čega je broj živih stanica ponovno određen indirektnom metodom.

### **3.2.3.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom**

Broj živih bakterija određen je indirektnom metodom, odnosno nacjepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica u sterilnoj fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica (*engl.* Colony-forming units, CFU) po mililitru uzorka.

### **3.2.4. Liofilizacija bakterijskih stanica**

Bakterijske stanice uzgojene u optimalnoj tekućoj hranjivoj do kasne eksponencijalne faze su prikupljene centrifugiranjem (3500 o min<sup>-1</sup>), dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom i resuspendirane u fosfatnom puferu (pH=7) s ili bez dodatka obranog mlijeka (10 % (w/v)) koje se koristio kao lioprotektor. Priređene suspenzije stanica su zatim zamrznute preko noći na -80 °C i zatim liofilizirane 24 h u liofilizatoru CHRIST Alpha 1-2 LDplus. Broj živih stanica (CFU mL<sup>-1</sup>) određen je prije i nakon liofilizacije indirektnom metodom za određivanje broja živih mikroorganizama prema postupku opisanom u 3.2.3.3.

### **3.2.5. Ispitivanje svojstva autoagregacije bakterijskih stanica**

Bakterijske stanice uzgojene u optimalnoj tekućoj hranjivoj podlozi prikupljene su centrifugiranjem 5 minuta pri 4200 o min<sup>-1</sup>, isprane dva puta te resuspendirane u fosfatnom puferu (pH = 7,4) do koncentracije od približno 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. Volumen od 4 mL tako pripremljenih suspenzija odpipetiran je u penicilinke te homogeniziran na vibromješaču Vortex V-1 plus. Izmjerena je apsorbancija uzoraka u nultom satu pri 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica Infinite® F Plex te je nakon 5 h inkubacije uzoraka pri sobnoj temperaturi, ponovno izmjerena apsorbancija uzoraka uzetih s površine na isti način (Kos i sur., 2003). Postotak autoagregacije je izračunat iz formule:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \cdot 100$$

gdje je:

$A_t$  - apsorbancija u vremenu (nakon 5 sati)

$A_0$  - apsorbancija u vremenu 0.

### 3.2.6. Mikrobna adhezija na otapala (*engl. Microbial adhesion to solvents, MATS*)

Sposobnost mikrobne adhezije na otapala sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka ispitana je prema Bellon-Fontaine i sur. (1996) s modifikacijama opisanim u Kos i sur. (2003). Bakterijske stanice uzgojene do stacionarnog stanja u optimalnoj tekućoj hranjivoj podlozi prikupljene su centrifugiranjem, dva puta isprane sterilnom destiliranom vodom i resuspendirane u 10 mL 0,1 mol L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> (pH = 6,2). Priređenim suspenzijama stanica (V = 3 mL), koncentracije približno 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, izmjerena je apsorbancija pri 620 nm ( $A_0$ ), a zatim im je dodano otapalo (V = 1 mL). Ispitana je adhezija na otapalo:

- heksan (nepolarno otapalo)

Tako pripremljena suspenzija je inkubirana pri sobnoj temperaturi 20 minuta, nakon čega je izmjerena apsorbancija vodene faze (A) te je postotak adhezije izračunat prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ adhezije} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot 100$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Identifikacija i proizvodnja odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline

Devet bakterijskih sojeva korištenih u ovom radu, prethodno je izolirano iz majčinog mlijeka nakon prekonoćne inkubacije uzoraka mlijeka na MRS krutoj hranjivoj podlozi pri 37 °C. Ukupno je izolirano 100 bakterijskih sojeva, po 20 iz uzorka mlijeka svake od 5 majki, koji su imenovani oznakom dojilje te brojem od 1-20. Hijerarhijskom klaster analizom RAPD-PCR produkata, odabrano je 28 genetički različitih sojeva koji su identificirani sekvenciranjem 16S rDNA. Sojevi su okarakterizirani nizom fenotipskih i genotipskih metoda te je odabrano 9 izolata za daljnje analize koji su korišteni u ovom radu.

API 50 CHL testom dobiveni su fermentacijski profili svakog izolata (tablica 2), čijom su analizom sojevi KR19, MC19, MB7, MB15, RS10 i MB18 identificirani kao *Lactobacillus plantarum* s točnošću  $\geq 99,8$  %, dok za ostale sojeve identifikacija nije bila dovoljno pouzdana, što je i očekivano jer API 50 CHL test služi za identifikaciju bakterija iz roda *Lactobacillus*.

**Tablica 2.** Fermentacijski profil izolata dobiveni API 50 CHL testom

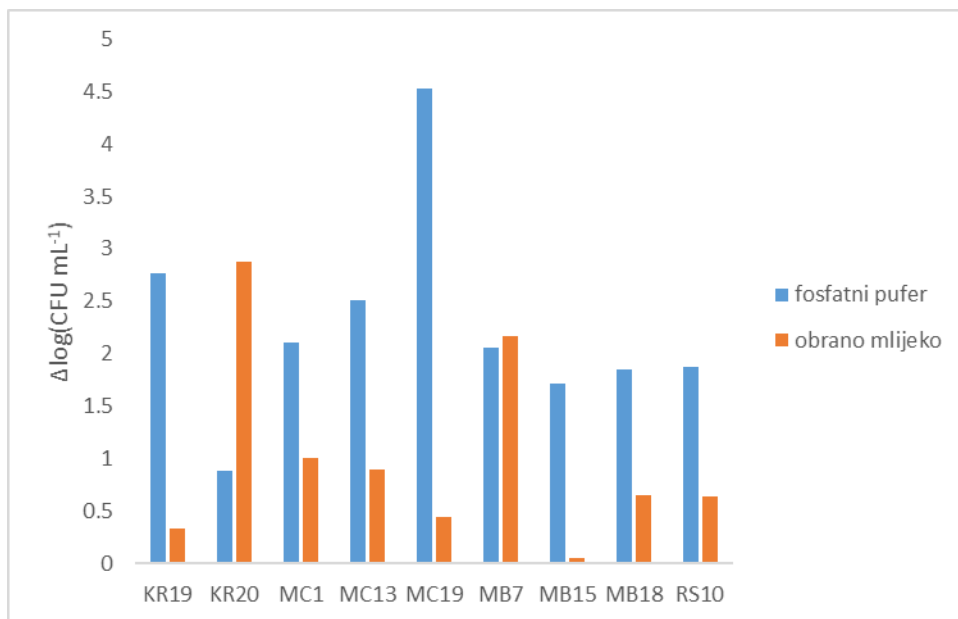
Ugljikohidrati	KR19	KR20	MC1	MC13	MC19	MB7	MB15	MB18	RS10
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritriol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Riboza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ksiloza	-	-	+	-	-	-	-	+	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -metil-ksilozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorboza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inozitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	-	+	+	+	+	+
$\alpha$ -metil-D-manozid	-	-	-	-	-	+	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalinal	+	+	-	+	+	+	+	+	+
2-keto-glukonat	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Maltoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoza	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Melibioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saharoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Melezitoza	-	-	+	-	-	+	-	-	-
D-rafinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksilitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta$ -gentobioza	+	-	-	+	+	+	+	+	+
D-turanoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-liksoza	+	+	+	+	+	-	-	-	-
D-tagatoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	+/-	-	+/-	+	+	+	+
Glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-keto-glukonat	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Liofilizacija je metoda sušenja mikroorganizama koja se koristi u svrhu njihova očuvanja tijekom dugotrajnog skladištenja i transporta. Stanice se prvo miješaju s otopinom lioprotektora, zamrzavaju pa suše u vakuumu čime postaju spremne za skladištenje. Liofilizirane stanice mogu se rehidratirati nakon čega ponovno postaju vijabilne. Lioprotektori služe očuvanju membrana stanica prilikom zamrzavanja i sušenja, a mogu se koristiti šećeri i proteini iz mlijeka, serum, trehaloza, glicerol, betain, ribitol, saharoza, glukoza i polimeri poput dekstrana i polietilenglikola. Odabir lioprotektora ovisi o mikroorganizmu (Morgan i sur., 2006).

Ispitano je preživljavanje procesa liofilizacije za 9 sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka (tablica 1) s fosfatnim puferom i obranim mlijekom kao lioprotektorima. Proces liofilizacije proveden je prema protokolu u poglavlju 3.2.4. te su rezultati prikazani na slici 4. Iz rezultata je vidljivo kako bakterije u znatno većem broju preživljavaju uvjete liofilizacije kada se kao lioprotektor koristi obrano mlijeko, osim kod sojeva KR20 i MB7 koji u većem broju preživljavaju uz fosfatni pufer kao lioprotektor. Najveći broj živih bakterija uočen je kod soja MB15 bakterije *Lactobacillus plantarum* s obranim mlijekom kao lioprotektorom. Najslabije rezultate s obranim mlijekom kao lioprotektorom postiže soj KR20 bakterije *Enterococcus faecium*. Najmanji broj preživljenih bakterije postignut je sa sojem MC19 bakterije *L. plantarum* kada je kao lioprotektor korišten fosfatni pufer. Shekh i sur. (2020) istraživali su probiotički potencijal liofiliziranih *L. plantarum* iz čega je zaključeno kako *L. plantarum* preživljava u značajnom broju uvjete liofilizacije s laktulozom i obranim mlijekom kao lioprotektorima, što se

poklapa s ovim rezultatima, budući da sojevi bakterije *L. plantarum* korišteni u ovom radu u većem broju preživljavaju s obranim mlijekom kao lioprotektorom, dok mali broj stanica preživljava uvjete liofilizacije s fosfatnim puferom kao lioprotektorom.



**Slika 4.** Preživljavanje bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka nakon procesa liofilizacije uz dodatak fosfatnog pufera i obranog mlijeka kao lioprotektora

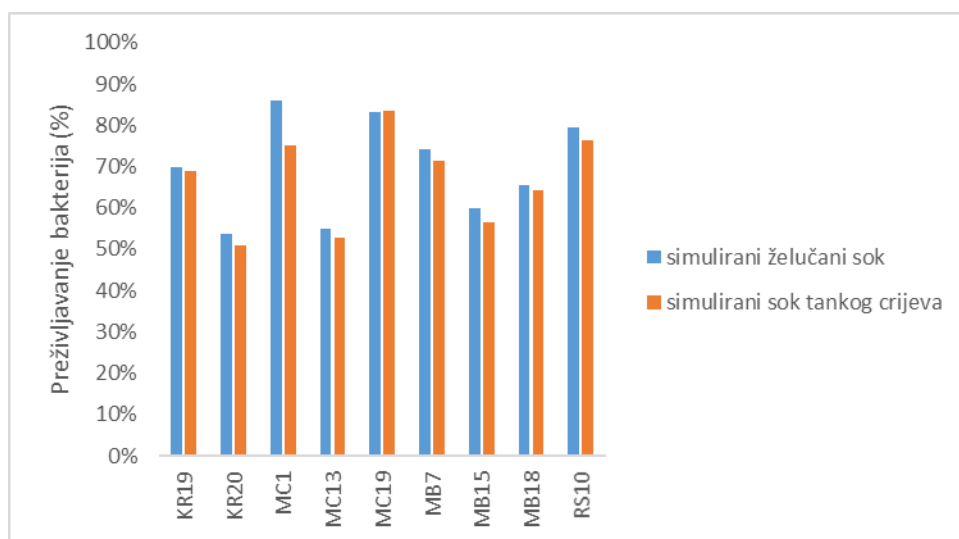
#### 4.2. Ispitivanje probiotičkih svojstava bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

Probiotici kao dodaci prehrani većinom su namijenjeni za oralnu primjenu. Kako bi se neki soj mogao smatrati probiotikom, on mora u dovoljnom broju preživjeti sve nepovoljne uvjete u gastrointestinalnom traktu (Naissinger da Silva i sur., 2021). Nepovoljni uvjeti u želucu uključuju nizak pH, a u tankom crijevu prisutnost enzima i antimikrobnu aktivnost žučnih soli (Millette i sur., 2013). Žučne soli iz tankog crijeva mogu oštetiti bakterijsku membranu, denaturirati proteine, kelirati željezo i kalcij, oštetiti DNA te kontrolirati ekspresiju gena domaćina uključenih u obranu od patogena. Bakterije, stoga, moraju razviti različite fiziološke mehanizme kako bi preživjele antimikrobnu aktivnost žučnih soli tako da primjerice preurede omotač stanice te aktiviraju efluks sustave (Urdaneta i Casadesús, 2017). Mnoge bakterijske vrste, uključujući i bakterije iz roda



*Lactobacillus* mogu hidrolizirati žučne soli uz pomoć enzima hidrolaze žučnih soli (engl. *bile salt hydrolase* ili BSH) (Erkkilä i Petäjä, 2000).

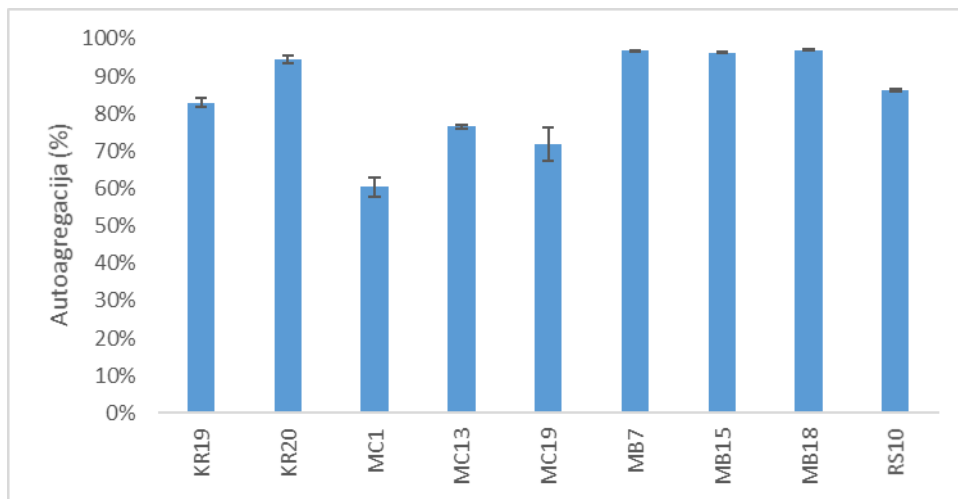
U ovom radu ispitano je preživljavanje 9 sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka (tablica 1) u simuliranom želučanom soku i soku tankog crijeva, pripremljenih prema opisu u poglavlju 3.2.3.1. te su rezultati prikazani na slici 5. Iz rezultata je vidljivo kako većina sojeva u većem postotku preživljava uvjete simuliranog želučanog soka, dok je postotak nešto manji za simulirani sok tankog crijeva. Najveći postotak preživljavanja uvjeta simuliranog želučanog soka, u rasponu od 69,99 % do 86,08 %, postižu bakterije iz roda *Lactobacillus*, odnosno sojevi KR19, MC1, MC19, MB7 i RS10, dok je najmanji postotak preživljavanja, od 53,70% i 54,81%, uočen kod sojeva KR20 i MC13 bakterije *Enterococcus faecium*. Najbolje rezultate preživljavanja uvjeta simuliranog soka tankog crijeva također postižu sojevi KR19, MC1, MC19, MB7 i RS10, u postotcima od 68,96 % do 83,41 %, jednako kao što i najslabije rezultate postižu sojevi KR20 i MC13 u postotcima od 50,83 % i 52,91 %. Stasiak-Róžańska i sur. (2021) također su istraživali preživljavanje probiotičkih bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Koristili su sojeve *Bifidobacterium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei*, *L. acidophilus* i *L. plantarum*, od kojih se *L. plantarum* pokazao najizdržljivijim. To je u skladu s ovim rezultatima jer su sojevi *L. plantarum* MC19 i RS10 pokazali veliki postotak preživljavanja.



**Slika 5.** Preživljavanje bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka u simuliranom želučanom soku i soku tankog crijeva

Još jedno važno svojstvo kojeg probiotici moraju posjedovati jest sposobnost agregacije, odnosno revezibilnog nakupljanja stanica zbog čega se one talože su mediju u kojem su suspendirane. Postoje dvije vrste agregacije; autoagregacija koja se odnosi na nakupljanje bakterijskih stanica istoga soja što je neophodno za njihovu adheziju na stijenku crijevnog epitela te koagregacija kada se agregiraju stanice dva različita bakterijska soja, zbog čega probiotičke bakterije mogu spriječiti kolonizaciju crijeva patogenima (Dlamini i sur., 2019).

Ispitano je svojstvo autoagregacije za 9 sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčina mlijeka (tablica 1) te su rezultati prikazani na slici 6. Postotak autoagregacije izračunat je prema formuli iz poglavlja 3.2.5. Iz rezultata je vidljivo kako najveću sposobnost autoagregacije posjeduju sojevi MB7, MB15 i MB18 bakterije *Lactobacillus plantarum*, čiji se postotci autoagregacije kreću u rasponu od 97,05 % do 96,36 %. Najslabiji rezultati postignuti su sa sojem MC1 bakterije *Lactobacillus fermentum* čiji postotak autoagregacije iznosi 60,41 %. Collado i sur. (2008) istraživali su svojstvo autoagregacije za probiotičke i patogene bakterijske sojeve. Korišteni su probiotički sojevi *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. salivarius* te neki sojevi iz roda *Bifidobacterium*. Probiotički sojevi imali su veću sposobnost autoagregacije od patogenih sojeva nakon 20 sati inkubacije na 20 °C, a najveći postotak postigli su sojevi *L. rhamnosus* i *L. fermentum*. Soj MC1 bakterije *L. fermentum* korišten u ovom radu postigao je najmanji postotak autogregacije, no u ovom je radu inkubacija trajala pet sati.

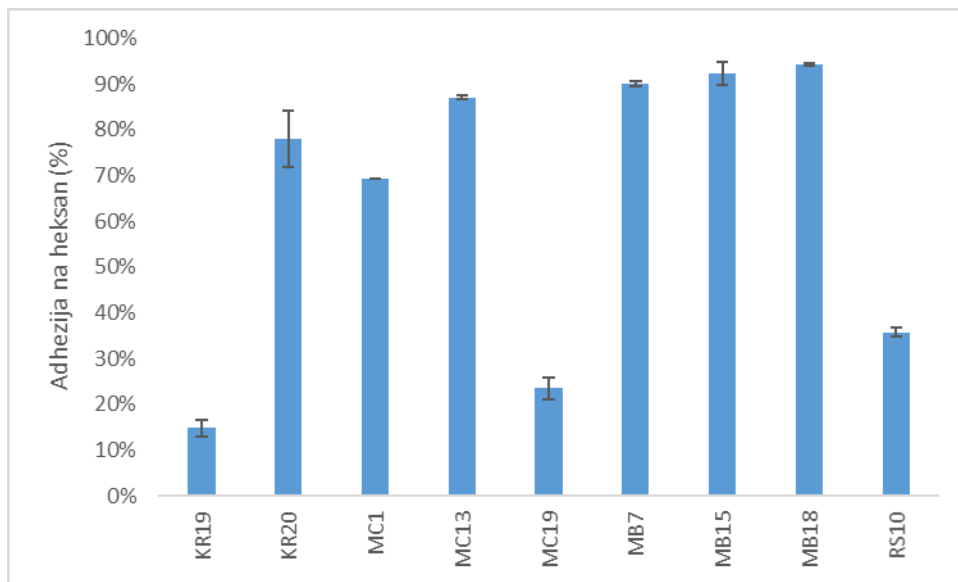


**Slika 6.** Postotak autoagregacije bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

Bakterije se mogu adhezirati i formirati biofilm na različitim površinama poput metala, stakla, gume i plastike. Vežanje bakterija na inertne površine ovisi o svojstvima supstrata i

bakterijske stanice, poput naboja, hidrofobnosti, hrapavosti površine, prisutnost fimbrija i bičeva te proizvodnja egzopolisaharida (Zeraik i Nitschke, 2012). Bakterije se vežu i na stanice, za što su morale razviti mnoštvo mehanizama kako bi olakšale kolonizaciju domaćina. Prilikom kontakta sa stanicom, bakterije mogu osjetiti promjenu fiziokemijskih svojstava u svom okolišu te promijeniti vlastitu fiziologiju kako bi se prilagodile. Ključnu ulogu ima površina bakterije čija je uloga olakšati adheziju. Postoje razne strukture na površini bakterijske stanice koje posreduju u specifičnoj i nespecifičnoj adheziji na površine. Nespecifične interakcije su primjerice hidrofobne interakcije s površinom stanice domaćina čime se nadvladava elektrostatsko odbijanje između bakterijske površine i površine domaćina. Specifične interakcije mogu se dogoditi s receptorima na površini stanica domaćina (Stones i Krachler, 2016). MATS metoda temelji se na usporedbi afiniteta mikrobnih stanica za polarna i nepolarna otapala na temelju elektrostatskih, van der Waalsovih i Lewisovih kiselo-baznih interakcija. Time se može predvidjeti sposobnost adhezije bakterija za čvrste površine u vodenom mediju (Bellon-Fontaine i sur., 1996).

Ispitana je sposobnost adhezije 9 sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčina mlijeka (tablica 1) na heksan. Rezultati su prikazani na slici 7. Iz rezultata je vidljivo kako većina sojeva iskazuje visoki postotak adhezije na heksan, u rasponu vrijednost od 69,23 % do 94,25 %, što ukazuje na hidrofobnost njihove površine, dok niži postotak, u rasponu od 14,81 % do 35,74 %, kod sojeva KR19, MC19 i RS10 ukazuje na hidrofilnost njihove površine.



**Slika 7.** Adhezija sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka na heksan

## 5. ZAKLJUČCI

1. U uvjetima simuliranog želučanog soka najveći postotak preživljavanja od 86,08 % postigao je soj *L. fermentum* MC1, a najslabiji od 54,81 % soj *E. faecium* MC13. Uvjetima simuliranog soka tankog crijeva u najvećem postotku od 83,41 % je preživio soj *L. plantarum* MC19, dok je soj *E. faecium* KR20 preživio u najmanjem postotku od 50,83 %.
2. Preživljavanje uvjeta liofilizacije za većinu sojeva znatno je bolje kada se kao lioprotektor koristi obrano mlijeko. Najbolji rezultati postignuti su sa sojem *L. plantarum* MB15 koristeći obrano mlijeko kao lioprotektor, dok je najslabije rezultate postigao soj *E. faecium* KR20. Najmanji broj preživjelih stanica uočen je kod soja *L. plantarum* MC19 s fosfatnim puferom kao lioprotektorom.
3. Najveći postotak autoagregacije postiže soj *L. plantarum* MB18 s 97,05 %, dok je najmanji postotak autoagregacije od 60,41 % postigao soj *L. fermentum* MC1.
4. Bakterijski sojevi *E. faecium* KR20, *L. fermentum* MC1, *E. faecium* MC13, *L. plantarum* MB7, *L. plantarum* MB15 i *L. plantarum* MB18 pokazuju hidrofobna svojstva površine stanice, a sojevi *L. plantarum* KR19, *L. plantarum* MC19 i *L. plantarum* RS10 hidrofilna svojstva.

## 6. LITERATURA

Andreas N. J., Kampmann B., Mehring Le-Doare K. (2015) Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development* **91(11)**: 629–635.

Bellon-Fontaine M. N., Rault J., van Oss C. J. (1996) Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or lewis acid-baseproperties of microbial cells. *Colloids Surf. B.* **7(1-2)**: 47–53.

Berger P. K., Plows J. F., Demerath E. W., Fields D. A. (2020) Carbohydrate composition in breast milk and its effect on infant health. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **23(4)**: 277–281.

Browne P. D., Aparicio M., Alba C., Hechler C., Beijers R., Rodríguez J. M., Fernández L., de Weerth C. (2019) Human Milk Microbiome and Maternal Postnatal Psychosocial Distress. *Frontiers in microbiology* **10**: 2333.

Christian P., Smith E. R., Lee S. E., Vargas A. J., Bremer A. A., Raiten D. J. (2021) The need to study human milk as a biological system. *The American journal of clinical nutrition* **113(5)**: 1063–1072.

Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology* **226**: 1065–1073.

Czosnykowska-Łukacka M., Lis-Kuberka J., Królak-Olejnik B., Orczyk-Pawłowicz M. (2020) Changes in Human Milk Immunoglobulin Profile During Prolonged Lactation. *Frontiers in pediatrics* **8**: 428.

Dlamini Z. C., Langa R. L. S., Aiyegoro O. A., Okoh I. A. (2019) Safety Evaluation and Colonisation Abilities of Four Lactic Acid Bacteria as Future Probiotics. *Probiotics & Antimicrobial Proteins* **11**: 397–402.

Erkkilä S., Petäjä E. (2000) Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science* **55(3)**: 297–300.

Goran M. I., Martin A. A., Alderete T. L., Fujiwara H., Fields D. A. (2017) Fructose in Breast Milk Is Positively Associated with Infant Body Composition at 6 Months of Age. *Nutrients* **9(2)**: 146.

- Jamyuang C., Phoonlapdacha P., Chongviriyaphan N., Chanput W., Nitisinprasert S., Nakphaichit M. (2019) Characterization and probiotic properties of Lactobacilli from human breast milk. *3 Biotech* **9**: 398.
- Koletzko B., Rodriguez-Palmero M., Demmelmair H., Fidler N., Jensen R., Sauerwald T. (2001) Physiological aspects of human milk lipids. *Early human development* **65**: 3–18.
- Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline, doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
- Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 981-987.
- Lamas A., Sanjulián L., Cepeda A., Fente C., Regal P. (2021) Milk Microbiota: A Source of Antimicrobial-Producing Bacteria with Potential Application in Food Safety. *Proceedings* **70(1)**:11.
- Le Doare K., Holder B., Bassett A., Pannaraj P. S. (2018) Mother's Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Frontiers in immunology* **9**: 361.
- Lönnerdal B. (2003) Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *The American journal of clinical nutrition* **77(6)**: 1537–1543.
- Łubiech K., Twarużek M. (2020) Lactobacillus Bacteria in Breast Milk. *Nutrients* **12(12)**: 3783.
- 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(4)**: 1039.
- Millette M., Nguyen A., Amine K. M., Lacroix M. (2013) Gastrointestinal survival of bacteria in commercial probiotic products. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* **8**: 149-156.
- Moossavi S., Azad M. B. (2020) Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut microbes* **12(1)**: 1667722.
- Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of microbiological methods* **66(2)**: 183–193.
- Moubareck C. A. (2021) Human Milk Microbiota and Oligosaccharides: A Glimpse into Benefits, Diversity, and Correlations. *Nutrients* **13(4)**: 1123.

Naissinger da Silva M., Lago Tagliapietra B., do Amaral Flores V., Pereira dos Santos Richards N. S. (2021) *In vitro* test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Current Research in Food Science* **4**: 320-325.

Ojo-Okunola A., Nicol M., du Toit E. (2018) Human Breast Milk Bacteriome in Health and Disease. *Nutrients* **10(11)**: 1643.

Olivares M., Díaz-Roperro M. P., Martín R., Rodríguez J. M., Xaus J. (2006) Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of applied microbiology* **101(1)**: 72–79.

Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F. J., Gil-Campos M., Gil A. (2019) Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in nutrition* **10(1)**: 49–66.

Riaz Rajoka M. S., Zhao H., Lu Y., Lian Z., Li N., Hussain N., Shao D., Jin M., Li Q., Shi J. (2018) Anticancer potential against cervix cancer (HeLa) cell line of probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from human breast milk. *Food & function* **9(5)**: 2705–2715.

Sánchez C., Franco L., Regal P., Lamas A., Cepeda A., Fente C. (2021) Breast Milk: A Source of Functional Compounds with Potential Application in Nutrition and Therapy. *Nutrients* **13(3)**: 1026.

Shekh S. L., Boricha A. A., Chavda J. G., Vyas B. R. M. (2020) Probiotic potential of lyophilized *Lactobacillus plantarum* GP. *Annals of Microbiology* **70**: 16.

Stasiak-Róžańska L., Berthold-Pluta A., Pluta A. S., Dasiewicz K., Garbowska M. (2021) Effect of Simulated Gastrointestinal Tract Conditions on Survivability of Probiotic Bacteria Present in Commercial Preparations. *International journal of environmental research and public health* **18(3)**: 1108.

Stones D. H., Krachler A. M. (2016) Against the tide: the role of bacterial adhesion in host colonization. *Biochemical Society transactions* **44(6)**: 1571–1580.

Šušković J., Brkić B. Matošić S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo: proizvodnja, proučavanje i tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda* **47(1)**: 57-73.

Urdaneta V., Casadesús J. (2017) Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts. *Frontiers in medicine* **4**: 163.

Zeraik A. E., Nitschke M. (2012) Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **55(4)**: 569-576.

Zimmermann P., Curtis N. (2020) Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *The Journal of infection* **81(1)**: 17–47.



## Izjava o izvornosti

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

Lucija Vučetić - Antić

ime i prezime studenta