

Kompetitivna ekskluzija sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

Nikolić, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:894503>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Maja Nikolić
58216139**

**KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA SOJEVA BAKTERIJA
MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINO
MLIJEKA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Zagreb, 2022.

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

KOMPETITIVNA EKSKLUZIJA SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA

Maja Nikolić, 58216139

Sažetak: Mnoge bakterije mliječne kiseline djeluju kao probiotici i korisne su za prevenciju ili održavanje ravnoteže intestinalne mikrobiote. Probiotičke bakterije imaju sposobnost kolonizacije debelog crijeva adhezijom na crijevnu sluznicu i time sprječavanja vezanja patogena kompetitivnom ekskluzijom. Bakterijske vrste roda *Lactobacillus* su potencijalni probiotički sojevi, posebice one koje eksprimiraju S-proteine jer su oni u izravnom kontaktu s bakterijskom okolinom i stoga mogu biti uključeni u brojna površinska svojstva. U ovom radu ispitana je uloga S-proteina u kompetitivnoj ekskluziji patogene bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 sa sojevima *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB2, izoliranim iz majčinog mlijeka. Nadalje je ispitana adhezija istih probiotičkih sojeva na crijevne Caco-2 epitelne stanice te na proteine ekstracelularnog matriksa kao i uloga S-proteina u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta. S-proteini prisutni na površini stanica probiotičkih sojeva MB1 i MB2 su pozitivno doprinjeli kompetitivnoj ekskluziji test-mikroorganizama *S. Typhimurium* FP1 u *in vitro* uvjetima. Pozitivan učinak S-proteina uočen je i prilikom adhezije bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa, budući da je broj bakterijskih stanica nakon tretmana s gvanidin hidrokloridom smanjen. Preživljavanje stanica bakterijskih sojeva MB1 i MB2 u nepovoljnim uvjetima GIT-a je bilo veće u prisutnosti S-proteina.

Ključne riječi: kompetitivna ekskluzija, bakterije mliječne kiseline, Caco-2 stanice, S-proteini

Rad sadrži: 32 stranice, 9 slika, 3 tablice, 44 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: Katarina Butorac, mag. ing. biotechn., Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: srpanj, 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate 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

COMPETITIVE EXCLUSION OF STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM BREAST MILK

Maja Nikolić, 58216139

Abstract: Many lactic acid bacteria act as probiotics and are useful for preventing or maintaining the balance of intestinal microbiota. Probiotic bacteria have the ability to colonise the colon by adhesion to the intestinal mucosa and thereby prevent pathogens from attaching by competitive exclusion. Bacteria of the genus *Lactobacillus* are potential probiotic strains, especially those expressing S-proteins because they are in direct contact with the bacterial environment and can therefore be included in numerous surface properties. The role of S-protein in the competitive exclusion of the pathogenic bacteria *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 with strains *Levilactobacillus brevis* MB1 and MB2, isolated from maternal milk, has been studied in this work. Adhesion of the same probiotic strains to intestinal Caco-2 epithelial cells and to extracellular matrix proteins as well as the role of S-protein in unfavourable gastrointestinal tract conditions was further investigated. S-proteins present on the cell surface of the tested probiotic strains MB1 and MB2 have positively contributed to the competitive exclusion of the test microorganism *Salmonella* Typhimurium FP1 under *in vitro* conditions. The positive effect of S-protein was also observed during the adhesion of bacterial cells to extracellular matrix proteins, since the number of bacterial cells after treatment with guanidine hydrochloride was decreased. Cell survival of bacterial strains MB1 and MB2 under unfavourable GIT conditions was higher in the presence of S-protein.

Keywords: competitive exclusion, lactic acid bacteria, Caco-2 cells, S-proteins

Thesis contains: 32 pages, 9 figures, 3 tables, 44 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Andreja Leboš Pavunc, PhD

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

Thesis defended: June, 2022

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 Katarine Butorac, 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.	BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE.....	2
2.1.1.	Bakterije mliječne kiseline izolirane iz majčinog mlijeka	3
2.2.	GASTROINTESTINALNI TRAKT	4
2.3.	PROBIOTICI.....	5
2.3.1.	Utjecaj probiotika u gastrointestinalnom traktu.....	5
2.3.2.	Mehanizam djeovanja probiotika	6
2.3.3.	Osnovni kriteriji za izbor probiotičkih sojeva	8
2.4.	S-SLOJ BAKTERIJA	9
2.4.1.	Građa S-sloja.....	9
2.4.2.	Funkcionalna uloga S-sloja kod <i>Lactobacillus</i> sojeva	10
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1.	MATERIJALI	12
3.1.1.	Radni mikroorganizmi.....	12
3.1.2.	Stanične linije.....	12
3.1.3.	Hranjive podloge.....	12
3.1.4.	Kemikalije.....	13
3.1.5.	Aparatura i pribor.....	14
3.2.	METODE	15
3.2.1.	Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija	15
3.2.2.	Uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih sojeva	15
3.2.3.	Preživljavanje probiotičkih bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT)	15
3.2.3.1.	Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva	15
3.2.3.2.	Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje probiotičkih bakterija	15
3.2.4.	Adhezija bakterijskih stanica na protein ekstracelularnog matriksa (ECM-a)	16
3.2.5.	Adhezija bakterijskih stanica na Caco-2 stanice.....	17
3.2.6.	Ispitivanje kompetitivne ekskluzije potencijalno patogene bakterije sa sojevima BMK primjenom Caco-2 stanične linije	18
3.2.7.	Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1.	Uloga S-proteina <i>Lactobacillus</i> sojeva u adhezijskim svojstvima i kompetitivnoj ekskluziji patogena.....	22
4.2.	Uloga S-proteina u preživljavanju <i>Lactobacillus</i> sojeva u simuliranim uvjetima GIT-a	27
5.	ZAKLJUČCI	29
6.	POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

Mikrobiom čovjeka je skupni genom mikroba (mikroorganizama uključujući bakterije, gljive, viruse, eukariote i arheje) koji nastanjuju različita mjesta u tijelu. Mikrobiom crijeva je raznolik i specijaliziran ekosustav koji se može promijeniti pod utjecajem brojnih čimbenika, uključujući prehranu, dob i upotrebu antibiotika. Sastoji se od različitih zajednica bakterija koje su općenito stabilne tijekom odrasle dobi i uglavnom su mutualističke i/ili komenzalne u svojim odnosima s ljudskim domaćinom. Postaje sve očitije da bakterije koje naseljavaju humani intestinalni trakt igraju ulogu u zdravlju i bolestima (Walker i sur., 2017). Za dugi niz godina, znanstvena istraživanja usmjerena su na razumijevanje patogenih bakterija i pronalaženje načina za prevenciju bolesti i liječenje ljudi. S druge strane, neke vrste bakterija mogu donijeti dobrobit domaćinu kroz simbiotski odnos. Ovi mikroorganizmi se općenito nazivaju probioticima (Fijan, 2014). Probiotici su živi nepatogeni mikroorganizmi koji pružaju zdravstvene prednosti kada se primjenjuju u odgovarajućim količinama (FAO/WHO, 2002). Većina probiotika su Gram-pozitivne bakterije, a njihove glavne funkcije vezane su za modulaciju i održavanje zdravlja crijevnog trakta (npr. bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) (Silva i sur., 2020). Bakterije mliječne kiseline se koriste kao probiotici te osiguravaju sposobnost adhezije na probavnu sluznicu, mijenjanje ekologije crijeva, održavanje barijere crijevne sluznice i moduliranje imunološkog odgovora kroz interakciju s imunološkim sustavom. Adhezija se smatra važnom karakteristikom za odabir probiotika i preduvjet je za bakterijsku kolonizaciju.

U Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-bioteknološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu izolirani su sojevi *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB2 koji djeluju kao probiotici te na površini stanica sadrže sloj S-proteine. U ovom radu istražena je svrha S-proteina sojeva *Lb. brevis* MB1 i MB2 prilikom kompetitivne ekskluzije bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, adhezije na Caco-2 staničnu liniju i na proteine ekstracelularnog matriksa, kao i preživljavanje navedenih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine skupinu Gram-pozitivnih bakterija ujedinjenih morfološkim, metaboličkim i fiziološkim karakteristikama (Salminen i sur., 2004). Općenito bakterijama ove skupine pripadaju nesporogeni, katala-negativni koki i štapići (tablica 1) koji preživljavaju u anaerobnim ili fakultativno aerobnim uvjetima. Smatraju se nepatogenim organizmima pa imaju GRAS status (eng. Generally Recognized as Safe) te su dio populacije mikroorganizma probavnoga trakta zdravih ljudi i životinja i uključene su u njihov metabolizam (Šušković i sur., 1997). Na temelju konačnog proizvoda razgradnje izvora ugljika (npr. glukoza ili saharoza) razlikuju se dva glavna puta fermentacije šećera. Stoga se BMK dijele na homofermentativne, kod kojih je jedini proizvod razgradnje izvora ugljika mliječna kiselina te heterofermentativne, kod kojih nastaje i mliječna kiselina i drugi proizvodi metabolizma poput etanola, octene kiseline i CO₂. Različiti uvjeti rasta mogu značajno promijeniti stvaranje krajnjeg proizvoda od strane nekih bakterija mliječne kiseline.

<i>KOKI</i>		<i>ŠTAPIĆI</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Dolosicoccus</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Globicatella</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Alloiococcus</i>	
<i>Oenococcus</i>	<i>Weissella</i>	
<i>Vagococcus</i>		

Tablica 1. Podjela rodova BMK na koke i štapiće (Šušković i Kos, predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akad. god. 2021./2022., https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5858973/mod_resource/content/1/biotehnologija%204_2021_5.pdf, pristupljeno 16. 05. 2022.)

BMK su značajne za provođenje raznih biotehnoških procesa kao što su konzerviranje hrane (npr. krastavci i zelje) odnosno krmiva (proces siliranja) i proizvodnja mliječnih proizvoda. Kako bi se ubrzao proces mliječno kiselog vrenja tijekom navedenih biotehnoških procesa potrebno je povećati početni broj (odnosno koncentraciju) bakterijskih stanica i stoga se vrši uzgoj bakterijske biomase. Homofermentativne bakterije mliječne kiseline koriste se za ubrzavanje prethodno navedenih procesa, budući da proizvode veće količine mliječne kiseline koja usporava (ili onemogućava) rast drugih nepoželjnih mikroorganizama prisutnih u hranjivoj podlozi, te se na taj način usmjerava odvijanje bioprocesa u željenom smjeru (Laboratorijski praktikum iz biokemijskog inženjerstva, 2019). Sastavni su dio ljudske prehrane te se mogu smatrati prirodnim načinom opskrbe probavnog sustava aktivnim tvarima. Takve aktivne tvari su npr. enzimi (laktaza, reduktaza) i tvari koje antagonistički djeluju na nepoželjnu mikrobnu populaciju u probavnom sustavu čovjeka. Područje između dvanaesnika i terminala ileuma primarna je regija kolonizirana bakterijama mliječne kiseline, posebno vrstom *Lactobacillus*, a ovo područje je prekriveno slojem sluzi koji se sastoji uglavnom od glikoproteina mucinskog tipa. Sloj sluzi igra ulogu u zaštiti epitelnih stanica crijeva od oštećenja, ali se također smatra kritičnim za prijanjanje *Lactobacillus* u gastrointestinalnom traktu (Nishiyama i sur., 2016).

2.1.1. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz majčinog mlijeka

Majčino mlijeko je optimalna prehrana za novorođenčad jer omogućuje jedinstvenu kombinaciju proteina, ugljikohidrata, lipida, minerala i vitamina koji osiguravaju pravilan rast i razvoj dojenčeta. Pokazalo se da majčino mlijeko pruža zaštitu od različitih zaraznih bolesti, budući da je učestalost ovih poremećaja niža kod dojenčadi hranjene majčinim mlijekom nego kod dojenčadi hranjene adaptiranim mlijekom (Lara-Villoslada i sur., 2007). Osim toga, sadrži i bioaktivne spojeve odgovorne za širok raspon korisnih učinaka kao što su promicanje sazrijevanja imunološkog sustava i zaštita od infekcija. Probiotičke bakterije su također izolirane iz ljudskog mlijeka. Različita izvješća pokazuju da probiotici iz ljudskog mlijeka koloniziraju crijeva i povećavaju broj fekalnih laktobacila čime modificiraju crijevnu mikrobiotu i kod glodavaca. Osim toga, molekularna analiza pokazuje da su te bakterije metabolički aktivne u ljudskim crijevima, povećavajući proizvodnju funkcionalnih metabolita kao što je butirrat, koji je glavni izvor energije za kolonocite i igra ključnu ulogu u modulaciji crijevne funkcije (Berni Canini i sur., 2017).

Među bakterijama koje se nalaze u majčinom mlijeku najčešće su one koje pripadaju vrstama *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* i *Lactobacillus* (tablica 2).

Sve je veći interes za neke od ovih laktobacila iz majčinog mlijeka, kao što su *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* i *L. fermentum*, jer se smatraju potencijalno probiotičkim vrstama.

Bakterijska skupina	Glavne vrste
<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Staphylococcus hominis</i>
	<i>Staphylococcus capitis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
	<i>Streptococcus mitis</i>
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
	<i>Streptococcus peroris</i>
<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
	<i>Levilactobacillus salivarius</i>
	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>

Tablica 2. Bakterijske vrste izolirane iz majčinog mlijeka zdravih žena (Lara-Villoslada i sur., 2007)

2.2. GASTROINTESTINALNI TRAKT

Gastrointestinalni (GI) trakt ljudi sadrži od 500 do 1000 različitih vrsta bakterija (filotipova), odnosno čak 7000 različitih bakterijskih sojeva, koji kontinuirano stupaju u interakciju sa svojim domaćinom dok rastu i tvore raznoliku mikrobiotu. Unatoč postojanju zajedničkih obilježja humane intestinalne mikrobiote, svaki čovjek ima vlastitu, unikatnu intestinalnu mikrobiotu, koja je u zdravih pojedinaca stabilna, a njen sastav ovisi o genotipu domaćina, stilu života i prehrani te zdravstvenom i fiziološkom statusu domaćina, uključujući urođena i stečena svojstva imunološkog sustava pod utjecajem okolišnih uvjeta.

GI trakt je važan organ u tijelu domaćina u obrani protiv patogenih mikroorganizama i neživih tvari, uključujući i kancerogene. Gastrointestinalni trakt je prekriven sluzi koja ima

različita svojstva u želucu, tankom crijevu i debelom crijevu. Veliki visoko glikozilirani mucini tvore sluz te su MUC2 i MUC5AC glavne komponente sluzi u crijevima, odnosno želucu. U tankom crijevu sluz ograničava broj bakterija koje mogu doći do epitela dok u debelom crijevu, unutarnji sloj sluzi odvaja komenzalne bakterije od epitela domaćina. Vanjski sloj sluzi debelog crijeva prirodno je stanište komenzalnih bakterija (Pelaseyed i sur., 2014).

Bakterijske vrste u GI traktu

Mnoge bakterijske vrste izolirane su iz ljudskog GI trakta, i spadaju u tri kategorije:

1. mikroorganizmi koji su gotovo uvijek prisutni u velikom broju i koji čine autohtonu i rezidentnu floru, npr. *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, itd.
2. mikroorganizmi koji su normalno prisutni u malom ili umjerenom broju, i dio rezidentne flore, npr. *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, itd.
3. mikroorganizmi prisutni u malom broju, vjerojatno kontaminanti iz drugih dijelova tijela, npr. *Staphylococcus*, *Haemophilus* itd., ili iz okoline, npr. *Bacillus*, *Corynebacterium* itd., koji čine prolaznu floru (Mitsuoka, 1992)

2.3. PROBIOTICI

2.3.1. Utjecaj probiotika u gastrointestinalnom traktu

Probiotički pripravci su proizvodi koji sadrže žive mikroorganizme i poboljšavaju zdravstveno stanje ljudi i životinja (koje može uključivati poticanje rasta životinja). Mogu djelovati u ustima ili probavnom traktu (u hrani ili u obliku kapsula), u gornjem respiratornom traktu (aerosol) ili u urogenitalnom traktu (lokalna primjena). Kliničke studije sugeriraju da bi probiotici mogli biti korisni u stimulaciji imunološkog sustava, prevenciji alergijskih bolesti i raka te kontroli upalnih bolesti GI trakta. Imaju važnu ulogu u održavanju imunološke ravnoteže u gastrointestinalnom traktu kroz izravnu interakciju s imunološkim stanicama. Učinkovitost probiotika može biti specifična za vrstu, dozu i bolest, a trajanje terapije ovisi o kliničkoj indikaciji. Postoje visokokvalitetni dokazi da su probiotici učinkoviti za akutne infektivne proljeve, proljeve povezane s antibioticima, proljeve povezane s *Clostridium difficile*, jetrenu encefalopatiju, ulcerozni kolitis, sindrom iritabilnog crijeva, funkcionalne gastrointestinalne poremećaje i nekrotizirajući enterokolitis. S druge strane, postoje dokazi da probiotici nisu učinkoviti za akutni pankreatitis i Crohnovu bolest. Sigurni su za dojenčad, djecu, odrasle i starije pacijente, ali se savjetuje oprez kod imunološki osjetljivih populacija (Wilkins i sur., 2017).

2.3.2. Mehanizam djelovanja probiotika

Nekoliko važnih mehanizama antagonističkih učinaka probiotika na različite mikroorganizme uključuju sljedeće: poboljšanje epitelne barijere, povećanu adheziju na crijevnu sluznicu i istodobnu inhibiciju adhezije patogena, kompetitivnu ekskluziju patogenih mikroorganizama, proizvodnju antimikrobnih tvari i modulaciju imunološkog sustava, kako bi se prenijela prednost na domaćina. Probiotici komuniciraju s domaćinom putem receptora za prepoznavanje uzoraka, kao što su receptori slični nukleotidima i receptori slični proteinima koji sadrže domenu oligomerizacije koji se vežu na nukleotide i oni koji moduliraju ključne signalne putove, kao što su nuklearni faktor- κ B i protein aktiviran mitogenom kinaze, za poboljšanje ili suzbijanje aktivacije i utjecaj na nizvodne putove (Bermudez i sur., 2012). Ovo prepoznavanje je ključno za izazivanje izmjerenih antimikrobnih odgovora uz minimalno oštećenje upalnog tkiva. Jasno razumijevanje ovih mehanizama omogućit će odgovarajući odabir probiotičkih sojeva za specifične primjene i može otkriti nove probiotičke funkcije.

1. Inhibicija rasta nepoželjnih mikroorganizama

a) proizvodnjom antibakterijskih supstancija, obuhvaćajući primarne metabolite: mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, diacetil, acetaldehid, vodikov peroksid i bakteriocine

Značajne količine organskih kiseline koje djeluju inhibicijski na rast i razmnožavanje mikroorganizama dobivaju se iz bakterija mliječne kiseline (Blažeka i sur., 1991). Nedisocirani oblici mliječne i octene kiseline mogu prodrijeti u stanicu mikroorganizma te sniziti intracelularni pH. Budući da je količina disocirane octene kiseline 2-4 puta veća od nedisocirane u usporedbi s mliječnom kiselinom, octena kiselina iskazuje jače inhibicijsko djelovanje nego mliječna kiselina. Svi rodovi bakterija mliječne kiseline proizvode metabolit diacetil koji pokazuje inhibicijsko djelovanje prema velikom broju Gram-negativnih bakterija. Djelovanjem flavoprotein oksidaze ili NADH reduktaze bakterije mliječne kiseline u aerobnim uvjetima proizvode vodikov peroksid koji djeluje inhibicijski prema *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas sp.* H_2O_2 potiče oksidaciju SH-grupa u vitalnim enzimima metabolizma: heksokinazi, aldolazi i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazi što ukazuje na njegovo bakteriocidno djelovanje. Ekstracelularne inhibicijske supstancije, bakteriocini, proizvedene su pomoću bakterije mliječne kiseline pri čemu bakteriocini Gram-pozitivnih mikroorganizama (bakterija mliječne kiseline) obično imaju nešto širi spektar inhibicije tako da djeluju i na druge Gram-pozitivne vrste. Na taj način probiotički sojevi imaju veću mogućnost naseljavanja i održavanja u gastrointestinalnom traktu. Molekula bakteriocina stupa u interakciju s

regulatomim sustavom bakterijske stanice i na taj način može utjecati na mnoge stanične funkcije (Šušković i sur., 1997).

b) kompeticija za hranjive tvari

Kompeticija za iskoristive ugljikohidrate važna je za regulaciju bakterijske populacije u intestinalnom traktu. Wilson (1986) je došao do zaključka da zbog preniske koncentracije ugljikohidrata u mišjem fekalnom filtratu ne može rasti *Clostridium difficile*. Osim toga, Freter i sur. (1983) su dokazali da je rast i razmnožavanje bakterija *Escherichia coli*, *Fusobacterium sp.* i *Eubacterium sp.* jako inhibirano kada se one inokuliraju u fekalni filtrat mišje intestinalne flore, iz čega proizlazi da mišja intestinalna mikroflora kontrolira ekosustav autohtone kulture (Šušković i sur., 1997).

c) kompeticija za mjesta adicije na crijevnom epitelu

Bakterije mliječne kiseline, kao i brojni patogeni imaju mogućnost vezanja na crijevni epitel. Sudionici mikroflora natječu se s patogenima za mjesto vezanja na sluznici crijeva pri čemu mikroflora koja je stalno vezana za sluznicu sprečava naseljavanje patogenih mikroorganizama. Kennedy i Volz (1985) su proveli istraživanja na hrčku kako bi odredili utjecaj antibiotičke terapije s penicilinom na vezanje patogena na crijevnu sluznicu. Rezultati pokusa ukazali su da je stupanj vezanja *Candida albicans* na površinu crijeva veći u životinja tretiranih antibiotikom nego u životinja netretiranih antibiotikom penicilinom (Šušković i sur., 1997).

2. Modifikacija metaboličkih procesa u probavnom traktu

Ključno i jedno od najkorisnijih djelovanja probiotika na domaćina je promjena procesa metabolizma u probavnom traktu. Neki od tih mehanizama koji imaju pozitivano djelovanje su:

- prekid reakcija čiji rezultat je proizvodnja toksičnih ili kancerogenih metabolita
- stimulacija enzimskih reakcija uključenih u detoksifikaciju potencijalnih toksičnih supstancija
- stimulacija enzima sisavaca, uključenih u razgradnju kompleksnih hranjivih sastojaka, ili enzima koji su odsutni zbog bolesti ili nasljedno
- sintetiziranje enzima i drugih esencijalnih hranjivih sastojaka koji prehranom nisu unešeni u dostatnim količinama (Šušković i sur., 1997)

3. Stimulacija imunološkog sustava domaćina

Crijevna mikroflora značajno utječe na imunološki sustav domaćina. Nije poznato koja je stanična komponenta odgovorna za aktivaciju imuno sustava. Međutim, zaključeno je da bakterije mliječne kiseline ili proizvodi njihova metabolizma uzrokuju promjene u crijevnoj mikrobnjoj populaciji, što za posljedicu izaziva promjene u imunološkom odgovoru. Stoga, probiotici ne djeluju samo na regulaciju crijevne mikroflore nego indirektno mogu utjecati i na pojavu bolesti (infekcije i tumori) u tkivima udaljenim od gastrointestinalnog trakta (Šušković i sur., 1997).

2.3.3. Osnovni kriteriji za izbor probiotičkih sojeva

Svjetska zdravstvena organizacija (eng. World health organisation, WHO) postavila je osnovne kriterije odabira probiotika, uključujući otpornost na stres povezanu s domaćinom, sposobnost adhezije epitela i antimikrobno djelovanje. Ovi aspekti se primjenjuju kako bi se osiguralo da probiotički soj može izdržati stresne uvjete ljudskog probavnog sustava i pokazati funkcionalna svojstva. Međutim, ne može se pretpostaviti da su ovi novi mikrobnji sojevi sposobni ponuditi nekoliko bioloških prednosti koje se pripisuju probioticima. Dodatno, kriteriji odabira povezani sa sigurnošću, kao što je širenje rezistencije na antibiotike povezano s plazmidom i proizvodnja enterotoksina, često se zanemaruju (de Melo Pereira i sur., 2018). Da bi se neki mikroorganizam mogao koristiti u probiotičke svrhe, mora zadovoljiti strogu izbornu probiotičku strategiju, a tri glavna aspekta su: opći, tehnološki i funkcionalni.

Opći kriteriji: odnose se na poznatu taksonomsku identifikaciju sojeva te humano podrijetlo za humane probiotike, zahtjevaju netoksičnost, nepatogenost i genetsku stabilnost (nema prijenosa plazmida) odnosno moraju biti zdravstveno sigurni (imati GRAS status) te moraju biti otporni prema žučnim solima i niskim pH vrijednostima

Tehnološki kriteriji: odnose se na brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura te na visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije, a osim toga trebaju imati željena organoleptička svojstva kad su uključeni u fermentacijske procese

Funkcionalni kriteriji: odnose se na antimikrobno djelovanje, posebno prema patogenim mikroorganizmima i sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela te moraju poticati imunološki odgovor i mijenjati mikrobnji metabolizam probavnog trakta (Šušković, 1996)

2.4. S-SLOJ bakterija

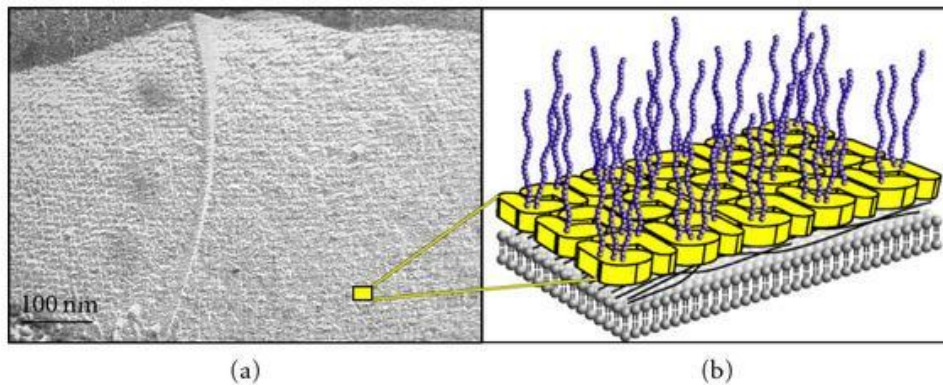
Sposobnost prijanjanja primarni je kriterij za odabir probiotičkih mikroorganizama. Postoji nekoliko važnih mehanizama za adheziju crijevnih epitelnih stanica. Kako bi se pričvrstili na crijevne stanice, općenito koriste različite strukture kao što su flagele, pili, proteini S sloja, lipoteihoična kiselina, egzopolisaharidi i proteini koji vežu sluz (Alp i sur., 2019). S-slojevi su parakristalni dvodimenzionalni nizovi proteina ili glikoproteina koji prekrivaju staničnu površinu nekoliko rodova i vrsta bakterija i arheja (Gerbino i sur., 2015). Kod Gram-pozitivnih bakterija i arheja, podjedinice S-sloja povezane su sa slojem koji sadrži peptidoglikan ili s pseudomureinom.

Kod Gram-negativnih bakterija vezanje uključuje komponente vanjske membrane (npr. lipopolisaharide). U arhejama kojima nedostaje čvrsti zidni sloj, S-slojevi su jedina zidna komponenta, usko povezana s plazminom membranom. Kao krajnji vanjski sloj nekoliko rodova i vrsta mikroorganizama, proteini S-sloja u izravnom su kontaktu s bakterijskom okolinom i stoga mogu biti uključeni u brojna njihova površinska svojstva, uključujući prijanjanje na različite supstrate, mucine i eukariotske stanice, agregaciju te koagregaciju s kvascima i drugim bakterijama. Osim toga, odgovorni su za zaštitu bakterija od štetnih okolišnih uvjeta i imaju važnu ulogu u površinskom prepoznavanju ili kao nositelji čimbenika virulencije. Molekularne mase proteina S-sloja uglavnom se kreću od 40 do 170 kDa (Sleytr i sur., 2007), dok je najčešća posttranslacijska modifikacija kojoj ti proteini prolaze glikolizacija. Ostale kovalentne modifikacije uključuju vezivanje lipida, fosforilaciju i metilaciju. Glikoproteini S-sloja javljaju se i u domenama Archaea i Bacteria. Sastavljanje i sinteza glikoproteina S-sloja djeluje kao učinkoviti sustav. Uz prosječno vrijeme generiranja bakterija od ~20 minuta, najmanje 500 kopija jedne vrste glikoproteina mora se sintetizirati u sekundi, translocirati na površinu stanice i ugraditi u postojeću nanorešetku S-sloja (Sleytr i sur., 2007). To odgovara 20 % ukupnog napora bakterije za sintezu proteina koji je posvećen proizvodnji S-sloja. Neki podaci pokazuju da glikozilacija S-sloja zaostaje za biosintezom proteina (Ristl i sur., 2011).

2.4.1. Građa S-sloja

Na površini bakterijske stanice, ali i *in vitro*, glikoproteini S-sloja karakteristično su poravnati u 2D nizovima, čime se povremeno prikazuju vezani glikani u ambijentalnu okolinu s nanometarskom točnošću ("nanolattice"). Studije elektronske mikroskopije visoke rezolucije

otkrile su da nanorešetke S-sloja mogu imati kosu (p1, p2), kvadratnu (p4) ili heksagonalnu (p3, p6) simetriju (slika 1).



Slika 1. a) Elektronna mikrofotografija kosog S-sloja glikoproteinske rešetke uočene na površini stanice *G. stearothermophilus* NRS 2004/3a nakon zamrzavanja i sjenčanja platina-ugljikom. Bar, 100 nm

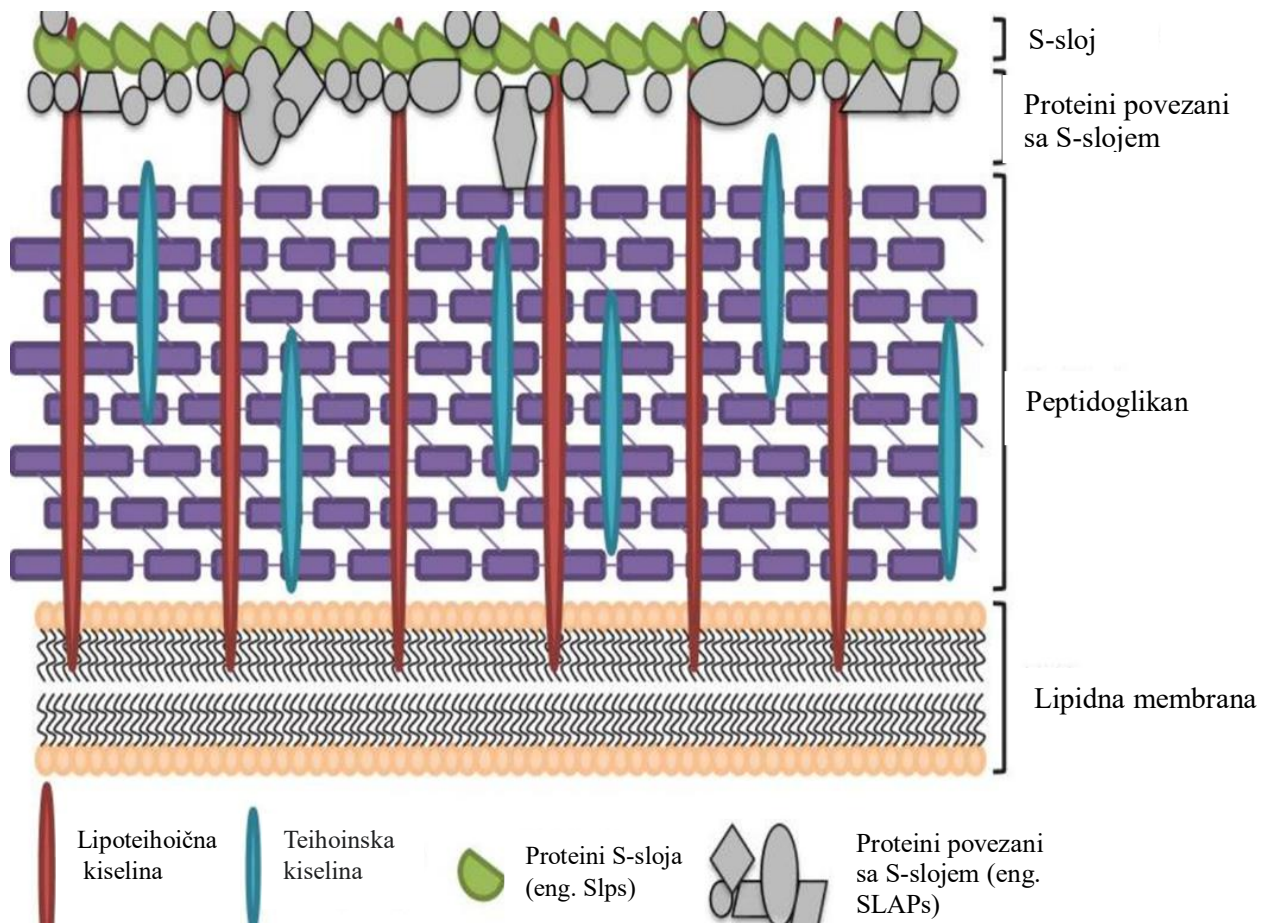
b) shematski prikaz stanične stijenke koji ilustrira glikoproteine S-sloja, s glikanskim lancima S-sloja koji strše u vanjsku okolinu (Ristl i sur., 2011)

2.4.2. Funkcionalna uloga S-sloja kod *Lactobacillus* sojeva

Postoji nekoliko sojeva bakterija *Lactobacillus* koje tvore S-slojeve, uključujući vrste povezane sa sluznicom (npr. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus* i *Lactobacillus gallinarum*) i vrste povezane s fermentacijom mlijeka (npr. *Lactobacillus cienscheltobacillobacil* i *Lactobacillus cheltobacitobacillus*). U usporedbi sa S-slojevima drugih Gram-pozitivnih bakterija, oni iz roda *Lactobacillus* su biokemijski jedinstveni budući da ne posjeduju SLH domene. Nadalje, njihova molekulska masa je među najmanjima (25–71 kDa) i vrlo su bazični, odnosno imaju visoke pH vrijednosti (od 9,35 do 10,4). *L. acidophilus* NCFM je široko korišten probiotički mikrob, koji se nalazi i u fermentiranim mliječnim proizvodima i u dodacima prehrani. *L. acidophilus* NCFM tvori S-sloj koji se sastoji uglavnom od SlpA, s pomoćnim komponentama SlpB i SlpX (Goh i sur., 2009; Altermann i sur., 2005). S obzirom na njegovu blizinu površini stanice, S-sloj je jedna od prvih bakterijskih komponenti koja stupa u interakciju s gastrointestinalnom površinom ljudskog domaćina. SlpA *L. acidophilus* NCFM pokazao je važnu ulogu u adheziji na Caco-2 crijevnu staničnu liniju (Buck i sur., 2005) i pokazalo se da modulira funkcionalnost dendritičnih stanica i T-stanica (Konstantinov i sur., 2008). Zajedno, ove studije naglašavaju potencijalnu ulogu S-slojeva u probiotičkim aktivnostima (Ristl i sur., 2011). Proteini povezani s površinskim slojem ekstrahirani su s površina Gram-pozitivnih bakterijskih stanica

tretiranjem s visokim koncentracijama soli (npr. gvanidin hidroklorid ili litijev klorid (LiCl)), koji remete vodikovu vezu između S-sloja i sekundarnog polisaharida stanične stijenke. Konkretno, tretmani LiCl u koncentracijama od 5 i 1 M korišteni su za izolaciju Slps-a iz mnogih vrsta *Lactobacillus* (Goh i sur., 2009; Frece i sur., 2005).

Identificirano je 37 proteina koji mogu biti povezani ili ugrađeni u S-sloj. Mnogi od ovih proteina, označeni kao proteini povezani sa S-slojem (slika 2), imaju nepoznatu funkciju i nude potencijal u unapređenju razumijevanja probiotičkog mehanizma, biologije stanične ovojnice i imunomodulacije kod *L. acidophilus*.



Slika 2. Shematski prikaz stanične lokalizacije proteina povezanih sa S-slojem (eng. SLAPs) kod bakterije *L. acidophilus* NCFM. Gram-pozitivna bakterijska stanična stijenka sastoji se od debelog sloja peptidoglikana (ljubičasta), stabiliziranog teihoinskom kiselinom i vezanog za lipidnu membranu lipoteihoičnom kiselinom. S-sloj, sastavljen od samosastavljajućih proteina S-sloja (eng. Slps), najudaljeniji je sloj stanične stijenke. Proteini povezani sa S-slojem (eng. SLAPs) mogu biti povezani s ovim najudaljenijim S-slojem (Johnson i sur., 2013)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korištene su bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus* izolirane iz majčinog mlijeka i test-mikroorganizam prikazani u tablici 1. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-bioteknološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu .

Tablica 3. 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>Levilactobacillus brevis</i>	MB1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB2	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	FP1	BHI, 37 °C, aerobno

3.1.2. Stanične linije

Caco-2 stanična linija je kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela, a priređena je na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković.

3.1.3. 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⁻¹ destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- MRS bujon („Biolife“, Italija), istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) za održavanje i uzgoj patogenih test-mikroorganizama

- BHI (Brain Heart Infusion) agar („Biolife“, Italija), sastava (g L⁻¹ destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- BHI bujon („Biolife“, Italija) istog je sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.

c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterije *Salmonella enterica*

- XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar („Biolife“, Italija), sastava ksiloza 3,5 g L⁻¹; L-lizin 5,0 g L⁻¹; laktoza 7,5 g L⁻¹; saharoza 7,5 g L⁻¹; NaCl 5,0 g L⁻¹; kvasčev ekstrakt 3,0 g L⁻¹; deoksikolna kiselina 2,5 g L⁻¹; natrijev tiosulfat 6,8 g L⁻¹; amonij željezov citrat 0,8 g L⁻¹; fenol crveno 0,08 g L⁻¹; agar 13,5 g L⁻¹. 55 g podloge se resuspendira u 1000 mL hladne destilirane vode. Zagrijavati uz miješanje dok se potpuno ne otopi (bez autoklaviranja) te ohladiti na 45-50 °C, dobro promiješati i izliti u sterilne Petrijeve zdjelice.

d) hranjiva podloga za kultivaciju staničnih linija

- Eagle's minimal essential medium (EMEM) s 10 % fetalnog goveđeg seruma (Thermo Fisher Scientific, SAD) za kultivaciju Caco-2 stanične linije

3.1.4. Kemikalije

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

- natrijeva lužina (NaOH), „Kemika“, Hrvatska
- pankreatin (165 U mg^{-1}) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- pepsin, „Sigma“, SAD
- Triton X-100, „AppliChem“, Njemačka
- Tween 20, „Fisher Scientific“, SAD
- žučne soli, „Difco“, SAD

3.1.5. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje (15 i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- magnetna mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- mikrotitarske pločice (24 i 96 jažica), „Falcon“, Engleska
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- plastične tubice, „Eppendorf“, SAD
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za kivete, „NeoLab“, Njemačka
- T-boca 25 cm^3 , „Corning“, SAD
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- zamrzivač ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvaju se na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v v⁻¹) glicerola, a patogeni test-mikroorganizam na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u BHI bujonu uz dodatak 15 % (v v⁻¹) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u odgovarajuću svježju hranjivu podlogu te inkubiraju u optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablici 1.

Stanice Caco-2 stanične linije pohranjene su na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u EMEM mediju s dodatkom 10 % glicerola kao krioprotektivnog sredstva.

3.2.2. Uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih sojeva

Prekonoćne bakterijske kulture ispitivanih *Lactobacillus* sojeva centrifugirane se pri 4200 o min⁻¹ tijekom 5 minuta te je talog stanica ispran dva puta sterilnom fiziološkom otopinom. Stanice su zatim resuspendirane u 3M GHCl-u i inkubirane 1 sat pri 37 °C. Nakon inkubacije, stanice su centrifugirane se pri 4200 o min⁻¹ tijekom 5 min te dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom i korištene za sljedeće pokuse.

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

3.2.3.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

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

Simulirani sok tankog crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g L⁻¹) i žučnih soli (3,0 mg mL⁻¹ govede žuči) u 0,5 % sterilnoj otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

3.2.3.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje probiotičkih bakterija

Ispitan je učinak simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta (GIT-a) na preživljavanje 2 različita soja BMK uzgojena u MRS bujonu, a ispitivanja su provedena u dvije paralele. Za prvu paralelu, stanice su prikupljene centrifugiranjem (5 minuta pri 4200 o min⁻¹), isprane dva puta te resuspendirane u fiziološkoj otopini. Za drugu paralelu su se koristile stanice kojima je S-sloj uklonjen prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Prekonoćne bakterijske kulture

centrifugirane su pri 4200 o min^{-1} tijekom 5 min i dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom. Dio suspenzije se odvojio za određivanje broja stanica mikroorganizama prije inkubacije u simuliranim uvjetima GIT-a, a ostatak je centrifugiran 5 min pri 4200 o min^{-1} . Talog stanica je resuspendiran u 3 mL simuliranog želučanog soka te inkubiran pri $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 2 sata. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 5 min pri 4200 o min^{-1} , a talog je resuspendiran u 3 mL fiziološke otopine. Nakon toga, dio suspenzije je uzet za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u želučanom soku, dok je ostatak suspenzije centrifugiran 5 min pri 4200 o min^{-1} . Talog je resuspendiran u 3 mL simuliranog soka tankog crijeva te inkubiran pri $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 4 sata, nakon čega je dio suspenzije korišten za određivanje broja živih stanica nakon inkubacije u tankom crijevu. Broj stanica je određen indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.

3.2.4. Adhezija bakterijskih stanica na protein ekstracelularnog matriksa (ECM-a)

Adhezija bakterijskih stanica na proteine ECM-a ispitana je na Corning®BioCoat™ pločicama s 96 jažica presvučenih lamininom, kolagenom, odnosno fibronektinom prema protokolu Antikainen i sur. (2002) s modifikacijama opisanim kod Uroić i sur. (2016). Jažice su isprane tri puta fosfatnim puferom ($\text{pH} = 7$) i blokirane tijekom 1 h fosfatnim puferom s dodatkom 1 % Tween 20. Bakterijske stanice uzgojene do kasne eksponencijalne faze su prikupljene centrifugiranjem, isprane i resuspendirane u fosfatnom puferu do postizanja koncentracije koja odgovara $\text{OD}_{620} = 1$. Ispitivanja su provedena u dvije paralele – prvu su činile stanice prikupljene centrifugiranjem (5 minuta pri 4200 o min^{-1}), isprane dva puta te suspendirane u fiziološkoj otopini (S+), a drugu stanice kojima je S-sloj uklonjen (S-) prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Po $100 \text{ } \mu\text{L}$ tako priređenih suspenzija pojedinih bakterijskih kultura dodano je u jažice i inkubirano preko noći pri $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon inkubacije, neadhezirane stanice su uklonjene ispiranjem tri puta s $200 \text{ } \mu\text{L}$ fosfatnog pufera koji sadrži 0,05 % Tween 20 te su pločice ostavljene 1 h na sobnoj temperaturi da se osuše. Adhezirane bakterijske stanice su detektirane bojanjem kristal-violetom koncentracije 1 mg mL^{-1} tijekom 45 min. Nakon ispiranja, bojilo je otpušteno dodatkom $100 \text{ } \mu\text{L}$ citratnog pufera (50 mmol L^{-1} , $\text{pH} = 4,0$) u svaku jažicu. Apsorbancija je izmjerena pri 620 nm čitačem mikrotitarskih pločica Infinite® F Plex. Jažice u koje je dodan fosfatni pufer služile su kao slijepa proba čije su vrijednosti apsorbancije oduzimate od vrijednosti apsorbancije jažica s adheziranim bakterijskim stanicama.

3.2.5. Adhezija bakterijskih stanica na Caco-2 stanice

Smrznuta Caco-2 stanična linija otopljena je u vodenoj kupelji pri 37 °C te je centrifugiranjem uklonjen supernatant s ostacima medija i glicerola. Biomasa stanica je potom isprana s 1 mL svježeg EMEM medija prethodno zagrijanog na 37 °C, te su stanice nacijepljene u Petrijeve zdjelice promjera 6 cm. Nakon 24 h propagacije, stanice su nacijepljene u T-bocu volumena 25 cm³ i održavane pri 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO₂, u EMEM mediju s dodatkom 10 % (v v⁻¹) toplinom inaktiviranog (56 °C tijekom 30 min) fetalnog goveđeg seruma, uz izmjenu medija svakih 48 h. U T-boci su stanice uzgajane do subkonfluentnog stanja i potom isprane fosfatnim puferom (pH = 7,4) kako bi se uklonili ostaci medija koji zbog α₂-makroglobulina prisutnog u serumu ima antitripsinsku aktivnost. Zatim su stanice inkubirane u 1-2 mL 0,25 % (w v⁻¹) tripsina pri 37 °C kako bi se odlijepile od podloge. Odljepljivanje stanica se detektira pod mikroskopom prelaskom stanica iz vretenastog u okrugli oblik i pokretanjem u smjeru tripsina. Zatim je uklonjen tripsin te su stanice resuspendirane u mediju sa serumom kako bi se zaustavilo proteolitičko djelovanje tripsina. Stanice su izbrojane u Bürken-Türk komorici volumena 10⁻⁴ mL i priređena je suspenzija koncentracije 10⁵ stanica mL⁻¹. 1 mL suspenzije dodan je u svaku od 24 jažice na pločici. Stanice su potom inkubirane tjedan dana pri 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO₂, u mediju sa serumom uz izmjenu medija svakih 48 h. Prije eksperimenta adhezije, Caco-2 stanice su isprane tri puta fosfatnim puferom.

Stanice prekonocnih kultura bakterijskih sojeva čija se adhezija na Caco-2 stanice ispituje, prikupljene su centrifugiranjem (5 min pri 4200 o min⁻¹) i isprane dva puta u fosfatnom puferu (pH = 7,4). Isprana biomasa bakterijskih stanica resuspendirana je u EMEM mediju do postizanja vrijednosti OD₆₂₀=1 te je broj živih bakterija u priređenim suspenzijama određen indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.7. Potom je u svaku jažicu s Caco-2 stanicama dodan 1 mL priređenih bakterijskih suspenzija. Nakon 1 h inkubacije pri 37 °C, Caco-2 stanice su isprane tri puta s fosfatnim puferom kako bi se uklonile neadhezirane bakterije. Caco-2 stanice su zatim lizirane 10 min pri 37 °C u 0,05 % (v v⁻¹) otopini Triton X-100, nakon čega je sadržaj jažice centrifugiran kako bi se prikupile adhezirane bakterijske stanice. Talog bakterijskih stanica je resuspendiran u fosfatnom puferu te je broj adheziranih stanica (izražen u CFU jedinicama) provjeren indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7. Postotak adhezije je izračunat prema sljedećoj jednadžbi:

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

3.2.6. Ispitivanje kompetitivne ekskluzije potencijalno patogene bakterije sa sojevima BMK primjenom Caco-2 stanične linije

Provedeno je *in vitro* ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogene bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 sa *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB2 kojima su na površini stanica prisutni S-proteini, primjenom Caco-2 stanične linije.

Stanice Caco-2 stanične linije uzgojene su u minimalnom esencijalnom mediju (*engl.* MEM-minimum essential medium) u T-boci volumena 25 cm³ i održavane pri 37 °C i 5 %-tnoj atmosferi CO₂ u minimalnom esencijalnom mediju s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog govedjeg seruma (56 °C tijekom 30 min). Stanice su čuvane u opisanim uvjetima i svaka 2 dana im je dodan svježi medij. Za ispitivanje kompetitivne ekskluzije stanica bakterija mliječne kiseline, Caco-2 crijevne epitelne stanice su inokulirane u plastične pločice s 24 jažice u koncentraciji od 1 x 10⁵ stanica mL⁻¹ i inkubirane tjedan dana uz izmjenu medija svaka 2 dana.

Prekonoćne kulture odabranih sojeva BMK uzgojene anaerobno pri 37 °C u MRS bujonu su centrifugirane pri 4200 o min⁻¹ tijekom 10 min s ciljem uklanjanja viška hranjive podloge da se spriječi mogući negativni učinak niskih pH vrijednosti ili izvanstaničnih proteina u supernatantu kulture. *Salmonella* Typhimurium FP1 je uzgojena preko noći u BHI bujonu pri 37 °C u aerobnim uvjetima i centrifugira na isti način kao BMK. Biomasa stanica potencijalno patogene bakterije i BMK su resuspendirane u fiziološkoj otopini i izmjerena je optička gustoća tako priređenih suspenzija pri A₆₂₀. Talog stanica je zatim resuspendiran u odgovarajućim volumenima fosfatnog pufera kako bi se dobio OD₆₂₀ = 1. Zatim je svaki soj BMK podijeljen u dvije Falconice – prvu su činili sojevi s prisutnim S-proteinima, a druga paralela su ti isti sojevi kojima je uklonjen sloj S-proteina prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2. Uzorci su centrifugirani 5 min pri 4200 o min⁻¹ te je talog resuspendiran u odgovarajućem volumenu EMEM medija. Prije eksperimenta, indirektnom metodom je određen početan broj stanica (CFU mL⁻¹) suspenzijama BMK i potencijalno patogenoj bakteriji.

Caco-2 epitelne stanice su isperane 3 puta u fosfatnom puferu (pH = 7,4) te je u jažicu dodan 1 mL suspenzije BMK i stanice su inkubirane 1 h pri 37 °C. Nakon inkubacije, Caco-2 stanice su isprane fosfatnim puferom te je u jažice dodan 1 mL suspenzije patogenih bakterija i nastavljena je inkubacija pri 37 °C kroz 1 h. Prije dodatka suspenzije bakterijskih stanica na Caco-2 stanice, provjeren je početan broj stanica (CFU mL⁻¹) u suspenziji indirektnom metodom, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7. Jažice su nakon inkubacije isprane 3

puta s 1 mL PBS-a kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu adhezirale te su inkubirane 10 min u 0,05 % (v v⁻¹) u otopini Triton X-100. Sadržaj svake jažice je prebačen u epicu i centrifugiran 5 min pri 13000 o min⁻¹. Potom je talog stanica resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera, a broj adheziranih stanica je određen indirektnom metodom, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.

3.2.7. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

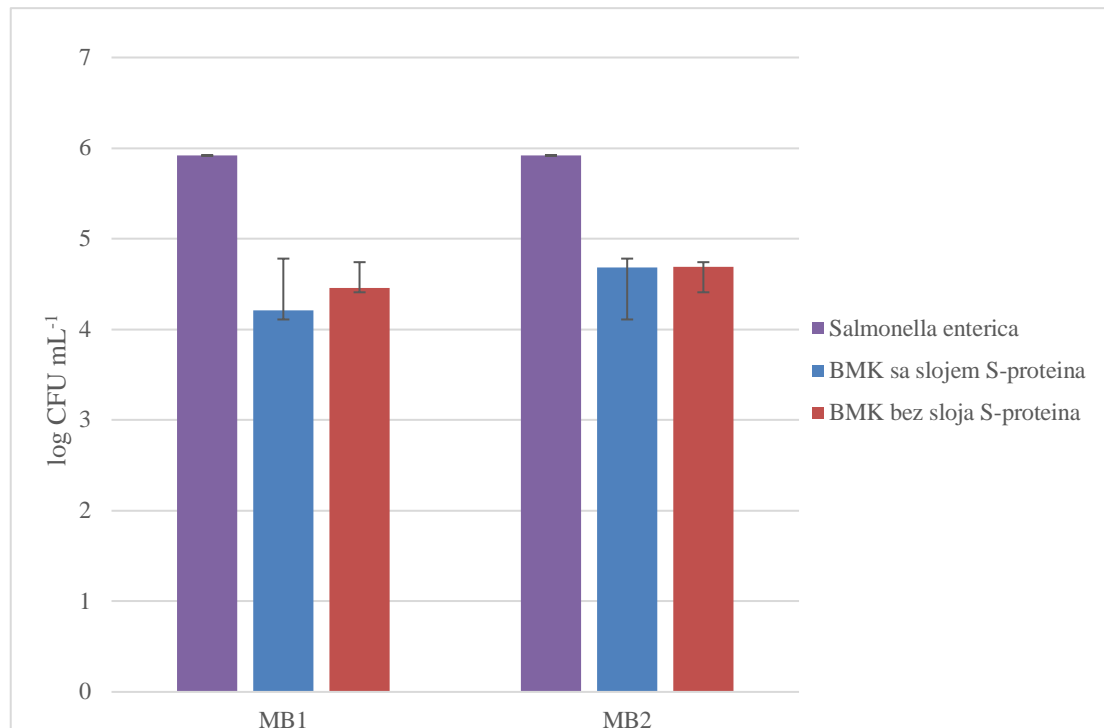
4.1. Uloga S-proteina *Lactobacillus* sojeva u adhezijskim svojstvima i kompetitivnoj ekskluziji patogena

Razvijen je niz eksperimentalnih modela koji koriste humane intestinalne stanične linije kao što su Caco-2 stanice i intestinalni mukus za proučavanje adhezije BMK te njihove kompetitivne ekskluzije prema patogenim bakterijama. Adhezija bakterija na crijevnu sluznicu često se prepoznaje kao preduvjet za kolonizaciju ljudskog gastrointestinalnog trakta. Stoga su svojstva adhezije važna i za patogene bakterije i za bakterije koje pripadaju autohtonu humanoj crijevnoj mikrobioti. Adhezija različitih bakterija proučavana je s kulturama eukariotskih stanica kao *in vitro* modelima za ljudsku crijevnu sluznicu. Jedan od tih modela je spomenuta Caco-2 stanična linija koja potječe od humanog adenokarcinoma debelog crijeva (Elina i sur., 1997). Poznato je da se vrste iz roda *Salmonella* prijanjaju na crijevne stanice, uključujući stanice Caco-2 (Finlay i sur., 1990). Inhibicija vezivanja patogena za crijevne stanice može spriječiti kolonizaciju i infekciju. Neke adhezirane bakterije mliječne kiseline inhibiraju adheziju patogenih bakterija na uzgojene ljudske crijevne stanice, što ukazuje na njihovo svojstvo kompetitivne ekskluzije. Kako bi stekle konkurentsku prednost, bakterije također mogu modificirati svoje okruženje kako bi ga učinile manje pogodnim za svoje konkurente. Proizvodnja antimikrobnih tvari, poput mliječne i octene kiseline, jedan je primjer ove vrste promjene okoliša.

Cocconnier i sur. izvijestili su o inhibiciji adhezije dijareogenih bakterija (*Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* i *Yersinia pseudotuberculosis*) (Cocconnier i sur., 1993a) na intestinalne Caco-2 i HT29-MTX stanice od strane *Lactobacillus acidophilus* sc (Cocconnier i sur., 1993b). Isti soj korišten je za inhibiciju adhezije nekih sojeva *E. coli* na Caco-2 stanice kompetitivnim isključivanjem (Chauvière i sur., 1992). Također, *Lactobacillus acidophilus* LA1 inhibirao je vezanje *S. Typhimurium* i nekih drugih patogena na kulture crijevnih stanica (Bernet i sur., 1994).

Provedena je kompetitivna ekskluzija sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB2 prema patogenoj bakteriji *S. enterica* serovar Typhimurium FP1. Na slici 3 prikazani su rezultati izraženi kao log (CFU mL⁻¹) za BMK s i bez sloja S-proteina. Nakon predinkubacije sojevima MB1 i MB2, adhezija test-mikroorganizma *S. Typhimurium* je smanjena. Prema tome, kompetitivna ekskluzija uspješno je provedena te su probiotički sojevi bakterija mliječne kiseline uspješno konkurirali za vezanje na Caco-2 stanice. Nakon uklanjanja S-sloja kod MB1 soja,

efekt smanjenja adhezije stanica test-mikroorganizma je bio manji što upućuje na pozitivno svojstvo S-proteina prilikom kompetitivne ekskluzije, na način da doprinose vezanju probiotičkih bakterija na Caco-2 epitelne stanice. Kod soja MB2, poslije skidanja S-proteina nije uočena značajnija razlika nego u prisutnosti S-proteina.

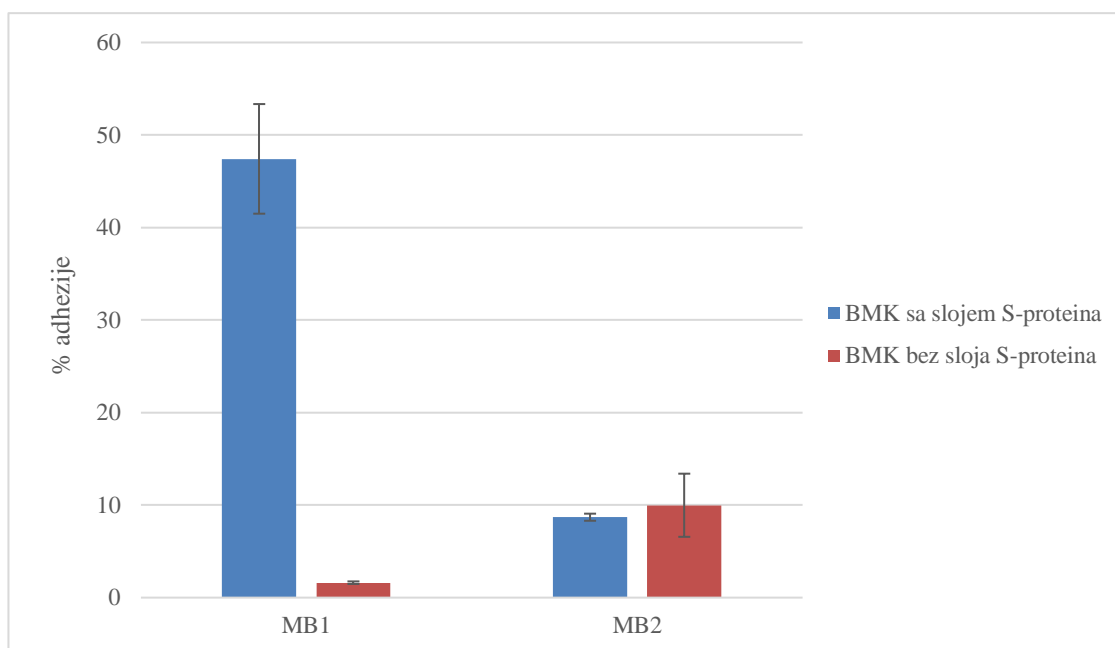


Slika 3. Kompetitivna ekskluzija patogene bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 sa sojevima *L. brevis* MB1 i MB2

Analizom sposobnosti bakterijskih stanica da se adheziraju na humane intestinalne stanice može se procijeniti mogućnost održavanja zdravog crijevnog mikrobioma, koji može pružiti zaštitu od gastrointestinalnih poremećaja, uključujući upalne bolesti crijeva, raka i gastrointestinalnih infekcija. Adhezija bakterijskih stanica započinje nespecifičnim fizikalno-kemijskim interakcijama koje onda omogućavaju specifične interakcije adhezina s površine bakterijske stanice i komplementarnog receptora na epitelnim stanicama u intestinalnom sustavu (Šušković i sur., 2009). Osim toga, pH vrijednost, odabir metoda i epitelnih stanica kao i početni broj stanica mikroorganizama (izražen kao CFU mL⁻¹) utječu na sposobnost adhezije laktobacila na Caco-2 stanice. Uklanjanje S-sloja sa soja *L. acidophilus* M92 smanjilo je bakterijsku adheziju na intestinalni epitel svinje (Kos i sur., 2003) i epitelne stanice ileuma miša (Frece i sur., 2005). Nasuprot tome adhezija *L. acidophilus* BG2FO4 i NCFM/N2 na Caco-2 stanice nije promijenjena nakon ekstrakcije Slp proteina s LiCl (Greene i Klaenhammer 1994).

Ispitana je sposobnost adhezije probiotičkih sojeva BMK na Caco-2 epitelne stanice prije

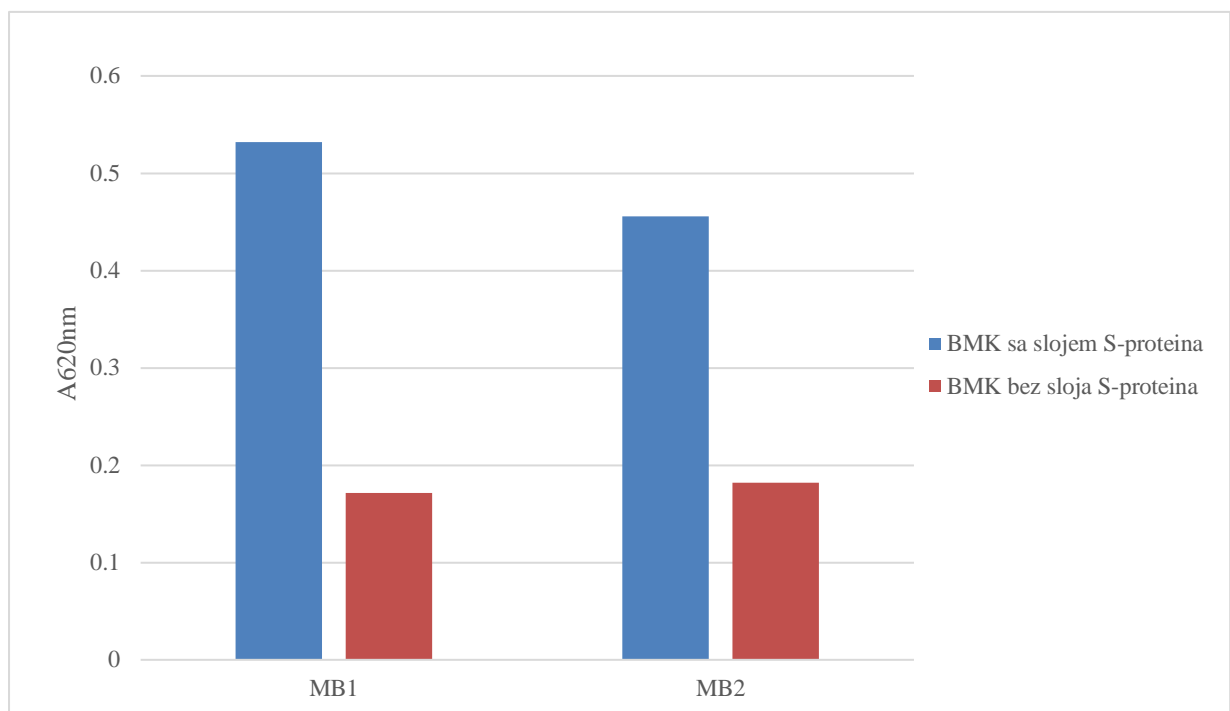
i nakon uklanjanja površinskog S-sloja gvanidin hidrokloridom. Nakon anaerobne inkubacije od 2 dana pri 37 °C, izračunat je postotak adhezije kao omjer dodanog broja bakterijskih stanica i broja adheziranih stanica na Caco-2 staničnu liniju. Od ispitanih sojeva, MB1 pokazuje veći postotak adhezije od soja MB2 prije uklanjanja S-proteina (slika 4). Razlog tome mogu biti različita adhezivna svojstva među bakterijskom sojevima, budući da površinski sloj bakterija može biti hidrofoban ili hidrofilan. Proteini S-sloja, adhezini također sudjeluju u adheziji stanica na crijevnu sluznicu (Šušković i sur., 2003). Stoga i njihova prisutnost i količina utječu na sposobnost adhezije. Naime, nakon uklanjanja S-sloja, broj adheziranih stanica MB1 soja značajno se smanjio, što ukazuje na to da S-sloj ima ulogu u adheziji na Caco-2 staničnu liniju. MB2 soj je pokazao veći postotak adhezije nakon uklanjanja S-sloja što može biti posljedica prisutnosti drugih površinskih proteina koji sudjeluju u adheziji s Caco-2 epitelnim stanicama, pogreške u izvođenju pokusa ili je u ovom slučaju S-protein blokirao adheziju (slika 4).



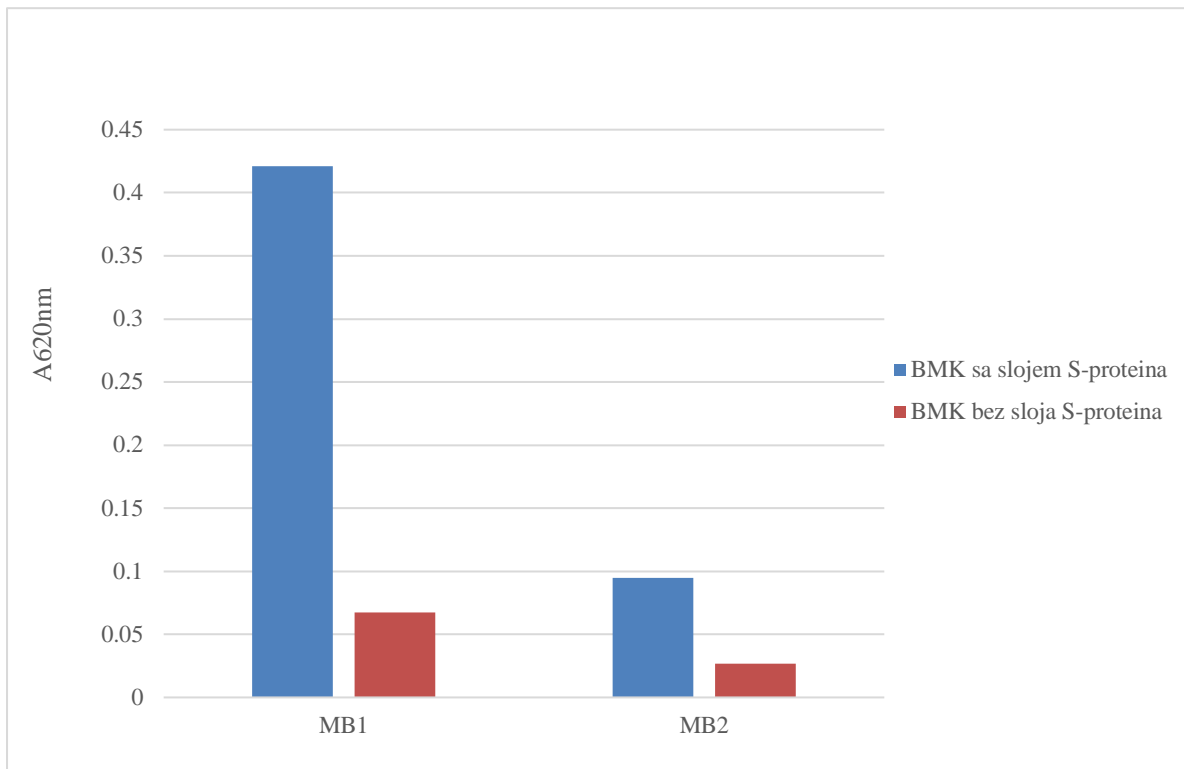
Slika 4. Adhezija bakterijskih sojeva *L. brevis* MB1 i MB2 na Caco-2 staničnu liniju

Uloga S-sloja također je ispitana adhezijom bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa (ECM), složenu strukturnu cjelinu koja okružuje i podržava intestinalne epitelne stanice koje se nalaze unutar tkiva sisavaca. Često se naziva vezivnim tkivom te se sastoji od različitih proteina kao što su laminin, fibronektin i kolagen. Provedeni su *in vitro* eksperimenti adhezije *Levilactobacillus brevis* sojeva MB1 i MB2 upravo na tim proteinima. Osim toga, ispitana je i adhezija istih sojeva nakon što je uklonjen S-sloj s bakterijskih stanica. Sposobnost adhezije bakterija temelji se na nespecifičnim interakcijama između adhezina (najčešće protein) i dopunskih receptora. Iz dobivenih rezultata, vidljivo je da

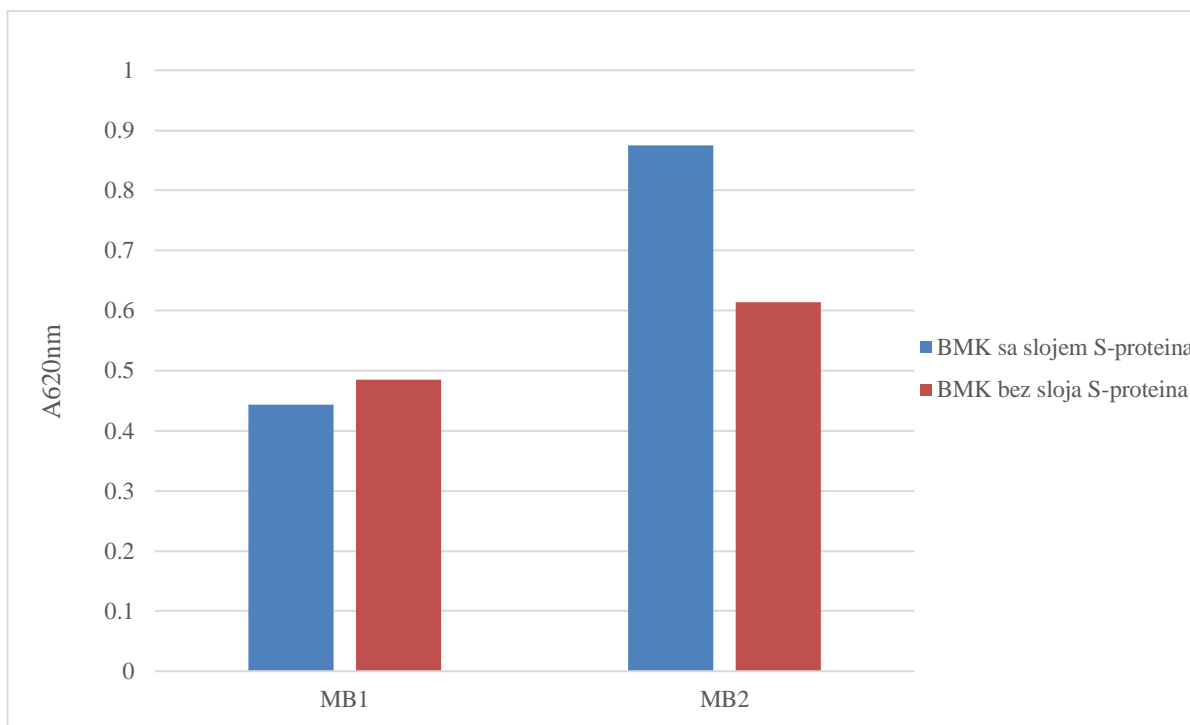
je smanjenja sposobnost adhezije stanica ispitivanih sojeva na proteine laminin i fibronektin kod oba soja nakon tretmana s gvanidin hidrokloridom. Adhezija na kolagen povećala se nakon tretmana s gvanidin hidrokloridom kod soja MB1, što može ukazivati na to da adhezija na taj protein nije posredovana S-slojem MB1 soja, već drugim površinskim komponentama. Za razliku od toga adhezija na kolagen kod soja MB2 pokazuje sličan trend kao kod adhezije na laminin i fibronektin (slike 5-7). Štoviše, rezultati ukazuju da se ekstrakcijom S-proteina s površine bakterijskih stanica smanjuje adhezija na proteine ECM-a, što dovodi do zaključka da S-proteini imaju ulogu kao adhezivni proteini.



Slika 5. *In vitro* adhezija *L. brevis* MB1 i MB2 stanica na laminin



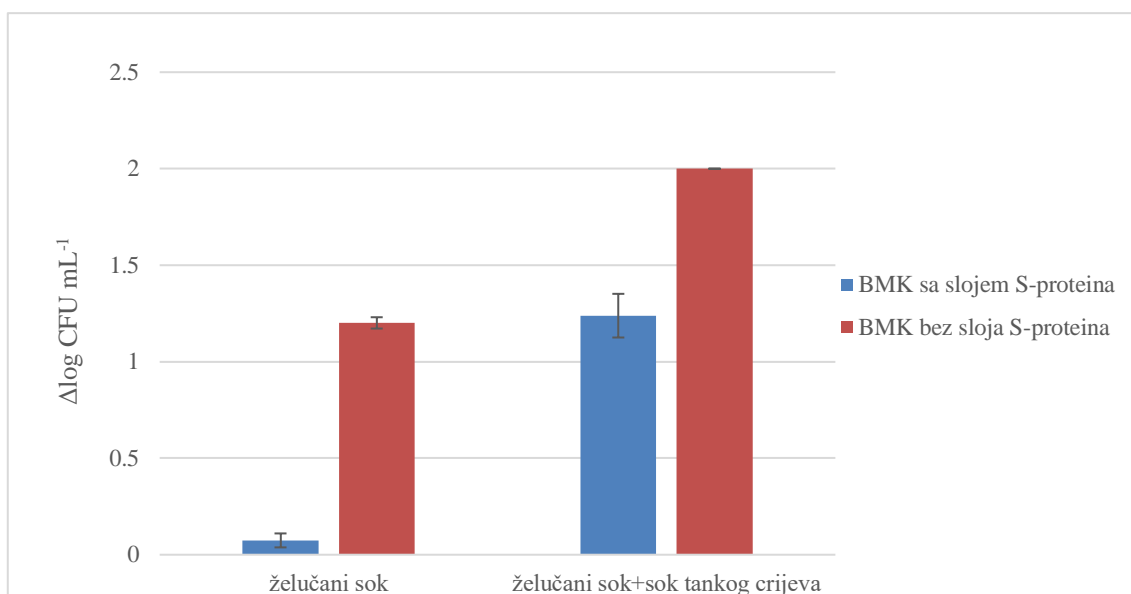
Slika 6. *In vitro* adhezija *L. brevis* MB1 i MB2 stanica na fibronektin



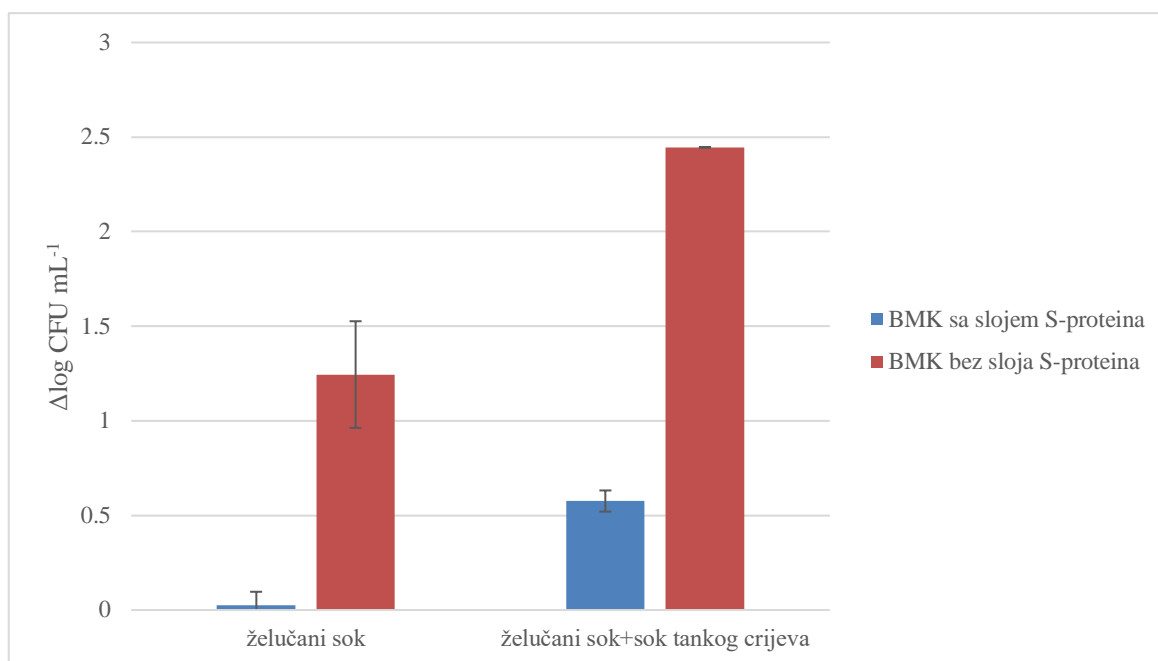
Slika 7. *In vitro* adhezija *L. brevis* MB1 i MB2 stanica na kolagen

4.2. Uloga S-proteina u preživljavanju *Lactobacillus* sojeva u simuliranim uvjetima GIT-a

S-proteini mogu preživjeti ekstremne uvjete pH te na taj način opstati u gastrointestinalnom traktu čovjeka te tako sudjelovati u zaštiti stanice u stresnim uvjetima. Kada se S-sloj ekstrahira kaotropnim agensima kao što je 5M litijev klorid, mikroorganizmi postaju osjetljiviji na agresivna okruženja kao što su gastrointestinalni sokovi (Frece i sur., 2005). U tom smislu, S-slojevi bakterija *L. brevis* i *L. kefira* pokazali su da učinkovito oblažu liposome i daju im veću stabilnost kada su izloženi žučnim solima, ekstraktu gušterače, promjenama pH i toplinskim šokovima (Hollmann, 2007). Važno svojstvo S-proteina je da probiotičkim sojevima omogućuje preživljavanje pri niskim pH vrijednostima okoline. Provedeno je preživljavanje *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranom soku želuca i soku tankog crijeva, kako bi se potvrdila zaštitna uloga S-proteina. Indirektnom metodom, broj živih stanica određivan je u simuliranom soku želuca tijekom 2 sata, a u simuliranom soku tankoga crijeva tijekom 4 sata. Rezultati ukazuju na to da prisutnost S-proteina na površini stanica kod sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1 i MB2 ima pozitivan utjecaj na preživljavanje u uvjetima GIT-a, budući da je smrtnost stanica značajno veća nakon što su podvrgnute tretmanu s gvanidin hidrokloridom. Dakle, S-proteini imaju važnu ulogu u preživljenju probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva, odnosno u uvjetima niskih pH vrijednosti GIT-a, te im je smrtnost manja u odnosu na iste sojeve s uklonjenim S-proteinima (slike 8 i 9).



Slika 8. Smrtnost bakterijskih stanica soja *L. brevis* MB1 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta



Slika 9. Smrtnost bakterijskih stanica soja *L. brevis* MB2 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Površinski proteini bakterija posrednici su raznih staničnih procesa poput transporta hranjivih tvari te adhezije dok pojedini *Lactobacillus* sojevi imaju i funkcionalnu ulogu u zaštiti bakterijske stanice i njenom imunomodulacijskom djelovanju na stanice domaćina (Šušković i sur., 2009). Kod Swiss albino miševa te svinja pasmine Landras utvrđena je *in vitro* adhezija probiotičkih sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactiplantibacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 na njihove epitelne stanice želuca i ileuma. Također je ustanovljeno i *in vivo* djelovanje na pokusnim Swiss albino miševima te je dokazano imunomodulacijsko djelovanje sva tri probiotička soja kroz povećanje razine ukupnih IgA i IgG antitijela u serumima pokusnih miševa (Frece i sur., 2005; Kos i sur., 2003). Prilikom provedenih eksperimenata, adhezija bakterije *Salmonella* Typhimurium smanjena je proteinima S-sloja, a sposobnost vezanja na Caco-2 stanice te proteine ekstracelularnog matriksa bila je povećana u prisutnosti S-sloja kod probitika koji ih sadrže. Osim toga, S-proteini pokazuju i zaštitnu ulogu u uvjetima gastrointestinalnog trakta.

5. ZAKLJUČCI

1. S-proteini prisutni na površini stanica probiotičkih sojeva MB1 i MB2 pozitivno doprinose kompetitivnoj ekskluziji *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 u *in vitro* uvjetima.
2. Pozitivan učinak S-proteina uočen je i prilikom adhezije bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa, budući da je broj bakterijskih stanica nakon tretmana s gvanidin hidrokloridom smanjen.
3. Preživljavanje stanica bakterijskih sojeva MB1 i MB2 u nepovoljnim uvjetima GIT-a je značajno uspješnije u usporedbi s preživljavanjem bakterijskih stanica istih sojeva nakon ekstrakcije S-proteina iz čega se može pretpostaviti zaštitni učinak S-sloja.

6. POPIS LITERATURE

Alp D, Kuleaşan H (2019) Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World J Microbiol Biotechnol* **35(10)**, 156. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2730-x>

Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T i sur. (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102(11)**, 3906–3912. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409188102>

Antikainen, J, Anton L, Sillanpaa J, Korhonen, TK (2002) Domains in the S-layer protein CBS of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Mol Microbiol* **46**, 381-394.

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

Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35(4)**, 483–489. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.35.4.483>

Berni Canani R, De Filippis F, Nocerino R, Laiola M, Paparo L, Calignano A i sur. (2017) Specific Signatures of the Gut Microbiota and Increased Levels of Butyrate in Children Treated with Fermented Cow's Milk Containing Heat-Killed *Lactobacillus paracasei* CBA L74. *Appl Environ Microbiol.* **83(19)**, 1206-1217. <https://doi.org/10.1128/AEM.01206-17>

Blažeka B, Šušković J, Matošić S (1991) Antimicrobial activity of lactobacilli and streptococci. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **7**, 533–536. <https://doi.org/10.1007/BF00368356>

Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR (2005) Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* **71(12)**, 8344–8351. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005>

Chauvière G, Coconnier M-H, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B, Servin AL (1992) Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Lett* **91(3)**, 213–217. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05211.x>

Coconnier M-H, Bernet M-F, Kernéis S, Chauvière G, Fourniat J, Servin AL (1993a) Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by

Lactobacillus acidophilus strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol Lett* **110(3)**, 299–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06339.x>

Coconnier M-H, Bernet M-F, Chauvière G, Servin AL (1993b) Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *J Diarrh Dis Res* **11(4)**, 235–242. <http://www.jstor.org/stable/23498285>

de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances* **36(8)**, 2060–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

Elina ML, Seppo JS (1997) Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect? *FEMS Immunol Med Microbiol* **18(2)**, 125–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1997.tb01037.x>

Fijan S (2014) Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health* **11(5)**, 4745–4767. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504745>

Finlay BB, Falkow S (1990) *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J Infect Dis* **162(5)**, 1096–1106. <https://doi.org/10.1093/infdis/162.5.1096>

Food and Agriculture Organization/World Health Organization (2002) Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, ON, Canada.

Frece J, Kos B, Svetec IK, Zgaga Z, Mrša V, Šušković J (2005) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **98(2)**, 285–292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02473.x>

Freter R, Stauffer E, Cleven D, Holdeman L V, Moore WE (1983) Continuous-flow cultures as *in vitro* models of the ecology of large intestinal flora. *Infect Immun* **39(2)**, 666–675. <https://doi.org/10.1128/iai.39.2.666-675.1983>

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

Goh YJ, Azcárate-Peril MA, O’Flaherty S, Durmaz E, Valence F, Jardin J, Lortal S, Klaenhammer TR (2009) Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* **75(10)**, 3093–3105.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02502-08>

Greene JD, Klaenhammer TR (1994) Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* **60(12)**, 4487-4494. <https://doi.org/10.1128/aem.60.12.4487-4494.1994>

Hollmann A, Delfederico L, Glikmann G, De Antoni GL, Semorile L, Disalvo A (2007) Characterization of liposomes coated with S-layer proteins from lactobacilli. *Biochem Biophys Acta* **1768(3)**, 393-400. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.009>

Johnson B, Selle K, O'Flaherty S, Goh YJ, Klaenhammer T (2013) Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Microbiology (Reading)*. **159(11)**, 2269-2282. <https://doi.org/10.1099/mic.0.070755-0>

Kennedy MJ, Volz PA (1985) Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. *Sabouraudia* **23(4)**, 265-273. <https://doi.org/10.1080/00362178585380391>

Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SC, Singh SK, Valence F, i sur. (2008) S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105(49)**, 19474–19479. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810305105>

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(6)**, 981-987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>

Laboratorijski praktikum iz biokemijskog inženjerstva(listopad, 2019), Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno - biotehnoški fakultet), akad.god. 2021/2022., <[Skripta-BI-vjezbe 2019.pdf](#)> . Pristupljeno 12.06.2022

Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Miguel Rodríguez J, Boza J, Xaus J (2007) Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* **98(S1)**, S96-S100. <https://doi.org/10.1017/S0007114507832910>

Mitsuoka T (1992) The Human Gastrointestinal Tract. U: Wood BJB. (ured.) *The Lactic Acid Bacteria*, 1 izd., Springer, Boston, MA., str. 69-114.

Nishiyama K, Sugiyama M, Mukai T (2016) Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms* **4(3)**, 34. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030034>

Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, i sur. (2014) The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev* **260(1)**,

8-20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>

Ristl R, Steiner K, Zarschler K, Zayni S, Messner P, Schäffer C (2010) The S-layer glycome-adding to the sugar coat of bacteria. *Int J Microbiol* 127870. <https://doi.org/10.1155/2011/127870>

Salminen S, von Wright A (2004) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3. izd, CRC Press, Boca Raton

Sanders ME, Klaenhammer TR (2001) Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci* **84**(2), 19–331. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74481-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74481-5)

Silva DR, Sardi JD, Pitangui ND, Roque SM, Silva AC, Rosalen PL (2020) Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. *J Funct Foods*, **73**. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104080>

Sleytr UB, Egelseer EM, Ilk N, Pum D, Schuster B (2007) S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit. *The FEBS Journal* **274**, 323–334. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05606.x>

Šušković J (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.

Šušković J, Kos B, Frece J, Beganović J, Leboš Pavunc A (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4** (3-4), 77-84. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/49962>

Šušković J, Brkić B, Matošić S (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**(1), 57-73. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/file/139731>

Šušković J, Kos B, predavanja iz predmeta Biotehnologija 4, akad. god. 2021./2022., https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5858973/mod_resource/content/1/biotehnologija%20_2021_5.pdf, pristupljeno 16.05.2022.

Uroić, K, Novak J, Hynönen U, Pietilä TE, Leboš Pavunc A, Kant R, Kos B, Palva A, Šušković 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**, 625-632. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.013>

Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos R (2017) The prenatal gut microbiome: are we colonized with bacteria in utero? *Pediatric Obes* **12**(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12217>

Wilkins T, Sequoia J (2017) Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician* **96(3)**, 170-178. <https://www.aafp.org/dam/brand/aafp/pubs/afp/issues/2017/0801/p170.pdf>

Wilson KH, Sheagren JN, Freter R, Weatherbee L, Lyerly D (1986) Gnotobiotic models for study of the microbial ecology of *Clostridium difficile* and *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **153(3)**, 547-551. <https://doi.org/10.1093/infdis/153.3.547>

Izjava o izvornosti

Ja Maja Nikolić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Maja Nikolić

Vlastoručni potpis