

Funkcionalna karakterizacija izolata bakterija mliječne kiseline za primjenu u inhibiciji *Helicobacter pylori*

Lalić, Helena

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:159:162299>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-29**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Helena Lalić

0058216069

**Funkcionalna karakterizacija izolata bakterija mliječne
kiseline za primjenu u inhibiciji *Helicobacter pylori***

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: dr. sc. Deni Kostelac

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Funkcionalna karakterizacija izolata bakterija mliječne kiseline za primjenu u inhibiciji

Helicobacter pylori

Helena Lalić, 0058216069

Sažetak:

Primjena probiotika u smanjenju tegoba uzrokovanih patogenom bakterijom *Helicobacter pylori* jedna je od istaknutijih potencijalnih alternativa antibiotičkoj terapiji. U ovom radu provedena je izolacija bakterija mliječne kiseline iz autohtonog ovčjeg sira te probiotička karakterizacija s ciljem pronalaska bakterijskih sojeva s potencijalom u inhibiciji *H. pylori*. Izolirano je deset sojeva te je određena antimikrobna aktivnost supernatanta kulture na rast *H. pylori*. Četiri izolata koja su pokazala stupanj inhibicije viši od 50 % dodatno su istraženi te su pokazali visok stupanj preživljenja u simuliranim uvjetima želuca. Izolati s najvećom sposobnosti autoagregacije biokemijski su identificirani kao *Latilactobacillus curvatus* DK1, *Lacticaseibacillus paracasei* DK5 i *Latilactobacillus curvatus* DK7. Daljnjim ispitivanjem antimikrobnog potencijala utvrđeno je kako sojevi *Latilactobacillus curvatus* DK1 i *Lacticaseibacillus paracasei* DK5 pokazuju značajan stupanj inhibicije *H. pylori* i nakon neutralizacije i termičke obrade supernatanta kulture što ukazuje na višestruke mehanizme ispoljavanja antimikrobne aktivnosti i izražen probiotički potencijal.

Ključne riječi: probiotici, *Helicobacter*, antimikrobna aktivnost, *Latilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*

Rad sadrži: 34 stranice, 7 slika, 3 tablice, 52 literaturna 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: dr. sc. Deni Kostelac

Datum obrane: 18. srpnja, 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Functional characterization of lactic acid bacteria isolates for use in *Helicobacter pylori*
inhibition

Helena Lalić, 0058216069

Abstract:

The use of probiotics to alleviate symptoms caused by the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* is one of the most prominent possible alternatives to antibiotic therapy. In this work, isolation of lactic acid bacteria from autochthonous sheep cheese and probiotic characterization were performed with the aim of finding bacterial strains that have the potential to inhibit *H. pylori*. Ten strains were isolated and the antimicrobial activity of the culture supernatant on *H. pylori* growth was determined. Four isolates that exhibited a degree of inhibition greater than 50% were further investigated and showed a high degree of survival under simulated gastric conditions. The isolates with higher autoaggregation ability were biochemically identified as *Latilactobacillus curvatus* DK1, *Lacticaseibacillus paracasei* DK5, and *Latilactobacillus curvatus* DK7. Further investigation of antimicrobial potential revealed that *Latilactobacillus curvatus* DK1 and *Lacticaseibacillus paracasei* DK5 strains exhibited a significant degree of inhibition of *H. pylori* even after neutralization and heat treatment of the culture supernatant, indicating multiple mechanisms of antimicrobial activity and distinct probiotic potential.

Keywords: probiotics, *Helicobacter*, antimicrobial activity, *Latilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*

Thesis contains: 34 pages, 7 figures, 3 tables, 52 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: Deni Kostelac, PhD

Thesis defended: 18th July, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	2
2.1.1 <i>Latilactobacillus curvatus</i>	3
2.1.2 <i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	3
2.2 PROBIOTICI.....	3
2.2.1 Mehanizam probiotičkg djelovanja	5
2.3 ANTIMIKROBNO DJELOVANJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE	6
2.3.1 Organske kiseline.....	6
2.3.2 Vodikov peroksid	7
2.3.3 Diacetil	7
2.3.4 Bakteriocini	8
2.4 PATOGENI MIKROORGANIZMI	8
2.4.1 <i>Helicobacter pylori</i>	8
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1 MATERIJALI	11
3.1.1 Mikroorganizmi	11
3.1.2 Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline	11
3.1.3 Hranjive podloge za održavanje i uzgoj <i>Helicobacter pylori</i>	11
3.1.4 Aparatura i pribor.....	11
3.1.5 Kemikalije	12
3.2 METODE	12
3.2.1 Izolacija bakterija mliječne kiseline iz autohtonog ovčjeg sira	12
3.2.2 Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline i <i>Helicobacter pylori</i> DSM®10242™	12
3.2.3 Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	13
3.2.4 Određivanje antimikrobne aktivnosti izolata prema <i>Helicobacter pylori</i> DSM®10242™	13
3.2.5 Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima želuca	14
3.2.6 Određivanje autoagregacijske sposobnosti bakterija mliječne kiseline	14
3.2.7 Određivanje sposobnosti rasta bakterije <i>Helicobacter pylori</i> prisutnosti neutraliziranog termički obrađenog supernatanta	14
3.2.8 Identifikacija pomoću analize fermentacijskog profila (API 50 CHL metoda)	15
3.2.9 Statistička obrada podataka	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1 Izolacija i identifikacija bakterija mliječne kiseline iz uzorka ovčjeg sira	16
5. ZAKLJUČCI	25

6. LITERATURA	26
----------------------------	-----------

1. UVOD

Infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* jedna je od najčešćih infekcija te se procjenjuje da je ovom bakterijom zaraženo oko 50 % svjetske populacije. *H. pylori* identificirana je kao glavni uzročnik mnogih bolesti gastrointestinalnog sustava te ima ključnu ulogu u razvoju želučanog karcinoma zbog čega je svrstana u kancerogene prvog reda. *H.pylori* narušava ravnotežu crijevne mikroflore što posljedično dovodi do oslabljivanja crijevne sluznice i razvoja kroničnih infekcija. *H. pylori* pokazuje visoku rezistentnost na antibiotike zbog čega se sve intenzivnije provode istraživanja o potencijalnim alternativnim terapijskim metodama poput upotrebe probiotika (Trogrlić, 2017).

Probiotici su prema važećoj definiciji jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene na životinjama ili ljudima, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore (FAO/WHO, 2002). Mikroorganizmi s probiotičkim potencijalom mogu se pronaći u mnogobrojnim biološkim nišama, a njihov pronalazak rezultat je sustavne probiotičke karakterizacije jer su pojedina probiotička svojstva ovisna o soju (Sanap i sur., 2019). Iako su dokazani višestruki korisni učinci različitih probiotika, mnogi mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni. U zadnje se vrijeme sve više ističe potencijal primjene probiotičkih bakterija mliječne kiseline u sprječavanju oboljenja uzrokovanih patogenom *H. pylori* (Kostelac, 2022).

Bakterije mliječne kiseline skupina su nepatogenih, Gram-pozitivnih mikroorganizama koji proizvode mliječnu kiselinu kao glavni produkt fermentacije (Carr i sur., 1997). Sastavni su dio prirodne mikroflore mlijeka i mliječnih proizvoda, a produktima svog metabolizma odnosno proizvodnjom antimikrobnih komponenata poput organskih kiselina, vodikovog peroksida i bakteriocina inhibiraju rast patogenih mikroorganizama. Zahvaljujući antimikrobnom djelovanju i pozitivnim učincima na zdravlje, bakterije mliječne kiseline sve češće se primjenjuju upravo kao probiotici. (Zdolec i sur., 2005).

U ovom radu ispitana je antimikrobna aktivnost izolata bakterija mliječne kiseline iz uzorka autohtonog ovčjeg sira na rast patogene bakterije *H. pylori*. Sojevi koji su pokazali najbolju antimikrobnu aktivnost izdvojeni su i biokemijski identificirani. Ispitana je i sposobnost autoagregacije izolata bakterija mliječne kiseline te sposobnost njihovog preživljavanja u simuliranim uvjetima želuca gdje se poželjno očekuje antagonistička aktivnost prema navedenom patogenu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su gram-pozitivne, nesporogene, katalaza-negativne bakterije koje nemaju citokrom te su prirodno prisutne na namirnicama poput mesa, mlijeka i biljnih materijala koji su bogati hranjivim tvarima te su dio mikroflore gastrointestinalnog sustava sisavaca (Carr i sur., 1997). Glavna karakteristika bakterija mliječne kiseline je metabolička oksidacija različitih ugljikohidrata do mliječne kiseline (Šušković i sur., 1997). Aerobne su do fakultativno anaerobne bakterije, odnosno prilagođene su i aerobnim i anaerobnim uvjetima - sadrže proteine koji su esencijalni za respiraciju, ali i enzime koji su odgovorni za fermentacijske procese (Obadić, 2018).

Sistematski se dijele na veliki broj vrsta koje pripadaju rodovima: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* i *Sporolactobacillus* (Šušković i sur., 1997). Morfološki se dijele na štapiće i koke, a obzirom na metabolizam te produkte fermentacije heksoza dijele se na dvije skupine: homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne BMK proizvode mliječnu kiselinu kao glavni produkt fermentacije glukoze. Heterofermentativne uz mliječnu kiselinu proizvode sekundarne produkte poput CO₂, octene kiseline i etanola. U skupinu homofermentativnih BMK spadaju rodovi *Streptococcus*, *Lactococcus* i *Pediococcus* te različite vrste roda *Lactobacillus*, dok u skupinu heterofermentativnih spadaju bakterije iz roda *Leuconostoc* i neke vrste roda *Lactobacillus* (Carr i sur., 1997).

BMK u prehrambenoj industriji imaju važnu ulogu u primjeni kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda. Svojim aktivnošću proizvod čine lakše probavljivim, pridonose specifičnoj aromi i teksturi te povećavaju nutritivnu vrijednost proizvodima poput kefira, jogurta, maslaca, kulena i trajnih kobasica te kiselog zelja i sl. (Rogelj, 1994).

Brojim istraživanjima zaključeno je da je optimalna temperatura rasta BMK između 30 i 40 °C, a mogu rasti i pri temperaturama manjim od 5 °C te većim od 45 °C. Također, utvrđena je optimalna pH vrijednost za rast bakterija mliječne kiseline koja iznosi između 5,5 i 5,8. Neke bakterije mogu rasti i ispod pH vrijednosti 5,0, a neutralni ili alkalni pH smanjuje ili potpuno zaustavlja njihov rast (Carr i sur., 1997).

Zbog dugotrajnog korištenja bakterija mliječne kiseline bez negativnog utjecaja na zdravlje čovjeka, dodijeljen im je status GRAS (eng. Generally Regarded As Safe) prema US FDA (eng. US Food and Drug Administration), odnosno QPS (eng. Qualified Presumption of Safety) status prema legislativi Europske Unije (Kostelac i sur., 2021).

2.1.1 *Latilactobacillus curvatus*

Latilactobacillus curvatus, prethodno znan kao *Bacterium curvatum*, a prema nedavnim istraživanjima Zheng i sur. (2020) preimenovan je u *Latilactobacillus curvatus*. *L. curvatus* bakterija je okruglasto izduženog izgleda sa zaobljenim rubovima. Uzgojena na hranjivoj podlozi vidljiva je kao gusta mliječno bijela kolonija. *L. curvatus* dugo je tema interesa zbog izvrsne sposobnosti fermentacije te bakteriocionogenog djelovanja zbog čega ima sposobnost inhibicije patogenih mikroorganizama, što potencijalno vrlo povoljno utječe na ljudsko zdravlje (Chen i sur., 2020).

2.1.2 *Lacticaseibacillus paracasei*

Lacticaseibacillus paracasei štapićasta je bakterija sa ravnim rubovima koja može egzistirati samostalno ili povezana u lance. Uobičajena temperatura rasta iznosi od 10°C do 40 °C, dok u iznimnim situacijama može rasti pri 5 °C kao i pri 45 °C. Fakultativno je heterofermentativna te proizvodi L-(+) mliječnu kiselinu (Collins i sur., 1989). Također posjeduje veliku sposobnost preživljavanja u kiselom mediju, odnosno u uvjetima želuca i prisustvu žučne kiseline i niske pH vrijednosti (Reale i sur., 2014).

Pokazuje vrlo dobar inhibitorni učinak prema patogenim mikroorganizmima u probavnom traktu i usnoj šupljini (Chuang i sur., 2011). Istraživanje koje su proveli Komatsuzaki i sur. (2005) pokazalo je kako je bakterija *Lacticaseibacillus paracasei* izvrstan proizvođač γ – aminomaslačne (GABA) kiseline. *L. paracasei* obično se nalazi u siru gdje uglavnom sudjeluje u procesu zrenja zbog svojih proteolitičkih i lipolitičkih aktivnosti (Ashokkumar i sur., 2011).

2.2 PROBIOTICI

Prema službenoj definiciji, probiotici se definiraju kao jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizama koje, primijenjene na životinjama ili ljudima, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore (FAO/WHO, 2002). Da bi se određen mikroorganizam mogao smatrati probiotikom, mora zadovoljavati određene uvjete. Uobičajeni

kriteriji za odabir roda, vrste i soja probiotika su tolerancija na uvjete probavnog trakta, sposobnost adhezije na intestinalnu mukozu te kompetitivna ekskluzija patogena (Leis i sur., 2020).

Bakterije mliječne kiseline otporne su na uvjete koji vladaju u gastrointestinalnom traktu i na žučne soli te imaju sposobnost adhezije na intestinalnu sluznicu (Kostelac i sur., 2021). Bakterije mliječne kiseline do sad su pokazale brojne pozitivne učinke na zdravlje pa se sve češće koriste upravo kao probiotici, a iskazuje se i sve veći interes za funkcionalnim i probiotičkim proizvodima koji sadrže BMK (Šušković i sur., 2010).

Kao probiotici, u prehrani čovjeka, najčešće se koriste bakterije roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Jedan od istaknutijih probiotičkih kvasaca je *Saccharomyces boulardii*. (Gregurek, 1999). Probiotici različitim mehanizmima djeluju na patogene mikroorganizme u intestinalnom traktu: smanjuju broj živih bakterija, mijenjaju metabolizam mikroorganizma i stimuliraju imunološki sustav domaćina (Šušković i sur., 1997). Probiotici se mogu koristiti kako bi se prevenirala i liječila razna stanja koja nastaju zbog sve šire primjene kemijskih dodataka i antibiotika u prehrani koji su uzrok kroničnom poremećaju crijevne mikroflore i terapijskoj nedjelotvornosti kemoterapeutika u slučaju različitih infektivnih bolesti koje zahvaćaju gastrointestinalni trakt, poput upale uzrokovane bakterijom *Helicobacter pylori*. Druge bolesti koje nisu direktno povezane sa gastrointestinalnim traktom, kao što su različite bakterijske ili gljivične upale urinarnog trakta te Chronova bolest, također pokazuju pozitivne reakcije prilikom tretiranja probioticima (Williams, 2010).

Dokazano je kako bakterije iz roda *Lactobacillus* posjeduju dobar antioksidativni kapacitet te pružaju određeni stupanj zaštite protiv oksidativnog stresa (Kostelac i sur., 2022). Probiotici potpomažu probavu laktoze na način da povećavaju koncentraciju enzima laktaze, stoga se njihova konzumacija preporučuje kod osoba koje boluju od intolerancije na laktozu (Oak i sur., 2018). Nadalje, prema istraživanju Rosenfeldt i sur. (2002), dokazano je da je kod djece koja su imala dijareju i konzumirala bakterije mliječne kiseline s probiotičkim djelovanjem, dijareja bila kraćeg trajanja nego kod one djece koja nisu konzumirala probiotičke pripravke. Mnoga istraživanja pokazuju da probiotici imaju određen utjecaj na smanjenje kolesterola, a prema nedavnom istraživanju Sui i sur. (2021) bakterija *L. plantarum* pokazuje sposobnost snižavanja koncentracije kolesterola od 55,8 %. Uočeno je još mnogo različitih benefita upotrebe probiotika, poput zaštite od raznih infekcija između kojih je inhibicija rasta bakterije *H. pylori*, smanjenje simptoma iritacija crijeva te prevencija ili liječenje alergija

(Lopez-Santamarina i sur., 2021).

2.2.1 Mehanizam probiotičkg djelovanja

Iako točni mehanizmi djelovanja probiotika u organizmu sisavaca nisu do kraja razjašnjeni, smatra se da se korisni učinci mogu grupirati u nekoliko osnovnih principa prema kojima se učinci ispoljavaju. Primarna aktivnost obuhvaća suzbijanje infekcija, modifikaciju crijevne mikrobiote, stimulaciju imunskog sustava i poboljšanje metabolizma laktoze. (Williams, 2010). Osnovni preduvjet ispoljavanja korisnih učinaka na željenom mjestu u domaćinu je sposobnost preživljavanja tijekom prolaska kroz probavni sustav domaćina (Rogelj, 1994). Visok stupanj preživljenja omogućuje adekvatno vezanje na crijevni epitel te uspješno ostvarivanje probiotičkih učinaka. Dosadašnja istraživanja pokazala su da upotreba BMK prilikom eksperimentalnog liječenja raznih bolesti omogućuje promjenu sastava crijevne mikrobiote i povećanje efikasnosti u borbi sa štetnim mikroorganizmima te tako prevenira nastanak dodatnih bolesti. (Williams, 2010).

Sprječavanje kolonizacije patogenih mikroorganizama, uz istovremenu apsorpciju hranjivih tvari, glavna je funkcija probavnog sustava (Halloran, 2019). Da bi patogeni uzrokovali infekciju i kolonizirali gastrointestinalni sustav, moraju se pričvrstiti za vezna mjesta crijevne stanice, nakon čega slijedi razvoj upalnog procesa i infekcije. Kako bi zaštitili organizam od infekcije, probiotici se pomoću posebnih receptora na površini stanice vežu na crijevni epitel prije patogena. Stvara se interakcija između probiotika i domaćina, koji ga prepoznaje te posljedično tome stvara imunološki odgovor (Van Zyl i sur., 2020). Adhezija probiotičkog soja na crijevne stanice domaćina direktno ili indirektno pokreće signalnu kaskadu koja dovodi do imunoloških modulacija (Khare i sur., 2018). Također, probiotičke bakterije pokazuju sposobnost ne samo inhibicije patogenih mikroorganizama i sprječavanja njihovog prijanjanja na crijevni epitel, već mogu zamijeniti postojeće kolonizatore gastrointestinalnog sustava (Van Zyl i sur., 2020).

Osnova inhibitorna aktivnost proizlazi iz metaboličke aktivnosti probiotičkih bakterija koje proizvodnjom antimikrobnih metabolita inhibiraju rast potencijalnih patogena (Gudiña i sur., 2009). Izlučivanjem antimikrobnih metabolita probiotičke bakterije snižavaju pH te modificiraju uvjete gastrointestinalnog sustava na način da nisu odgovarajući za rast patogena. Prilikom kompetencije za hranjive komponente tada efektivnije uskraćuju hranjive tvari patogenima zbog čega nemaju na raspolaganju dostatan izvor iskoristivih ugljikohidrata potrebnih za daljnji rast i razmnožavanje (Van Zyl i sur., 2020).

Modifikacija metaboličke aktivnosti crijevne mikrobiote u probavnom traktu još je jedno važno funkcionalno svojstvo probiotičkih bakterija, uslijed čega dolazi do inhibicije rasta nekih sudionika crijevne mikroflore koji proizvode enzime (β -glukuronidazu, nitroreduktazu, azoreduktazu i steroid-7 α -dehidroksilazu) koji potiču razvoj kancerogenih procesa (Šušković i sur., 2009). Probiotici također imaju mogućnost simulacije enzimskih reakcija koje su uključene u reakcije detoksikacije pojedinih toksina te simuliraju razgradnju kompleksnih hranjivih sastojaka ili ako za razgradnju ne postoje potrebni enzimi, osiguravaju bakterijski izvor takvih probavnih enzima prilikom čega će modulirati njihovu aktivnost i spriječiti sudjelovanje u indukciji kancerogenih spojeva (Šušković i sur., 1997). Dokazano je da probiotici i BMK sprječavaju nastanak raka debelog crijeva smanjenjem koncentracije kancerogenih tvari koje su potencijalno prisutne u hrani (Shoukat, 2020).

2.3 ANTIMIKROBNO DJELOVANJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline, koje su stoljećima sastavni dio ljudske prehrane, mogu se 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 (Kršev, 1996). BMK i njihovi antimikrobni metaboliti snažno inhibicijski djeluju na kvarenje hrane i razmnožavanje patogenih mikroorganizama i na taj način poboljšavaju sigurnost hrane (Rogelj, 1994), čuvaju svjež okus hrane i produljuju rok trajanja. Jaku antimikrobnu aktivnost BMK pokazuju prema gram pozitivnim bakterijama (Gregurek, 1999).

Antimikrobni metaboliti BMK mogu se podijeliti u dvije skupine: metaboliti male molekulske mase s molekulskom masom <1000 Da i metabolite velike molekulske mase s molekulskom masom >1000 Da u koje pripadaju bakteriocini. Svi ostali metaboliti imaju malu molekulska masu (Šušković i sur., 2010). Njihovo antimikrobno djelovanje odvija se pomoću organskih kiselina, vodikovog peroksida, ugljikovog dioksida i bakteriocina (Zdolec i sur., 2005).

2.3.1 Organske kiseline

Organske kiseline smatraju se glavnom antimikrobnom komponentom odgovornom za inhibitorno djelovanje probiotičkih bakterija. Inhibitorni učinak postižu kada nedisocirani oblik organske kiseline ulazi u bakterijsku stanicu i disocira unutar njezine citoplazme. Eventualno sniženje intracelularnog pH ili intracelularno nakupljanje ioniziranog oblika organskih kiselina

može dovesti do smrti patogena (Khare i sur., 2018).

Najvažnije organske kiseline koje imaju antimikrobno djelovanje jesu mliječna i octena kiselina. Octenu kiselinu proizvode samo heterofermentativne BMK te onda ujedno imaju i jači inhibitorni učinak, dok mliječnu kiselinu proizvode i homofermentativne i heterofermentativne BMK (Šušković i sur., 2010). Mliječna kiselina, ovisno o zakretanju ravnine polarizirane svjetlosti, može biti u dva oblika: L(+) i D(-) što je prikazano u tablici 1. Bakterije iz roda *Lactococcus* i *Streptococcus* proizvode znatno manje mliječne kiseline u odnosu na bakterije iz roda *Lactobacillus* (Gregurek, 1999).

Tablica 1. Primjeri bakterija mliječne kiseline koje proizvode različite oblike mliječne kiseline (Preuzeto i prilagođeno prema Gregurek, 1999)

<i>Bakterije mliječne kiseline</i>	D(-) mliječna kiselina	L (+) mliječna kiselina
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp <i>bulgaricus</i>	+	-
<i>Lactobacillus lactis</i>	+	-
Neke vrste roda <i>Streptococcus</i> spp.	-	+
<i>Lactobacillus casei</i>	-	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+

2.3.2 Vodikov peroksid

Uz organske kiseline, proizvodnja vodikovog peroksida potencijalni je važan antimikrobni mehanizam u borbi protiv patogena (Van Zyl i sur., 2020). Vodikov peroksid ima snažan antioksidacijski učinak na bakterijske stanice. Oksidiraju SH- grupe u enzimima koji sudjeluju u metabolizmu kao što su heksokinaza, aldolaza i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (Rupčić, 2016) što dovodi do denaturacije enzima. Shodno tome smanjuje se zaraznost patogena te se usporava njihovo prodiranje u crijevni epitel (Van Zyl i sur., 2020).

2.3.3 Diacetil

Diacetil (2,3-butandion) proizvode svi rodovi BMK. Značajne količine mogu nastati u prisustvu neke organske kiseline (Šušković i sur. 1997). Antimikrobno djelovanje diacetila najbolje se očituje kada se nalazi u visokoj koncentraciji, a izraženije antimikrobno djelovanje

pokazuje prema gram-negativnim bakterijama (Šušković, 2010).

2.3.4 Bakteriocini

Bakteriocini su bioaktivne peptidne molekule antimikrobnog djelovanja (Šušković i sur., 2010) i inhibicijskog učinka na bakterije kvarenja. Različitih su spektara, načina djelovanja, molekulskih masa, genetičkih i biokemijskih svojstava (Zdolec i sur., 2005). Bakteriocini se lako razgrađuju djelovanjem proteolitičkih enzima posebice djelovanjem proteaza gastrointestinalnog trakta sisavaca zbog čega su sigurni za ljudsku uporabu (Zacharof i Lovitt, 2012).

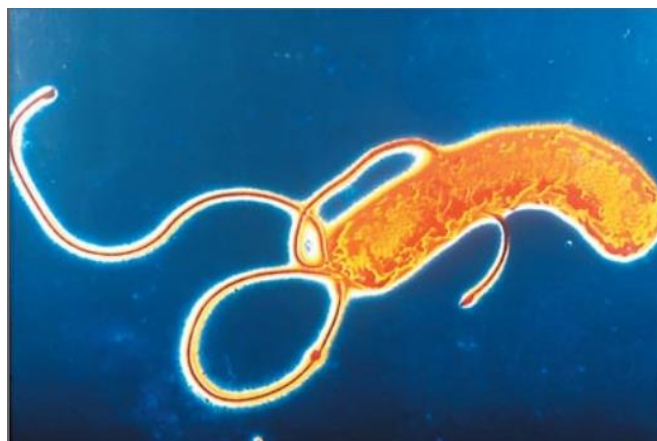
Među bakteriocinogenim BMK značajno mjesto zauzimaju vrste roda *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium* i dr. Učinak bakteriocina na gram-negativne bakterije nije moguć zbog strukture stanične stijenke G(-) bakterija, stoga bakteriocini mogu biti aktivni samo protiv gram-pozitivnih bakterija (Zdolec i sur., 2005) osim u slučaju destabilizacije stanične stijenke G(-) bakterija. Najpoznatiji bakteriocin, kojeg proizvodi bakterija mliječne kiseline *Lactococcus lactis* je nizin (Arqués i sur., 2014).

2.4 PATOGENI MIKROORGANIZMI

2.4.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori je spiralna, Gram negativna, mikroaerofilna štapićasta bakterija. Ima 4 – 7 bičeva koji se nalaze samo na jednom polu i upravo zahvaljujući njima je visoko pokretna. Duga je 3 – 5 µm i promjera 0.5 µm. Optimalna temperatura rasta 35 °C – 36 °C. Preživljava u okolišu pH vrijednosti 3 – 7 (Trogrlić, 2017). Sastavni je dio želučane mikroflore gotovo polovice svjetskog stanovništva, a prvi su ju uspješno izolirali Robin Warren i Barry Marshall 1983. iz ljudskog želuca (Kusters i sur., 2006).

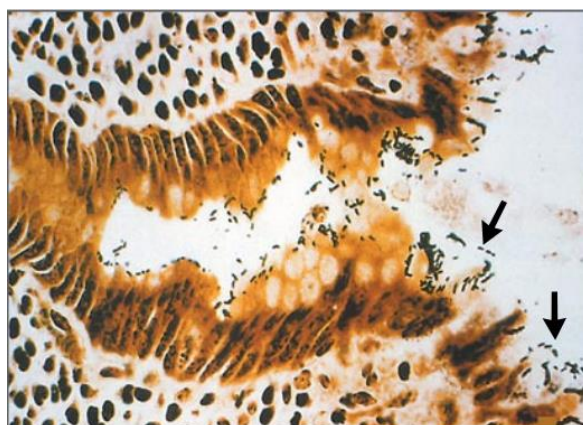
Lako se prenosi s jednog organizma na drugi, povezana je s nekoliko bolesti gastrointestinalnog sustava, a navodi se i kao glavni uzročnik gastritisa i peptičke ulkusne bolesti (Trogrlić, 2017). Postotak zaraze ovom bakterijom najveći je u slabije razvijenim državama. Može se razmnožavati pri niskom pH koji vlada u želucu zbog mogućnosti sinteze ureaze kojom neutralizira kiselo okruženje te izlučuje adhezivne proteine koji joj omogućuju da lakše prodire do crijevnog epitela domaćina (Jin i Yang, 2021).



Slika 1. Mikroskopski prikaz bakterije *H. pylori* (McColl i sur., 2010)

Dosadašnja istraživanja provedena na *H. pylori* baziraju se na slobodnom planktonskom obliku bakterije, no pokazalo se da ima mogućnost razmnožavanja i kada je vezana za neku površinu te ima formirani biofilm (Jin i Yang, 2021). *H. pylori* može narušiti i promijeniti prirodnu mikrofloru crijevnog trakta ostvarujući interakciju s ostalim mikroorganizmima u probavnom traktu (McColl i sur., 2010). Inficira sluznicu želuca te uzrokuje kronične infekcije poput kroničnog gastritisa, a dokazano ima ključnu ulogu u nastanku želučanog (MALT) limfoma i raka želuca te je 1994.g. svrstana u kancerogene prvog reda (Trogrlić, 2017).

Infekcija bakterijom *H. pylori* može se dijagnosticirati velikim brojem testova i najčešće uspješno liječiti određenim spektrom antibiotika. Međutim, sve veća upotreba antibiotika rezultira sve učestalijom pojavom bakterijske rezistentnosti, što otežava postupak liječenja (Kusters i sur., 2006).



Slika 2. Prikaz tkiva sluznice želuca inficiranog bakterijom *H. pylori* (McColl i sur., 2010)

Nedavne studije pokazale su da aktivne tvari prisutne u prirodnim proizvodima, poput

kapsaicina u ljutim papričicama, te probiotici pozitivno utječu na smanjenje infekcije nastale bakterijom *H. pylori* *in vivo* i *in vitro*. Također utječu i na smanjivanje iritacija želuca nastalih upotrebom antibiotika na način da smanjuju količinu hranjivih tvari koje trebaju bakteriji i izlučuju bakteriocine koji razaraju njen biofilm te tako postaje osjetljivija na djelovanje antibiotika (Jin i Yang, 2021).

Istraživanje koje su proveli Yin i Jang (2021) pokazalo je da na različite sojeve *H. pylori* gotovo trećina primijenjenih probiotika ima antibakterijski učinak, od kojih su značajan utjecaj imale vrste *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus helveticus* te *Lactobacillus plantarum*, a najistaknutiji učinak u razaranju biofilma primijećen je kod *L. salivarius*. Unatoč visoko razvijenim tehnologijama, još uvijek ne postoji potpuno razjašnjen mehanizam djelovanja *H. pylori* na crijevnu mikrofloru, kao niti probiotika na *H. pylori*. (Jin i Yang, 2021).

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Mikroorganizmi

- *Helicobacter pylori* DSM[®]10242[™]. Korišteni test-mikroorganizam uključen u istraživanje preuzet je iz DSMZ (The Leibniz Institute SMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH)
- Uzorak autohtonog ovčjeg sira proizveden je bez dodatka komercijalnih starter kultura, u Hrvatskoj od strane lokalnog Obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva u Istri.

3.1.2 Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava (g/l): pepton 10,0; goveđi ekstrakt 10,0; ekstrakt kvasca 5,0; glukoza 20,0; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 ; natrijev acetat 5,0 ; amonijev citrat 2,0 ; magnezijev sulfat 0,2; manganov sulfat 0,05; agar 15,0; Tween 80 1,0; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija pri 121 °C, 15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promiješan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.
- MRS bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodanog agara. Sterilizacija se provela pri 121 °C, 15 min.

3.1.3 Hranjive podloge za održavanje i uzgoj *Helicobacter pylori*

- TSB bujon (Biolife, Italija) sastava (g/l): produkti razgradnje kazeina 17; produkti peptičke razgradnje soje 3; glukoza (dekstroza) 2,5 ; NaCl 5,0; K₂HPO₄ 2,5. Konačan pH podloge pri 25 °C je 7,3.

3.1.4 Aparatura i pribor

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- denzitometar (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- plastične tubice, 2ml (Eppendorf)
- Erlenmeyerove tikvice volumena 50 i 100 mL
- filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0.22 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- laboratorijske čaše volumena 50 i 100 mL

- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm) štapići po Drigalskom
- tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- Vibromješač EV-102 (Tehtnica, **Železniki**, Slovenija)

3.1.5 Kemikalije

- etanol, 96 % (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- fetalni teleći serum (**Gibco, Waltham, MA, SAD**)
- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev hidroksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kristal-violet 1 % otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija bakterija mliječne kiseline iz autohtonog ovčjeg sira

Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka ovčjeg sira provedena je klasičnim mikrobiološkim metodama. Izvagano je 10 g uzorka sira te je uzorak usitnjen i prebačen u Erlenmeyerovu tikvicu sa staklenim kuglicama i 90 mL demineralizirane vode. Pripremljeni uzorak u Erlenmeyerovoj tikvici prenesen je na tresilicu i homogeniziran 10 min pri 150 okretaja min⁻¹ i 25 °C. Nakon homogenizacije uzorka, napravljeno je 6 decimalnih razrjeđenja suspenzije uzorka. Iz svakog razrjeđenja prebačeno je po 100 µL suspenzije uzorka na MRS agar u Petrijevoj zdjelici i po 200 µg suspenzije uzorka u 5 mL MRS bujona. Pripremljeni uzorci stavljeni su na inkubaciju u termostat na 37 °C tijekom 24 h, aerobno i anaerobno. Nakon inkubacije, po 0,1 mL porasle kulture razmazano je štapićem po Drigalskom na MRS agar te je stavljeno na inkubaciju tijekom 24 – 48 h na 37 °C aerobno i anaerobno. Nakon inkubacije, porasle pojedinačne kolonije nacijepljene su u zasebne MRS bujone, kako bi se izolirale čiste kulture, te inkubirane na 37 °C u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Nakon porasta čiste kulture su spremljene u 30 %-tni glicerol na -20 °C do korištenja.

3.2.2 Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline i *Helicobacter pylori* DSM[®]10242[™]

Stanice BMK prekončno su uzgojene u MRS bujonu, dok su stanice bakterije *H. pylori* DSM[®]10242[™] prekončno uzgojene u TSB bujonu u mikroaerofilnim uvjetima s obogaćenim CO₂. Dobivena suspenzija centrifugirana je 10 min pri 6000 okretaja min⁻¹ kako bi se

bakterijske stanice izdvojile iz suspenzije i odvojile od supernatanta. Istaložene stanice resuspendirane su u 5 mL sterilne deionizirane vode nakon čega su ponovo centrifugirane prema ranije navedenim uvjetima te je takav postupak ispiranja stanica ponovljen dva puta. U završnom postupku pripreme radne suspenzije stanica, istaložene stanice resuspendirane su u 5 mL sterilne deionizirane vode.

3.2.3 Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Broj bakterijskih stanica u uzorcima određen je naciepljivanjem decimalnih razrjeđenja uzorka na MRS agar. Nakon inkubacije, porasle kolonije na agaru su izbrojane te je izračunat broj stanica u ispitivanim uzorcima koji je izražen kao jedinice koje tvore kolonije po mililitru (CFU, eng. colony forming units).

3.2.4 Određivanje antimikrobne aktivnosti izolata prema *Helicobacter pylori* DSM[®]10242[™]

Nakon prekonocnog uzgoja u MRS bujonu, stanice BMK odvojene su od medija centrifugiranjem na 6000 okretaja min⁻¹ tijekom 10 min. Supernatanti su odvojeni te su sterilizirani filtracijom kroz 0,22 µm filtere.

Antimikrobna aktivnost supernatanta određena je na mikrotitarskoj ploči s 96 jažica prilagođenom metodom prema Kostelac (2022).

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 170 µL supernatanta bakterija mliječne kiseline, 100 µL TSB bujona s dodatkom 5 % goveđeg seruma. Inokulacija je provedena dodatkom 10 µL prekonocno uzgojene *H. pylori* u TSB bujonu s dodatkom seruma. Provedena je inkubacija na 37 °C tijekom 48 sati u mikroaerofilnim uvjetima te je u intervalu do 24 h izmjerena apsorbancija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Praćen je rast u navedenom razdoblju te je inhibicija izračunata prema izrazu:

$$\text{Inhibicija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad [1]$$

gdje je:

A_t = apsorbancija u vremenu t

A_0 = apsorbancija u vremenu 0

Kontrolni uzorci su umjesto supernatanta sadržavali neinokulirani MRS bujon tretiran isto kao i ostali uzorci, a slijepe probe bili su uzorci bez dodatka patogenih mikroorganizama.

3.2.5 Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima želuca

Određen je kontinuirani stupanj preživljavanja izolata BMK u simuliranim uvjetima želuca nakon 90 minuta inkubacije. Navedeni uvjeti simulirani su pripremom otopina kao što je opisano u radu Marques i sur. (2011) prema oznaci SS1 za simulaciju usne šupljine, te uz prilagođene koncentracije pepsina i pankreatina prema Kostelac (2022) za simulaciju uvjeta želuca.

Uvjeti koji oponašaju prirodne uvjete želuca ostvareni su otapanjem pepsina (3 gL^{-1}) u otopini sljedećih soli (gL^{-1}): NaCl 9,0, KCl 0,8946, NaH_2PO_4 0,8878, Na_2SO_4 1,680, NaHCO_3 1,680, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0,1981 te podešavanjem pH na 3,1 pomoću koncentrirane klorovodične kiseline.

3.2.6 Određivanje autoagregacijske sposobnosti bakterija mliječne kiseline

Bakterijske stanice su nakon prekonoćnog uzgoja u MRS bujonu izdvojene centrifugiranjem te je pripremljena suspenzija stanica u fosfatnom puferu pH 7,2 volumena 5 mL te je određen stupanj autoagregacije prilagođenom metodom prema Kos i sur. (2003). U uzorku koji miruje tijekom 24 h pažljivo se u odabranim intervalima uklanjao gornji sloj suspenzije te se mjerila apsorbancija pri 600 nm pomoću spektrofotometra. Apsorbancija uzoraka mjerila se intervalima od 15 min unutar 90 min. Stopa autoagregacije je izračunata prema izrazu:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100 \quad [2]$$

gdje je:

A_t – apsorbancija u vremenu t

A_0 – apsorbancija u vremenu 0

3.2.7 Određivanje sposobnosti rasta bakterije *Helicobacter pylori* prisutnosti neutraliziranog termički obrađenog supernatanta

Uzgojni medij je od stanica BMK odvojen kako je opisano u poglavlju 3.2.4., nakon čega je neutraliziran s pomoću 1M NaOH. Polovica volumena neutraliziranog uzorka termički je obrađena kuhanjem na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 5 min.

Sposobnost rasta bakterije *H. pylori* u prisutnosti neutraliziranog termički obrađenog supernatanta određena je u mikrotitarskoj ploči s 96 jažica prilagođenom metodom prema Kostelac (2022) kako je opisano u poglavlju 3.2.4.

3.2.8 Identifikacija pomoću analize fermentacijskog profila (API 50 CHL metoda)

Nakon porasta bakterijskih kultura na MRS agaru, biomasa je resuspendirana pomoću mikrobiološke ušice u API 50 CHL mediju. Postignuta gustoća suspenzije je mjerena na denzitometru te je konačna gustoća suspenzija iznosila 2 McF (eng. McFarland units). Suspenzijom su napunjene ampule API 50 CHL stripa te je dodano mineralno ulje. Nakon inkubacije (48 h, 37 °C), očitani su rezultati na način da promjena boje u ampuli iz žute u plavu znači da je došlo do fermentacije šećera što je rezultiralo zakiseljavanjem i promjenom boje bromkrezol-purpurnog indikatora. Iznimka je ampula 25 gdje se pozitivnim rezultatom smatra promjena boje iz ljubičaste u crnu. Rezultati su očitani pomoću identifikacijskog softvera Api-web™ (BioMerieux, Francuska).

3.2.9 Statistička obrada podataka

Rezultati eksperimanata su izraženi kao srednje vrijednosti ponovljenih eksperimenata \pm standardna devijacija. Statističke razlike među ponavljanjima određene su t-testom. Usporedbe među grupama provede su ANOVA testom. Statistička značajnost podešena je na $p < 0,05$ i sve usporedbe rađene su pomoću programa STATISTICA 14.0.0.15 (Tibco, Palo Alto, SAD).

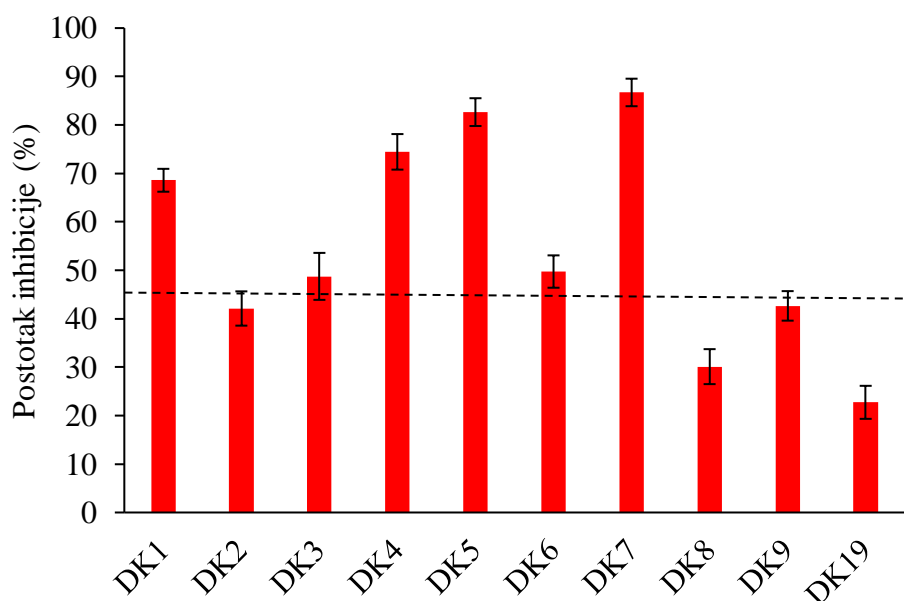
4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je izolacija BMK iz autohtonog ovčjeg sira te je ispitana sposobnost izolata u inhibiciji patogene bakterije *H. pylori*. Nakon primarnog određivanja sposobnosti izolata da prežive stresne uvjete želuca, detaljno je ispitan način antagonističkog djelovanja na spomenutu patogenu bakteriju. Izolati s najvećim antagonističkim potencijalom su identificirani pomoću biokemijskog fermentacijskog profila.

4.1 Izolacija i identifikacija bakterija mliječne kiseline iz uzorka ovčjeg sira

Uspješno je izolirano deset sojeva BMK iz uzoraka ovčjeg sira. Izolirani sojevi označeni su oznakom DK te numerirani od 1 do 10. Nakon provedene izolacije, sojevi su pohranjeni u Zbirku mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Tradicionalni sirevi su i ranije prepoznati kao potencijalan izvor BMK sa probiotičkim potencijalom (Mohammed i Çon, 2021; Abdi i sur., 2006, Jabbari i sur., 2017). Kako su probiotička svojstva ovisna o pojedinom soju iznimno je važno pravilno okarakterizirati sve dobivene izolate kako bi se otkrila prisutnost onih sojeva koji potencijalno imaju probiotička svojstva.

Kako bi se odredila sposobnost dobivenih izolata da inhibiraju *H. pylori*, ispitana je sposobnost rasta navedene patogene bakterije u prisutnosti supernatanta kulture izolata BMK izoliranih iz uzorka ovčjeg sira. Rezultati iskazani kao postotak inhibicije prikazani su na slici 3.

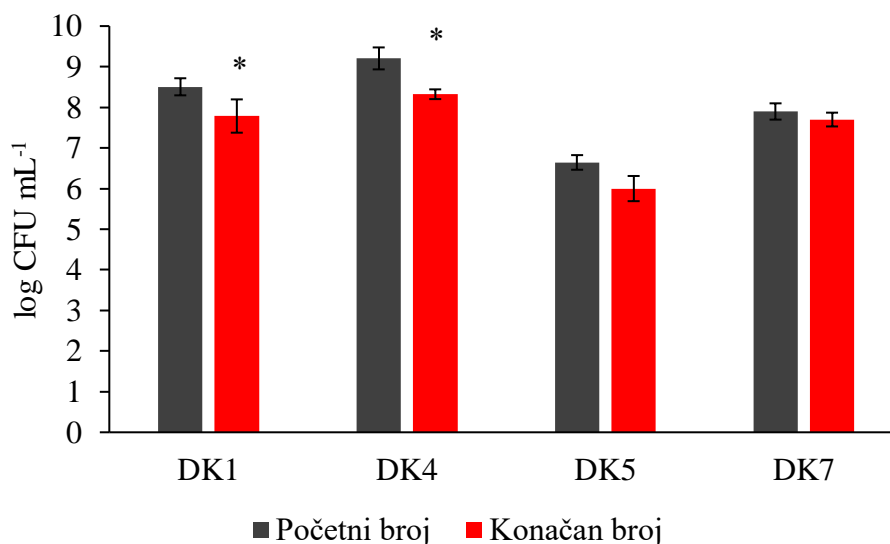


Slika 3. Inhibicija rasta bakterije *H. pylori* DSM[®]10242[™] u prisutnosti supernatanta kulture izolata BMKe izoliranih iz ovčjeg sira. Rezultati inhibicije prikazani su kao postotak \pm standardna devijacija. Isprekidana linija označava zadani zadovoljavajući stupanj inhibicije veći od 50 %

Iz rezultata je vidljivo da su svi ispitani izolati pokazali određeni stupanj inhibicije *H. pylori*, a razine inhibicije značajno variraju među pojedinim sojevima. S ciljem lakše interpretacije rezultata u ovom eksperimentu zadana je granična linija od 50 % inhibicije te se smatra kako su izolati koji su inhibirali *H. pylori* na razini višoj od zadane iskazali izraženi probiotički potencijal. Obzirom na navedeno, izolati DK1, DK4, DK5 i DK7 pokazali su najbolja inhibicijska svojstva od ispitivanih sojeva te su odabrani za daljnju analizu.

Inhibitorna aktivnost supernatanta kulture BMK, osobito pripadnika roda *Lactobacillus* primijećena je i u ranijim studijama (Hamilton-Miller, 2003). Pripadnici roda *Lactobacillus* proizvode relativno visoke količine mliječne kiseline koja je smatra jednim od načina inhibicije patogenih bakterija, pa tako i *H. pylori* (Kamiya i sur., 2019).

Kako bi se osigurala interakcija probiotika i patogenih bakterija, probiotici moraju u dovoljnom broju aktivno djelovati na željenom mjestu u domaćinu. Obzirom na ciljeve ovog rada i istraživanje interakcija potencijalnih probiotika s *H. pylori*, određena je sposobnost preživljavanja izolata BMK koji su zadovoljili 50 % inhibicije u prethodnom eksperimentu (DK1, DK4, DK5 i DK7) u simuliranim uvjetima želuca. Preživljenje nakon 90 minuta izlaganja uvjetima želuca prikazano je na slici 4.

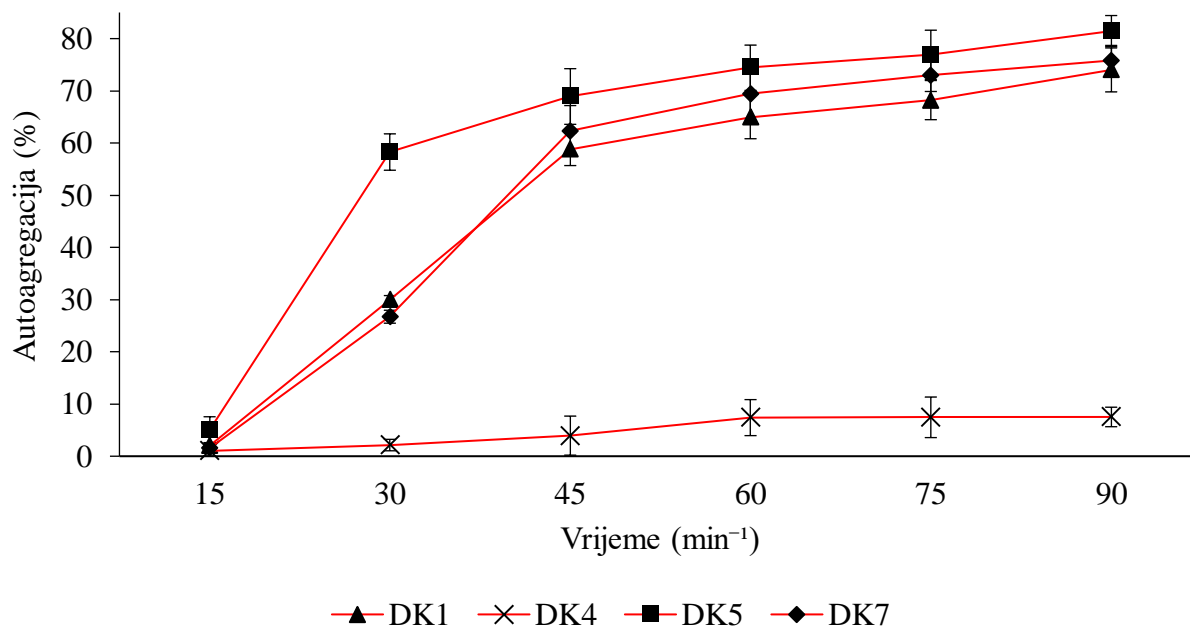


Slika 4. Preživljenje izolata BMK izoliranih iz ovčjeg sira tijekom 90 minuta izlaganja simuliranim uvjetima želuca. Rezultati su prikazani kao logaritam broja stanica po mililitru suspenzije ± standardna devijacija (*statistički značajno različito od početnog broja, $p < 0,05$)

Izolati DK5 i DK7 nisu pokazali značajno smanjenje broja nakon izlaganja opisanim uvjetima, dok je kod izolata DK1 i DK4 došlo do pada broja stanica u razini jedne logaritamske jedinice. Ako se dobiveni rezultati za izolate DK1 i DK4 usporede sa sličnom studijom 90 minutnog izlaganja probiotika uvjetima želuca gdje je došlo do pada broja od 4,6 logaritamskih jedinica (Afzaal i sur., 2020). može se smatrati kako izolati iskazuju umjerenu do značajnu sposobnost preživljenja. Visok stupanj preživljenja izolata BMK roda *Lactobacillus* primijećen je i u istraživanju Fonseca i sur. (2021) gdje je 18 od 19 izolata pokazalo stupanj preživljenja veći od 81 %. Smatra se kako je sposobnost preživljavanja BMK u stresnim uvjetima gastrointestinalnog trakta intrinzično svojstvo koje ovisi o osjetljivosti pojedinog soja na niski pH i na prisutnost žučnih soli (Curto i sur., 2011). Također, otpornost pojedinih sojeva na navedene uvjete također ovisi i o fazi rasta, fiziološkom stanju mikroorganizma te drugim, ne do kraja razjašnjenim mehanizmima.

Osim sposobnosti preživljenja u uvjetima na ciljanom mjestu djelovanja, važna je sposobnost zadržavanja probiotičkih bakterija na željenom mjestu te onemogućavanje kolonizacije patogena. Jedan od načina onemogućavanja kolonizacije patogena je adhezija na epitel čime se onemogućava prodor ili stvaranje patogenih biofilmova što u konačnici rezultira smanjenjem patogenosti. U ovom je radu ispitana sposobnost autoagregacije u simuliranim uvjetima želuca za 4 izolata koja su pokazala najbolju sposobnost inhibicije (DK1, DK4, DK5

i DK7) u simuliranim uvjetima želuca te su rezultati prikazani na slici 5.



Slika 5. Sposobnost autoagregacije izolata BMK u simuliranim uvjetima želuca tijekom 90 minuta inkubacije prikazana kao postotak \pm standardna devijacija

Iz rezultata je vidljivo kako najveću sposobnost autoagregacije iskazuje soj DK5, dok sojevi DK1 i DK7 imaju nešto nižu sposobnost autoagregacije u rasponu od 74 do 76 %. Najniži stupanj autoagregacije pokazao je izolat DK4 čiji postotak iznosi manje od 10 %.

Sposobnost autoagregacije, odnosno nakupljanja bakterijskih stanica istog soja BMK, iznimno je važna zato što povećava mogućnost vezanja probiotika za crijevni epitel te omogućuje probiotičkim sojevima lakšu integraciju u autohtonu mikrofloru gastrointestinalnog sustava. Posljedično tomu, probiotici štite gastrointestinalni sustav domaćina tako što se natječu s patogenima za supstrat i mjesto vezanja (Xu i sur., 2009). Široki raspon autoagregacijske sposobnosti primijećen je i u istraživanju Bautista-Gaullego i sur. (2013) gdje je na velikom broju izolata primijećen raspon autoagregacije od 10 do preko 90 %. Autoagregacija je jedan od korisnih parametara za detekciju sojeva s dobrim adhezijskim svojstvima te je pokazano kako izolati koji dobro adheziraju također pokazuju visoki stupanj autoagregacije Bautista-Gaullego i sur. (2013).

Obzirom na dobivene rezultate, izdvojeni su visoko agregativni izolati DK1, DK5 i DK7 te su prije dodatnih ispitivanja identificirani API 50 CHL testom. API testom dobiveni su

fermentacijski profili sva tri izolata (tablica 2), čijom su analizom sojevi DK1 i DK7 identificirani kao *Latilactobacillus curvatus* s postotkom identifikacije $\geq 99,7\%$, dok je soj DK5 identificiran kao *Lacticaseibacillus paracasei* s postotkom $\geq 99,9\%$ (tablica 3).

Tablica 2. Fermentacijski profili bakterijskih izolata iz autohtonog ovčjeg sira (DK1, DK5 i DK7) dobiveni API 50 CHL testom

Ugljikohidrati	DK1	DK5	DK7
Kontrola	-	-	-
Glicerol	-	-	-
Eritriol	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-
L-arabinoza	-	-	-
Riboza	+	+	+
D-ksiloza	-	-	-
L-ksiloza	-	-	-
Adonitol	-	-	-
β -metil-ksilozid	-	-	-
Galaktoza	+	+	+
D-glukoza	+	+	+
D-fruktoza	+	+	+
D-manoza	+	+	+
L-sorboza	-	+	-
Ramnoza	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inozitol	-	+	-
Manitol	+	+	+
Sorbitol	-	+	-
α -metil-D-manozid	-	-	-
α -metil-D-glukozid	+	-	+
N-acetil glukozamin	+	+	+
Amigdalín	-	-	-
Arbutin	-	+	-
Eskulin	+	+	+
Salicin	+	+	+
Celobioza	+	+	+

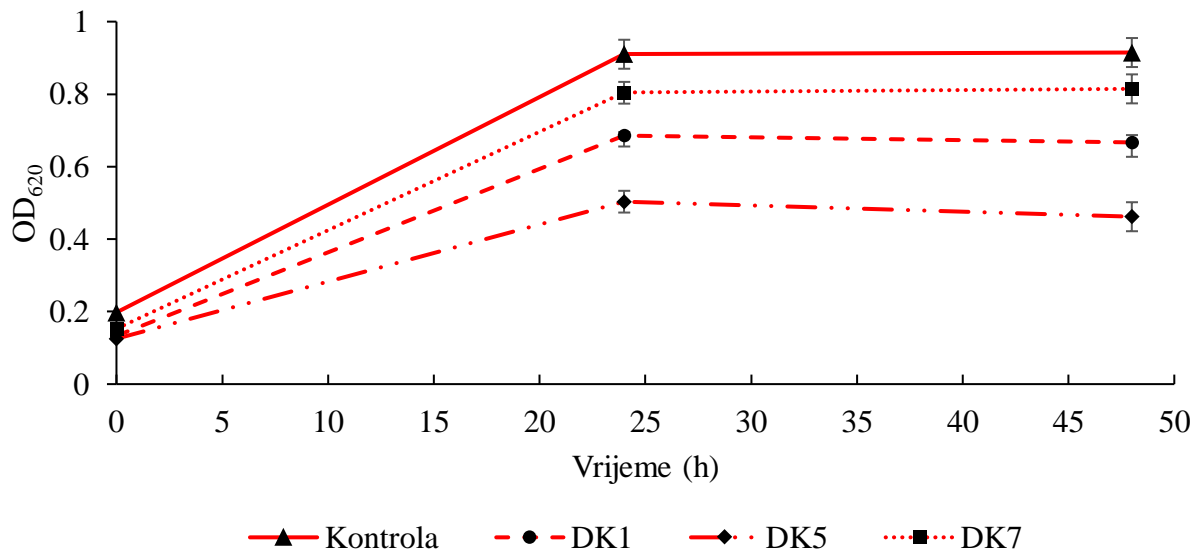
Tablica 2. Fermentacijski profili bakterijskih izolata iz autohtonog ovčjeg sira (DK1, DK5 i DK7) dobiveni API 50 CHL testom – *nastavak*

Maltoza	+	+	+
Laktoza	+	+	+
Melibioza	-	-	-
Saharoza	-	+	-
Trehaloza	+	+	+
Inulin	-	+	-
Melezitoza	+	+	+
D-rafinosa	-	-	-
Amidon	-	-	-
Glikogen	-	-	-
Ksilitol	-	-	-
β -gentobioza	-	+	-
D-turanoza	-	+	-
D-liksoza	-	-	-
D-tagatoza	+	+	+
D-fukoza	-	-	-
L-fukoza	-	-	-
D-arabitol	-	-	-
L-arabitol	-	-	-
Glukonat	-	+	-
2-keto-glukonat	-	-	-
5-keto-glukonat	-	-	-

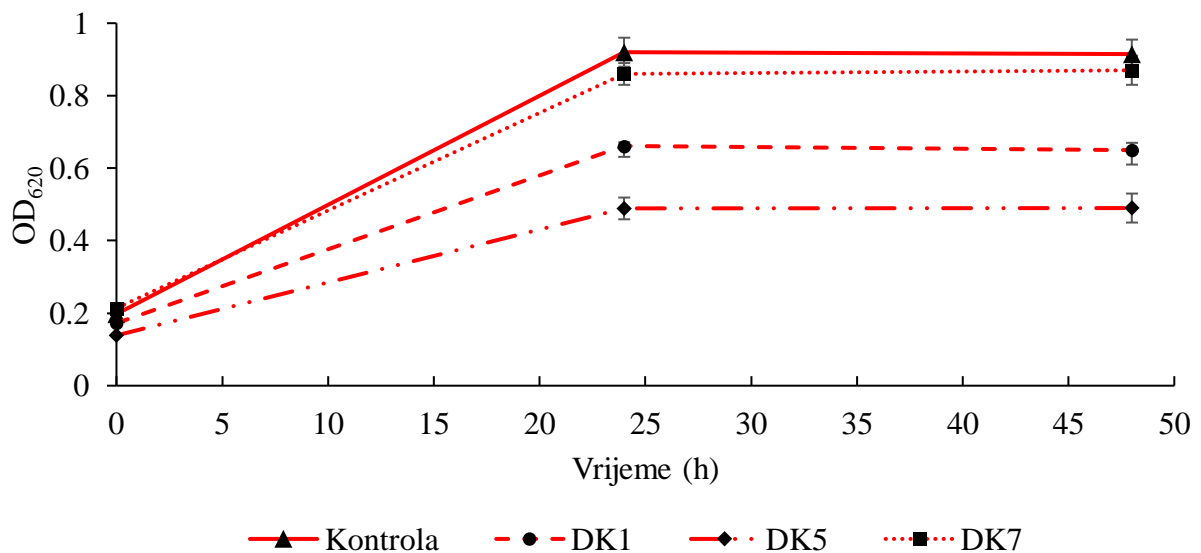
Tablica 3. Rezultati API 50 CHL biokemijske identifikacije BMK izolata iz ovčjeg sira

Oznaka soja	Rezultat	Postotak identifikacije
DK1	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	99,7
DK5	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	99,9
DK7	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	99,7

Kako bi se dodatno istražila antagonistička svojstva sojeva DK1, DK5 i DK7 određena je antimikrobna aktivnost neutraliziranih i termički inaktiviranih supernatanta kulture BMK na rast *H. pylori*. Rezultati su prikazani na slikama 6 i 7.



Slika 6. Sposobnost rasta bakterije *H. pylori* DSM[®]10242[™] u prisutnosti neutraliziranog supernatanta izolata BMK iz ovčjeg sira tijekom 48 h inkubacije. Rezultati su prikazani kao optička gustoća na 620 nm ± standardna devijacija



Slika 7. Sposobnost rasta bakterije *H. pylori* DSM[®]10242[™] u prisutnosti neutraliziranog i termički obrađenog supernatanta izolata BMK iz ovčjeg sira tijekom 48 h inkubacije. Rezultati su prikazani kao optička gustoća na 620 nm ± standardna devijacija

Sva tri ispitana soja pokazala su značajan gubitak inhibitorne aktivnosti u usporedbi s originalnim supernatantom u početnom eksperimentu antimikrobne aktivnosti. Nakon neutralizacije inhibitorna aktivnost primijećena je kod sva tri soja, a najmanja sposobnost rasta *H. pylori* zabilježena je kod supernatanta soja DK5. Nakon neutralizacije i termičke obrade, inhibicija rasta nije bila statistički značajna za soj DK7 dok su sojevi DK1 i DK5 zadržali inhibitornu aktivnost.

Navedeni rezultati ukazuju kako sva tri ispitana soja antimikrobno aktivnost prema *H. pylori* iskazuju višestrukim mehanizmima, a ne isključivo sniženjem pH. Navedeno proizlazi iz usporedbe rezultata prikazanih na slici 3 i slici 6 gdje je nakon neutralizacije uočena i dalje značajna inhibicija rasta ispitivanog patogena. Nakon termičke obrade, inhibicija je zadržana u prisutnosti supernatanta kulture DK1 i DK5 što otvara mogućnost temostabilnih antimikrobnih molekula uključenih u inhibiciju. Antimikrobna aktivnost *L. paracasei* prema *H. pylori* i ranije je primijećena u radu Hong i sur. (2018). Eksperimentima na laboratorijskim miševima također je dokazano da bakterija *L. paracasei* inhibira prijanjanje *H. pylori* na crijevni epitel te za 50 % suzbija infekciju kada je probavni trakt već koloniziran patogenom *H. pylori* (Hong i sur., 2018). Višestruki mehanizmi ispoljavanja antagonističkih svojstava probiotičkih bakterija otprije su poznati, a neki od istaknutijih antimikrobnih metabolita su bakteriocini, diacetil, organske kiseline i vodikov peroksid (Ashokkumar i sur., 2011).

U istraživanju Ashokkumar i sur. (2011), soj *L. paracasei* je već ranije uspješno izoliran iz magarećeg mlijeka te je podvrgnut testiranju na prisutne bakteriocine, peptide koji pokazuju letalno djelovanje prema sojevima bakterija različitim od soja producenta, koji su izloženi odabranim kliničkim patogenima *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, i *Pseudomonas aeruginosa* na koje su bakteriocini *L. paracasei* pokazivali značajnu inhibicijsku aktivnost.

Nadalje, Chen i sur. (2020) navode kako *L. curvatus* ima izvrsno bakteriocinogeno djelovanje zbog proizvodnje više vrsta bakteriocina te ima vrlo dobro razvijen metabolizam ugljikohidrata. Opisani bakteriocini koje proizvodi bakterija *L. curvatus* tolerantni su na široki spektar pH i temperatura. Kurvacin A prvi je bakteriocin koji je identificiran i okarakteriziran iz soja bakterije *L. curvatus*. Kurvacin A relativno je malen peptid koji se sastoji od svega 38-41 aminokiselinska ostatka te sadrži N-terminalan alanin. Pepsin, koji je u ovom radu korišten u pripremi simuliranih uvjeta želuca, ne razgrađuje kurvacin A (Chen i sur. 2020).

Obzirom na dobivene rezultate može se smatrati kako izolirani sojevi *L. curvatus* DK1 i *L. paracasei* DK5 pokazuju značajna probiotička svojstva i potencijalnu mogućnost primjene u smanjenju patogeneze uzrokovane patogenom *H. pylori*. Rezultati također potvrđuju kako su autohtoni fermentirani proizvodi potencijalan izvor probiotičkih bakterija sa specifičnim svojstvima čije se mehanizme djelovanja treba sustavno istražiti i opisati.

5. ZAKLJUČCI

1. Uspješno je izolirano 10 izolata bakterija mliječne kiseline iz uzoraka autohtonog ovčjeg sira.
2. Izolati DK1, DK4, DK5 i DK7 značajno su inhibirali rast patogene bakterije *H. pylori* s postotkom višim od 50 %.
3. Izolati DK1, DK4, DK5 i DK7 pokazali su visoku sposobnost preživljenja u simuliranim uvjetima želuca čime je ostvaren preduvjet ispoljavanja probiotičkih učinaka na ciljanom mjestu u domaćinu.
4. Izolati DK1, DK5 i DK7 iskazali su visok stupanj autoagregacije, jednog od ključnih parametara u detekciji sojeva s potencijalom adhezije.
5. Uspješno je provedena biokemijska identifikacija odabranih izolata te su sojevi identificirani kao: *Latilactobacillus curvatus* DK1, *Lacticaseibacillus paracasei* DK5 i *Latilactobacillus curvatus* DK7 s visokim postotkom identifikacije.
6. Sojevi *Latilactobacillus curvatus* DK1 i *Lacticaseibacillus paracasei* DK5 pokazuju značajan stupanj inhibicije *H. pylori* i nakon neutralizacije i termičke obrade supernatanta kulture što ukazuje na višestruke mehanizme ispoljavanja antimikrobne aktivnosti.

6. LITERATURA

Abdi R, Sheikh-Zeinoddin M, Soleimani-Zad S (2006) Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. *Pak J Biol Sci* **9**, 99-103.

Afzaal M, Khan AU, Saeed F, Arshad MS, Khan MA, Saeed M, Anjum FM (2020) Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. *Food Science & Nutrition* **8**(3), 1649-1656.

Arqués JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M (2015) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed research international* **2015**(22), 1.9.

Ashokkumar S, Sree Krishna R, Pavithra V, Hemalatha V, Priya I (2011) Production and antibacterial activity of bacteriocin by *Lactobacillus paracasei* isolated from donkey milk. *Int. J. Current Sci* **1**, 109 – 115

Bautista-Gallego J, Arroyo-López FN, Rantsiou K, Jiménez-Díaz R, Garrido-Fernández A, Cocolin L (2013) Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International* **50**(1), 135-142.

Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology* **28**(4), 281-370.

Chen Y, Yu L, Nanzhen Q, Xiao Y, Fengwei T, Jianxin Z, i sur. (2020) *Lactilactobacillus curvatus*: a candidate probiotic with excellent fermentation properties and health benefits. *Foods* **9**, 1366.

Chuang LC, Huang CS, Ou-Yang LW, Lin SY (2011) Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. *Clin Oral Invest* **15**(4), 471–476.

Collins MD, Phillips BA, Zannoni P (1989) Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **39**(2), 105-108.

Curto AL, Pitino I, Mandalari G, Dainty JR, Faulks RM, Wickham MSJ (2011) Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiology* **28**(7), 1359-1366.

FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 1–11.

Fonseca HC, de Sousa Melo D, Ramos CL, Dias DR, Schwan RF (2021) Probiotic properties of lactobacilli and their ability to inhibit the adhesion of enteropathogenic bacteria to Caco-2 and HT-29 cells. *Probiotics and antimicrobial proteins* **13**(1), 102-112.

Gregurek Lj (1999) Antimikrobno i antimutageno djelovanje probiotika. *Mljekarstvo* **49**(4), 255-260.

Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR (2010) Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **76**(1), 298–304.

Halloran K, Underwood MA (2019) Probiotic mechanisms of action. *Early human development* **135**, 58-65.

Hamilton-Miller JMT (2003) The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International journal of antimicrobial agents* **22**(4), 360-366.

Hong SS, Lee HA, Kim JY, Jeong JW, Shim JJ, Lee JL, i sur. (2018) In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus paracasei* HP7. *Laboratory Animal Research* **34**(4), 216-222.

Jabbari V, Khiabani MS, Mokarram RR, Hassanzadeh AM, Ahmadi E, Gharenaghadeh S, i sur. (2017) *Lactobacillus plantarum* as a probiotic potential from kouzeh cheese (traditional Iranian cheese) and its antimicrobial activity. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **9**(2), 189-193.

Jin F, Yang H (2021) Effects of *Lactobacillus salivarius* LN12 in Combination with amoxicillin and clarithromycin on *Helicobacter pylori* biofilm in vitro. *Microorganisms* **9**(8), 1611.

Kamiya S, Yonezawa H, Osak, T (2019) Role of probiotics in eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter pylori in Human Diseases* 243-255.

Khare A, Thorat G, Bhimte A, Yadav V (2018) Mechanism of action of prebiotic and probiotic. *Immunity* **3**, 27-27.

Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T (2005) Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology* **22**(6), 497–504.

Kos BVZE, 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**(6), 981-987.

Kostelac D (2022) Formulacija i razvoj višeslojno mikroinkapsuliranoga probiotika s ciljanim učincima na zdravlje (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kostelac D, Gerić M, Gajski G, Frece J (2022) Probiotic and paraprobiotic derivatives exhibit anti-inflammatory and genoprotective effects in induced stress. *Journal of Applied Microbiology*

Kostelac D, Gerić M, Gajski G, Markov K, Domijan AM, Čanak I, i sur. (2021) Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal* **112**, 104828.

Kršev Lj (1996) Utjecaj bakterija mliječne kiseline na zdravlje ljudi. *Mljekarstvo* **46**(1), 57-65.

Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews* **19**(3), 449–490.

Leis R, de Castro MJ, de Lamas C, Picáns R, Couce ML (2020) Effects of prebiotic and probiotic supplementation on lactase deficiency and lactose intolerance: a systematic review of controlled trials. *Nutrients* **12**(5), 1487.

Lopez-Santamarina A, Gonzalez EG, Lamas A, Mondragon ADC, Regal P, Miranda JM (2021) Probiotics as a possible strategy for the prevention and treatment of allergies. a narrative review. *Foods* **10**(4), 701.

Marques MRC, Loebenberg R, Almukainzi M (2011) Simulated Fluids. *Dissolution Technologies* **18**(3), 15–28

McColl KEL (2010) *Helicobacter pylori* Infection. *New England Journal of Medicine* **362**(17), 1597–1604.

Mohammed S, Çon AH (2021) Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria from traditional cheese. *LWT* **152**, 112319.

Oak SJ, Jha R (2018) The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1–9.

Obadić V (2018) Antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Reale A, Di Renzo T, Rossi F, Zotta T, Iacumin L, Preziuso M, i sur. (2015) Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. *LWT - Food Science and Technology* **60**(2), 721-728.

Rogelj I (1994) Bakterije mliječne kiseline kao probiotici. *Mljekarstvo* **44**(4), 277 – 284.

Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Tvede M, i sur. (2002) Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **21**(5), 417–419.

Rupčić M (2016) Antimikrobno djelovanje autohtone mikrobne populacije izolirane iz riba i školjkaša Jadranskog mora (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Sanap D, Garje M, Godge G (2019) Probiotics, their Health Benefits and Applications for Development of Human Health: A Review introduction. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* **9**(4-s), 631–640.

Shoukat S (2020) Potential anti-carcinogenic effect of probiotic and lactic acid bacteria in detoxification of benzo [a] pyrene: A review. *Trends in Food Science & Technology* **99**, 450-459.

Sui Y, Liu J, Liu Y, Wang Y, Xiao Y, Gao B, i sur. (2021) In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus* strains from fermented tangerine vinegar and their cholesterol degradation activity. *Food Bioscience* **39**, 100843.

Šušković J, Brkić B, Matošić S (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**(1), 57-73.

Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc A, Habjanič K, Matošić S (2010) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology* **48**(3), 296-307.

Šušković J, Kos B, Frece J, Beganović J, Pavunc AL (2009) Probiotic Concept-probiotics as food supplements and probiotics as biotherapeutics. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**(3-4), 77-84.

Trogrlić J (2017) Utjecaj probiotika i prehrane na infekciju bakterijom *Helicobacter pylori* (doktorski rad), Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Van Zyl WF, Deane SM, Dicks LM (2020) Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes* **12**(1), 1831339.

Williams NT (2010) Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* **67**(6), 449–458.

Xu H, Jeong HS, Lee HY, Ahn J (2009) Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Lett. Appl. Microbiol* **49**(4), 434 – 442.

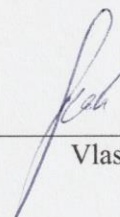
Zacharof MP, Lovitt RW (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia* **2**, 50–56.

Zdolec N, Hadžiosmanović M, Kozačinski L, Filipović I (2005) Utjecaj bakteriocina na mikrobiološku kakvoću fermentiranih kobasica. *Meso* **7**(3), 43-47.

Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CM, Harris HM, Mattarelli P, i sur. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **70**(4), 2782-2858.

Izjava o izvornosti

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.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized, cursive script that appears to be the initials 'Rab'.

Vlastoručni potpis