

# Formulacija i razvoj višeslojno mikroinkapsuliranoga probiotika s ciljanim učincima na zdravlje

---

**Kostelac, Deni**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**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:159:929676>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Deni Kostelac

**FORMULACIJA I RAZVOJ VIŠESLOJNO  
MIKROINKAPSULIRANOGA  
PROBIOTIKA S CILJANIM UČINCIMA NA  
ZDRAVLJE**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Deni Kostelac

**FORMULATION AND DEVELOPMENT  
OF A MULTI-LAYERED,  
MICROENCAPSULATED PROBIOTIC  
WITH TARGETED HEALTH  
EFFECTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Jadranka Frece, Full Professor

Zagreb, 2022

*Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jadranke Frece. Eksperimenti na izoliranim ljudskim stanicama provedeni su u Jedinici za mutagenezu na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, a masena spektrometrija protuupalnih metabolita provedena je u Laboratoriju za bioanalitiku na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.*

*Tema doktorskog rada pod naslovom „Formulacija i razvoj višeslojno mikroinkapsuliranoga probiotika s ciljanim učincima na zdravlje“ prihvaćena je na sjednici Fakultetskog Vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu održanoj 28. rujna 2021. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 16. studenog 2021.*

*Informacije o mentoru:* prof. dr. sc. Jadranka Frece

Prof. dr. sc. Jadranka Frece rođena je u Zagrebu, 27. ožujka 1974. godine. Diplomirala je 1997. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2003. stekla je akademski stupanj magistra biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija. Akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti, stekla je 2007. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjeluje u izvođenju predmeta: Mikrobiologija, Mikrobiologija namirnica, Bakteriologija, Mikologija, Mikrobiologija hrane i Mikrobni indikatori u kontroli kvalitete hrane na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Zvanje izvanredne profesorice stječe 24. siječnja 2012. godine, redovite profesorice u travnju 2016., a redovite profesorice u trajnom zvanju 2021. Usavršavala se na Biotehniškoj fakulteti Univerza v Ljubljani, Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu te na Karl-Franzens-University u Grazu. Koautorica je pet sveučilišnih udžbenika, jedne znanstvene knjige te devet poglavlja u znanstvenim knjigama i tri poglavlja u udžbenicima, a pod njenim mentorstvom izrađeno je 27 diplomskih i 20 završnih radova i obranjena četiri doktorska rada. Pod njenim mentorstvom također je izrađen jedan magistarski rad i dva magistarska specijalistička rada. Prof. dr. sc. Jadranka Frece je bila članica znanstvenog i organizacijskog odbora mnogih znanstvenih međunarodnih kongresa. Glavna je urednica časopisa Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition. Znanstvena istraživanja vezana su uz područje opće i primjenjene mikrobiologije, mikrobnog kvarenja hrane i antimikrobne aktivnosti prirodnih biokonzervansa u zaštiti hrane. Recentna znanstvena istraživanja obuhvaćaju identifikaciju i karakterizaciju probiotičkih i autohtonih funkcionalnih starter kultura i njihovu proizvodnju za fermentirane proizvode. Rezultati istraživanja zaštićeni su u 3 nacionalna patenta. Objavila je ukupno 105 znanstvenih radova te desetak stručnih radova. Dobitnica je Državne nagrade za znanost za 2014. godinu te mnogih drugih nagrada za znanstveni doprinos i inovacije (ARCA 2007. i 2021.) Prof. dr. sc. Jadranka Frece bila je prodekanica za znanstveno-istraživački rad Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od 2011.-2015. godine. Ponovno je 2015. godine izabrana za Prodekanicu za znanost PBF-a, a 2019. izabrana je za Dekanicu PBF-a. Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Hrvatskog mikrobiološkog društva te član suradnik u Odjelu za bioproceno inženjerstvo, Akademije tehničkih znanosti Hrvatske (HATZ).

## **ZAHVALA**

*Od srca se zahvaljujem mojoj mentorici profesorici Jadranki Frece na bezrezervnoj podršci, savjetima i usmjeravanju tijekom proteklih pet godina. Hvala na stalnom ohrabrivanju i motiviranju, nesebičnom prijenosu neprocjenjivog znanja te znanstvenih ali i životnih iskustava.*

*Veliko hvala profesorici Kseniji Markov na podršci, konstruktivnim savjetima te brizi i toplini koju svakodnevno donosi u naš Laboratorij.*

*Posebno se zahvaljujem mojim dragim kolegama Ivi Čanak i Željku Jakopoviću što su mi stalan oslonac, prijatelji i najzabavniji cimeri te zato što radno okruženje čine vrlo zabavnim mjestom.*

*Hvala dragim kolegicama Ines Kuk i Vesni Jurišević na pomoći, podršci i ugodnoj svakodnevnici.*

*Hvala svim kolegama sa Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na susretljivosti te prijateljskom i kolegijalnom odnosu.*

*Veliko hvala kolegama Marku Geriću i Goranu Gajskom s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada s kojima surađujem od svog prvog dana u znanosti. Hvala na svim savjetima, pomoći, motivaciji i izuzetnoj nesebičnosti. Hvala i kolegici Katarini Matković koja se vrlo brzo uključila u našu suradnju te mi uvelike pomogla u razumijevanju kompleksnih podataka.*

*Hvala dragoj kolegici Emi Svetličić što mi je pokazala put u neka nova područja znanosti te što se s entuzijazmom uključila u moja istraživanja te brzo i precizno provela analizu uzoraka na Institutu Ruđer Bošković.*

*Svim dragim prijateljima hvala na nezaboravnim trenucima, brizi i ohrabrivanju.*

*Najveće hvala mojoj obitelji mami Vesni, tati Svemiru, baki Mariji i teti Željki na savršenom djetinjstvu i prekrasnom životu. Hvala na svim odricanjima, brizi i neizmjerne podršci u tome da ostvarim ono što želim. Svih ovih godina sa mnom ste nosili moj teret, slavili moje uspjehe i svaki me dan usmjeravate prema zvijezdama, no znajte da meni ono najsajnije nije na nebu, nego kada pogledam vas.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 573.4:579.84:579.864:613.287.6(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### FORMULACIJA I RAZVOJ VIŠESLOJNO MIKROINKAPSULIRANOGA PROBIOTIKA S CILJANIM UČINCIMA NA ZDRAVLJE

Deni Kostelac, mag. ing. biotechn.

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Mentor:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

#### Kratki sažetak

U ovom radu provedena je izolacija bakterija mliječne kiseline iz mlijeka magarice i kobile, stolice zdravog dojenčeta te je formirana baza izolata kojima je pridodan soj prethodno izoliran iz fermentirane sirutke. Bakterijski sojevi identificirani su i podvrgnuti sustavnoj probiotičkoj karakterizaciji kako bi se izdvojili sojevi s potencijalom u zaštiti zuba i usne šupljine, inhibicijom *Helicobacter pylori*, protuupalnom i antioksidativnom aktivnošću. Bakterijski izolati iz mlijeka magarice i kobile pokazali su značajnu inhibiciju i koagregaciju s uzročnicima karijesa, gingivitisa i parodontitisa te izraženu protuupalnu aktivnost blokirajući upalnu signalizaciju ljudskih mononuklearnih stanica i proizvodnju proupalnog citokina TNF- $\alpha$  u uvjetima upale. Izolati iz stolice dojenčeta pokazali su inhibitorni potencijal prema patogenoj bakteriji *H. pylori* dok je *Lactobacillus plantarum* S1, izoliran iz sirutke, pokazao sposobnost smanjenja oksidativnog stresa u okolini djelujući protektivno na DNA ljudskih mononuklearnih stanica u uvjetima oksidativnog stresa. Navedeni izolati uklopljeni su u višeslojni mikroinkapsulat koji je razvijen korištenjem dvaju neškodljivih polimera alginata i kitozana te je razvijena troslojna kapsula formirana tako da na ciljanom mjestu otpušta sojeve čija je aktivnost potrebna u ustima, želudcu i crijevima.

**Broj stranica:** 144

**Broj slika:** 25

**Broj tablica:** 26

**Broj literaturnih navoda:** 308

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** probiotici, *Lactobacillus*, protuupalno, antioksidativno, mikroinkapsulacija

**Datum obrane:** 07. travnja 2022.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Ksenija Markov
2. prof. dr. sc. Jasna Novak
3. dr. sc. Marko Gerić, znanstveni suradnik
4. prof. dr. sc. Anita Slavica (zamjenski član)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice 4 i u Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

PhD thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate University Doctoral Study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 573.4:579.84:579.864:613.287.6(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### FORMULATION AND DEVELOPMENT OF A MULTI-LAYERED, MICROENCAPSULATED PROBIOTIC WITH TARGETED HEALTH EFFECTS

Deni Kostelac, MSc

Thesis performed in Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

Supervisor: PhD Jadranka Frece, Full Professor

#### Short abstract

In this study, lactic acid bacteria were isolated from donkey and mare milks and from the feces of a healthy infant, and a base of isolates was formed to which a strain previously isolated from fermented whey was added. The bacterial strains were identified and subjected to systematic probiotic characterization in order to detect the strains with the potential for dental and oral protection, *Helicobacter pylori* inhibition, anti-inflammatory and antioxidant activities. Bacterial isolates from donkey and mare milk showed significant inhibition and coaggregation with pathogens associated with caries, gingivitis, and periodontitis, and exhibited high anti-inflammatory activity by blocking inflammatory signaling of human mononuclear cells and the production of proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  under inflammatory conditions. The isolates from infant feces showed inhibitory potential against the pathogenic bacterium *H. pylori*, while *Lactobacillus plantarum* S1 isolated from whey showed the ability to reduce oxidative stress in the environment by protecting the DNA of human mononuclear cells under oxidative stress. These isolates were incorporated into a multilayer microcapsule developed using two innocuous polymers (alginate and chitosan). This resulted in a three-layer capsule that releases the strains at the target site, whose activity is required in the mouth, stomach, and intestine.

**Number of pages:** 144

**Numer of figures:** 25

**Number of tables:** 26

**Number of references:** 308

**Original in:** Croatian

**Keywords:** probiotics, *Lactobacillus*, antiinflammatory, antioxidant, microencapsulation

**Date of thesis defence:** April 7<sup>th</sup>, 2022

#### Reviewers:

1. PhD. Ksenija Markov, Full professor
2. PhD. Jasna Novak, Full professor
3. PhD. Marko Gerić, Research associate
4. PhD. Anita Slavica, Full professor (substitute)

**Thesis is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, and in the University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske, 14.

## Sažetak

Izražen rast probiotičkog tržišta i usmjeravanje prema personaliziranoj medicini potaknutoj znanstvenim spoznajama i tehnološkim dostignućima stvara potrebu razvoja novih probiotičkih proizvoda s ciljanim učincima na zdravlje te novim naporima u razumijevanju mehanizama interakcije probiotičkih mikroorganizama i domaćina. U ovom istraživanju provedena je izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka mlijeka magarice i kobile te stolice dojenčeta. Prikupljeno je ukupno 60 izolata te im je pridodan prethodno izoliran i preliminarno probiotički okarakteriziran soj iz fermentirane sirutke. Izolati su fenotipski identificirani i probiotički okarakterizirani kako bi se izdvojili sojevi koji mogu preživjeti stresne uvjete gastrointestinalnog trakta, pokazuju stabilnost na proizvodnim temperaturama te zadovoljavaju sigurnosne kriterije za primjenu u ljudi tako što nemaju hemolitičku aktivnost niti rezistenciju na odabrane antibiotike. Izolatima koji su zadovoljili preliminarne probiotičke kriterije ispitana je antagonistička aktivnost prema najčešćim patogenima. Ispitivanje antagonističke aktivnosti usmjereno je na stupanj inhibicije rasta patogena, mehanizam ispoljavanja antimikrobne aktivnosti te stupanj koagregacije s patogenima. Nužna sposobnost adhezije ispitana je preko nekoliko parametara: autoagregacije, formiranja biofilmova i hidrofobnosti stanične površine. Nakon toga, izolatima je određena vijabilnost u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta te sposobnost preživljenja procesa liofilizacije, kao jednog od čestih načina pripreme probiotičkih pripravaka. Na osnovu provedenih ispitivanja, odabrani su izolati koji su identificirani API 50 CHL testom i na genetičkoj razini 16S rRNA identifikacijom te su dalje uključeni u ciljanu probiotičku karakterizaciju. Izolati iz mlijeka magarice i kobile (M1, KO4), koji su pokazali značajan probiotički potencijal, no nešto niži stupanj preživljenja u simuliranim uvjetima želuca i tankog crijeva ispitani su na sposobnost primjene u zaštiti zuba i usne šupljine. Ispitane su interakcije izolata s najčešćim uzročnicima karijesa, gingivitisa i parodontitisa. Izolat M1 iz mlijeka magarice pokazao je značajnu koagregaciju i antimikrobnu aktivnost prema uzročnicima oboljenja zuba i pridruženih tkiva te je utvrđeno kako je patogenima onemogućeno stvaranje biofilmova u prisutnosti metabolita izolata M1. Izolati iz stolice dojenčeta pokazali su visok stupanj preživljavanja u simuliranim uvjetima želuca stoga je ispitana njihova sposobnost u inhibiciji želučanog patogena *Helicobacter pylori*. Izolati A4, A8, B2 i B12 pokazali su visoki stupanj inhibicije *H. pylori* dok je kod izolata A8 i B2 bila najviša inhibicija, te je značajan dio aktivnosti zadržan i nakon neutralizacije supernatanta što ukazuje na višestruki mehanizam inhibicije sniženjem pH i proizvodnjom inhibitornih molekula. Kako je konzumacija mlijeka magarice i kobile prema literaturi povezana s

protuupalnom aktivnošću, ispitana je sposobnost protuupalne aktivnosti izolata M2 i KO9 izoliranih iz tih izvora. U uvjetima stimulirane upale pomoću bakterijskih lipopolisaharida (LPS-a) metaboliti izolata molekulske mase niže od 2000 Daltona značajno su inhibirali proizvodnju proupalnog citokina TNF- $\alpha$  u izoliranim ljudskim mononuklearnim stanicama. Provedena je metabolomička analiza aktivnih protuupalnih frakcija metabolita tekućinskom kromatografijom spregnutom s masenom spektrometrijom (LC-MS) te su rezultati analizirani pomoću mrežnog bioinformatičkog sustava *MetaboAnalyst 5.0*. *Heatmap* analiza i metoda najmanjih parcijalnih kvadrata (PLS) izdvojile su deset metabolita čija je koncentracija značajnija u aktivnim frakcijama ( $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metil-butirat, formil-l-metionin, 2-metil-3-hidroksibutirat, N-acetilleucin, acetilkarnitin, p-hidroksi-fenil laktat, glutamat, indol-3-laktat, 4-vinilfenol, DL-laktat). Mononuklearne stanice venske krvi ljudi inducirane su upalom u prisutnosti i odsutnosti metabolita izolata M2 te je provedena ekspresijska analiza vezanim sustavom tekućinske kromatografije na nano skali i tandemске spektrometrije masa (nanoLC-MS/MS). Nakon detekcije eksprimiranih gena u različitim uzorcima pomoću mrežnog bioinformatičkog sustava *Panther*, provedeno je funkcionalno klasteriranje uzoraka u mrežnom sustavu *David* te su izdvojeni geni čija je različita ekspresija detektirana u prisutnosti probiotičkih metabolita u induciranoj upali naspram kontrolnih upalnih uvjeta (beta podjedinica integrina, tubulin alfa 1a, tubulin alfa 4a, tubulin alfa 1c i aktin beta). Navedeni geni dio su KEGG (eng. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) metaboličkog procesa infekcije patogenom bakterijom *E. coli. Lb. plantarum* S1, izoliran iz sirutke pokazao je najvišu preliminarnu antioksidativnu aktivnost stoga su mu detaljno ispitana antioksidativna svojstva. Navedeni soj je okarakteriziran obzirom na uvjete rasta te je pokazao najveću otpornost na uvjete oksidativnog stresa u aerobnim uvjetima. Izolat S1 zadržao je antioksidativnu sposobnost nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt. U uvjetima oksidativnog stresa, S1 je značajno smanjio oštećenje DNA ljudskih mononuklearnih stanica, što je potvrđeno komet testom. Najveću zaštitu ostvarili su metaboliti izolata i termički inaktivirane stanice što daje naznaku paraprobiotičke aktivnosti. Metaboliti S1 također su pokazali protuupalnu aktivnost pa se potencijalno mogu koristiti u kombiniranom protuupalno-antioksidativnom modelu primjene. Odabrani sojevi za zaštitu zuba, želudca te protuupalnu i antioksidativnu aktivnost uklopljeni su u višeslojnu kapsulu sačinjenu od alginatne jezgre, kitozanskog omotača i biomase izolata te je izmjereno njihovo otpuštanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Rezultati su pokazali kako se željeni izolati ciljano otpuštaju u ustima, želudcu i crijevima te je ostvaren preduvjet za ispoljavanje dokazanih korisnih učinaka. Proizvedene mikrokapsule sačuvale su stabilnost i mikrobiološku ispravnost tijekom 15 dana skladištenja na 4 °C.

## Abstract

The significant growth of the probiotics market and the focus on personalized medicine driven by scientific knowledge and technological advances necessitate the development of new probiotic products with targeted health effects and new efforts to understand the mechanisms of interaction between probiotic microorganisms and hosts. In this study, lactic acid bacteria were isolated from donkey and mare milk and from infant feces. A total of 60 isolates were obtained and a previously isolated and preliminary characterized strain from fermented whey was added to them. The isolates were phenotypically identified and characterized to isolate the strains that can survive stressful gastrointestinal conditions, which are stable at production temperatures, and meet the safety criteria for human use by not exhibiting hemolytic activity or resistance to antibiotics. The isolates meeting the preliminary probiotic criteria were tested for antagonistic activity against the most common pathogens. The study of antagonistic activity focused on the degree of inhibition of pathogen growth, the mechanism of antimicrobial activity, and the degree of coaggregation with pathogens. The necessary adhesion capacity was investigated using several parameters: autoaggregation, biofilm formation, and cell surface hydrophobicity. Subsequently, the viability of the isolates under simulated gastrointestinal tract conditions and the ability to survive the freeze-drying process, as one of the common methods of producing probiotic preparations, were determined. The isolates were identified by the API 50 CHL assay and at the genetic level by 16S rRNA identification and included in the targeted probiotic characterization. The isolates from donkey and mare milk (M1, KO4), which showed significant probiotic potential but slightly lower survival under simulated gastric and intestinal conditions, were tested for their suitability for dento-oral protection. The interactions of the isolates with the microbes that cause dental caries, gingivitis, and periodontitis were investigated. Isolate M1 from donkey milk showed significant coaggregation and antimicrobial activity against dento-oral pathogens, and pathogen biofilm formation was inhibited in the presence of metabolites of M1 isolates. The isolates from infant feces showed a high survival rate under simulated gastric conditions, so their ability to inhibit the gastric pathogen *Helicobacter pylori* was investigated. Isolates A4, A8, B2, and B12 showed a high level of inhibition of *H. pylori*, while this was highest in isolates A8 and B2, and a significant portion of the activity was retained after neutralization of the supernatant, indicating multiple mechanisms of inhibition by lowering pH and the production of inhibitory molecules. Because consumption of donkey and mare milk has previously been associated with anti-inflammatory activity, isolates M2 and KO9 obtained from these sources were tested for the mentioned activity. Under inflammation-stimulating conditions by bacterial lipopolysaccharides (LPS),

the metabolites of the isolates smaller than 2000 Daltons significantly inhibited the production of proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  in isolated human mononuclear cells. Metabolomic analysis of the active anti-inflammatory fractions of the metabolites by liquid chromatography-coupled mass spectrometry (LC-MS) was performed, and the results were analyzed using the MetaboAnalyst 5.0 network bioinformatics system. Heat map analysis and partial least squares (PLS) method were used to isolate ten metabolites with a more significant concentration in the active fractions ( $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate, formyl-1-methionine, 2-methyl-3-hydroxybutyrate, N-acetyl-leucine, acetylcarnitine, p-hydroxy-phenyl-lactate, glutamate, indole-3-lactate, 4-vinylphenol, DL-lactate). Human mononuclear cells were induced by inflammation in the presence and absence of M2 isolate metabolites, and expression analysis was performed using a linked nanoscale liquid chromatography and tandem mass spectrometry system (nanoLC-MS/MS). After detection of the expressed genes in different samples using the Panther network bioinformatics system, functional clustering of the samples was performed in the David network system and genes were identified whose differential expression in the presence of probiotic metabolites was detected in induced inflammation compared with controlled inflammatory conditions (beta subunit alpha integrin 1, tubulin alpha 4a, tubulin alpha 1c, and actin beta). These genes are part of the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) metabolic process of infection with the pathogenic bacterium *E. coli*. *Lb. plantarum* S1 isolated from whey showed the highest preliminary antioxidant activity, thus its antioxidant properties were studied in detail. This strain was characterized in terms of growth conditions and showed the greatest resistance to oxidative stress conditions under aerobic conditions. Isolate S1 retained its antioxidant capacity after the passage through the gastrointestinal tract. Under oxidative stress conditions, S1 significantly reduced DNA damage to human mononuclear cells, which was confirmed by a comet assay. The greatest protection was achieved by metabolites from isolates and thermally inactivated cells, indicating paraprobiotic activity. The S1 metabolites also showed anti-inflammatory activity and may potentially be used in a combined anti-inflammatory and antioxidant application model. Selected strains for dento-oral protection, gastric protection, and anti-inflammatory and antioxidant activity were incorporated into a multilayer capsule of alginate core, chitosan shell, and biomass of the isolates, and their release was measured under simulated gastrointestinal tract conditions. The results showed that the desired isolates were released selectively in the mouth, stomach, and intestine, and the prerequisite for the demonstrated beneficial effects manifestation was met. The prepared microcapsules maintained the stability and microbiological safety during storage at 4 °C for 15 days.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Probiotici .....	3
2.2. Bakterije mliječne kiseline .....	4
2.2.1. Rod <i>Lactobacillus</i> .....	6
2.3. Crijevna mikrobiota .....	6
2.4. Interakcije probiotika s crijevnom mikrobiotom .....	10
2.5. Izvori probiotika .....	11
2.6. Kriteriji za odabir probiotika .....	12
2.7. Zdravstveni učinci probiotika .....	14
2.7.1. Probiotici u očuvanju zuba i usne šupljine .....	14
2.7.2. Probiotici u inhibiciji patogene bakterije <i>Helicobacter pylori</i> .....	15
2.7.3. Protuupalna aktivnost probiotika .....	16
2.7.4. Antioksidativna aktivnost probiotika .....	18
2.7.5. Ostale probiotičke aktivnosti .....	19
2.8. Tehnologije dopreme probiotika.....	19
2.9. Industrijska proizvodnja i važnost razvoja novih probiotika.....	21
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1. Materijali .....	23
3.1.1. Uzorci mlijeka magarice i kobile .....	23
3.1.2. Uzorci stolice dojenčeta .....	23
3.1.3. Mikroorganizmi .....	23
3.1.4. Hranjive podloge.....	24
3.1.5. Aparatura i pribor.....	27
3.1.6. Kemikalije.....	29
3.2. Metode rada .....	30
3.2.1. Način odabira ispitanika te kriteriji za uključivanje u studiju .....	30
3.2.2. Izolacija bakterija mliječne kiseline.....	31
3.2.2.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka mlijeka magarice i kobile.....	31
3.2.2.2. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka stolice dojenčeta.....	32
3.2.3. Opća morfološka i probiotička karakterizacija dobivenih izolata .....	32

3.2.3.1. Priprema radnih suspenzija, određivanje broja stanica i izdvajanje unutarstaničnog sadržaja.....	32
3.2.3.1.1. Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline.....	32
3.2.3.1.2. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom .....	32
3.2.3.1.3. Izdvajanje unutarstaničnog sadržaja bakterija mliječne kiseline.....	33
3.2.3.2. Ispitivanje otpornosti izolata na niske pH vrijednosti .....	33
3.2.3.3. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline na različitim temperaturama.....	33
3.2.3.4. Katalaza test .....	33
3.2.3.5. Određivanje hemolitičke aktivnosti.....	33
3.2.3.6. Identifikacija bakterijskih izolata .....	34
3.2.3.6.1. Analiza fermentacijskog profila (API 50 CHL metoda).....	34
3.2.3.6.2. Genetička identifikacija izolata .....	34
3.2.3.7. Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike disk difuzijskom metodom.....	34
3.2.3.8. Antimikrobna aktivnost prema odabranim patogenima .....	35
3.2.3.9. Određivanje autoagregacijske sposobnosti bakterija mliječne kiseline .....	36
3.2.3.10. Određivanje sposobnosti koagregacije izolata s odabranim patogenima .....	36
3.2.3.11. Određivanje hidrofobnosti stanične površine bakterija mliječne kiseline.....	36
3.2.3.12. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima probavnog sustava .....	37
3.2.3.12.1. Priprema simuliranih uvjeta usne šupljine.....	37
3.2.3.12.2. Priprema simuliranih uvjeta želuca .....	37
3.2.3.12.3. Priprema simuliranih uvjeta u crijevima .....	37
3.2.3.12.4. Određivanje stupnja preživljenja .....	38
3.2.3.13. Liofilizacija bakterija mliječne kiseline .....	38
3.2.3.14. Sposobnost formiranja biofilмова bakterijskih izolata .....	38
3.2.4. Probiotička karakterizacija za primjenu u zaštiti zuba i usne šupljine .....	39
3.2.4.1. Test mikroorganizmi uzročnici oboljenja zuba i usne šupljine.....	39
3.2.4.2. Uzgoj test mikroorganizama .....	39
3.2.4.3. Preživljavanje izolata bakterija mliječne kiseline u uvjetima simulirane sline.....	40
3.2.4.4. Sposobnost formiranja biofilмова uzročnika bolesti zuba .....	40
3.2.4.5. Koagregacija zubnih patogena i izolata bakterija mliječne kiseline .....	40
3.2.4.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti prema dentalnim patogenima .....	40
3.2.4.7. Inhibicija formiranja biofilмова zubnih patogena.....	41
3.2.5. Probiotička karakterizacija sojeva za primjenu u redukciji <i>Helicobacter pylori</i> ....	41
3.2.5.1. Određivanje antimikrobne aktivnosti prema <i>Helicobacter pylori</i> .....	41

3.2.5.2. Sposobnost koagregacije probiotičkih bakterija i <i>Helicobacter pylori</i> .....	42
3.2.6. Probiotička karakterizacija sojeva s protuupalnom aktivnošću .....	42
3.2.6.1. Priprema frakcija bakterijskih metabolita .....	42
3.2.6.2. Izolacija i tretman stanica periferne krvi .....	42
3.2.6.3. Određivanje tumorskog faktora nekroze .....	42
3.2.6.4. Metabolomička analiza aktivnih probiotičkih frakcija metabolita.....	42
3.2.6.4.1. Priprema uzorka.....	43
3.2.6.4.2. LC-MS analiza metabolita u aktivnim frakcijama .....	43
3.2.6.4.3. Obrada podataka .....	43
3.2.6.5. Analiza ekspresije gena u mononuklearnim stanicama u upalnom modelu.....	44
3.2.6.5.1. Tretman mononuklearnih stanica u uvjetima inducirane upale LPS-om..	44
3.2.6.5.2. Ekstrakcija proteina, pročišćavanje i digestija.....	44
3.2.6.5.3. Masena spektrometrija (nanoLC-MS/MS) eluiranih peptida .....	44
3.2.6.5.4. Analiza podataka .....	45
3.2.6.5.5. Obrada podataka .....	45
3.2.7. Probiotička karakterizacija sojeva s antioksidativnom aktivnošću.....	46
3.2.7.1 Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala .....	46
3.2.7.2. Izdvajanje unutarstaničnog sadržaja i priprema toplinski inaktiviranih stanica.....	46
3.2.7.3. Određivanje unutarstanične koncentracije glutationa .....	47
3.2.7.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze .....	47
3.2.7.5. Određivanje sposobnosti rasta u aerobnim i anaerobnim uvjetima te u uvjetima respiracije .....	47
3.2.7.6. Određivanje rasta u uvjetima oksidativnog stresa .....	48
3.2.7.7. Sposobnost uklanjanja slobodnih DPPH radikala u različitim uvjetima rasta .....	48
3.2.7.8. Ispitivanje protektivnog učinka izolata S1 na mononuklearne stanice u modelu oksidativnog stresa .....	49
3.2.7.8.1. Izolacija i tretman stanica periferne krvi .....	49
3.2.7.8.2. Komet test.....	49
3.2.7.9. Ispitivanje protuupalnog učinka izolata S1 na ljudskim mononuklearnim stanicama	49
3.2.8. Višeslojna mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva .....	50
3.2.8.1. Određivanje broja živih mikroorganizama u mikroinkapsulama .....	50
3.2.8.2. Određivanje ciljanog otpuštanja dobivenih mikroinkapsulata .....	50
3.2.8.3. Mikrobiološka ispravnost višeslojnog mikroinkapsulata .....	51
3.2.9. Statistička obrada podataka.....	51



<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>53</b>
4.1. Izolacija, karakterizacija i identifikacija dobivenih izolata .....	53
4.2. Probiotička karakterizacija za primjenu u zaštiti zuba i usne šupljine .....	71
4.3. Probiotička karakterizacija sojeva za primjenu u redukciji <i>Helicobacter plyori</i> .....	74
4.4. Probiotička karakterizacija sojeva s protuupalnom aktivnošću .....	76
4.5. Probiotička karakterizacija sojeva s antioksidativnom aktivnošću .....	82
4.6. Višeslojna mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva .....	88
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>90</b>
5.1. Izolacija, karakterizacija i identifikacija dobivenih izolata .....	90
5.2. Probiotička karakterizacija izolata za primjenu u zaštiti zuba i usne šupljine .....	101
5.3. Probiotička karakterizacija sojeva za primjenu u redukciji <i>Helicobacter plyori</i> .....	104
5.4. Probiotička karakterizacija sojeva s protuupalnom aktivnošću .....	105
5.5. Probiotička karakterizacija sojeva s antioksidativnom aktivnošću .....	109
5.6. Višeslojna mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva .....	111
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>113</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>115</b>

## **1. UVOD**

Desetljeća istraživanja i primjene probiotika u različitim oblicima rezultirala su mnogobrojnim spoznajama o njihovim korisnim učincima na zdravlje domaćina. Kliničke studije potvrdile su pozitivan utjecaj probiotičke terapije na crijevnu mikrobiotu i imunski sustav domaćina (Hori i sur., 2020). Unatoč brojnim istraživanjima, mehanizmi modulacije imunskog sustava pomoću probiotičkih stanica nisu do kraja razjašnjeni što je posljedica značajnih razlika u crijevnoj mikrobioti među pojedincima, različite reaktivnosti imunskog sustava, kompleksnih interakcija komenzalnih i probiotičkih mikroorganizama te važnim svojstvom da su korisni učinci probiotika specifični za pojedini soj (Sanap i sur., 2019). Prepoznavanje korisnih učinaka probiotika i porast svjesnosti potrošača rezultirali su iznimnim rastom probiotičkog tržišta posljednjih godina te analize projiciraju nastavak rasta u nadolazećem desetljeću, posebice nakon otkrivenog potencijala u olakšavanju simptoma uzrokovanih SARS-CoV-2 virusom (Al-Ansari i sur., 2021). Kako rast tržišta prati porast broja novih probiotičkih proizvoda ustanovljene su određene nepravilnosti u deklaracijama i kvaliteti dostupnih probiotičkih proizvoda (Drago i sur., 2010).

U današnje su vrijeme probiotički preparati široko dostupni ljudima u razvijenim zemljama, a prisutan je i relativno velik broj probiotičkih proizvoda za koje se često pogrešno prikazuju korisni učinci njihove konzumacije (Reid i sur., 2019). Nasuprot nepravilno doznačenim korisnim učincima probiotika, nalazi se potreba uvođenja probiotika s ciljem smanjenja zaraznih bolesti u zemljama u razvoju, no prepreka na tome putu je nedostatak pristupačnih, pravilno istraženih i dokumentiranih sojeva (Reid i sur., 2019). Pokrenute su globalne inicijative s ciljem povećavanja upotrebe probiotičkih kultura u zemljama u razvoju, potaknute dokazima da u regijama s niskim prihodima primjena probiotika, osim zdravstveno korisnih učinaka, donosi i dodatne pozitivne socio-ekonomske učinke u borbi s pothranjenošću što se ostvaruje preko poticanja lokalnih resursa u prehrani i ostvarivanjem dodatne vrijednosti proizvodima fermentiranim s pomoću probiotičkih kultura (Reid i sur., 2018; Reid i sur., 2020). Probiotički mikroorganizmi prisutni su u mnogobrojnim biološkim nišama stoga je važno kontinuirano ulagati napore u pronalasku novih sojeva koji mogu ispoljavati korisne zdravstvene učinke na domaćina. Indikacije korisnih učinaka probiotika u mnogobrojnim oboljenjima poticaj su budućih istraživanja kako bi se razjasnili mehanizmi djelovanja u domaćinu. Osim imunomodulacijskih svojstava te kompeticije s patogenima u donjem dijelu gastrointestinalnog trakta, postoje naznake korisnih učinaka i u zaštiti zuba (Cagetti i sur., 2013), želuca (Yu i sur., 2015) te protektivne uloge u kroničnim upalama (Alard i sur., 2018) i oksidativnom stresu (Badehnoosh i sur., 2018).

U ovom radu provedena je probiotička karakterizacija izolata bakterija mliječne kiseline iz mlijeka magarice i kobile te stolice dojenčeta. Izolati koji su zadovoljili probiotičke kriterije uključeni su u usmjerenu probiotičku karakterizaciju kako bi se pronašli oni koji pokazuju potencijal u zaštiti zuba i usne šupljine, zaštiti želuca inhibicijom *Helicobacter pylori* te djeluju protuupalno i antioksidativno u donjem dijelu gastrointestinalnog trakta. Krajnji cilj ovog rada bio je formulirati mikroinkapsulirani probiotički proizvod koji na ciljanom mjestu u domaćinu otpušta odabrane probiotičke bakterije te na taj način omogućuje ispoljavanje dodatnih korisnih učinaka na zdravlje.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. Probiotici

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). Iako navedena definicija obuhvaća desetljeća istraživanja čiji su rezultat mnogi znanstveni dokazi o korisnim učincima na domaćina, primjena probiotika u različitim oblicima zabilježena je još od davnina. Primjerice, postoje zabilješke (ilustracije na zidovima) o inokulaciji mlijeka s ciljem poticanja fermentacije u doba Sumerana, 2500 godina prije Krista (Fuller, 1992). Poticanjem očuvanja namirnica pomoću fermentacija te smanjenjem kvarenja, indirektno su ostvareni korisni učinci na populaciju. Tek su početkom dvadesetog stoljeća Tissier i Metchnikoff postavili znanstvene pretpostavke probiotičkog potencijala korisnih bakterija te su ukazali da konzumacija dobrih mikroorganizama može obnoviti crijevnu mikrofloru ljudi s dijarejom (Zommiti i sur., 2020). Uslijedila su brojna istraživanja čiji su rezultati posljednjih desetljeća potaknuli široku primjenu probiotika u različitim oblicima. Najčešće korišteni rodovi bakterija pripadaju bakterijama mliječne kiseline i to su: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* i *Streptococcus* (Attri i sur., 2021). Probiotički potencijal razlikuje se među sojevima iste vrste jer pojedini sojevi pokazuju različitu sposobnost adhezije i specifične učinke na imunski sustav te su interakcije na mukoznim tkivima različite u uvjetima zdravog domaćina ili primjerice u upalnim procesima (Soccol i sur., 2010).

Probiotički proizvodi na tržištu se u različitim zemljama kategoriziraju kao: dodaci prehrani, lijekovi, medicinska hrana, živi bioterapeutici (SAD); prirodni proizvodi za poboljšanje zdravlja (Kanada), funkcionalna hrana (Japan, Indija, Kina i Malezija), dodaci prehrani (Švedska, Finska i Danska) i bioterapeutici/farmaceutici (europske zemlje poput Belgije i Njemačke) (Attri i sur., 2021). Pronalazak novih sojeva s korisnim učincima na zdravlje stalan je izazov u znanosti i industriji. Navedeno je vidljivo u stalnom povećanju probiotičkih prehrambenih proizvoda čiji se razvoj nije zadržao isključivo na području mliječnih proizvoda nego su uključeni i fermentirani mesni proizvodi (Frece i sur., 2010), fermentirano povrće (Park i sur., 2014) pa i voćni sokovi (Patel, 2017). Probiotičko tržište je u porastu, te će se rast nastaviti razvojem probiotika u društvu pogođenom COVID-19 pandemijom (Al-Ansari i sur., 2021). Iako se na osnovu prethodnih istraživanja mogu pretpostaviti korisni učinci probiotika, mnogi mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni što rezultira stalnim povećanjem broja istraživanja na ovom području koje je u skladu s rastom tržišta probiotika.

**Tablica 1.** Pregled najzastupljenijih mikroorganizama dostupnih na tržištu u probiotičkim proizvodima (prilagođeno prema Foligné i sur., 2013)

<b>Probiotički mikroorganizmi najzastupljeniji na tržištu</b>	
<b>Rod</b> <i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> , <i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>
<b>Rod</b> <i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. salivarius</i>
<b>Ostale bakterije mliječne kiseline</b>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. thermophilus</i> .
<b>Rod</b> <i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. mesentericus</i> , <i>B. subtilis</i>
<b>Ostali mikroorganizmi</b>	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> subsp. <i>boulardii</i> .

## 2.2. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline čine raznoliku skupinu s relativno sličnim svojstvima, a krajnji produkt fermentacije im je mliječna kiselina (Bintsis, 2018). Gram pozitivne su, nesporigene te katalaza negativne. Kemoorganotrofi su, aerotolerantni, mikroaerofilni ili fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji dolaze u štapičastom ili okruglom obliku, a optimalni temperaturni raspon rasta im je između 30 °C i 40 °C (Lima i sur., 2020). Trenutno su taksonomski klasificirani u koljeno *Firmicutes*, razred *Bacilli* i red *Lactobacilliales*. Rod *Bifidobacterium* se povijesno svrstava u grupu bakterija mliječne kiseline no pripada koljenu *Actinobacteria*, drugoj važnoj grani gram pozitivnih bakterija (Wright i Axelsson, 2019). Kao što je ranije spomenuto, bakterije mliječne kiseline središnjica su fermentacijskih procesa.

Uzrokuju brzu acidifikaciju startnih sirovina proizvodnjom organskih kiselina, prvenstveno mliječne kiseline. Dodatno, proizvodnja octene kiseline, etanola, bakteriocina, spojeva arome, egzopolisaharida te određenih enzima su industrijski vrlo značajne (Leroy i De Vuyst, 2004). Iako skupina obuhvaća mnoštvo rodova, mogu se grupirati na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne bakterije mliječne kiseline proizvode mliječnu kiselinu kao glavni produkt fermentacije glukoze, dok heterofermentativne, uz mliječnu kiselinu, proizvode ugljični dioksid, acetat i etanol u različitim omjerima. Razlog nastajanja takvog profila produkata jest prisutnost enzima aldolaze kod homofermentativnih bakterija stoga mogu fermentirati glukozu direktno do mliječne kiseline za razliku od heterofermentativnih koje koriste pentozna-fosfatni put te nastaju aldehyd i diacetil, dva spoja vrlo važna za pojačavanje okusa i aromu proizvoda (Carr i sur., 2002). Prirodno zauzimaju velik broj staništa, pa su tako izolirani iz biljnog materijala, mliječnih proizvoda, povrća, voća, vode te su prirodni stanovnici gastrointestinalnog sustava čovjeka i životinja (König i sur., 2017). Osim kao dio probiotičkih proizvoda, bakterije mliječne kiseline koriste se u proizvodnji antimikrobnih spojeva, šećernih polimera, zaslađivača, aromatskih spojeva, enzima i nutraceutika (Leroy i De Vuyst, 2004). Izražen antagonizam nekih sojeva prema patogenima i uzročnicima kvarenja namirnica industrijski je značajan, s potencijalnom terapijskom ulogom u sprječavanju infekcija, stoga se antimikrobna aktivnost smatra jednim od najvažnijih svojstava probiotika i starter kultura (Šušković i sur., 2010). Bakterije ove skupine najznačajnije su u proizvodnji fermentiranih namirnica gdje su uključene primarno u mliječno-kiselu fermentaciju, ali i u mješovite fermentacije (Buckenhüskes, 1993). Bakterije mliječne kiseline imaju raspon veličine genoma od 1,23 Mb (*Lb. sanfranciscensis*) do 4,91 Mb (*Lb. parakefiri*), a genetički podaci sakupljeni su od početka 21. stoljeća te su u javno dostupnim bazama podataka sadržani podaci za preko 200 sojeva (Hatti-Kaul i sur., 2018). Komparativne genetičke analize otkrile su veliku raznolikost među pojedinim vrstama, ali i na razini pojedinih sojeva što je povezano s različitim razinama interakcije s okolišnim nišama koje uzrokuju gubitak gena te unos gena horizontalnim prijenosom (Wu i sur., 2017). Dokazano je kako su neke vrste zadržale gene koji im omogućuju otpornost na nepovoljne okolišne uvjete kao što su niske vrijednosti pH, povišene razine soli i temperatura te gene koji imaju ulogu u inhibiciji patogena (Hatti-Kaul i sur., 2018). Njihova upotreba od prehrambene industrije pa sve do medicinskih pripravaka dokaz su jedinstvenih fizioloških osobina i sigurnosti upotrebe, obzirom da su označene kao sigurne za upotrebu (GRAS status, eng. Generally Recognized as Safe) (Li i Cao, 2010).



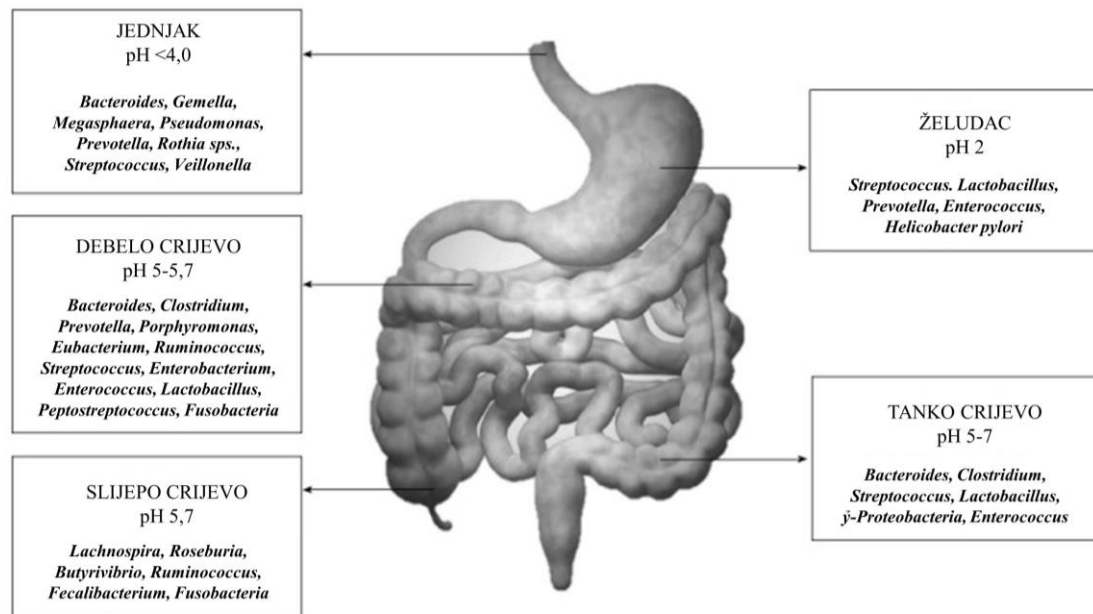
### 2.2.1. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus*, u trenutku pisanja ovog rada, sadrži 261 vrstu sa velikom raznolikošću na fenotipskoj, ekološkoj i genetičkoj razini (Zheng i sur., 2020). Najveći je rod u skupini bakterija mliječne kiseline te se prvenstveno koristi u proizvodnji fermentiranih namirnica i kao probiotik (De Angelis i Gobbetti, 2016). Tradicionalno se dijeli u tri grupe obzirom na fermentaciju ugljikohidrata: obligatne homofermentativne laktobacile koji fermentiraju heksoze isključivo do mliječne kiseline, a pentoze ne fermentiraju; fakultativno heterofermentativne, koji u uvjetima limitacije glukoze, fermentiraju heksoze do mliječne, octene i mravlje kiseline te etanola, a pentoze do mliječne i octene kiseline; i obligatno heterofermentativne, koji fermentiraju heksoze do mliječne kiseline, CO<sub>2</sub>, octene kiseline i/ili etanola, a pentoze do mliječne i octene kiseline (De Angelis i Gobbetti, 2016). Prijašnje studije ukazuju na nedvojbeno probiotička svojstva pojedinih sojeva roda *Lactobacillus* (Frece i sur., 2009) te funkcionalnih svojstava S-sloja koji im omogućuje adheziju i ispoljavanje protektivnih učinaka na domaćina (Frece i sur., 2005). Uz probiotičku aktivnost, određeni pripadnici ovog roda pokazali su izraženu antimikrobnu aktivnost prema patogenim bakterijama i potencijal za primjenu kao probiotičke starter kulture za fermentirane proizvode (Frece i sur., 2010).

### 2.3. Crijevna mikrobiota

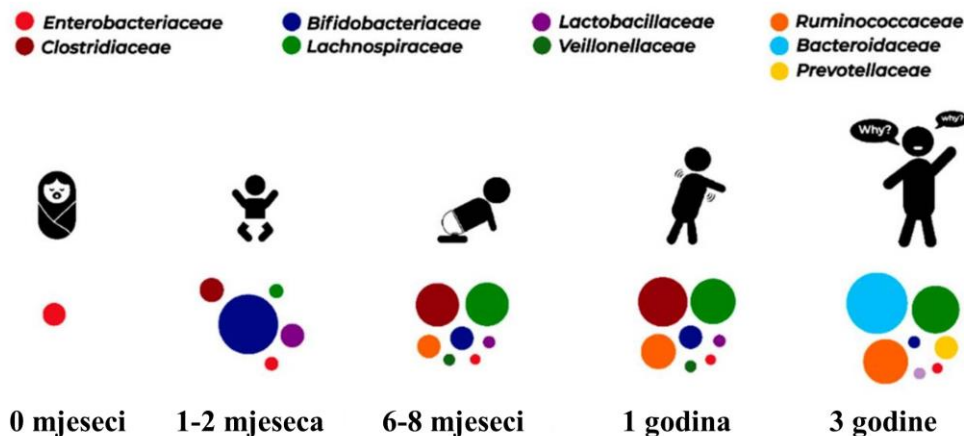
Pojam mikrobiota se odnosi na cjelokupnu populaciju mikroorganizama koji koloniziraju određeno stanište i uključuje, osim bakterija, i ostale mikroorganizme, viruse i protozoe (Jandhyala i sur., 2015). Posljednjih godina, crijevna mikrobiota predmet je mnogih istraživanja, posebice jer su promjene u mikrobioti povezane s velikim brojem bolesti kao što su upalni procesi i pretilost (Cox i sur., 2015), neurodegenerativne bolesti (Quigley, 2017), alergije (Sjögren i sur., 2009), dijabetes (Baothman i sur., 2016) i mnoge druge. Odmah nakon rođenja dolazi do razvoja novog mikrobnog ekosustava unutar gastrointestinalnog trakta novorođenčeta. Iako je sastavni dio ljudske biologije, detaljni mehanizmi razvoja, izvori mikroorganizama, točni uzroci varijabilnosti sastava mikrobiote među pojedincima te posljedično utjecaj na ljudsku fiziologiju, razvoj i cjelokupno zdravstveno stanje organizma, nisu potpuno razjašnjeni (Palmer i sur., 2007). Crijevna mikrobiota se sastoji od 10<sup>13-14</sup> mikroorganizama te je podložna stalnim promjenama zbog mnogih utjecaja: prehrana, starost, lijekovi, bolesti, stres i način života (Purchiaroni i sur., 2013). Općenito gledano, mikrobiota zdrave osobe sastoji se u najvećem dijelu od pripadnika koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, a slijede koljena *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia*, no sastav mikrobiote pokazuje vremenske i

prostorne varijacije u omjerima navedenih skupina (Jandhyala i sur., 2015). Mikrobna raznolikost gastrointestinalnog sustava zdrave osobe prikazana je na slici 1.



**Slika 1.** Sastav mikrobiote gastrointestinalnog sustava zdrave osobe (preuzeto i prilagođeno prema Jandhyala i sur., 2015)

Najveće fluktuacije crijevne mikrobiote zabilježene su od neonatalnog perioda do ranog djetinjstva. Mikrobiota u ranom djetinjstvu različita je u sastavu od mikrobiote u kasnijim periodima, a zajednička karakteristika mikrobiote tijekom ranih faza života je povećanje raznolikosti tijekom rasta djece (Drago i sur., 2019). Shematski prikaz sastava mikrobiote tijekom prvih godina života prikazan je na slici 2.



**Slika 2.** Sastav crijevne mikrobiote tijekom prvih godina života (preuzeto i prilagođeno prema Drago i sur., 2019)

Crijevna mikroflora ima metaboličku, zaštitnu i imunološku funkciju te zajedno s probavnim enzimima, mucinima, peristaltikom i komponentama epitelne barijere pripada skupini indirektnih komponenti mukoznog imunskog sustava (Purchiaroni i sur., 2013). Općenito gledano, imunski sustav mikroorganizme vidi kao patogene te ih prepoznaje i elimira, no većina bakterija u crijevima su nepatogene stoga su u simbiotskom odnosu s enterocitima (Jandhyala i sur., 2015). Komenzalna mikrobiota utječe na razvoj crijevnog mukoznog imunskog sustava i igra ključnu ulogu u onemogućavanju prodora patogena, bilo direktnom interakcijom ili stimulacijom imunskog sustava (Purchiaroni i sur., 2013). Također, njihova važna uloga je u metaboliziranju nutrijenata te je takav uzajamni odnos posljedica koevolucije s normalnom mikrobiotom čiji je rezultat onemogućavanje kolonizacije patogena (Jandhyala i sur., 2015). Crijevna mikrobiota sudjeluje u regulaciji proizvodnje citokina, kemokina i drugih imunskih medijatora kako bi se povećao repertoar T-stanica u crijevima i okolnim tkivima (Sommer i Bäckhed, 2013). Gubitak raznolikosti ili promijenjen omjer mikrobnih skupina u crijevima uslijed različitih oboljenja naziva se disbioza. Važan primjer povezanosti metabolita crijevne mikrobiote i razvoja imunskog odgovora u plućima je istraživanje potaknuto prisutnošću virusa u stolici oboljelih osoba te je otkrivena direktna povezanost odgovora na infekciju SARS-CoV-2 virusom i sastava crijevne mikrobiote (Dhar i Mohanty, 2020). Od mnoštva faktora koji konstantno utječu na raznolikost i funkcioniranje crijevne mikrobiote, ističe se prehrana. Dio bakterija u crijevima sposoban je metabolizirati širok raspon supstrata dok neke imaju uži metabolički spektar stoga su specijalizirane za

pojedine supstrate, primjerice degradaciju staničnih stijenki biljnih stanica (Scott i sur., 2013). Mikrobní metabolizam ugljikohidrata rezultira nastankom kratkolančanih masnih kiselina i plinova, a glavni produkti fermentacija su acetat, propionat i butirát, koji snižavaju pH okoline, što direktno utječe na mikrobní sastav i zdravlje domaćina, posebice preko butirata, koji je glavni izvor energije kolonocita (Scott i sur., 2013).

Zapadnjačka prehrana i način života povezani su s razvojem kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti i dijabetes te su istraživanja pokazala kako zamjena zapadnjačke prehrane s uravnoteženom prehranom bogatom vlaknima već u 24 h rezultira promjenom sastava fekalne mikrobiote (Conlon i Bird, 2015). Snažan utjecaj na sastav i funkciju mikrobiote primjećen je i tijekom probiotičke terapije (Ramirez i sur., 2020). Antibiotici su revolucionizirali medicinu omogućivši liječenje infekcija koje su do tada bile neizlječive i uzrokovale nebrojene smrtne slučajeve kroz stoljeća. Razvojem znanosti o antibioticima i velikim brojem provedenih istraživanja pokazalo se kako antibiotska terapija uzrokuje promjene u sastavu i funkcioniranju mikrobiote, što može rezultirati stanjem disbioze (Francino, 2016). Problem se javlja zbog nekontrolirane upotrebe antibiotika u medicini, poljoprivredi, industriji hrane i stočarstvu, što je dovelo do povećanja kontaminacije okoliša antibioticima (Nogueira i sur., 2019). Tijekom izlaganja, svaka bakterija ili mikrobiom može biti pod utjecajem antibiotika neovisno pripada li patogenim, nepatogenim, mutualističkim ili komenzalnim vrstama (Francino, 2016). Svaki tip antibiotika ima drugačija svojstva što rezultira različitim izmjenama sastava mikrobioma, a izmjene ovise o tipu antibiotika, dozi, vremenu izlaganja, farmakološkim učincima te ciljnim bakterijama (Iizumi i sur., 2017). Antibiotici širokog spektra djelovanja mogu izmijeniti sastav čak 30 % mikrobiote rezultirajući brzim padom raznolikosti sustava, te unatoč otpornosti mikrobiote i sustavnom oporavljanju prema prvobitnom stanju, proces oporavka može trajati mjesecima, čak i godinama (Francino, 2016). Utjecaj antibiotika na crijevnu mikrobiotu istražuje se primjenom „omičkih“ tehnika te su istraživanja pokazala kako uz promjene u omjerima skupina mikroorganizama, antibiotici utječu na ekspresiju gena, aktivnost proteina te na ukupni metabolizam mikrobiote, što dovodi do stanja usporedivih s razvojem različitih oboljenja (Francino, 2016). Nedavno istraživanje Sun i sur. (2019) na miševima pokazalo je kako antibiotska intervencija u trajanju od tri tjedna inducira povećanje ekspresije citokina, što sugerira direktnu interakciju antibiotika i tkiva domaćina. Nadalje, u istom je istraživanju dokazano kako antibiotici širokog spektra imaju značajniji utjecaj na razinu citokina, dok je vankomicin uzrokovao značajne promjene u sastavu i metaboličkoj aktivnosti crijevne mikrobiote. Maier i sur. (2021) proveli su istraživanje utjecaja

različitih antibiotika na 38 reprezentativnih vrsta crijevne mikrobiote te su pokazali kako su kinolonski antibiotici svakom generacijom povećavali utjecaj na veći broj bakterijskih vrsta, i posebice je istaknuta četvrta generacija, gdje je došlo do inhibicije skoro svih ispitivanih vrsta u provedenom istraživanju; beta-laktamski antibiotici različito su djelovali na bakterije iste skupine stoga autori zaključuju kako se geni za rezistenciju vjerojatno horizontalno prenose; makrolidni antibiotici pokazali su značajan utjecaj na komenzale, inhibirajući sve ispitane mikroorganizme osim *Clostridium difficile*, koji je pokazao rezistenciju na makrolidne antibiotike i klindamicin; tetraciklinski antibiotici pokazali su značajnu inhibitornu aktivnost što je iznenađujuće obzirom da se crijevna mikrobiota smatra rezervoarom gena rezistencije na tetraciklin. Obzirom na navedeno, utjecaj antibiotika na crijevnu mikrobiotu je neupitan, što je i razlog ograničenja nepravilne uporabe antibiotika s ciljem sprječavanja širenja antibiotske rezistencije i multirezistentnih sojeva. Nastale neželjene promjene crijevne mikrobiote uslijed antibiotske terapije moguće je reducirati ili spriječiti upotrebom probiotika (D'Souza i sur., 2002; Engelbrekton i sur., 2009; Korpela i sur., 2018).

#### **2.4. Interakcije probiotika s crijevnom mikrobiotom**

Kako je već spomenuto, postoje brojni dokazi o direktnoj vezi metaboličke aktivnosti i sastava crijevne mikrobiote sa zdravstvenim stanjem čovjeka. Također, sastav mikrobiote utječe na mnoge organske sustave kao što su kardiovaskularni, živčani, imunosni i metabolički sustav (Azad i sur., 2018). Dokazi upućuju na modulaciju sastava mikrobiote pomoću probiotika u uvjetima raznih oboljenja: dijareje uzrokovane antibioticima, infektivne dijareje, upalne bolesti crijeva, sindroma iritabilnog crijeva i intolerancije na laktozu (Sánchez i sur., 2017). U uvjetima dijareje uzrokovane antibioticima, probiotici ispoljavaju korisne učinke kroz nekoliko izglednih mehanizama: pozitivno utječući na intestinalni transport elektrolita; povećavanjem koncentracije sekundarnih žučnih soli; poboljšavajući funkciju crijevne barijere proizvodnjom različitih molekula te utjecajem na imunosni odgovor u crijevima sprječavajući aktivaciju upalnih kaskada (Mekonnen i sur., 2020). Jedni od najčešćih uzročnika infektivne dijareje su *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* i *Shigella* te u slučajevima infekcije, probiotici onemogućavaju vezanje patogena kompetitivnom ekskluzijom, zakiseljavajući okolinu i proizvodeći niz antimikrobnih molekula te modulirajući imunosni odgovor domaćina (Sánchez i sur., 2017). Istraživanja usmjerena na ulogu probiotika u upalnoj bolesti crijeva upućuju na protuupalne mehanizme preko smanjenja sekrecije proupalnih citokina, inhibicijom NF- $\kappa$ B, indukcijom heat-shock proteina i inhibicijom proteasoma (Guzy i Sturm, 2008). Korisna uloga probiotika u osoba sa sindromom iritabilnog crijeva može se ispoljavati preko

jačanja fizičke barijere, kompeticije za nutrijente, metaboličkim interakcijama, proizvodnjom bakteriocina, jačanjem mukozne membrane, smanjenjem crijevne permeabilnosti i bakterijske translokacije te regulaciji imunskih odgovora (Dai i sur., 2013). Veliki broj ljudi ima nisku razinu enzima  $\beta$ -galaktozidaze te im se nakon konzumacije mlijeka javljaju simptomi intolerancije na laktozu. Smatra se da probiotici ispoljavaju pozitivne učinke povećavajući aktivnost mikrobne  $\beta$ -galaktozidaze što poboljšava toleranciju i probavljivost laktoze (Sánchez i sur., 2017). Probiotici ulaze u interakciju s domaćinom na tri razine donjeg gastrointestinalnog trakta: mukoznom sloju, stanicama epitela i limfnom tkivu pridruženom sluznici probavnog sustava (Sánchez i sur., 2017).

## 2.5. Izvori probiotika

Općenito gledano probiotički sojevi moraju imati dokazane korisne učinke na zdravlje i moraju biti sigurni za upotrebu (Frece, 2007). Kako bi se korisni učinci mogli ispoljavati i kako bi se osigurala njihova pozitivna interakcija s crijevnom mikrobiotom, vrlo je važno da mogu u dovoljnom broju preživjeti stresne uvjete gastrointestinalnog trakta. Iako su razvijene dodatne metode zaštite, još je uvijek uvriježeno kako za upotrebu u ljudi, prednost imaju sojevi ljudskog porijekla, baš zbog bolje adaptiranosti na navedene uvjete (O'Sullivan, 2001). Istraživanja potvrđuju kako je stolica odraslih ljudi potencijalan izvor probiotičkih bakterija koje se odlikuju sposobnošću preživljavanja u uvjetima gastrointestinalnog sustava (Sathyabama i sur., 2012; Park i Lim, 2015). Stolica dojenčeta je također prepoznata kao izvor probiotika te su dokazani mnogi korisni učinci takvih izolata poput antimikrobne aktivnosti (Wang i sur., 2021), imunomodulirajuće (Plaza-Diaz i sur., 2013), antioksidativne (Kim i sur., 2006) i mnogih drugih. Iako su iz stolice dojenčeta izolirane mnoge probiotičke bakterije roda *Lactobacillus*, najčešće se pronalaze probiotičke bakterije roda *Bifidobacterium* (Kwak i sur., 2016). Majčino mlijeko se također istaknulo kao izvor probiotika visokog potencijala s dokazanim učincima na smanjenje kolesterola (Anandharaj i Sivasankari, 2014), jačanju imunskog sustava i zaštiti od infekcija (Lara-Villoslada i sur., 2007) te mnogim drugim korisnim probiotičkim svojstvima (Martín i sur., 2005). Unatoč preporuci o ljudskom podrijetlu, mnogi probiotički sojevi izolirani su iz fermentiranih proizvoda te su takvi izolati prvi istraženi i imaju dokazane korisne učinke na zdravlje. Važno je naglasiti razliku proizvodnje fermentiranih namirnica s pomoću probiotičkih kultura i izolaciju potencijalnih probiotika iz spontano fermentiranih supstrata ili onih fermentiranih s autohtonim starter kulturama, koji iako pružaju korisne učinke na zdravlje potencijalno sadrže neokarakterizirane probiotičke kulture. Potonje predstavlja izvor novih sojeva s visokim probiotičkim

potencijalom. U prilog navedenom, dostupna literatura ukazuje na značajan broj izolata s visokim probiotičkim potencijalom iz tradicionalnih fermentiranih proizvoda. Primjerice, probiotički sojevi uspješno su izolirani i okarakterizirani iz tradicionalnih mliječnih proizvoda (Bao i sur., 2010; Guo i sur., 2016; Kostelac i sur., 2020), lokalnih fermentiranih namirnica (Kumari i sur., 2016), različitih fermentiranih namirnica na bazi mesa kao što su kulen i fermentirana zečetina (Frece i sur., 2014; Wulandari i sur., 2020) te voća i povrća (Gao i sur., 2012; Swain i sur., 2014). Probiotički kandidati za ljudsku upotrebu izolirani su i iz svježih mlijeka domaćih životinja (Tambekar i sur., 2009). Kako se povećavao broj istraživanja na području probiotika, pokazali su se potencijali dodatnih izvora probiotika poput tla (Yanagida i sur., 2006), voćnih sokova (Naeem i sur., 2012) i mnogih drugih.

## **2.6. Kriteriji za odabir probiotika**

Obzirom na velik broj potencijalnih izvora probiotika te činjenicu da su korisna probiotička svojstva vezana uz pojedini soj (McFarland i sur., 2018), vrlo je važno metodološki pravilno pristupiti odabiru te od mnoštva sojeva odabrati one koji će najbolje djelovati kao dio probiotičkog proizvoda. Kako bi se olakšao izbor, eliminirale potencijalne opasnosti te izdvojili sojevi s najvećim potencijalom, razvijeni su kriteriji selekcije probiotika. Navedeni kriteriji obuhvaćaju ispitivanje sigurnosti karakteristika sojeva, njihovu mogućnost da prežive stresne uvjete gastrointestinalnog trakta, sposobnost kolonizacije i inhibicije patogena te druga neophodna svojstva. Pobrajani kriteriji prikazani su u tablici 2. Navedeni osnovni kriteriji podijeljeni su u tri grupe: opći, tehnološki i funkcionalni. Opći kriteriji uključuju sigurnosne elemente, kako bi se isključili sojevi koji predstavljaju zdravstvenu opasnost, te element sposobnosti preživljavanja prolaska kroz gastrointestinalni trakt domaćina. Ispitivanje tehnoloških kriterija usmjereno je na mogućnost proizvodnje, skladištenja i distribucije nakon uključivanja u probiotički proizvod poradi zadržavanja korisnih učinaka tijekom cjelokupnog proizvodnog procesa. Ovdje pobrojani funkcionalni kriteriji okvirno obuhvaćaju preduvjete ispoljavanja korisnih učinaka preko adhezije, inhibicije patogena te stimulacije imunskog sustava. Ova grupa kriterija može se proširivati obzirom na specifična svojstva pojedinih sojeva i njihovu aktivnost.

**Tablica 2.** Popis kriterija za izbor probiotičkih sojeva (preuzeto i prilagođeno prema Frece, 2007)

<b>OPĆI KRITERIJI</b>
<p>točna taksonomska identifikacija izolata</p> <p>ljudsko podrijetlo za primjenu u ljudi</p> <p>netoksičnost i nepatogenost</p> <p>genetička stabilnost</p> <p>otpornost prema žučnim kiselinama</p> <p>otpornost prema niskim pH vrijednostima</p>
<b>TEHNOLOŠKI KRITERIJI</b>
<p>stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreve kulture, skladištenja i isporuke</p> <p>visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu</p> <p>brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreve probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije</p> <p>dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese</p>
<b>FUNKCIONALNI KRITERIJI</b>
<p>sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti na ciljanom mjestu u domaćinu</p> <p>sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela</p> <p>proizvodnja antimikrobnih molekula</p> <p>antagonistička aktivnost prema patogenim i kariogenim bakterijama</p> <p>moćnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore</p> <p>imunostimulatorni učinak</p> <p>sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka</p>



## 2.7. Zdravstveni učinci probiotika

Desetljeća istraživanja rezultirala su mnogim spoznajama o funkcioniranju probiotika te su se usmjeravanjem medicine u precizniju, personaliziranu primjenu, i probiotička istraživanja usmjerila na ciljane sustave domaćina. U literaturi postoje dokazi o korisnim učincima probiotika ne samo u donjem gastrointestinalnom sustavu nego i u želudcu, usnoj šupljini i koži te su se paralelno tome počeli istraživati neki novi, do sada nerazjašnjeni mehanizmi probiotika (Daliri i Lee, 2015).

### 2.7.1. Probiotici u očuvanju zuba i usne šupljine

Sumarno gledajući, mehanizmi korištenja probiotika u zaštiti zuba nisu razjašnjeni te je broj istraživanja na tom području značajno manji i raste sa stomatološkim potrebama preventivnog pristupa liječenju oboljenja zuba. Učinci probiotika u navedenom sustavu mogu se sumarno svesti na dvije razine: antagonizam prema patogenim bakterijama i interakcije s oralnim epitelom (Mahasneh i Mahasneh, 2017). Antagonizam prema patogenim bakterijama uključuje sposobnost koagregacije, modulaciju biofilmova, modulaciju oralnog plaka, utjecaj na uzročnike karijesa, gingivitisa i paradontoze dok interakcija s epitelom podrazumijeva pojačavanje funkcije epitelne barijere i imunosnog odgovora domaćina (Mahasneh i Mahasneh, 2017). Karijes je jedna od najčešćih bolesti usne šupljine i uzrokovana je stanjem oralne disbioze (Zhu i sur., 2018). Zbog faktora virulencije i rezultirajućeg stanja narušene ravnoteže, *Streptococcus mutans* znatno doprinosi razvoju karijesa (Wasfi i sur., 2018). Istraživanje Wasfi i sur. (2018) pokazalo je kako probiotička bakterija roda *Lactobacillus* može inhibirati propadanje zuba i kontrolirati karijes inhibicijom *S. mutans*, disrupcijom biofilma patogena, utišavanjem gena za virulenciju i gena za otpornost na niski pH okoline te imunostimulativnim učinkom na domaćina preko indukcije IFN- $\gamma$ . Istraživanja također ukazuju kako je sposobnost autoagregacije i koagregacije s uzročnicima karijesa koristan alat u detekciji anti-kariogenih probiotika (Twetman i sur., 2009). Periodontitis je upalna bolest koju karakterizira progresivno razaranje tkiva pridruženog zuba (Listgarten, 1986). Uzrokuje ga nakupljanje bakterija na zubu oko gingive (Alvarenga i sur., 2015). Istraživanja su povezala mnogo mikroorganizama s razvojem periodontitisa. Bakterija *Porphyromonas gingivalis* povezana je s razvojem kroničnog periodontitisa preko promjena koje uvodi u komenzalnu mikrofloru rezultirajući disbiozom (Mei i sur., 2020). Iako je provedeno malo istraživanja na tom području, pokazano je kako probiotici roda *Lactobacillus* mogu inhibirati nastajanje biofilmova *P. gingivalis* te narušiti transkripciju virulentnih faktora (Ishikawa i sur., 2020). Istraživanja na ovom području također potvrđuju kako su probiotička svojstva specifična za pojedini soj. Navedeno je

potvrđeno i u istraživanju Albuquerque-Souza i sur. (2019) gdje su određeni sojevi probiotika uspješno modulirali sposobnost *P. gingivalis* u infekciji tkiva pridruženih zuba. Također, bakterija *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* povezana je s nekoliko oblika periodontitisa (Izano i sur., 2007), a u slučajevima periodontalne infekcije bakterijom *Streptococcus intermedius* postoji mogućnost razvoja apscesa u mozgu ili jetri (Wagner i sur., 2006). Probiotici su pokazali korisne učinke i na navedena dva patogena (Sang-Ngoen i sur., 2021; Stašková i sur., 2021) no daljnja istraživanja su potrebna kako bi se razjasnili mehanizmi i omogućilo korištenje probiotika u zaštiti zuba i pridruženih tkiva. Dostupne studije naglašavaju važnost istraživanja interakcija probiotičkih stanica i uzročnika oboljenja zuba, jer se trenutno to može smatrati primarnim probiotičkim mehanizmom djelovanja u zaštiti zuba.

### **2.7.2. Probiotici u inhibiciji patogene bakterije *Helicobacter pylori***

Infekcija patogenom bakterijom *Helicobacter pylori* značajan je faktor u nastajanju kroničnog gastritisa i faktor rizika za maligne promjene na želucu (Lesbros-Pantoflickova i sur., 2007). Trenutno je prevladavajući pristup u rješavanju infekcije antibiotska terapija, no porastom antibiotske rezistencije i nuspojama, istraživanja su se usmjerila na druge pristupe (Ruggiero, 2014). Probiotici su pokazali značajan potencijal u sprječavanju infekcije uzrokovane s *H. pylori*. Kliničke studije i eksperimentalni modeli na životinjama pokazali su kako bakterija *L. acidophilus* proizvodi metabolite koji inhibiraju rast *H. pylori* u *in vitro* i *in vivo* uvjetima te kako *L. johnsonii* uspješno sprječava nastale upalne procese mukoznog tkiva želuca (Felley i Michetti, 2003). Pretpostavljeni mehanizmi djelovanja obuhvaćaju antimikrobne produkte metabolizma, posebice mliječnu kiselinu, koja djeluje inhibitoryno snižavanjem pH, ali i inhibicijom ureaze *H. pylori* (Lesbros-Pantoflickova i sur., 2007). Drugi važan aspekt je kompeticija za vezanje na mukozne površine u želucu (Michetti i sur., 1999), za što je pretpostavljena sposobnost nekih sojeva da inhibiraju vezanje *H. pylori* na glikolipidne receptore (Mukai i sur., 2002) no najvjerojatnije, da pored specifičnih mehanizama puno značajniju ulogu ima kompeticijska prednost probiotika, što je i potvrđeno istraživanjem na miševima, gdje je onemogućeno vezanje *H. pylori* na prethodno kolonizirane membrane s probiotičkim bakterijama (Kathene i sur., 2004). Jedan od predloženih mehanizama ispoljava se preko modulacije gena u mukoznoj membrani. Naime, dokazano je kako *H. pylori* inhibira ekspresiju *MUC1* i *MUC5A* gena u staničnoj liniji ljudskih stanica želuca te reducira proizvodnju mukusa; no *in vitro* je dokazano kako *Lb. plantarum* i *Lb. rhamnosus* induciraju ekspresiju *MUC2* i *MUC3* gena te povećavaju sekreciju mucina, pa posljedično regeneriraju svojstva mukozne membrane i inhibiraju adheziju patogena, uključujući *H. pylori* (Lesbros-

Pantoflickova i sur., 2007). Ostali mehanizmi uključuju modulaciju imunskih odgovora domaćina i iznimno su divergentni, jer specifični sojevi iskazuju različite učinke na imunski sustav te oni ovise i o domaćinu (Haller i sur., 2000). Sumarno, istraživanja su detektirala utjecaj probiotika na razinu proupalnih i protuupalnih citokina što je rezultiralo smanjenjem upale sluznice želuca. Također je zabilježeno smanjenje razine specifičnih IgG antitijela kod infekcije s *H. pylori* uslijed probiotičke terapije te su probiotici uspješno ojačali mukoznu membranu stimulirajući lokalnu proizvodnju IgA antitijela (Lesbros-Pantoflickova i sur., 2007). Probiotička terapija djeluje obećavajuće u eliminaciji infekcije s *H. pylori* ili barem olakšavanju simptoma, no daljnja istraživanja su potrebna kako bi se razumjeli mehanizmi djelovanja i patogeneza uzrokovana ovom bakterijom (Ruggiero, 2014).

### **2.7.3. Protuupalna aktivnost probiotika**

Jedan od glavnih učinaka pojedinih probiotičkih sojeva jest sposobnost pozitivne modulacije imunskog sustava domaćina. Prilikom prolaska kroz stresne uvjete gastrointestinalnog sustava, probiotički mikroorganizmi mogu stupiti u interakciju s mukoznim slojem i imunskim komponentama sluznice pridružene probavnom sustavu te na taj način utjecati na staničnu signalizaciju preko dendritičkih stanica, makrofaga, epitelnih stanica, posebice preko receptora za prepoznavanje obrazaca (PRR, eng. pattern recognition receptors) uključujući i receptore slične Tollu (TLR, eng. Toll-like receptor), koji su uključeni u signalne kaskade s direktnom regulacijom ekspresije određenih gena (Kang i Im, 2015). Osim direktne interakcije, utjecaj na imunski sustav može biti ostvaren s pomoću probiotičkih metabolita, komponenti stanične stijenke, mrtvih probiotičkih stanica i DNA molekula (Oelschlaeger, 2010). Imunomodulacijska sposobnost probiotika ovisna je o soju i detektirana je mnogim prijašnjim studijama (Fang i sur., 2000; Frece i sur., 2009; J. Frece i sur., 2005; Matsuzaki i Chin, 2000; Uroić i sur., 2016). Imunomodulacijska aktivnost i interakcija sa stanicama crijevnog epitela može biti posebno značajna u uvjetima upalnih procesa. Upalne bolesti crijeva, kao što su Chronova bolest i ulcerozni kolitis, karakterizira kronična upala u crijevnom epitelu te se smatra kako uz genetske faktore, crijevna mikroflora ima važnu ulogu u aktivaciji upalnih procesa (Riedel i sur., 2006). Istraživanja ukazuju kako određeni probiotici mogu inhibirati proizvodnju proupalnih citokina kao što je tumorski faktor nekroze (TNF- $\alpha$ ) u oboljelih od Chronove bolesti (Borruel i sur., 2002) te smanjiti ekspresiju mRNA proupalnih citokina u pacijenata s ulceroznim kolitisom (Cui i sur., 2004). Sumarno, najveći broj dostupnih istraživanja na području mehanizma protupalne aktivnosti probiotika usmjeren je na jezgreni faktor NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B predstavlja skupinu inducibilnih transkripcijskih faktora koji reguliraju

ekspresiju velikog broja gena uključenih u različite procese imunskih i upalnih odgovora, a skupina se sastoji od pet strukturno povezanih članova koji uključuju NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB i c-Rel, koji moduliraju transkripciju ciljanih gena vezanjem na specifični element u DNA molekuli,  $\kappa$ B pojačivač (eng. enhancer) te mnoge hetero- i homodimere (Liu i sur., 2017). Aktivacija NF- $\kappa$ B signalnog puta uključena je u patogenezu kroničnih upalnih bolesti kao što je astma, reumatoidni artritis i upalna bolest crijeva te postoje indikacije aktivnosti u arterosklerozi, Alzheimerovoj bolesti i dijabetesu (Yamamoto i Gaynor, 2005). U slučaju aktivacije NF- $\kappa$ B (primjerice stimulacija LPS-om), dolazi do translokacije u jezgru i ekspresije gena za proupalni odgovor (Riedel i sur., 2006). U neaktivnom stanju, NF- $\kappa$ B nalazi se u citopolazmi, vezan za inhibitorni protein I $\kappa$ B, te se aktivira u slučaju upalnog signala tako što dolazi do aktivacije I $\kappa$ B kinaze, koja fosforilira inhibitorni protein I $\kappa$ B te se NF- $\kappa$ B otpušta i slobodno translocira u jezgru. Istraživanja pokazuju kako neki probiotički sojevi proizvode metabolite koji onemogućuju fosforilaciju inhibitora I $\kappa$ B te posljedično i translokaciju NF- $\kappa$ B u jezgru te tako zaustavljaju upalnu signalizaciju (Guo i sur., 2017; Cui i sur., 2019). Dodatno, istraživanje Dobrogosz i sur. (2010) pokazalo je kako bakterija *Lb. reuteri* stimulira proizvodnju protuupalne molekule NGF (eng. nerve growth factor, eng) koja sprječava translokaciju NF- $\kappa$ B u jezgru te smanjuje štetne procese uslijed infekcije s patogenima.

Drugi mehanistički pristup vezan je uz proizvodnju reaktivnih kisikovih molekula koje proizvode neke bakterije mliječne kiseline. Naime, ukoliko je povećana koncentracija navedenih molekula, može doći do inhibicije Ubc12 enzima koji sudjeluje u signalizaciji odvajanja NF- $\kappa$ B od inhibitora, pa ne može doći do translokacije u jezgru (Kumar i sur., 2007). *L. rhamnosus* GG ATCC®53103™ pokazao je sposobnost indukcije nastanka reaktivnih kisikovih molekula te *in vitro*, ali i *in vivo* smanjenje upalnog signala i proizvodnje TNF- $\alpha$  preko inaktivacije Ubc12 proteina (Lin i sur., 2009). Navedeni mehanizam ipak treba uzeti s dozom opreza jer neregulirana proizvodnja reaktivnih kisikovih molekula može dovesti do oksidativnog oštećenja tkiva. Regulacija navedenog signalnog puta može se odvijati i preko modulacije vezanja na receptore. Jedan od glavnih TLR receptora je TLR4 koji se nalazi na površini epitelnih i imunskih stanica i služi kao LPS receptor. Negativni TLR regulatori mogu osigurati da ne dođe do kroničnih upalnih odgovora u tkivima (Shibolet i Podolsky, 2007). Probiotička bakterija *L. casei* OLL2768 smanjila je ekspresiju proupalnih citokina (IL-6, IL8, IL-1) inhibirajući aktivaciju NF- $\kappa$ B i put mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (MAPK)

preko negativne regulacije TLR4 i uz pozitivnu regulaciju negativnog TLR4 regulatora (Takanashi i sur., 2013).

Nedvojbeno je da probiotici mogu modulirati signalne puteve povezane s upalnim procesima. Najistaknutiji mehanizmi su preko inhibicije degradacije i fosforilacije I $\kappa$ B i većina istraživanje je usmjerena na taj mehanizam. S druge strane, dokazi upućuju na postojanje dodatnih mehanizama onemogućavanjem interakcija s upalnim receptorima. Obzirom da su probiotička svojstva specifična za soj, generalni zaključci se ne smiju donositi, nego se moraju ispitati mehanizmi svakog soja prije uključivanja u probiotičke proizvode.

#### **2.7.4. Antioksidativna aktivnost probiotika**

Prehrana čovjeka uključuje provođenje oksidativnog metabolizma, koji je osim u proizvodnju energije, uključen u veliki broj biološki neophodnih procesa. Oksidativni metabolizam uključuje nastanak različitih molekula koje uključuju kisik, te se uglavnom radi o visoko reaktivnim molekulama. U slučaju viška reaktivnih kisikovih molekula i produljenog izlaganja istima, biomolekule i tkiva mogu biti oštećeni što rezultira neravnotežom antioksidativnog sustava i može dovesti do patoloških upalnih procesa (Songisepp i sur., 2005). Preciznije, oksidativni stres može se definirati kao stanje u kojem je stanična ravnoteža prooksidans–antioksidans narušena te rezultira hidroksilacijom DNA, denaturacijom proteina, peroksidacijom lipida i apoptozom stanica (Wang i sur., 2017). Dokazana je antioksidativna aktivnost probiotika i prehrambenih proizvoda s probioticima, no točni mehanizmi antioksidativne aktivnosti nisu potpuno razjašnjeni (Mishra i sur., 2015). Preliminarna probiotička karakterizacija prvenstveno uključuje mjerenje sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala iz *in vitro* sustava te se uspoređuje s antioksidativnim standardima kao što je L-askorbinska kiselina. Meta-analiza kliničkih studija ukazuje kako probiotička terapija poboljšava oksidativni status domaćina što može dovesti do prevencije nekih kroničnih bolesti (Askari i sur., 2020). Istraživanja ukazuju kako različite stanične komponente imaju različite antioksidativne aktivnosti, primjerice unutarstanični probiotički ekstrakti pokazali su inhibiciju peroksidacije lipida, dok su cijele stanice i supernatanti uzgojnog medija imali jaču aktivnost prema uklanjanju slobodnih radikala (Tang i Lu, 2019). Istraživanja provedena na većem broju sojeva sugeriraju da se mehanistički gledano, antioksidativna aktivnost ispoljava preko vezanja reaktivnih kisikovih spojeva, inhibicije enzima, inhibicije askorbatne autooksidacije te je dodatno povezana s probiotičkom metaboličkom aktivnošću koja rezultira uklanjanjem reaktivnih spojeva te na taj način sprječava njihovo nakupljanje u crijevima (Amaretti i sur., 2013).

Dodatna prednost potencijalno probiotičkih bakterija roda *Lactobacillus* je indukcija gena za antioksidativne enzime nakon izlaganja oksidativnom stresu pomoću vodikovog peroksida (Tang i sur., 2017). Bakterije roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* mogle bi biti korisne u smanjenju oksidativnog oštećenja uslijed upalnih bolesti ili karcinoma putem povećanja aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i drugih antioksidativnih molekula (Hoffmann i sur., 2019). Dodatna istraživanja su potrebna na ovom području kako bi se bolje objasnili mehanizmi djelovanja i formirali precizniji kriteriji probiotičke karakterizacije za upotrebu u smanjenju oksidativnog stresa u organizmu.

### **2.7.5. Ostale probiotičke aktivnosti**

Istraživanja upućuju kako su probiotička svojstva specifična za pojedini soj te se samo usmjerenom i pravilnom probiotičkom karakterizacijom mogu pronaći sojevi koji ispoljavaju korisne učinke na ciljanom mjestu u domaćinu. Kao što je već opisano, probiotička aktivnost nije isključivo ostvarena u donjem dijelu gastrointestinalnog trakta nego i na ostalim mjestima u domaćinu, pa se korisni učinci mogu ispoljavati od trenutka unosa probiotika već u usnoj šupljini. Interakcije probiotičkih stanica i metabolita sa imunskim sustavom uvelike utječu na signalne kaskade koje se prenose kroz cijeli organizam. Iako je istaknut oprez do potpune kliničke potvrde, probiotička terapija s određenim sojevima upućuje na antikancerogenu aktivnost (Soa i sur., 2017). Nadalje, dokazano je i probiotički uzrokovano smanjenje kolesterola (Ishimwe i sur., 2015) te je predloženi mehanizam preko metaboličke proizvodnje propionata i butirata koji smanjuju serumsku razinu kolesterola inhibirajući njegovu sintezu (Wang i sur., 2012). Protuupalna svojstva povezana su i s korištenjem probiotika u kozmetici, i, iako mehanizmi nisu razjašnjeni, pretpostavlja se kako će interes znanosti i industrije ovog područja značajno rasti u budućnosti (Jeong i sur., 2016). Značajni rezultati pokazani su na području bolesti živčanog sustava gdje su probiotici pokazali korisne učinke kod oboljelih od depresije, anksioznosti, opsesivno kompulzivnog poremećaja i poteškoća u pamćenju (Wang i sur., 2016). Probiotička terapija se preporuča u smanjenju simptoma uzrokovanih virusnim infekcijama, stoga su znanstvena istraživanja usmjerena na probiotičku mogućnost smanjenja rizika od posljedica infekcije SARS-CoV-2 virusom (Olaimat i sur., 2020) te postoji mogućnost kako bi probiotičke bakterije mogle biti izvor molekula koje bi se mogle koristiti u terapijske svrhe, vezujući se na virusne proteine (Balmeh i sur., 2021).

### **2.8. Tehnologije dopreme probiotika**

Različiti mehanizmi dopreme probiotika koriste se u mnogobrojnim proizvodima s ciljem uspješne dopreme probiotika na ciljano mjesto i ispoljavanja korisnih učinaka. Dva su

osnovna cilja razvijanja sustava dopreme i uklapanja u stabilne formulacije: stabilnost pri proizvodnji, skladištenju i distribuciji te sposobnost zadržavanja vijabilnosti prolaskom kroz stresne uvjete gastrointestinalnog trakta. Probiotici su od početka proizvodnje do trenutka ispoljavanja korisnih učinaka izloženi različitim stresnim uvjetima. Navedeno obuhvaća temperaturni šok tijekom skladištenja i proizvodnje što može biti pogubno za stanice osjetljive na povišenje temperature; oksidativni stres anaeroba izloženih kisiku; osmotski šok tijekom sušenja te stres niskog pH želuca, probavnih enzima i žučnih soli u probavnom sustavu (Kim i sur., 2016). Više od 90 % komercijalno dostupnih probiotičkih formulacija uklopljeno je u prehrambene proizvode, posebice funkcionalne namirnice te se koriste desetljećima uz relativno nisku razinu regulacije i kontrole (Govender i sur., 2014). Takve formulacije uključuju mnogo proizvoda kao što su sirevi, jogurt, vrhnje, mlijeko, čokolade, mesni proizvodi te mnoge fermentirane namirnice s probioticima. Mnoga istraživanja dokazala su uspješnu dopremu probiotičkih stanica u takvim pripravcima na ciljano mjesto u domaćinu, no postoje velike varijacije u razinama vijabilnosti te se takvi proizvodi značajno razlikuju od farmaceutskih pripravaka (de Vos i sur., 2010; Yeo i sur., 2011). Farmaceutski pripravci najčešće su u obliku tableta, kapsula i mikrokapsula (Govender i sur., 2014). Unatoč navedenim deklaracijama o vijabilnosti probiotika, sposobnost preživljavanja uvjeta gastrointestinalnog trakta često je varijabilna. Tablete su se pokazale kao pouzdan način dopreme, jer dodatkom pojačivača adhezije ili polimera otpornih na uvjete gastrointestinalnog trakta značajno se povećao stupanj preživljenja probiotičkih sojeva (Govender i sur., 2014). Također, tablete i kapsule lakše su za korisnike te imaju veću stabilnost tijekom skladištenja nego tekući preparati. Potencijalno ograničenje je formiranje tableta tj. kompresija koja se može odvijati u uvjetima temperature do 60 °C, što može uzrokovati gubitak vijabilnosti mikroorganizama (Rouèche i sur., 2006). Primjena mikrokapsula i inkapsulacija u polimer pokazalo je značajno povećanje vijabilnosti tijekom skladištenja, ali i dopreme na ciljano mjesto u domaćinu (Cook i sur., 2012). Iako ukupna sposobnost dopreme takvih pripravaka ovisi o kombinaciji korištenih polimera, vijabilost je značajno veća nego kod direktnih unosa probiotika (Govender i sur., 2014).

Vijabilnost inkapsuliranih probiotika uvelike ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima korištenih materijala (Chen i Chen, 2007). Alginat je prirodni polisaharid dobiven od smeđih algi ili bakterija te se vrlo često koristi za inkapsulaciju probiotika zbog biokompatibilnosti, sigurnosti i jednostavnog procesa geliranja (Kim i sur., 2016). Kitozan je polisaharid koji se često koristi kao dodatan sloj zaštite alginatnih kapsula, no rijetko je glavni nosač probiotika jer je topljiv u kiselom mediju (Calinoiu i sur., 2019). Mnogobrojna istraživanja potvrđuju višu

razinu vijabilnosti probiotika u alginatnim kapsulama obloženim slojem kitozana (Chávarri i sur., 2010; Lohrasbi i sur., 2020). Osim alginata, često se kao nosači prilikom inkapsulacije probiotičkih bakterija primjenjuju gume, kao što je primjerice ksantan, egzopolisaharid dobiven od *Xanthomonas campestris* (Kim i sur., 2016). U istu skupinu spada i karagenan koji je također pokazao efikasnu zaštitu probiotičkih sojeva (Ding i Shah, 2009). Jedna od zastupljenijih skupina su i proteini, kao što su želatin, kazein i proteini sirutke čija su fizikalno-kemijska svojstva pokazala protektivnu ulogu u dopremi probiotika na ciljano mjesto u domaćinu (Kim i sur., 2016).

## **2.9. Industrijska proizvodnja i važnost razvoja novih probiotika**

Svjetsko tržište probiotika u stalnom je porastu te se pretpostavlja rast vrijednosti tržišta od 49,4 milijarde dolara 2018. godine do oko 69,3 milijardi 2023. godine (Liu i sur., 2020). Očekivani rast može biti i znatno veći obzirom na utjecaj pandemije uzrokovane SARS-CoV-2 virusom, porastom svijesti potrošača o namirnicama i proizvodima s korisnim učincima na jačanje imuniteta i cjelokupno zdravlje. Navedeni porast će se posebno odraziti na farmaceutske probiotičke pripravke jer će rasti potražnja za jasno definiranim korisnim učincima. Rastuća osvještenost potrošača ima uporište u dugoročnom korištenju tradicionalnih probiotičkih namirnica što se jasno očituje u činjenici da su probiotički mliječni proizvodi najbrže rastuća tržišna niša funkcionalne hrane (Yilmaz-Ersan i sur., 2020). Iako je na tržištu prisutno stalno povećanje probiotičkih proizvoda, zabrinjavajuća činjenica jest da su često ispitani komercijalno dostupni probiotici nedovoljne kvalitete te da proizvodi ne sadrže kulture u koncentracijama navedenim na pakiranju te dodatno čak mogu sadržavati i kontaminante. Primjer navedenog je studija u kojoj je mikrobiološki ispitano 13 komercijalno dostupnih probiotičkih preparata u SAD-u te je samo 31 % ispitanih proizvoda bilo u skladu s deklaracijom (Drago i sur., 2010). Slični problemi primjećeni su i na Europskom tržištu gdje je samo 43 % ispitanih proizvoda zadovoljilo kriterije, a niti jedan od probiotičkih koktela koji sadržavaju više mikrobnih vrsta nije bio u skladu s deklariranim sadržajem (Macedo i Fredua-Agyeman, 2016). Probiotički preprati su lako dostupni ljudima u razvijenim zemljama te je prisutan relativno velik broj probiotičkih proizvoda za koje se često pogrešno prikazuju korisni učinci koje konzumacija istih donosi (Reid i sur., 2019). Nasuprot nepravilno doznačenim korisnim učincima tržišno prisutnih probiotika nalazi se potreba uvođenja probiotika s ciljem redukcije zaraznih bolesti u zemljama u razvoju, no prepreka na tome putu je nedostatak pristupačnih, pravilno istraženih i dokumentiranih sojeva (Reid i sur., 2019). Pokrenute inicijative na globalnoj razini pokušavaju povećati udio probiotičkih kultura u zemljama u



razvoju potaknute dokazima da u regijama s niskim prihodima primjena probiotika osim zdravstveno korisnih učinaka donosi i dodatne pozitivne socio-ekonomske učinke u borbi s pothranjenošću potičući lokalne resurse u prehrani te ostvarujući dodatak vrijednosti proizvodima fermentiranim s pomoću probiotičkih kultura (Reid i sur., 2018; Reid i sur., 2020).

Razvojem tehnologije mijenja se pristup potrošačima te je personalizirana medicina najbolji odgovor na kompleksne razlike među pojedincima. Kako su među pojedincima značajne razlike u sastavu crijevne mikrobiote, tako je i personalizirani probiotički pristup izgledna budućnost. No kako bi se omogućila direktna, personalizirana terapija, potrebno je dodatno istražiti kompleksne mehanizme interakcije probiotika i domaćina. Usmjerenje probiotičke karakterizacije s ciljem pronalaska sojeva koji s izraženim ciljanim svojstvom poput protuupalne, antioksidativne ili antimikrobne aktivnosti, te njihovo uklapanje u probiotičke proizvode s ciljanim otpuštanjem mogu biti spona između općenite probiotičke terapije i personalizirane upotrebe jer omogućuje selekciju korisnih učinaka ovisno o potrebi potrošača.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Materijali**

#### **3.1.1. Uzorci mlijeka magarice i kobile**

Uzorci mlijeka magarice (n=2) i kobile (n=2) nabavljeni su na lokalnim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima u Moslavini u Hrvatskoj. Svaki uzorak bio je volumena 10 mL. Uzorci su prikupljeni prikladnim aseptičnim postupcima kako bi se izbjegla kontaminacija uzoraka. Uzorkovano je mlijeko nakon alkoholne sterilizacije vimena u sterilnu posudu, spremljeno na +4 °C te isti dan prebačeno pomoću prijenosnog hladnjaka u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio uzorka odmah je uključen u postupak izolacije, a ostatak je pohranjen na -20 °C do daljnjeg korištenja.

#### **3.1.2. Uzorci stolice dojenčeta**

Uzorak stolice (n=1) zdravog dojenčeta prikupljen je iz korištene pelene. Korištena pelena prebačena je u zaštitnoj vrećici u prijenosnom hladnjaku u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je čitav uzorak odmah uključen u postupak izolacije.

#### **3.1.3. Mikroorganizmi**

Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu izolirani su iz gore navedenih uzoraka mlijeka magarice i kobile te stolice dojenčeta. Uz navedene sojeve, u istraživanju je korišten *Lb. plantarum* S1 autohtoni probiotički soj bakterija mliječne kiseline izoliran iz fermentirane sirutke i preuzet iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica. Iz komercijalnih zbirki mikroorganizama (The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH i American Type Culture Collection, ATCC) pribavljeni su standardni sojevi test-mikroorganizama korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti, autoagregacije, koagregacije, sposobnosti formiranja biofilmova te zaštitu zuba i usne šupljine. Popis test-mikroorganizama korištenih u ovom istraživanju prikazan je u tablici 3.

**Tablica 3.** Korišteni test-mikroorganizmi uključeni u istraživanje preuzeti iz DSMZ (The Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) i ATCC (American Type Culture Collection) zbirki mikroorganizama.

<b>Test-mikroorganizmi korišteni u ovom istraživanju</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922™
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923™
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC®29631™
<i>Listera monocytogenes</i> ATCC®23074™
<i>Candida albicans</i> ATCC®10231™
<i>Streptococcus mutans</i> DSM®20523™
<i>Streptococcus intermedius</i> DSM®20573™
<i>Porphyromonas gingivalis</i> DSM®28984™
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> DSM®11122™
<i>Helicobacter pylori</i> DSM®10242™

#### 3.1.4. Hranjive podloge

Tijekom izrade ovog rada korištene su sljedeće hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama i izoliranih stanica iz ljudske krvi:

a) Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- ❖ MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar (Biolife, Italija) sastava: pepton 10,0 gL<sup>-1</sup>; goveđi ekstrakt 10,0 gL<sup>-1</sup>; ekstrakt kvasca 5,0 gL<sup>-1</sup>; glukoza 20,0 gL<sup>-1</sup>; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 gL<sup>-1</sup>; natrijev acetat 5,0 gL<sup>-1</sup>; amonijev citrat 2,0 gL<sup>-1</sup>; magnezijev sulfat 0,2 gL<sup>-1</sup>; manganov sulfat 0,05 gL<sup>-1</sup>; agar 15,0 gL<sup>-1</sup>; Tween 80 1,0 gL<sup>-1</sup>; pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija pri 121 °C, 15 min. Navedeni sadržaj je otopljen u destiliranoj vodi dobro promješšan 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.
- ❖ M17 agar (Biolife, Italija) sastava: pepton iz kazeina 2,5 gL<sup>-1</sup>; pepton 2,5 gL<sup>-1</sup>; sojin pepton 2,5 gL<sup>-1</sup>; kvašćev ekstrakt 5 gL<sup>-1</sup>; goveđi ekstrakt 5 gL<sup>-1</sup>; natrijev glicerofosfat 19 gL<sup>-1</sup>; magnezijev sulfat 0,25 gL<sup>-1</sup>; askorbinska kiselina 0,5 gL<sup>-1</sup>; laktoza 5 gL<sup>-1</sup>; agar 13 gL<sup>-1</sup>. pH vrijednost podloge je 7,1; sterilizacija pri 121 °C, 15 min. Navedeni sadržaj

je otopljen u destiliranoj vodi, dobro promješšan i nakon sterilizacije razliven u petrijeve zdjelice.

- ❖ M17 bujon (Biolife, Italija), istog sastava kao M17 agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C, 15 min.
- ❖ BSM agar (Biolife, Italija): natrijev klorid 3,62 gL<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,26 gL<sup>-1</sup>; (NH<sub>4</sub>)Cl 0,08 gL<sup>-1</sup>; NaNO<sub>3</sub> 0,85 gL<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 gL<sup>-1</sup>; elementi u tragovima 1,0 mL; otopina vitamina 10,0 mL; Na-DL-laktat 1,12 gL<sup>-1</sup>; ekstrakt kvasca 0,20 gL<sup>-1</sup>; NaHCO<sub>3</sub> (8%) 52,50 mL. Sterilizacija pri 121 °C, 15 min.
- ❖ BSM bujon (Biolife, Italija) istog sastava kao BSM agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C, 15 min.

#### **b) Podloge za pripremu frakcija metabolita i tretman izoliranih mononuklearnih stanica iz venske krvi dobrovoljnih davatelja**

- ❖ RPMI – 1640 (Merck, SAD) sastava: Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 0,1 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0,048 g L<sup>-1</sup>; KCl 0,4 g L<sup>-1</sup>; NaHCO<sub>3</sub> 2,0 g L<sup>-1</sup>; NaCl 6,0 g L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> g L<sup>-1</sup>; glukoza 2,0 g L<sup>-1</sup>; reducirani glutation 0,001 g L<sup>-1</sup>; fenol crveno 0,005 g L<sup>-1</sup>; glicin 0,01 g L<sup>-1</sup>; L-arginin 0,241 g L<sup>-1</sup>; L-asparagin 0,056 g L<sup>-1</sup>; L-aspartat 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-glutamat 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-glutamin 0,292 g L<sup>-1</sup>; L-histidin 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-hidroksiprolin 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-izoleucin 0,050 g L<sup>-1</sup>; L-leucin 0,050 g L<sup>-1</sup>; L-lizin hidroklorid 0,040 g L<sup>-1</sup>; L-metionin 0,015 g L<sup>-1</sup>; L-fenilalanin 0,015 g L<sup>-1</sup>; L-prolin 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-serin 0,030 g L<sup>-1</sup>; L-treonin 0,020 g L<sup>-1</sup>; L-triptofan 0,005 g L<sup>-1</sup>; L-tirozin dinatrijev dihidrat 0,029 g L<sup>-1</sup>; L-valin 0,020 g L<sup>-1</sup>; biotin 0,0002 g L<sup>-1</sup>; kolin klorid 0,003 g L<sup>-1</sup>; kalcijev pantotemat 0,000253 g L<sup>-1</sup>; folna kiselina 0,001 g L<sup>-1</sup>; niacin amid 0,001 g L<sup>-1</sup>; para-aminobenzojeva kiselina 0,001 g L<sup>-1</sup>; piridoksin hidroklorid 0,001 g L<sup>-1</sup>; riboflavin 0,0002 g L<sup>-1</sup>; tiamin hidroklorid 0,001 g L<sup>-1</sup>; vitamin B12 5×10<sup>-6</sup> g L<sup>-1</sup>; i-inozitol 0,0035 g L<sup>-1</sup>.

#### **c) Podloga za određivanje hemolitičke aktivnosti**

- ❖ Columbia krvni agar (Biolife, Italija) sastava: pepto-kompleks 10 gL<sup>-1</sup>; triptoza 10 gL<sup>-1</sup>; pepton 3 gL<sup>-1</sup>; kukuruzni škrob 1 gL<sup>-1</sup>; natrijev klorid 5 gL<sup>-1</sup>; agar 12 gL<sup>-1</sup>. pH vrijednost podloge je 7,3. Podloga sadrži 5 % defibrirane ovčje krvi.

#### **d) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj patogenih mikroorganizama**

- ❖ HA (hranjivi agar) (Biolife, Italija) sastava: pepton 15,0 g L<sup>-1</sup>; mesni ekstrakt 3,0 g L<sup>-1</sup>; NaCl 5,0 g L<sup>-1</sup>; K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g L<sup>-1</sup>; agar 18,0 g L<sup>-1</sup>; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C, 15min.
- ❖ HB (hranjivi bujon) (Biolife, Italija) - istog sastava kao i hranjivi agar, ali bez dodanog agara.
- ❖ BHI (eng. brain heart infusion) bujon (Biolife, Italija) sastava: dekstroza 0,002 g L<sup>-1</sup>; NaCl 0,005 g L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0025 g L<sup>-1</sup>; pepton 0,1 g L<sup>-1</sup>; ekstrakt telećeg mozga 200 g L<sup>-1</sup>; ekstrakt goveđeg srca 250 g L<sup>-1</sup>. Konačan pH podloge pri 25 °C je 7,4.
- ❖ BHI (eng. brain heart infusion) agar (Biolife, Italija) istog je sastava kao BHI bujon ali sadrži agar (2,5 %).
- ❖ TSB bujon (Biolife, Italija) sastava: produkti digestije kazeina 17 g L<sup>-1</sup>; produkti peptičke digestije soje 3 g L<sup>-1</sup>; glukoza (dekstroza) 2,5 g L<sup>-1</sup>; NaCl 5,0 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g L<sup>-1</sup>. Konačan pH podloge pri 25 °C je 7,3.

#### **e) Podloge za ispitivanje mikrobiološke ispravnosti proizvedenih mikroinkapsulata tijekom skladištenja**

- ❖ Fraser bujon sastava: proteaza pepton 5,0 g L<sup>-1</sup>; tripton 5,0 g L<sup>-1</sup>; goveđi ekstrakt 5,0 g L<sup>-1</sup>; ekstrakt kvasca 5,0 g L<sup>-1</sup>; natrij-klorid 20,0 g L<sup>-1</sup>; dinatrij-hidrogenfosfat anhidrid 9,5 g L<sup>-1</sup>; kalij-dihidrogenfosfat 1,35 g L<sup>-1</sup>; eskulin 1,0 g L<sup>-1</sup>; litij-klorid 3,0 g L<sup>-1</sup>; akriflavin HCl 0,025 g L<sup>-1</sup>; nalidiksična kiselina 0,02 g L<sup>-1</sup>. pH podloge je 7,32. Sterilizacija pri 121 °C, 15 min. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodan suplement (željezo amonijev citrat) prethodno sterilno rekonstituiran u 5 ml sterilne destilirane vode, sadržaj je dobro promješšan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.
- ❖ PALCAM agar sastava: pepto-kompleks 10,0 g L<sup>-1</sup>; triptoza 10,0 g L<sup>-1</sup>; pepton 3,0 g L<sup>-1</sup>; ekstrakt kvasca 3,0 g L<sup>-1</sup>; kukuruzni škrob 1,0 g L<sup>-1</sup>; natrij-klorid 5,0 g L<sup>-1</sup>; glukoza 0,5 g L<sup>-1</sup>; manitol 10,0 g L<sup>-1</sup>; eskulin 0,8 g L<sup>-1</sup>; željezo amonijev citrat 0,5 g L<sup>-1</sup>; litij-klorid 15,0 g L<sup>-1</sup>; fenolno crvenilo 0,08 g L<sup>-1</sup>; agar 12,0 g L<sup>-1</sup>; polimiksin B 10,0 mg L<sup>-1</sup>; ceftazidim 20,0 mg L<sup>-1</sup>; akriflavin HCl 5,0 mg L<sup>-1</sup>. pH podloge je 7,2. Sterilizacija pri 121 °C, 15 min. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodan suplement (*Listeria* PALCAM Antimikrobni) prethodno sterilno rekonstituiran u 5 mL sterilne destilirane vode, sadržaj je dobro promješšan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- ❖ RVS (eng. Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Broth) bujon sastava: sojin pepton 4,5 g L<sup>-1</sup>; natrijev klorid 7,2 g L<sup>-1</sup>; kalijev dihidrogenfosfat 1,26 g L<sup>-1</sup>; di-kalijev hidrogen

fosfat 0,18 gL<sup>-1</sup>; magnezijev klorid 13,4 gL<sup>-1</sup>; malahitno zelenilo oksalat 0,036 gL<sup>-1</sup>. pH vrijednost podloge je 5,2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C, 5 min. Sadržaj je dobro promješšan i razliven po 10 mL u epruvete s čepom.

- ❖ XLD (eng. Xylose Lysine Deoxycholate) agar sastava: ksiloza 3,75 gL<sup>-1</sup>; L-lizin 5 gL<sup>-1</sup>; laktoza 7,5 gL<sup>-1</sup>; saharoza 7,5 gL<sup>-1</sup>; natrijev klorid 5 gL<sup>-1</sup>; kvašćev ekstrakt 3 gL<sup>-1</sup>; natrijev deoksikolat 1 gL<sup>-1</sup>; natrijev tiosulfat 6,8 gL<sup>-1</sup>; amonij željezo (III) citrat 0,8 gL<sup>-1</sup>; fenol crveno 0,08 gL<sup>-1</sup>; agar 14,5 gL<sup>-1</sup>. pH vrijednost podloge je 4,7; podloga se sterilizira na plameniku do vrenja uz povremeno miješanje. Sadržaj je dobro promješšan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- ❖ RAPID'E. coli 2 agar sastava: pepton 10 gL<sup>-1</sup>, natrijev klorid 5 gL<sup>-1</sup>, kvašćev ekstrakt 3 gL<sup>-1</sup>, selektivni kromogeni mix 6 gL<sup>-1</sup>, agar 13 gL<sup>-1</sup>. pH vrijednost podloge je 7,2 ± 0,2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C, 15 min. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodan suplement (2 mL na 200 mL podloge), sadržaj je dobro promješšan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- ❖ VRBG (eng. Violet Red Bile Glucose) agar sastava: pepton 7 gL<sup>-1</sup>; kvašćev ekstrakt 3 gL<sup>-1</sup>; natrijev klorid 5 gL<sup>-1</sup>; žučne soli 1,5 gL<sup>-1</sup>; glukoza 10 gL<sup>-1</sup>; neutralno crveno 0,03 gL<sup>-1</sup>; kristal violet 0,002 gL<sup>-1</sup>; agar 15 gL<sup>-1</sup>. pH vrijednost podloge je 7,4 ± 0,4; podloga se sterilizira na plameniku do vrenja uz povremeno miješanje. Sadržaj je dobro promješšan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- ❖ Sladni agar sastava: sladni ekstrakt (praškasti) 20 g L<sup>-1</sup>; pepton 6 g L<sup>-1</sup>; glukoza 20 g L<sup>-1</sup>; agar 15 g L<sup>-1</sup>; pH 5,5; sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 min.
- ❖ Sladni bujon sastava istog kao sladni agar, samo bez dodatka agara.

### 3.1.5. Aparatura i pribor

- ❖ analitička vaga, Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ autoklav (Sutjeska, Beograd, Srbija)
- ❖ automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ❖ centrifuga, 5424R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- ❖ centrifuga, Centric 150 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- ❖ centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- ❖ čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- ❖ čitač mikrotitarskih pločica, Victor® (PerkinElmer, Waltham, SAD)
- ❖ denzitometar (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- ❖ DNA-termoblok, Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

- ❖ Epifluorescencijski mikroskop (Zeiss Göttingen, Njemačka) povezan s Comet assay II (Perceptive Instruments Ltd., Suffolk, UK)
- ❖ Eppendorf tubice (2ml)
- ❖ Erlenmeyerove tikvice
- ❖ ESI-Q-TOF Synapt G2-Si maseni spektrometar spregnut s nanoACQUITY tekućinskom kromatografijom UPLC (Waters, Milford, MA, SAD)
- ❖ filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0.22 µm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- ❖ horizontalna elektroforeza (Bio-Rad, Hercules, SAD)
- ❖ horizontalna elektroforeza, MSMIDI (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, UK)
- ❖ inkubator, Heraeus Hera Cell 240, (Langensfeld, Njemačka)
- ❖ inkubator, MEMMERT BE 600 (Mettmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Njemačka)
- ❖ kivete (50 ml)
- ❖ kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- ❖ laboratorijske čaše
- ❖ Laboratorijski laminar (Iskra Pio, Ljubljana, Slovenija)
- ❖ laboratorijski stalci
- ❖ magnetna mješalica (Domel, Železniki, Slovenija)
- ❖ magnetska mješalica, Lab Stir (Gilson, Middleton, WI, SAD)
- ❖ mikrobiološka ušica
- ❖ mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- ❖ mikrotitarske pločice s 96, 24 i 12 jažica (Falcon, SAD)
- ❖ Olympus BX-41 (Tokyo, Japan)
- ❖ Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- ❖ pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- ❖ plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- ❖ spektrofotometar, Helios β UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- ❖ sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ štapići po Drigalskom
- ❖ tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- ❖ Tekućinski kromatograf (Ultimate 3000 LC) spregnut s Q Exactive masenim spektrometrom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- ❖ transiluminator, MacroVue UVIS-20 (Hoefer, Inc., Holliston, MA, SAD)
- ❖ vertikalna elektroforeza (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, UK)



- ❖ vibracijska miješalica, V<sup>-1</sup> plus (Biosan, Riga, Latvija)

### 3.1.6. Kemikalije

- ❖ acetonitril (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ agaroz (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ agaroze (LMP i NMP) (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ akrilamid (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ alginat (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ amonijev persulfat (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- ❖ BenchTop 100 pb DNA standardi (Promega, Madison, WI, USA)
- ❖ Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- ❖ dimetilsulfoksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ etanol 70 % (v v<sup>-1</sup>) (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ etanol, 96% (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Etidij bromid (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- ❖ etilendiamintetraoctena kiselina, dinatrijeva sol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ fetalni teleći serum (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD)
- ❖ glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ glicin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Histopaque 1077 (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- ❖ HotStarTaq Plus master Mix (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- ❖ kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ kalijev hidroksid (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ Kit za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (Abcam, Cambridge, UK)
- ❖ Kit za određivanje tumorskog faktora nekroze (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Njemačka)
- ❖ kristal-violet 1% otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ ledena octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ limunska kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ lipopolisaharidi *E. coli* O55:B5 (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)

- ❖ metilensko modriLO R-250 (Merck, SAD)
- ❖ Midori Green Advance DNA boja (Nippon Genetics, Dueren, Njemačka)
- ❖ mravlja kiselina (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin (Serva, Heidelberg, Njemačka)
- ❖ N,N'-metilenbisakrilamid (Fluka, Buchs, Švicarska)
- ❖ Na sarkozinat (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- ❖ natrijev acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev citrat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev dodecilsulfat (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- ❖ natrijev hidroksid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- ❖ natrijev klorid (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- ❖ NucleoSpin® Microbal DNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- ❖ octena kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- ❖ standardi za proteinsku elektroforezu, 2-212 kDa (BioLabs, Engleska)
- ❖ standardna puferka otopina pH 4 (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)
- ❖ standardna puferka otopina pH 7 (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)
- ❖ TAE-pufer (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- ❖ Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, SAD)
- ❖ β-merkaptioetanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)

## **3.2. Metode rada**

### **3.2.1. Način odabira ispitanika te kriteriji za uključivanje u studiju**

U ovom istraživanju korišteni su uzorci stolice dojenčeta te venska krv troje dobrovoljnih darivatelja. Etičku prihvatljivost cjelokupnog istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu na sjednici održanoj 4. veljače 2021. godine (Ur.br. 100-21/21-1, Klasa 01-18/21-02-2/1), te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na sjednici održanoj 19. svibnja 2021. godine (Ur. Broj 380-59-10106-21-111/123, Klasa 641-01/21-02/01).

Odabir sudionika proveden je osobnim pristupom, direktno, od strane doktoranda Denija Kostelca te ostalih suradnika u istraživanju. Poziv za sudjelovanje bio je objavljen na oglasnoj ploči na Prehrambeno-biotehnoLOškom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kriteriji za darivatelje krvi za uključivanje u studiju: životna dob 18 – 40 godina, oba spola, u periodu od tri mjeseca nisu bili na antibiOLOškoj niti protuupalnoj terapiji, boravište na području Grada Zagreba. Kriteriji za isključivanje iz studije: akutna bolest, visoka konzumacija alkohola,

korištenje droga, trudnoća, alergije na hranu, konzumacija probiotika, korištenje antibiotika u posljednjih 3 mjeseca, radiološka pretraga u posljednjih 3 mjeseca, sudjelovanje u kliničkoj studiji za razvoj lijeka, ispitanici koji nemaju sposobnost samostalnog kretanja, autonomiju te oni koji ne mogu pratiti plan studije.

Kriteriji za darivatelje stolice za uključivanje u studiju: životna dob do 4 mjeseca, oba spola, boravište na području Grada Zagreba. Kriteriji za isključivanje iz studije: dijete hranjeno adaptivnim mlijekom, dijete koje je započelo s dohranom, konzumacija probiotika, korištenje antibiotika u posljednjih 3 mjeseca, akutne bolesti.

Ispitanici su upoznati sa svrhom istraživanja, rizicima i prednostima istraživanja. Prilikom odabira ispitanicima su bili usmeno i pismeno prikazani ciljevi i metodologija te prednosti i rizici istraživanja. Svojim potpisom ispitanici su iskazali pristanak za sudjelovanjem u istraživanju. Privatnost i anonimnost darivatelja krvi zaštićena je tako što je svakom ispitaniku po ispunjenju upitnika dodijeljena šifra pod kojom su se uzorci vodili tijekom istraživanja. U svim izvještajima i publikacijama anonimnost darivatelja ostat će zajamčena. Također, darivatelji su biti upoznati s pravom da u bilo kojem trenutku mogu bez navedenog razloga odustati od istraživanja te se u tom slučaju niti jedan podatak neće koristiti u disertaciji, te također da se niti jedan privatni podatak od imena, prezimena, adrese i kontakta neće koristiti u objavljenim radovima. Upitnici se čuvaju u arhivi Jedinice za mutagenezu na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehnoškog fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a uvid u njihov sadržaj nije omogućen neovlaštenom osoblju.

Ovo istraživanje predstavljalo je minimalan rizik za darivatelje jer su uzorkovanja minimalno invazivna ili potpuno neinvazivna. Vensku krv vadila je Maja Nikolić, med. lab. ing., Jedinica za mutagenezu, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada. Zbrinjavanje biološkog otpada preostalog nakon analiza u laboratorijima Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada provelo se neškodljivo prema standardima i zakonskim propisima (prema Naputku o postupanju s otpadom koji nastaje u pružanju zdravstvene zaštite; NN50/00).

### **3.2.2. Izolacija bakterija mliječne kiseline**

#### **3.2.2.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka mlijeka magarice i kobile**

Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka mlijeka magarice i kobile provedena je klasičnim mikrobiološkim metodama. Nakon temperiranja pristiglih uzoraka mlijeka na sobnu

temperaturu, po 1 mL uzorka mlijeka prebačen je u 5 mL MRS bujona (Biolife) u triplikatu te je stavljen 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 Drygalskom na MRS agar te je stavljeno na inkubaciju tijekom 24 – 48 h na 37 °C aerobno i anaerobno. Nakon inkubacije, porasle pojedinačne kolonije naciepljene su u zasebne MRS bujone te inkubirane na 37 °C u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Nakon inkubacije i porasta, izolati su pročišćeni naciepljivanjem na MRS-agar te, ukoliko se radilo o morfološki ujednačenim kulturama, spremljene su pod oznakom izolata na -20 °C u 30 % glicerolu do daljnje upotrebe.

### **3.2.2.2. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka stolice dojenčeta**

Izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzorka stolice dojenčeta provedena je klasičnim mikrobiološkim metodama. Odmah nakon uzorkovanja, 1 g uzorka stolice prebačen je s korištene pelene u 5 mL MRS bujona u duplikatu te je stavljen na inkubaciju u termostat na 37 °C tijekom 24 h aerobno i anaerobno u anaerokult. Nakon inkubacije, po 0,1 mL decimalnih razrijeđenja ( $10^{-1}$  do  $10^{-5}$ ) poraslih kultura razmazano je štapićem po Drygalskom na MRS i na BSM agare te inkubirano tijekom 24 – 48 h na 37 °C aerobno i anaerobno. Nakon inkubacije, porasle pojedinačne kolonije naciepljene su u zasebne MRS i BSM bujone i inkubirane na 37 °C aerobno i anaerobno. Nakon inkubacije i porasta, izolati su pročišćeni naciepljivanjem na MRS agar te, ukoliko se radilo o morfološki ujednačenim kulturama, spremljene su pod oznakom izolata na -20 °C u 30 % glicerolu do daljnje upotrebe.

### **3.2.3. Opća morfološka i probiotička karakterizacija dobivenih izolata**

#### **3.2.3.1. Priprema radnih suspenzija, određivanje broja stanica i izdvajanje unutarstaničnog sadržaja**

##### **3.2.3.1.1. Priprema radnih suspenzija bakterija mliječne kiseline**

Nakon prekonoćnog uzgoja u MRS bujonu, bakterijske stanice izdvojene su iz suspenzije centrifugiranjem pri  $6000 \text{ okretaja min}^{-1}$  u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja, supernatant je odvojen, a istaložene stanice resuspendirane su u 9 mL sterilne deionizirane vode, te ponovno centrifugirane u istim uvjetima. Postupak ispiranja sterilnom vodom ponovljen je dva puta te su se nakon ispiranja istaložene stanice resuspendirale u 10 mL sterilne vode formirajući radnu suspenziju stanica.

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

Broj bakterijskih stanica u uzorcima određen je naciepljivanjem decimalnih razrijeđenja uzorka na MRS agar. Nakon inkubacije, izbrojane su porasle kolonije na agaru te je izračunat broj

stanica u ispitivanim uzorcima koji je izražen kao jedinice koje tvore kolonije po mililitru (CFU, eng. colony forming units).

#### **3.2.3.1.3. Izdvajanje unutarstaničnog sadržaja bakterija mliječne kiseline**

Za izdvajanje unutarstaničnog sadržaja korištene su pripremljene suspenzije prekončno uzgojenih kultura. Nakon pripreme radnih suspenzija, pripremljenih prethodno opisanim postupkom pod 3.2.3.1.1., smjesa od 2 mL suspenzije stanica i staklenih kuglica zajedno je izmješana na vibromješaču (1,5 min) te uzastopno hlađena na ledu (1 min). Postupak miješanja i hlađenja ponovljen je pet puta uzastopno. Izdvajanje unutarstaničnog sadržaja rezultat je trenja među staklenim kuglicama nastalih u koraku miješanja. Nakon tretmana, nastali fragmenti razbijenih stanica i staklene kuglice odvojene su od unutarstaničnog sadržaja centrifugiranjem na 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  u vremenu od 10 min. Unutarstanični sadržaj je izdvojen pažljivim pipetiranjem te je prebačen u sterilne kivete i pohranjen na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnjih analiza.

#### **3.2.3.2. Ispitivanje otpornosti izolata na niske pH vrijednosti**

Nakon prekončnog uzgoja u MRS bujonu, stanice bakterijskih izolata odvojene su od medija centrifugiranjem (6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ , 15 min), isprane dva puta sterilnom deioniziranom vodom te resuspendirane u deioniziranoj vodi kojoj je pH podešen na 2,5 pomoću klorovodične kiseline. Nakon dva sata, određen je broj živih stanica indirektnom metodom nacjepljivanja na MRS agar i izračunata je CFU vrijednost. Određen je postotak preživljenja u usporedbi s početnim brojem i kontrolnim uzorkom kojemu nije podešen pH.

#### **3.2.3.3. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline na različitim temperaturama**

Nakon prekončnog uzgoja u MRS bujonu, pripremljena je suspenzija bakterijskih stanica kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.3.1.1. Naknadno su suspenzije izložene različitim temperaturama ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) tijekom 24 sata. Nakon tretmana, broj preživjelih stanica određen je indirektnom metodom.

#### **3.2.3.4. Katalaza test**

Katalaza test proveden je na predmetnici tako što su dodane dvije kapi 3 % vodikovog peroksida na prekončnu kulturu bakterija mliječne kiseline poraslu na MRS agaru. Katalaza test se smatra pozitivnim ukoliko dođe po pojave mjehurića kisika koji su rezultat enzimskog cijepanja peroksida.

#### **3.2.3.5. Određivanje hemolitičke aktivnosti**

Hemolitička aktivnost izolata bakterija mliječne kiseline određena je prema metodi koju su opisali Halder i sur. (2017). Nakon prekončnog uzgoja u MRS bujonu, porasle kulture su

nacijepnjene na Columbia krvni agar i inkubirane 24 do 48 h na 37 °C. Nakon inkubacije, na krvnom agaru su se ispitale porasle kolonije na prisutnost ili odsutnost hemolitičkih zona. Vidljive prozirne zone oko kolonija ukazuju na  $\beta$ -hemolizu, zelene zone rezultat su  $\alpha$ -hemolize dok izostanak zona oko kolonija ukazuje na  $\gamma$ -hemolizu, odnosno izostanak hemolitičke aktivnosti.

### **3.2.3.6. Identifikacija bakterijskih izolata**

#### **3.2.3.6.1. Analiza 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<sup>TM</sup> (BioMerieux, Francuska).

#### **3.2.3.6.2. Genetička identifikacija izolata**

Ukupna genomska DNA izolirana je prema postupku opisanom u radu od Martín-Platero i sur. (2007) i služila je kao predložak za reakciju lančane polimeraze (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) provedenu pomoću Q5 polimeraze (NEB, SAD), prema uputama proizvođača. Sekvence koje kodiraju 16S rRNA su amplificirane i sekvencionirane s već opisanim početnicama 27F i 1492R (Lane, 1991). Lokusi *recA* (Torriani i sur., 2001) amplificirani su i sekvencionirani s dizajniranim početnicama LbrecA-f (5'- TTGGCTGATGCACGGAAA-3') i LbrecA-r (5'GCGAGGATTATACCGAAAACATTCAT-3') koje amplificiraju *recA* gene u *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* i *Lb. pentosus*. Dobiveni PCR produkti pročišćeni su pomoću Monarch DNA gel ekstrakcijskog kita (NEB, SAD) i sekvencionirani pomoću Microsyntha (Austria). DNA sekvenca je analizirana pretraživanjem EzBioCloud baze podataka (Yoon i sur., 2017) i NCBI BLAST baza podataka (Sayers i sur., 2011).

#### **3.2.3.7. Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike disk difuzijskom metodom**

Određivanje osjetljivosti na odabrane antibiotike provedeno je prema smjernicama Europskog odbora za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (EUCAST) uz minimalne izmjene u svrhu prilagodbe metode bakterijama mliječne kiseline.

Nakon uzgoja na MRS agaru, porasle kolonije bakterija mliječne kiseline sterilnom su ušicom resuspendirane u sterilnoj fiziološkoj otopini (0,85 % NaCl) te je gustoća suspenzije podešena pomoću denzitometra na 0,5 McF. Sterilni pamučni štapić uronjen je u suspenziju te je višak suspenzije uklonjen laganim pritiskanjem na unutarnje stijenke epruvete. Nakon toga, inokulum (suspenzija stanica) je pomoću pamučnog štapića nanešen jednoliko po MRS agaru razmazivanjem u tri smjera. Nakon naciepljivanja, unutar 15 min od razmazivanja, na inokulirani MRS agar dodani su diskovi ispitivanih antibiotika te su ploče stavljene na inkubaciju na 37 °C. Kako bi se spriječilo preklapanje potencijalnih zona inhibicije, po jednom agaru dodana su najviše tri diska antibiotika. Nakon inkubacije, ukoliko je došlo do pojave zona inhibicije tada se smatra da je ispitivani soj osjetljiv na testirani antibiotik te se u takvim slučajevima mjere promjeri zona inhibicije i izražavaju se u milimetrima. U ovom radu ispitivala se osjetljivost izolata bakterija mliječne kiseline na navedene antibiotike: kloramfenikol, klindamicin, tetraciklin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, gentamicin, ampicilin i vankomicin.

### **3.2.3.8. Antimikrobna aktivnost prema odabranim patogenima**

Nakon prekonoćnog uzgoja u MRS bujonu, stanice bakterija mliječne kiseline odvojene su od medija centrifugiranjem na 6000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 10 min. Supernatanti su odvojeni te sterilizirani kroz filtere veličine 0,22 µm. Nakon toga, supernatant je raspodijeljen na tri dijela: netretiran, neutraliziran pomoću NaOH do pH 6,6 te treći koji je zagrijavan na 100 °C tijekom 20 min.

Antimikrobna aktivnost supernatanta određena je na polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 96 jažica prilagođenim postupkom prema Frece i sur. (2011) i Ratsep (2014). Određena je antimikrobna aktivnost prema test-mikroorganizmima: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ i *Candida albicans* ATCC®10231™.

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 240 µL ispitivanog supernatanta bakterija mliječne kiseline, 30 µL medija za patogene (hranjivi bujon, odnosno sladni bujon za *Candida albicans*) te su inokulirane s 10 µL prethodno uzgojenog ispitivanog test-mikroorganizma. Provedena je inkubacija na 37 °C tijekom 48 sati te je u intervalima mjerena apsorbancija na 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Praćen je rast u navedenom razdoblju te je izračunata inhibicija pomoću izraza:

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

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.

### **3.2.3.9. Određivanje autoagregacijske sposobnosti bakterija mliječne kiseline**

Bakterijske stanice su nakon prekonocnog 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 1, 2, 3, 4 i 24 sata. 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

### **3.2.3.10. Određivanje sposobnosti koagregacije izolata s odabranim patogenima**

Bakterijske suspenzije za određivanje koagregacije pripremljene su kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.3.9. Za određivanje stupnja koagregacije, pomješani su jednaki volumeni suspenzija bakterija mliječne kiseline i suspenzija odabranih test-mikroorganizama. Test-mikroorganizmi korišteni u ovom ispitivanju su: *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ i *Candida albicans* ATCC®10231™.

Pažljivo uzorkovanje s vrha pripremljenih suspenzija u mirovanju provodilo se tijekom 24 sata inkubacije na 37 °C, mjerenje apsorbancije provedeno je ekvivalentno prethodno opisanoj metodi autoagregacije.

### **3.2.3.11. Određivanje hidrofobnosti stanične površine bakterija mliječne kiseline**

Sposobnost adhezije bakterija mliječne kiseline na ugljikovodike određena je prema metodi opisanoj u Mishra i Prasad (2005) uz određene izmjene. Nakon uzgoja u MRS bujonu, porasle



kulture odvojene su od uzgojnog medija centrifugiranjem na 6000 okretaja min<sup>-1</sup>, 15 min. Bakterijske stanice su se nakon odvajanja isprale dva puta sterilnom deioniziranom vodom i resuspendirale u PUM - fosfat urea magnezij sulfatnom puferu. U 3 mL suspenzije bakterijskih stanica dodano je po 1 mL ispitivanog ugljikovodika. Za određivanje hidrofobnosti korištena su četiri ugljikovodika: kloroform, heksan, toluen i ksilen. Uzorci su inkubirani na 37 °C tijekom jednog sata kako bi se odvojile faze. Nakon odvajanja faza, pažljivo se uklonila donja faza te joj se izmjerila apsorbancija na 600 nm pomoću spektrofotometra.

Postotak hidrofobnosti izračunao se prema sljedećoj formuli:

$$\text{Hidrofobnost (\%)} = \left( \frac{A-A_0}{A} \right) \times 100 \quad [3]$$

Gdje je:

A = početna apsorbancija

A<sub>0</sub> = konačna apsorbancija

### **3.2.3.12. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima probavnog sustava**

Određen je kontinuirani stupanj preživljavanja izolata bakterija mliječne kiseline u simuliranim uvjetima usta, želuca i crijeva. 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 Frece (2007) za simulaciju uvjeta želuca i crijeva:

#### **3.2.3.12.1. Priprema simuliranih uvjeta usne šupljine**

Uvjeti koji oponašaju prirodne uvjete usne šupljine ostvareni su pripremom otopine sastava (gL<sup>-1</sup>): KCl 0,8946, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8878, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,680, NaHCO<sub>3</sub> 1,680 i CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 0,1981 kojoj je pH podešen na 6,8 pomoću koncentrirane kloridne kiseline.

#### **3.2.3.12.2. Priprema simuliranih uvjeta želuca**

Uvjeti koji oponašaju prirodne uvjete želuca ostvareni su otapanjem pepsina (3 gL<sup>-1</sup>) u otopini sljedećih soli (gL<sup>-1</sup>): NaCl 9,0, KCl 0,8946, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8878, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,680, NaHCO<sub>3</sub> 1,680, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 0,1981 te podešavanjem pH na 3,0 pomoću koncentrirane kloridne kiseline.

#### **3.2.3.12.3. Priprema simuliranih uvjeta u crijevima**

Uvjeti koji oponašaju uvjete u tankom crijevu ostvareni su otapanjem pankreatina (1 gL<sup>-1</sup>) i žučnih soli (3,0 gL<sup>-1</sup>) u otopini sljedećih soli (gL<sup>-1</sup>): NaCl 9,0, KCl 0,8946, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8878,

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,680, NaHCO<sub>3</sub> 1,680, CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 0,1981 te podešavanjem pH na 7,0 pomoću natrijeve lužine.

#### **3.2.3.12.4. Određivanje stupnja preživljenja**

Nakon uzgoja u MRS bujonu, porasle kulture resuspendirane su u sterilnoj fiziološkoj otopini. Suspenzijama bakterija ujednačen je broj stanica na 10<sup>7</sup> st mL<sup>-1</sup> te je po 1,5 mL suspenzije dodano u 6 mL pripravljene otopine za simulaciju usne šupljine i inkubirano na 37 °C, 2 min. Nakon toga stanice su odvojene centrifugiranjem na 6000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 6 min te resuspendirane u simuliranoj otopini želuca i inkubirane na 37 °C, 2 h. Nakon inkubacije, ekvivalentno prvom međukoraku, stanice su na 4 sata resuspendirane u simuliranim uvjetima tankog crijeva.

Nakon svakog koraka, indirektnom metodom naciepljivanja na MRS agar, određen je broj bakterijskih stanica. Usporedbom s početnim brojem u suspenziji, izračunat je postotak preživljenja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava.

#### **3.2.3.13. Liofilizacija bakterija mliječne kiseline**

Bakterijske kulture uzgojene su na MRS hranjivoj podlozi te su odvojene od medija centrifugiranjem pri 6000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 10 min, isprane sterilnom deioniziranom vodom te resuspendirane u obranom mlijeku (10 %). Pripremljene suspenzije zamrznute su na -80 °C preko noći. Tako zamrznute, suspenzije su liofilizirane u liofilizatoru Christ Alpha 1-2 LD plus te je prije i nakon liofilizacije određen broj živih stanica indirektnom metodom. Usporedbom stupnja preživljenja prije i nakon liofilizacije, određena je uspješnost postupka te sposobnost stanica da prežive proces liofilizacije.

#### **3.2.3.14. Sposobnost formiranja biofilmova bakterijskih izolata**

Sposobnost formiranja biofilmova određena je prema metodi opisanoj u Kostelac i sur. (2021). Ispitivane izolate bakterija mliječne kiseline klasificiralo se prema jačini nastalih biofilmova nakon inkubacije.

U polistirenskim mikrotitarskim pločicama s 24 jažice dodano je 2 mL MRS bujona. Uzorci su naciepljeni s 100 µL suspenzije prethodno uzgojenih bakterijskih kultura te su pločice inkubirane na 37 °C tijekom 48 h. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je ispražnjen pažljivim pipetiranjem kako ne bi došlo do grebanja dna jažica, a talog bakterijskih stanica je ispran je s 2 mL sterilne vode uz lagano miješanje. Preostale stanice (adhezirane u biofilm) fiksirane su dodatkom 2 mL metanola te inkubacijom tijekom 15 min. Nakon fiksiranja, metanol je uklonjen, a pločice osušene na zraku. Dodatkom 1 %-tnog kristal violeta tijekom 5 min obojane

su adhezirane stanice. Višak boje uklonjen je temeljitim ispiranjem deioniziranom vodom. Vezana boja otpuštena je dodatkom 2 mL 33 % octene kiseline te je mjerena optička gustoća (OD) pri 595 nm pomoću spektrofotometra. Negativna kontrola bili su neinokulirani uzorci.

Dobivene vrijednosti optičke gustoće uspoređene su s optičkom gustoćom negativne kontrole (ODC) te su klasificirani prema Borges i sur. (2012). Klasifikacije su prikazane u tablici 4.

**Tablica 4.** Klasifikacija formacije biofilмова usporedbom optičke gustoće uzorka i negativne kontrole prema Borges i sur. (2012).

Usporedba OD i ODC vrijednosti	Klasifikacija proizvodnje biofilma
$OD < ODC$	nema formacije biofilma
$ODC < OD < 2 \times ODC$	slaba formacija biofilma
$2 \times ODC < OD \leq 4 \times ODC$	umjerena formacija biofilma
$4 \times ODC < OD$	jaka formacija biofilma

### 3.2.4. Probiotička karakterizacija za primjenu u zaštiti zuba i usne šupljine

Probiotička karakterizacija dobivenih izolata za ciljano korištenje u očuvanju zdravlja zubi i usne šupljine temeljila se na ispitivanju interakcija izolata s najčešćim uzročnicima zdravstvenih oboljenja zuba i okolnih tkiva.

#### 3.2.4.1. Test mikroorganizmi uzročnici oboljenja zuba i usne šupljine

Korišteni test-mikroorganizmi koji imaju dokazanu ulogu u razvoju oboljenja zuba i usne šupljine pribavljeni su iz Njemačke zbirke mikroorganizama i staničnih kultura (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, DSMZ). Pribavljeni su bakterijski sojevi: *Streptococcus mutans* DSM<sup>®</sup>20523<sup>TM</sup>, *Streptococcus intermedius* DSM<sup>®</sup>20573<sup>TM</sup>, *Porphyromonas gingivalis* DSM<sup>®</sup>28984<sup>TM</sup> i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSM<sup>®</sup>11122<sup>TM</sup>.

#### 3.2.4.2. Uzgoj test mikroorganizama

Bakterije roda *Streptococcus* uzgajane su aerobno u M17 bujonu na 37 °C tijekom 24 do 48 h. *Porphyromonas gingivalis* uzgojen je u triptičnom soja bujonu anaerobno pri 37 °C tijekom 24 do 48 h. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* uzgojen je u triptičnom soja bujonu s dodatkom 5 % telećeg fetalnog seruma na 37 °C tijekom 48 h.

#### **3.2.4.3. Preživljavanje izolata bakterija mliječne kiseline u uvjetima simulirane sline**

Nakon prekonoćnog uzgoja u MRS bujonu, ispitivani sojevi bakterija mliječne kiseline odvojeni su od hranjivog medija centrifugiranjem ( $6000 \text{ okretaja min}^{-1}$ ), isprani dva puta sterilnom fiziološkom otopinom (0,5 % NaCl) te resuspendirani u otopini simulirane sline. Pripremljene suspenzije kalibrirane su na optičku gustoću ( $OD_{600}$ ) od 0,25.

Simulirana slina pripremljena je prema protokolu od Marques i sur. (2011) označenom kao SS1 i opisanom u poglavlju 3.2.3.12.1. U vremenskim intervalima do 24 h određen je broj bakterijskih stanica te uspoređen s kontrolom (stanice resuspendirane u sterilnoj demineraliziranoj vodi) indirektnom metodom nacjepljivanja na MRS agar, inkubacijom te izražavanjem broja preživjelih bakterija kao  $CFU \text{ mL}^{-1}$ .

#### **3.2.4.4. Sposobnost formiranja biofilmova uzročnika bolesti zuba**

Određena je *in vitro* sposobnost formiranja biofilmova test mikroorganizama, uzročnika bolesti zuba i usne šupljine prema već opisanom protokolu navedenom u poglavlju 3.2.3.14. uz iznimku korištenja prikladnih hranjivih medija i uvjeta uzgoja test-mikroorganizama opisanih u poglavlju 3.2.4.2.

#### **3.2.4.5. Koagregacija zubnih patogena i izolata bakterija mliječne kiseline**

Nakon prekonoćnog uzgoja u MRS bujonu, porasle kulture bakterija mliječne kiseline izdvojene su centrifugiranjem, biomasa je isprana dva puta sterilnom demineraliziranom vodom te su kulture resuspendirane u simuliranoj slini pripremljenoj kako je prethodno opisano u poglavlju 3.2.3.12.1. Navedeni postupak proveden je i za test-mikroorganizme uzročnike oboljenja zuba.

Sposobnost koagregacije izolata bakterija mliječne kiseline i dentalnih patogena provedena je i izračunata prema već opisanom postupku u poglavlju 3.2.3.10. uz iznimku otopine pripremljenih suspenzija jer su se u ovom dijelu istraživanja koristile suspenzije koje oponašaju uvjete sline stoga je korištena simulirana slina kao otapalo za suspenzije mikroorganizama.

#### **3.2.4.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti prema dentalnim patogenima**

Antimikrobna aktivnost supernatanta izolata bakterija mliječne kiseline prema test-mikroorganizmima uzročnicima oboljenja zubi i usne šupljine određena je metodom opisanom u poglavlju 3.2.3.8. uz iznimku korištenja hranjivih medija prilagođenim test-mikroorganizmima opisanim u poglavlju 3.2.4.2.

### **3.2.4.7. Inhibicija formiranja biofilmova zubnih patogena**

Određena je sposobnost formiranja biofilmova test mikroorganizama uzročnika oboljenja zubi u prisutnosti različitih razrijeđenja supernatanta ispitivanih izolata bakterija mliječne kiseline izdvojenih nakon prekonocnog uzgoja u MRS bujonu.

Određivanje stupnja inhibicije provedeno je u mikrotitarskim pločicama s 12 jažica, a uzorci su sadržavali 2 mL medija patogena, 400  $\mu\text{L}$  određenog razrijeđenja supernatanta bakterija mliječne kiseline te 100  $\mu\text{L}$  inokuluma suspenzije patogena. U kontrolne uzorke dodan je sterilni MRS bujon dok su neinokulirani uzorci služili kao kontrole. Kvantifikacija i klasifikacija proizvedenih biofilmova provedena je prema Borges i sur. (2012). Eksperiment je proveden u četverostrukoj paraleli.

### **3.2.5. Probiotička karakterizacija sojeva za primjenu u redukciji *Helicobacter pylori***

#### **3.2.5.1. Određivanje antimikrobne aktivnosti prema *Helicobacter pylori***

Nakon prekonocnog uzgoja u MRS bujonu, stanice bakterija mliječne kiseline odvojene su od medija centrifugiranjem na 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 10 min. Supernatanti su odvojeni te su sterilizirani filtracijom kroz 0,22  $\mu\text{m}$  filtere. Nakon toga, supernatant je raspodijeljen na tri dijela: netretiran, neutraliziran pomoću NaOH do pH 7 te treći, koji je zagrijavan na 100 °C tijekom 20 min.

Antimikrobna aktivnost supernatanta određena je na mikrotitarskoj ploči s 96 jažica prilagođenom metodom prema Ratsep (2014). Određena je antimikrobna aktivnost prema *Helicobacter pylori* DSM<sup>®</sup>10242<sup>™</sup>.

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 120  $\mu\text{L}$  supernatanta bakterija mliječne kiseline, 120  $\mu\text{L}$  TSB bujona s dodatkom 5 % goveđeg seruma. Inokulacija je provedena dodatkom 10  $\mu\text{L}$  prekonocno uzgojene *Helicobacter 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 izračunata inhibicija prema izrazu [1].

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.

### **3.2.5.2. Sposobnost koagregacije probiotičkih bakterija i *Helicobacter pylori***

Sposobnost koagregacije potencijalnih probiotičkih izolata i *Helicobacter pylori* DSM®10242™ provedena je metodom opisanom u poglavlju 3.2.3.10. uz iznimku pripreve suspenzija u uvjetima simuliranog soka želuca.

### **3.2.6. Probiotička karakterizacija sojeva s protuupalnom aktivnošću**

#### **3.2.6.1. Priprema frakcija bakterijskih metabolita**

Nakon prekonoćnog uzgoja u MRS bujonu, stanice bakterija mliječne kiseline odvojene su od podloge centrifugiranjem na 6000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 10 min, isprane dva puta sterilnom fiziološkom otopinom (0,5 %) te su prebačene u 5 mL RPMI 1640 medija koji sadrži 5 % telećeg fetalnog seruma te inkubirane 48 sati na 37 °C. Nakon inkubacije, bakterijske stanice odvojene su od podloge centrifugiranjem na 6000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 20 min pri 4 °C. Supernatanti su prebačeni u sterilne kivete, filtrirani na 0,22 µm membranama i prebačeni u VIVACON 2 (propuštanje molekula (eng. *cut-off*) manjih od 2000 Daltona) kivete te centrifugirani na 2500 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 20 min na 4 °C. Frakcije s metabolitima manjim od 2000 Daltona koje su prošle kroz membranu, prebačene su u sterilne kivete i zamrznute na -20 °C do korištenja.

#### **3.2.6.2. Izolacija i tretman stanica periferne krvi**

Izolacija stanica iz pune krvi dobrovoljnih davatelja provedena je pomoću centrifuge u gradijentu gustoće koristeći Histopaque 1077. Navedenu metodu su prethodno opisali Gajski i sur. (2016). Ukupno, 10<sup>4</sup> izoliranih stanica po uzorku je dodano u 500 µL pripremljenih frakcija metabolita bakterija mliječne kiseline u prisutnosti i odsutnosti 10 ng mL<sup>-1</sup> pročišćenih LPS-a *E. coli* i inkubirano tijekom 4 sata na 37 °C pri 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **3.2.6.3. Određivanje tumorskog faktora nekroze**

Određivanje tumorskog faktora nekroze (TNF-alfa) u izoliranim stanicama periferne krvi u indukciji LPS-om te u prisutnosti frakcija metabolita bakterija mliječne kiseline provedeno je pomoću imunoenzimske ELISA metode prema uputama proizvođača. Rezultati koncentracije citokina kvantificirani su iz baždarne krivulje i izraženi kao pg mL<sup>-1</sup>.

#### **3.2.6.4. Metabolomička analiza aktivnih probiotičkih frakcija metabolita**

Provedena je metabolomička LC-MS analiza aktivnih frakcija metabolita (manjih od 2000 Daltona) izolata *Lb. plantarum* M2, pripremljenih kako je opisano u poglavlju 3.2.6.1.

#### **3.2.6.4.1. Priprema uzorka**

Uzorak je nakon odležavanja raspoređen u volumen od 0,5 mL i liofiliziran. Nakon liofilizacije uzorak je pomješan s 500 mL 80 %-tnog metanola. Uzorci su potom izmješani na vibromješaču 60 s i sonificirani 30 min na 4 °C. Nakon sonifikacije, uzorci su zamrznuti na -20 °C tijekom jednog sata, te 30 min na -40 °C. Nakon zamrzavanja, uzorci su centrifugirani na 12000 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 15 min na 4 °C. U 200 µL supernatanta dodano je 5 µL klorfenilalanina (1 mg mL<sup>-1</sup>) i prebačeo u viala za LC-MS analizu.

#### **3.2.6.4.2. LC-MS analiza metabolita u aktivnim frakcijama**

Separacija je provedena pomoću Ultimate 3000 sustava tekućinske kromatografije spregnutog s *Q exactive* spektrometrom masa analiziranog sa sustavom ionizacije raspršenim elektronima (ESI, eng. *electrospray ionisation* spregnutim s masenim spektrometrom, ESI-MS). Sustav tekućinske kromatografije sastoji se od ACQUITY UPLC HSS T3 (100×2.1mm×1.8 µm) s Ultimate 3000 LC sustavom. Mobilna faza sastojala se od otapala A (0,05 % mravlja kiselina) i otapala B (acetonitril) s gradijentnom eluacijom (0-1 min, 5 % B; 1-12 min, 5 %-95 % B; 12-13.5 min, 95 % B; 13.5-13.6 min, 95 %-5 % B; 13.6-16 min, 5 % B). Protok mobilne faze bio je 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura kolone održavana je na 40 °C, a temperatura sakupljača frakcija bila je podešena na 4°C.

Parametri spektrometrije masa u ESI+ i ESI- modu bili su: ESI+ : temperatura grijača 300 °C; protok plina u omotaču 45 arbitrarnih jedinica (arb); protok pomoćnog plina 15 arb; protok plina za čišćenje 1 arb; napon raspršivanja 3.0 KV; temperatura kapilare 350 °C; *S-Lens RF* razina 30 %. ESI-: temperatura grijača 300 °C, protok plina u omotaču 45 arb; protok pomoćnog plina 15 arb; protok plina za čišćenje 1 arb; napon raspršivanja 3.2 KV; temperatura kapilare 350 °C; *S-Lens RF* razina 60 %.

#### **3.2.6.4.3. Obrada podataka**

Dobiveni podaci su analizirani na osnovi retencijskog vremena, m/z omjera te su dobivene molekulske mase i, nakon provedene normalizacije podataka, identificirani su metaboliti u uzorcima. Dobiveni metaboliti su statistički analizirani T-testom u programu Excel te su detektirani značajno ( $p < 0,05$ ) različiti metaboliti u kontrolnim i aktivnim frakcijama pomoću analize glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*, PCA) i Heatmap analize u softveru MetaboAnalyst 5.0 (Xia i sur., 2009).

### **3.2.6.5. Analiza ekspresije gena u mononuklearnim stanicama u upalnom modelu**

#### **3.2.6.5.1. Tretman mononuklearnih stanica u uvjetima inducirane upale LPS-om.**

Izolacija stanica iz pune krvi dobrovoljnih sudionika provedena je pomoću centrifuge u gradijentu gustoće koristeći Histopaque 1077. Navedenu metodu su prethodno opisali Gajski i sur. (2016). Ukupno,  $10^4$  izoliranih stanica po uzorku je dodano u 500  $\mu\text{L}$  pripremljenih frakcija metabolita bakterija mliječne kiseline u prisutnosti i odsutnosti 10 ng  $\text{mL}^{-1}$  pročišćenih lipopolisaharida *E. coli* (Merck) i inkubirano tijekom 4 sata na 37 °C pri 5 %  $\text{CO}_2$ .

#### **3.2.6.5.2. Ekstrakcija proteina, pročišćavanje i digestija**

Stanice su isprane tri puta s 50 mM amonij bikarbonatnim puferom (pH 7,8) te je na talog stanica dodano 200  $\mu\text{L}$  pufera za liziranje (2% SDS, 100 mM Tris-HCl, 20 mM DTT). Stanice su inkubirane u puferu za liziranje 30 min te su svakih 10 min izmješane na vibromješaču 10 s. Uzorci su centrifugirani pri  $12\,000 \times g$  tijekom 20 min te je supernatant odvojen u čistu kivetu. Alikvot od 200  $\mu\text{L}$  smjese ekstrahiranih proteina dodan je u čisti filter, pomješan s 200  $\mu\text{L}$  UA (8 M urea u 100 mM Tris/HCL otopine pufera) i centrifugiran pri  $12\,000 \times g$  tijekom 20 min na 20 °C. Opisani korak je ponovljen dva puta te su filteri isprani dva puta s 200  $\mu\text{L}$  50 mM amonij-bikarbonatnim puferom. Triptična digestija provedena je dodatkom 1 mL otopine tripsina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i 100  $\mu\text{L}$  50 mM amonijeva bikarbonatnog pufera te prekonoćnom inkubacijom konačne otopine na termomikseru pri 37 °C i 500 okretaja  $\text{min}^{-1}$ . Sljedeći dan, peptidi su sakupljeni centrifugiranjem pri  $12\,000 \times g$  tijekom 15 min te ispiranjem s 50  $\mu\text{L}$  50 mM amonijeva bikarbonata. Peptidi su desalinizirani koristeći C18 Zip Tip kolone. Eluirani peptidi osušeni su u vakuum koncentratoru i resuspendirani u 0,1 %-tnoj mravljoj kiselini.

#### **3.2.6.5.3. Masena spektrometrija (nanoLC-MS/MS) eluiranih peptida**

Uzorci su analizirani na ESI-Q-TOF Synapt G2-Si masenom spektrometru spregnutom s nanoACQUITY tekućinskom kromatografijom (UPLC). Parametri instrumenta podešeni su koristeći MassLynx software verziju 4.1. SCN902 (Waters, Milford, MA, SAD). Separacija peptida provedena je na analitičkoj koloni nanoAcquity UPLC 1.7  $\mu\text{m}$  BEH130 C 18, 100  $\mu\text{m} \times 100 \text{ mm}$  koristeći UPLC 2G-V/M Trap pre-kolonu (5  $\mu\text{m}$  Symmetry C 18, 180  $\mu\text{m} \times 20 \text{ mm}$ ). Injektirani volumen uzorka bio je 2  $\mu\text{L}$ . Primjenjen je 65 minutni gradijent za optimalnu separaciju triptiziranih peptida pomoću kromatografije u reverznoj fazi kao što je prikazano u tablici 5. Mobilna faza A je bila vodena otopina 0,1 % mravlje kiseline, a mobilna faza B je bila vodena otopina 0,1 % mravlje kiseline i 95 % acetonitrila. Protok je bio podešen na 1  $\mu\text{L min}^{-1}$ , a temperatura kolone bila je 40 °C. Uzorci peptida sakupljeni su pri niskoj i visokoj energiji MSE pristupom. U uvjetima niske energije, podaci su sakupljeni pri konstantnoj energiji sudara



od 4eV, dok je u stanju visoke energije, energija sudara linearno povišena od 20 do 40 eV. Podaci su sakupljeni svake sekunde u rasponu masa od 50 do 3200 Da. Tijekom analize uzoraka, konstantni protok leucin enkephalina (1 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , flow 0.4  $\mu\text{L min}^{-1}$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 556.2771$  Da) je korišten za kalibraciju masa.

**Tablica 5.** nanoUPLC gradijent mobilne faze tijekom nanoLC-MS/MS

Vrijeme (min)	% A	% B
Početni	99,0	1,0
0,10	99,0	1,0
25,0	60,0	40,0
40,0	40,0	60,0
50,0	1,0	99,0
55,0	99,0	1,0
65,0	99,0	1,0

#### 3.2.6.5.4. Analiza podataka

Dobiveni podaci analizirani su s pomoću ProteinLynx globalnog servera (PLGS; verzija 3.0.1). Postavke procesiranja peakova prilagođeni su MSE analizi i postavljeni na automatsku deizotopizaciju i dekonvoluciju. Daljnji parametri procesiranja postavljeni su na prag niske energije za 100 brojanja, prag povišene energije za 20 brojanja i prag intenziteta od 500 brojanja. Podaci su pretraženi preko UniProt baze podataka za proteom *Homo sapiens* UP000005640 (pristupljeno 15. travnja 2021 na <https://www.uniprot.org/>). Postavke pretraživanja bile su: 2 propuštena mjesta cjepanja, oksidacija metionina, deaminacija asparagina kao varijabilne modifikacije, 3 preklapanja ionskih fragmenata po peptidu, 7 preklapanja ionskih fragmenata po proteinu, 1 peptid po proteinu, pogrešno otkrivanje od 4 %.

#### 3.2.6.5.5. Obrada podataka

Dobiveni setovi eksprimiranih gena u uzorcima analizirani su s pomoću mrežnog sustava *David* v6.8 (Huang i sur., 2009a; Huang i sur., 2009b) tako što je unesena lista gena i provedena funkcionalna anotacijska analiza te je analizirana ontologija gena za biološke procese u bazi *Homo sapiens* kako bi se detektirali aktivni biološki procesi u uzorcima. Dodatna analiza provedena je na mrežnom sustavu *Panther* (Mi i sur., 2021; Mi i Thomas, 2009) gdje su ulazni podaci bili anotirana lista gena te je provedena funkcionalna klasifikacija za organizam *Homo sapiens*.

### 3.2.7. Probiotička karakterizacija sojeva s antioksidativnom aktivnošću

Ispitana je preliminarna antioksidativna aktivnost izolata mjerenjem sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala te je na osnovu toga odabran soj s najvećim potencijalom kojemu su detaljno ispitana antioksidativna svojstva.

#### 3.2.7.1 Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala

Sposobnost uklanjanja 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) slobodnih radikala, kao mjera ukupne antioksidativne aktivnosti, određena je prema prilagođenoj metodi prema Son i Lewis, (2002). Nakon uzgoja u MRS podlozi, bakterijske stanice odvojene su od hranjivog medija centrifugiranjem na 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 15 min te resuspendirane u sterilnoj demineraliziranoj vodi. Stanične suspenzije izolata bakterija mliječne kiseline prilagođene su tako da im broj stanica iznosi  $\sim 10^8$  stanica po mililitru poradi kvalitetnije usporedbe aktivnosti.

U 2 ml etanolne otopine DPPH radikala (0,07 mM) dodano je 1 mL suspenzije bakterijske kulture te se nakon kratke homogenizacije uzorak inkubirao u mraku 30 min. Nakon inkubacije, stanice su odvojene centrifugom na 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 5 min te je izmjerena apsorbancija na 517 nm pomoću spektrofotometra. Slijepa proba sadržavala je samo etanol i uzorak bakterijskih stanica, dok su kontrole sadržavale etanolnu otopinu DPPH i dodatak sterilne demineralizirane vode bez bakterijskih stanica. Postotak uklanjanja preostalih DPPH slobodnih radikala izračunat je prema izrazu:

$$\text{Uklanjanje radikala (\%)} = [1 - (A - A_{bl} / A_c)] * 100 \quad [4]$$

gdje je:

A - apsorbancija uzorka

$A_{bl}$  - apsorbancija slijepa probe

$A_c$  - apsorbancija kontrolnog uzorka

#### 3.2.7.2. Izdvajanje unutarstaničnog sadržaja i priprema toplinski inaktiviranih stanica

Nakon prekonocnog uzgoja u MRS bujonu, biomasa kulture *Lb. plantarum* S1 izdvojena je centrifugiranjem na 6000 okretaja  $\text{min}^{-1}$ , 15 min, isprana tri puta sa sterilnom fiziološkom otopinom (0,5 % otopina NaCl) uz uzastopno centrifugiranje te je resuspendirana u konačnoj suspenziji u 0,5 % otopini NaCl. Unutarstanični sadržaj izdvojen je nakon razbijanja stanica staklenim kuglicama kako je opisano u odjeljku 3.2.3.1.3.

Toplinski inaktivirane stanice pripremljene su izlaganjem stanica bakterijske kulture *Lb. plantarum* S1 trima različitim uvjetima: 100 °C, 10 min; 80 °C, 20 min te 75 °C, 60 min. Za svaki od navedenih tretmana 3 mL suspenzije stanica izloženo je navedenim uvjetima te je naknadno 0,1 mL suspenzije nakon tretmana naciepljeno na MRS agar i inkubirano na 37 °C kako bi se potvrdio potpuni gubitak vijabilnosti tretiranih stanica.

### **3.2.7.3. Određivanje unutarstanične koncentracije glutaciona**

Koncentracija glutaciona određena je u unutarstaničnom sadržaju *Lb. plantarum* S1. Preduzgoj i izdvajanje unutarstaničnog sadržaja prethodno je opisano. Za određivanje koncentracije glutaciona (GSH) korištena je DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), poznata pod nazivom Ellmanov reagens i omogućuje određivanje tiolnih skupina u biološkim uzorcima.

Uzorci koji su sadržavali unutarstanični sadržaj razrijeđeni su u fosfatnom puferu u omjeru 1:4 te je 2,5 mL razrijeđenog uzorka pomiješano s 200 µL 10 mM otopine DTNB-a u 0,3 M natrij-fosfatnom puferu, pH. Odmah po dodatku uzorka, mjerila se apsorbancija uzorka na 412 nm pomoću spektrofotometra. Pomoću izmjerene apsorbancije izračunata je koncentracija glutaciona prema izrazu:

$$c = A/\varepsilon \quad [5]$$

gdje je:

c = koncentracija glutaciona u uzorku

A = apsorbancija na 412 nm

$\varepsilon = 14,10 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (molarni apsorpcijski koeficijent; Eyer i sur., 2003)

### **3.2.7.4. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze**

Aktivnost enzima superoksid dismutaze određena je u unutarstaničnom sadržaju *Lb. plantarum* S1. Unutarstanični sadržaj izdvojen je razbijanjem stanica pomoću staklenih kuglica, kako je prethodno opisano. Unutarstanična aktivnost superoksid dismutaze izmjerena je pomoću komercijalno dostupnog kita (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, SAD).

### **3.2.7.5. Određivanje sposobnosti rasta u aerobnim i anaerobnim uvjetima te u uvjetima respiracije**

Sposobnost rasta bakterijskog soja *Lb. plantarum* S1 u modificiranim uvjetima provedena je prilagođenom metodom prema Zotta i sur. (2014). Bakterijski soj naciepljen je na mikrotitarske ploče s 12 jažica u različitim uvjetima te mu je određena sposobnost rasta u intervalima od 16,

24 i 48 sati. Jažice su sadržavale 3 mL MRS bujona te su inokulirane s 300  $\mu\text{L}$  anaerobno preduzgojene kulture. Bakterijski soj *Lb. plantarum* S1 uzgojen je u anaerobnim uvjetima (statični uvjeti u anaerokultu), aerobnim uvjetima (uzgoj na tresilici pri 150 okretaja  $\text{min}^{-1}$ ) te u uvjetima respiracije (dodatak 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hemina i 1  $\text{mg mL}^{-1}$  menaquinona na tresilici pri 150 okretaja  $\text{min}^{-1}$ ). U navedenim vremenskim intervalima mjerena je optička gustoće pri 600 nm pomoću spektrofotometra i pH vrijednost podloge pomoću pH metra u četverostrukim paralelama.

### **3.2.7.6. Određivanje rasta u uvjetima oksidativnog stresa**

Rast bakterijskog soja *Lb. plantarum* S1 u prisutnosti vodikovog peroksida i menadiona određen je prema prilagođenoj metodi Zotta i sur. (2014). Bakterijski soj uzgojen je u mikrotitarskoj ploči s 96 jažica uz prisutnost različitih koncentracija vodikovog peroksida (1 – 40 mM) i menadiona (0,15 – 40 mM). Mikrotitarske ploče inokulirane su s 20  $\mu\text{L}$  prethodno uzgojenog bakterijskog soja i inkubirane 24 sata na 37 °C. Kontrolni uzorci uzgojeni su bez dodatka spojeva koji generiraju reaktivne kisikove spojeve, a slijepe probe bili su neinokulirani uzorci. Nakon inkubacije, izmjerena je optička gustoća na 620 nm i izračunat je postotak inhibicije rasta u prisutnosti vodikovog peroksida i menadiona.

### **3.2.7.7. Sposobnost uklanjanja slobodnih DPPH radikala u različitim uvjetima rasta**

Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala određena je za *Lb. plantarum* S1 u uvjetima aerobnog i anaerobnog rasta te u uvjetima respiracije. Također, određena je sposobnost uklanjanja radikala toplinski inaktiviranih bakterijskih stanica, pripremljenih već opisanim postupkom.

Za kvalitetniju usporedbu sposobnosti uklanjanja radikala sve suspenzije bakterijskih stanica (uzgojenih u navedenim različitim uvjetima i toplinski inaktiviranih) kalibrirane su kako bi im  $\text{CFU mL}^{-1}$  iznosio  $10^9$  stanica. Dodatno, kao pozitivni antioksidativni standard služila je otopina L-askorbinske kiseline u koncentracijskom rasponu od 1 do 100  $\text{mgL}^{-1}$ .

Uz navedeno, uzorak aerobno uzgojenih stanica *Lb. plantarum* S1 ( $10^9 \text{ CFU mL}^{-1}$ ) izložen je simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava. Simulirani uvjeti pripremljeni su kako je opisano u odjeljku 3.2.3.11. Nakon izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava određena je  $\text{CFU}$  vrijednost te sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala.

U svim navedenim uvjetima određena je sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala postupkom kako je navedeno u poglavlju 3.2.7.1.

### **3.2.7.8. Ispitivanje protektivnog učinka izolata S1 na mononuklearne stanice u modelu oksidativnog stresa**

Ispitana je sposobnost zaštite izoliranih stanica periferne krvi u peroksid induciranom oksidativnom stresu pomoću metabolita i inaktiviranih stanica bakterije *Lb. plantarum* S1.

#### **3.2.7.8.1. Izolacija i tretman stanica periferne krvi**

Izolacija stanica iz pune krvi dobrovoljnih davatelja provedena je postupkom opisanim pod 3.2.6.2. Kako bi se provela analiza izlaganja izoliranih stanica periferne krvi vodikovom peroksidu,  $10^4$  izoliranih stanica tretirano je s 25  $\mu$ M vodikovog peroksida tijekom 5 min na ledu (Bankoglu i sur., 2021). Stanice bez dodatnog tretmana korištene su kao kontrolni uzorci dok su ostali uzorci istovremeno tretirani s frakcijama metabolita *Lb. plantarum* S1 manjih od 2000 Da, termički inaktiviranim stanicama ili kombinacijom metabolita i inaktiviranih stanica u prisutnosti vodikovog peroksida. Nakon inkubacije, stanice su isprane u PBS puferu te su uzorci pripremljeni za provođenje komet testa.

#### **3.2.7.8.2. Komet test**

Na tretiranim uzorcima s frakcijama metabolita bakterije *Lb. plantarum* S1, termički inaktiviranim stanicama te kombinacijom metabolita i inaktiviranih stanica u prisutnosti vodikovog peroksida proveden je komet test pomoću protokola od (Singh i sur., 1988) uz smjernice (Møller i sur., 2020) kao što je prethodno opisano u (Kostelac i sur., 2021). Izolirane stanice periferne krvi uklopljene su u sloj 0,5 % agaroze s niskom točkom tališta te položene na prethodno stvrdnutu 0,6 % agarozu s normalnom točkom tališta. Nakon otapanja u sloju agaroze, stanice su lizirane nakon uranjanja u otopinu za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 1% natrij sarkozinat, 1% Triton X-100, 10 % DMSO, pH 10) preko noći. Nakon lize, provedena je denaturacija uzoraka na stakalalcima (300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13) tijekom 20 min nakon čega je slijedila elektroforeza od 20 min pri uvjetima 1 V cm<sup>-1</sup> u mraku na 4°C. Uzorci na stalakcima su neutralizirani ispiranjem Tris HCl-om, bojani 10 min s pomoću etidij bromida (10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) i analizirani koristeći Comet Assay II sustav za analizu slika. Intenzitet repova je određen kao deskriptor kometa te su rezultati prikazani kao srednja vrijednost stotine nasumično analiziranih kometa na oba gela.

### **3.2.7.9. Ispitivanje protuupalnog učinka izolata S1 na ljudskim mononuklearnim stanicama**

Protuupalni učinak određen je prethodno opisanim postupcima izolacije mononuklearnih stanica (3.2.6.2.), indukcije upale LPS-om (3.2.6.2.) i određivanjem tumorskog faktora nekroze

(TNF- $\alpha$ ) u ljudskim mononuklearnim stanicama (3.2.6.3.) u prisutnosti metabolita bakterije *Lb. plantarum* S1.

### **3.2.8. Višeslojna mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva**

Višeslojna mikroinkapsulacija odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline provedena je ekstruzijskom metodom. Dva bakterijska soja, *Lb. plantarum* M2 i *Lb. plantarum* S1 inkapsulirana su u alginatnu jezgru. Nakon prekonoćnog uzgoja dva navedena bakterijska soja pripremljena je suspenzija obje bakterijske kulture u sterilnoj demineraliziranoj vodi te je u navedenoj suspenziji otopljen natrijev alginat (3%) u 15 mL suspenzije. Otopina alginata u suspenziji postupno je pomoću šprice dodana u 50 mL 2 %-tne otopine CaCl<sub>2</sub> uz miješanje na magnetskoj mješalici. Formirani mikroinkapsulati ostavljeni su u otopini CaCl<sub>2</sub> kako bi očvrstnuli tijekom 25 min te su potom ukonjeni filtracijom.

Oblaganje pripremljenih mikrokapsula slojem kitozana provedeno je otapanjem kitozana u suspenziji stanica bakterijskog soja *Lb. rhamnosus* A8 koja je pripremljena ekvivalentno prethodno opisanom postupku. U suspenziji je pripremljena otopina kitozana 0,4 % (w/v) uz dodatak 0,1 M octene kiseline te prilagodbe pH vrijednosti na 6,0 pomoću 1 M NaOH. Pripremljene alginatne kapsule dodane su u otopinu kitozana tijekom 15 min uz miješanje na magnetskoj mješalici. Nakon vezanja drugog sloja, kapsule su odvojene pomoću filtera.

Odmah nakon vezivanja drugog sloja, pripremljeni mikroinkapsulati uronjeni su u smjesu svježe biomase bakterijskih kultura *Lb. plantarum* M1 i *Lb. plantarum* KO4 kako bi se na kapsule vezao gornji sloj biomase navedenih kultura. Nakon oblaganja, kapsule su osušene na zraku u aseptičnim uvjetima te su spremljene u sterilne bočice i čuvane paralelno u različitim uvjetima: 4°C, sobnoj temperaturi i zamrznute na -20 °C.

#### **3.2.8.1. Određivanje broja živih mikroorganizama u mikrokapsulama**

Pripremljene mikrokapsule depolimerizirane su u 15 mL sterilne 2 %-tne otopine natrijevog citrata uz konstantno miješanje na magnetskoj mješalici. Broj stanica je određen indirektnom metodom, nacjepljivanjem na MRS agar. Nakon inkubacije na 37 °C, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica po gramu mikrokapsula.

#### **3.2.8.2. Određivanje ciljanog otpuštanja dobivenih mikroinkapsulata**

Višeslojni mikroinkapsulati dobiveni u prethodno opisanom postupku izloženi su simuliranim uvjetima usta, želuca i crijeva. Otopine simuliranih uvjeta pripremljene su kako je opisano u poglavlju 3.2.3.12. Višeslojne kapsule izložene su navedenim uvjetima uz vrijeme zadržavanja

u simuliranim uvjetima usne šupljine od 30 s, 2 h u uvjetima želuca te 4 h u simuliranim uvjetima crijeva.

Kako bi se preciznije odredilo željeno otpuštanje pripremljene su modificirane višeslojne kapsule koje su u prvom slučaju sadržavale alginatnu jezgru s dvije zadane bakterijske kulture (M2, S1) no kitozanski sloj kapsula nije sadržavao ostale bakterijske kulture te kapsule nisu bile obložene dodatnim bakterijskim kulturama. Na taj način se pravilno izmjerilo otpuštanje bakterija iz središnjeg dijela kapsule nakon izlaganja simuliranim uvjetima. Ekvivalnetno navedenom, drugi tip kapsula sadržavao je prazne alginatne jezgre omotane bakterijskim kulturama (A8, B2) u kitozanskom sloju, a treći tip bile su prazne dvoslojne kapsule omotane biomasom konačnih kultura (M1, KO4).

Za svaki tip kapsula određeno je otpuštanje u svim navedenim uvjetima indirektnom metodom nacjepljivanjem na MRS agar i određivanjem CFU vrijednosti izražene po gramu pripremljenih mikroinkapsulata.

### **3.2.8.3. Mikrobiološka ispravnost višeslojnog mikroinkapsulata**

Mikrobiološka ispravnost pripremljenih kapsula određena je ispitivanjem prisutnosti patogenih bakterija i čestih kontaminanata iz okoliša nakon skladištenja kapsula tijekom 15 dana. Razbijanjem 1g kapsula u 2 % otopini Na-citrata i nacjepljivanjem na prikladne hranjive podloge za određivanje *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, enterobakterija, kvasaca i plijesni. Nakon inkubacije, analiziran je porast patogenih bakterija i kontaminanata na korištenim agarima.

### **3.2.9. Statistička obrada podataka**

Svi eksperimenti provedeni su u najmanje tri nezavisna ponavljanja. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ponovljenih eksperimenata  $\pm$  standardna devijacija. Za provjeru vrste razdiobe korišteni su histogrami te Shapiro-Wilks Test i Kolmogorov–Smirnov test. Statističke razlike među ponavljanjima određene su t-testom i  $\chi^2$  testom. Rezultati analize kometa logaritamski su transformirani kako bi se normalizirala distribucija. Usporedbe među grupama provede su ANOVA testom. Post hoc analize razlika izvedene su Scheffé 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).

Statistička obrada podataka metabolomičke analize protuupalnih metabolita izolata M2 napravljena je pomoću mrežnog programa MetaboAnalyst 5.0 (Pang i sur., 2021). Kako bi se ispitala razlika između skupina uzoraka provedena je PCA analiza te je prikazan 2D-Scores

grafičkim prikazom. Potom je provedena PLS-DA (eng, Partial Least Squares Discriminant Analysis) kako bi se prikazali metaboliti koji su najzaslužniji za razdvajanje kontrolne skupine uzoraka od aktivnih frakcija. Uz pomoć *Hierarchical Clustering Heatmap* prikazana je relative abundance 24 glavnih karakteristika u svakom uzorku.



## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Izolacija, karakterizacija i identifikacija dobivenih izolata

U ovom radu provedena je izolacija bakterija mliječne kiseline iz uzoraka mlijeka magarice i kobile te stolice dojenčeta. Iz prikupljenih uzoraka izolirano je 60 bakterijskih izolata pomoću selektivnih hranjivih podloga. Navedenim izolatima pridružen je autohtoni probiotički soj *Lb. plantarum* S1 prethodno izoliran iz sirutke i preliminarno probiotički okarakteriziran (Potočnjak i sur., 2017). Novim izolatima su pridružene oznake po mjestu izolacije te su pohranjeni u Zbirku mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Mjesto izolacije i pridružene oznake prikazani su u tablici 6.

**Tablica 6.** Porijeklo, broj te osnovne oznake izolata bakterija mliječne kiseline dobivenih u ovom istraživanju

Porijeklo izolata	Selektivna podloga i uvjeti uzgoja	Broj izoliranih sojeva	Oznaka
Mlijeko magarice	MRS, aerobno	10	M
Mlijeko kobile	MRS, aerobno	10	KO
Stolica dojenčeta	MRS, aerobno	20	A
	TOS-MUP, anaerobno	20	B
Fermentirana sirutka	MRS, aerobno	1	S1

Dobiveni bakterijski izolati morfološki i fenotipski su okarakterizirani KOH metodom, katalaza testom te bojanjem po Gramu. Morfološki je opisan oblik bakterijskih stanica i provjerena čistoća izoliranih kultura. Svi ispitani izolati pokazali su se kao KOH negativne, gram-pozitivne, štapičaste bakterije te je mikroskopski potvrđena čistoća izoliranih čistih kultura. Kao preliminarno ispitivanje probiotičkog potencijala, ispitana je sposobnost izolata da prežive uvjete niskog pH, što daje važnu informaciju o potencijalnom korištenju u probiotičke svrhe. Rezultati sposobnosti preživljenja izolata u uvjetima niskih pH vrijednosti prikazani su u tablici 7 za izolate iz mlijeka magarice i kobile te u tablicama 8 i 9 za izolate iz stolice dojenčeta. Razina preživljenja iskazana je kao postotak kontrolnih uzoraka koji nisu bili izloženi uvjetima niskog pH. Za izolate koji su iskazali stupanj preživljenja 95 % i više, smatralo se da su zadovoljili preliminarni kriterij te su posebno istaknuti u tablicama. Izolati koji nisu zadovoljili pretpostavljeni kriterij ostali su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica no isključeni su iz ove studije.

**Tablica 7.** Postotak preživljenja izolata bakterija mliječne kiseline iz mlijeka magarice i kobile nakon izlaganja uvjetima niskog pH (pH 2,5) nakon 2 h inkubacije

Oznaka izolata	Preživljenje (%)	Oznaka izolata	Preživljenje (%)
M1	<b>96*</b>	KO1	10
M2	<b>98*</b>	KO2	71
M3	52	KO3	47
M4	/	KO4	<b>95*</b>
M5	<b>96</b>	KO5	/
M6	75	KO6	78
M7	67	KO7	4
M8	/	KO8	55
M9	/	KO9	<b>98*</b>
M10	60	KO10	82

\* Razina preživljenja izolata je iznad 95 %.

**Tablica 8.** Postotak preživljenja izolata (A1 – A20) bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta nakon izlaganja uvjetima niskog pH (pH 2,5) nakon 2 h inkubacije

Oznaka izolata	Preživljenje (%)	Oznaka izolata	Preživljenje (%)
A1	62	A11	77
A2	45	A12	13
A3	<b>97*</b>	A13	59
A4	<b>96*</b>	A14	87
A5	76	A15	<b>97*</b>
A6	68	A16	75
A7	69	A17	2
A8	<b>98*</b>	A18	83
A9	/	A19	/
A10	/	A20	79

\* Razina preživljenja izolata je iznad 95 %.

**Tablica 9.** Postotak preživljenja izolata (B1 – B20) bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta nakon izlaganja uvjetima niskog pH (pH 2,5) nakon 2 h inkubacije

Oznaka izolata	Preživljenje (%)	Oznaka izolata	Preživljenje (%)
B1	80	B11	53
B2	<b>99*</b>	B12	<b>95*</b>
B3	81	B13	80
B4	88	B14	87
B5	92	B15	92
B6	64	B16	<b>96*</b>
B7	31	B17	/
B8	74	B18	/
B9	/	B19	88
B10	62	B20	61

\* Razina preživljenja izolata je iznad 95 %.

Izolati bakterija mliječne kiseline koji su zadovoljili prethodne kriterije ispitani su na sposobnost preživljavanja na različitim temperaturama. Sposobnost preživljavanja ispitana je na rasponu od 4 °C do 45 °C te je dobivena informacija o potencijalnim tehnološkim karakteristikama izoliranih sojeva. Rezultati su prikazani u tablicama 10 i 11.

**Tablica 10.** Preživljavanje bakterijskih izolata izoliranih iz mlijeka magarice i kobile pri različitim temperaturama tijekom 24 h tretmana

Oznaka izolata	Početni broj	4 °C (CFU/mL)	15 °C (CFU/mL)	30 °C (CFU/mL)	45 °C (CFU/mL)
M1*	$2,7 \times 10^9$	$2,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$
M2*	$3,4 \times 10^9$	$4,7 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$5,5 \times 10^8$
KO4*	$2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$	$2 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$
KO9*	$5,2 \times 10^9$	$2,6 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$3,2 \times 10^9$	$2,7 \times 10^8$

\* Razina preživljenja zadovoljava kriterij probiotičkog potencijala

**Tablica 11.** Preživljavanje bakterijskih izolata izoliranih iz stolice dojenčeta pri različitim temperaturama tijekom 24 h tretmana

Oznaka izolata	Početni broj	4 °C (CFU/mL)	15 °C (CFU/mL)	30 °C (CFU/mL)	45 °C (CFU/mL)
A3	$1,1 \times 10^9$	$5,9 \times 10^5$	$7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^8$	$8,2 \times 10^6$
A4*	$2,3 \times 10^9$	$1,8 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
A8*	$3 \times 10^9$	$2,4 \times 10^8$	$1,9 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$	$6,6 \times 10^8$
A15	$3,6 \times 10^9$	$2,6 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$	$7,3 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$
B2*	$2,7 \times 10^9$	$8,3 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$9,4 \times 10^8$
B12*	$4,4 \times 10^9$	$2,7 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	$2,7 \times 10^9$	$4,3 \times 10^8$
B16*	$1,7 \times 10^9$	$6,8 \times 10^8$	$8,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^9$	$7,8 \times 10^8$

\* Razina preživljenja zadovoljava kriterij probiotičkog potencijala

Na ispitivanom rasponu temperatura kojima su bakterijski izolati izloženi, pretpostavljen je kriterij zadovoljavajućeg preživljenja u kojem razina preživljenja nije niža od  $10^8$  stanica po mililitru, obzirom da su početne vrijednosti za sve izolate odgovarale redu veličine  $10^9$  stanica po mililitru suspenzije. Izolati koji nisu zadovoljili pretpostavljeni kriterij, pohranjeni su u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica no isključeni su iz ove studije.

U svrhu procjene sigurnosnih aspekata za probiotičku upotrebu sojeva, provedeno je ispitivanje hemolitičke aktivnosti dobivenih izolata. Nužan je sigurnosni kriterij da probiotičke bakterije ne pokazuju hemolitičku aktivnost. Nadalje, ispitana je i aktivnost katalaze ispitivanih izolata te su rezultati prikazani u tablici 12.

**Tablica 12.** Rezultati određivanja hemolitičke aktivnosti i rezultat katalaza testa izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz mlijeka magarice i kobile te stolice dojenčeta

Oznaka izolata	Uzorak	Nastale zone porastom na krvnom agaru	Katalaza test
M1	mlijeko magarice	nema zone	negativan
M2	mlijeko magarice	nema zone	negativan
KO4	kobilje mlijeko	nema zone	negativan
KO9	kobilje mlijeko	nema zone	negativan
A4	stolica dojenčeta	nema zone	negativan
A8	stolica dojenčeta	nema zone	negativan
B2	stolica dojenčeta	nema zone	negativan
B12	stolica dojenčeta	nema zone	negativan
B16	stolica dojenčeta	nema zone	negativan

Nakon isključivanja hemolitičke aktivnosti, izolati koji su zadovoljili sigurnosne i preliminarne probiotičke kriterije podvrgnuti su fenotipskoj identifikaciji pomoću API 50 CHL metode, čiji su rezultati prikazani u tablicama 13 i 14.

**Tablica 13.** Fermentacijski profili bakterijskih izolata iz mlijeka magarice (M1, M2), kobiljeg mlijeka (KO4, KO9) te stolice dojenčeta (A4, A8, B2, B12, B16) dobiveni API 50 CHL testom

Ugljikohidrati	M1	M2	KO4	KO9	A4	A8	B2	B12	B16
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	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -metil-D-manozid	+	+	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -metil-D-glukozid	+	+	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalín	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutín	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saharoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-rafinoza	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -gentobioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-turanoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-liksoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoza	-	-	+	-	-	+	-	-	-
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukonat	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
2-keto-glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-keto-glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tablica 14.** Rezultati API 50 CHL biokemijske identifikacije izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz mlijeka magarice (M1, M2), kobiljeg mlijeka (KO4, KO9) te stolice dojenčeta (A4, A8, B2, B12, B16)

Oznaka soja	Rezultat	Postotak identifikacije
M1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
M2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
KO4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	97,5
KO9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,6
A4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,7
A8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99,9
B2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
B12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,8
B16	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9

Izolati su identificirani pomoću 16S rRNA sekvenciranja i rezultati su prikazani u tablici 15.

**Tablica 15.** Rezultati 16S rRNA identifikacije izolata bakterija mliječne kiseline iz mlijeka magarice (M1, M2), kobiljeg mlijeka (KO4, KO9) te stolice dojenčeta (A4, A8, B2, B12, B16)

Oznaka soja	Rezultat identifikacije
M1	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
KO4	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
KO9	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
A4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
A8	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
B2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
B12	<i>Lactobacillus plantarum</i>
B16	<i>Lactobacillus plantarum</i>

Ispitana je osjetljivost izolata na antibiotike kako bi se otklonila mogućnost poticanja antibiotske rezistencije. Određena je osjetljivost sojeva na 9 različitih antibiotika kloramfenikol, klindamicin, tetraciklin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, gentamicin,



ampicilin i vankomicin za koje je prema smjernicama EFSA-e (2012) nužno godine nužno ispitati za sve probiotičke sojeve s potencijalnom primjenom kod ljudi i životinja. Rezultati osjetljivosti na antibiotike prikazani su u tablici 16.

**Tablica 16.** Rezultati ispitivanja osjetljivosti bakterija mliječne kiseline na odabrane antibiotike disk difuzijskom metodom

Antibiotički disk	BAKTERIJSKI SOJ								
	M1	M2	KO4	KO9	A4	A8	B2	B12	B16
Kloramfenikol	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Klindamicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tetraciklin	S	S	S	S	I	S	S	I	I
Kanamycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Streptomycin	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Eritromicin	S	S	S	S	I	S	S	I	I
Gentamicin	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilin	S	S	S	S	S	S	S	I	I
Vankomicin	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S-osjetljiv; I-umjereno osjetljiv; R-rezistentan

Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva bakterija mliječne kiseline ispitana je turbidimetrijskom metodom. Praćen je rast patogenih mikroorganizama u prisutnosti supernatanta kulture bakterija mliječne kiseline. Kako postoji više potencijalnih mehanizama inhibicije rasta, supernatant kulture ispitan je u tri oblika: netretiran, neutraliziran te neutraliziran i termički obrađen. Antimikrobna aktivnost izražena je kao postotak inhibicije rasta patogenih mikroorganizama u prisutnosti supernatanta naspram kontrole. Rezultati antimikrobne aktivnosti prikazani su u tablicama 17 i 18.

**Tablica 17.** Inhibicija rasta test mikroorganizama u prisutnosti netretiranog, neutraliziranog te neutraliziranog i termički obrađenog supernatanta bakterija mliječne kiseline iz mlijeka magarice i kobile nakon 48 h koinkubacije. Inhibicija je izražena kao postotak smanjenja rasta u usporedbi s netretiranim kontrolnim uzorkom.

<i>Lactobacillus plantarum</i> M1					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	80,51	73,18	86,33	97,21	80,91
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	4,65*	9,34*	3,11*	-	6,15*
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	2,11*#	9,12	2,97	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> M2					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	77,5	91,72	91,1	97,95	63,9
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	-	57,23*	-	68,18*	-
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	-	60,33*	-	62,81*#	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KO4					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	73,16	62,96	74,88	89,25	72,42
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	-	-	3,76*	5,81*	-
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	-	-	-	1,65*#	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KO9					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	80,72	93,18	93,42	99,36	82,24
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	8,53*	11,01*	4,62*	81,29*	10,24*
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	12,8*	6,63*#	12,21*	72,91*#	-

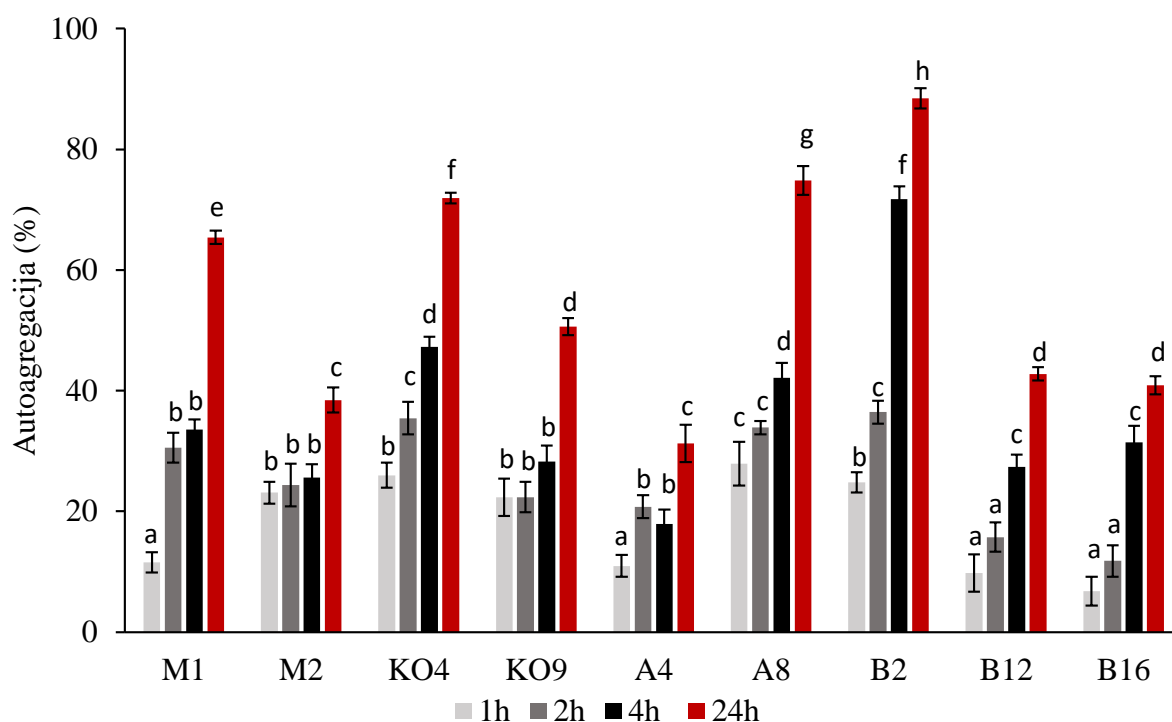
\*.# značajno različito od netretiranog (\*) i neutraliziranog (#) supernatanta (p<0,05)

**Tablica 18.** Inhibicija rasta test mikroorganizama u prisutnosti netretiranog, neutraliziranog te neutraliziranog i termički obrađenog supernatanta izolata bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta nakon 48 h koinkubacije. Inhibicija je izražena kao postotak smanjenja rasta u usporedbi s netretiranim kontrolnim uzorkom.

<i>Lactobacillus plantarum A4</i>					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	79,62	63,71	87,46	91,57	88,23
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	-	-	3,11*	6,91*	4,78*
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	-	-	2,91*	2,42*#	-
<i>Lactobacillus rhamnosus A8</i>					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	87,34	89,64	95,67	72,71	78,56
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	42,11*	36,23*	23,98*	34,18*	41,81*
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	36,81*#	12,51*#	14,67*#	-	29,74*#
<i>Lactobacillus plantarum B2</i>					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	91,74	88,56	94,65	91,45	82,76
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	31,84*	45,78*	30,23*	21,45*	54,33*
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	11,55*#	30,24*#	12,75*#	-	24,76*#
<i>Lactobacillus plantarum B12</i>					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	77,64	68,35	91,52	93,46	88,11
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	2,53*	3,01*	-	9,43*	10,24*
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum B16</i>					
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
<b>SUPERNATANT</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>				
Netretiran	65,82	71,91	64,98	79,87	82,56
Neutraliziran (pH 6.5±0.2)	-	-	3,64*	3,1*	2,87*
Neutraliziran i termički obrađen (100°C, 20 min)	-	-	-	1,11*#	1,76*#

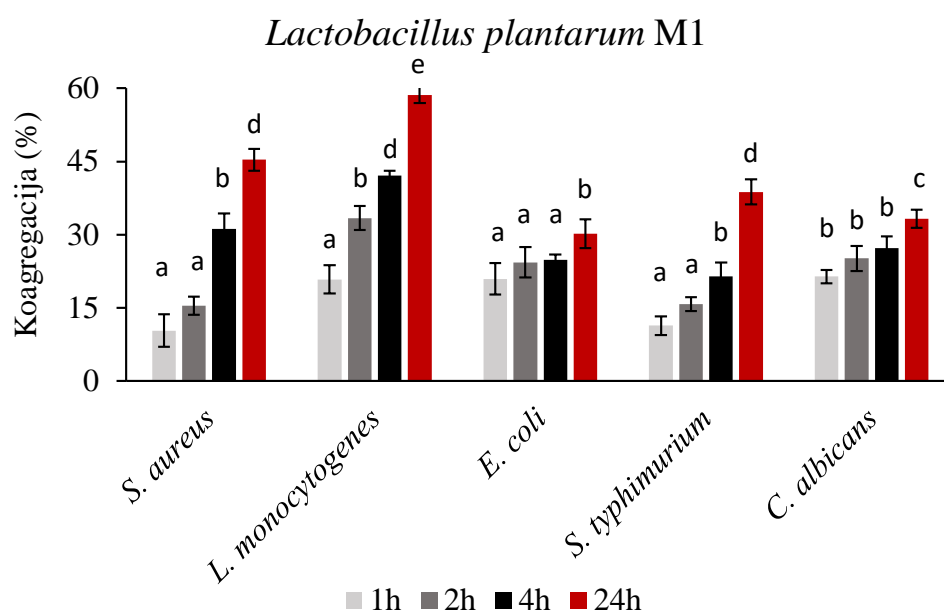
\*# značajno različito od netretiranog (\*) i neutraliziranog (#) supernatanta (p<0,05)

Određena je sposobnost autoagregacije bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka magarice i kobile te koagregacija s test-mikroorganizmima *Escherichia coli* ATCC®25922™, *Staphylococcus aureus* ATCC®25923™, *Salmonella typhimurium* ATCC®29631™, *Listeria monocytogenes* ATCC®23074™ i *Candida albicans* ATCC®10231™. Rezultati autoagregacije prikazani su kao postotak autoagregiranih stanica u rasponu od 1 do 24 sata inkubacije (slika 3), a rezultati koagregacijskog testa kao postotak koagregiranih stanica s navedenim patogenima u usporedbi s početnim brojem, koji je određen kao 100 % (slike 4 i 5).

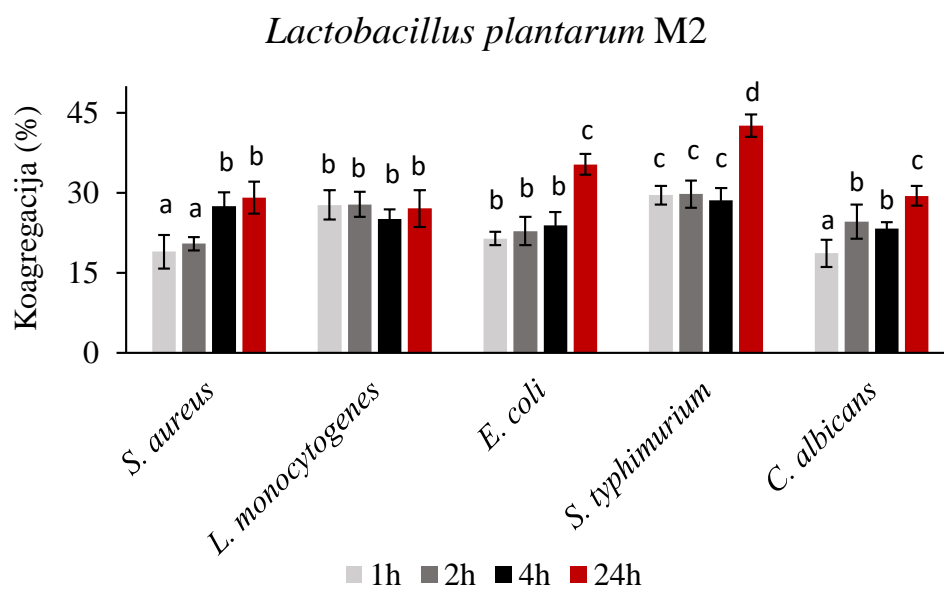


**Slika 3.** Sposobnost autoagregacije odabranih izolata bakterija mliječne kiseline u vremenskim intervalima tijekom 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD. <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup> različita slova označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

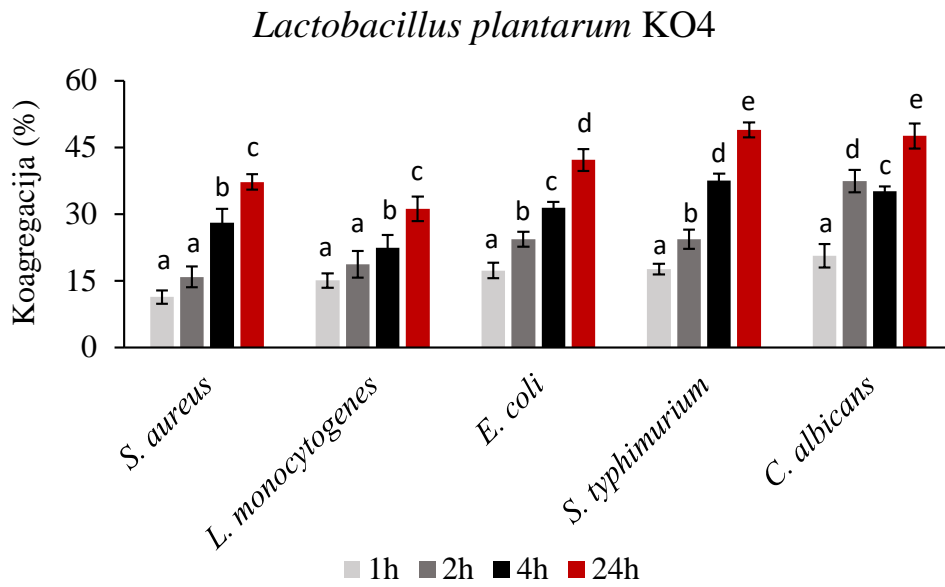
**A**



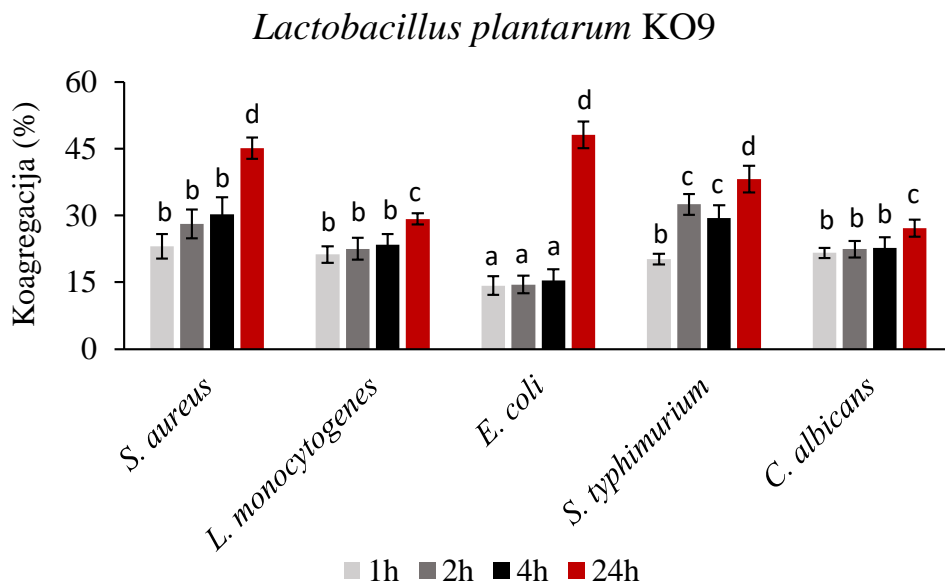
**B**



C

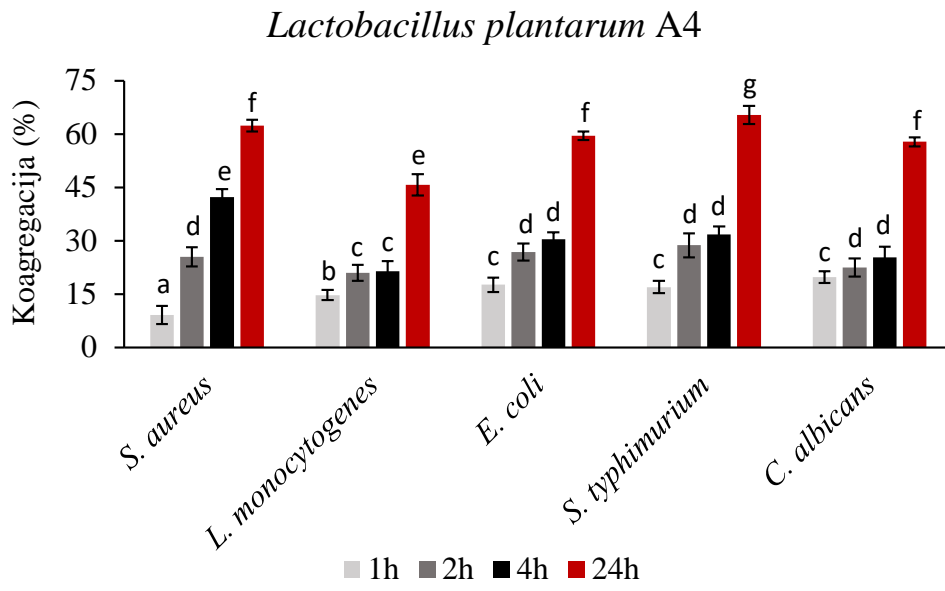


D

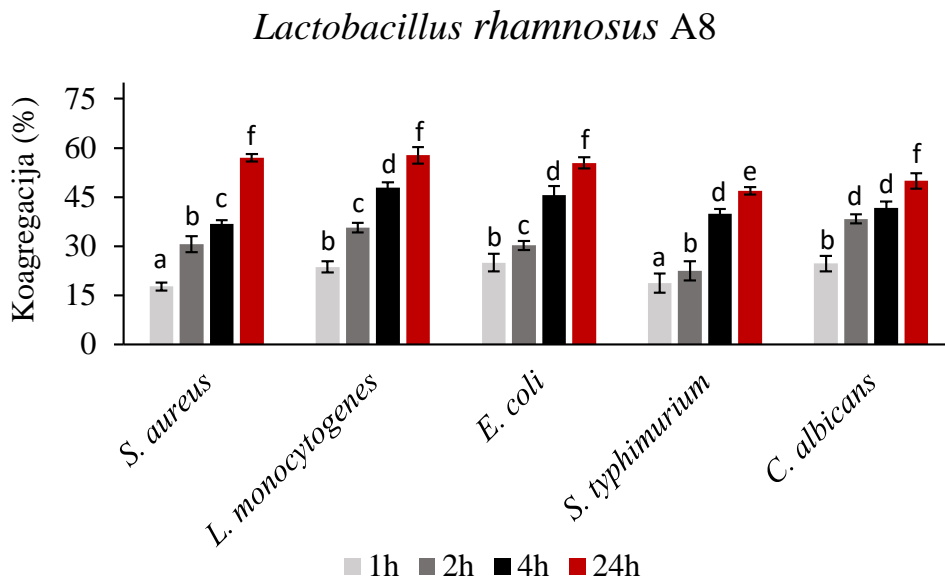


**Slika 4.** Sposobnost koagregacije odabranih izolata bakterija mliječne kiseline iz mlijeka magarice (A i B) i kobile (C i D) s patogenim mikroorganizmima u vremenskim intervalima tijekom 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> različita slova označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

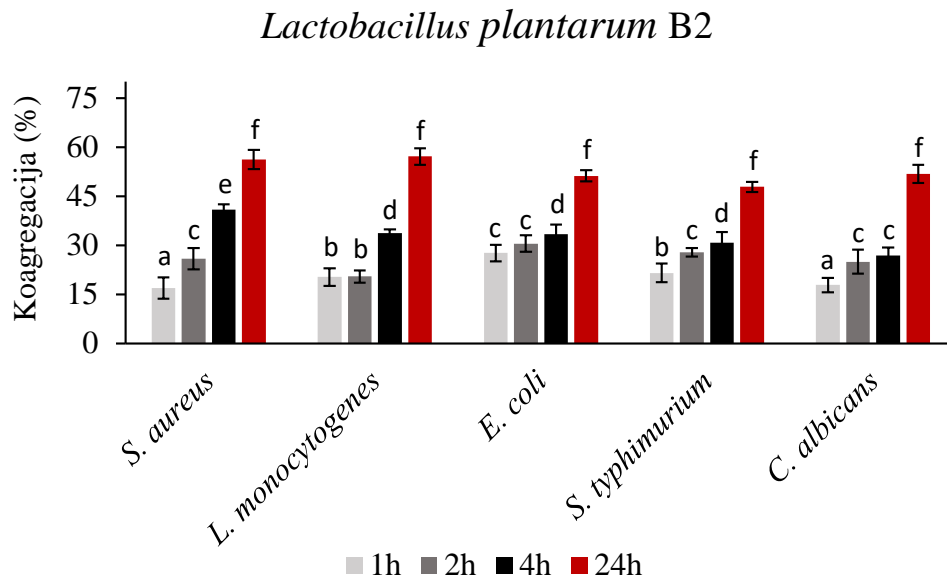
**A**



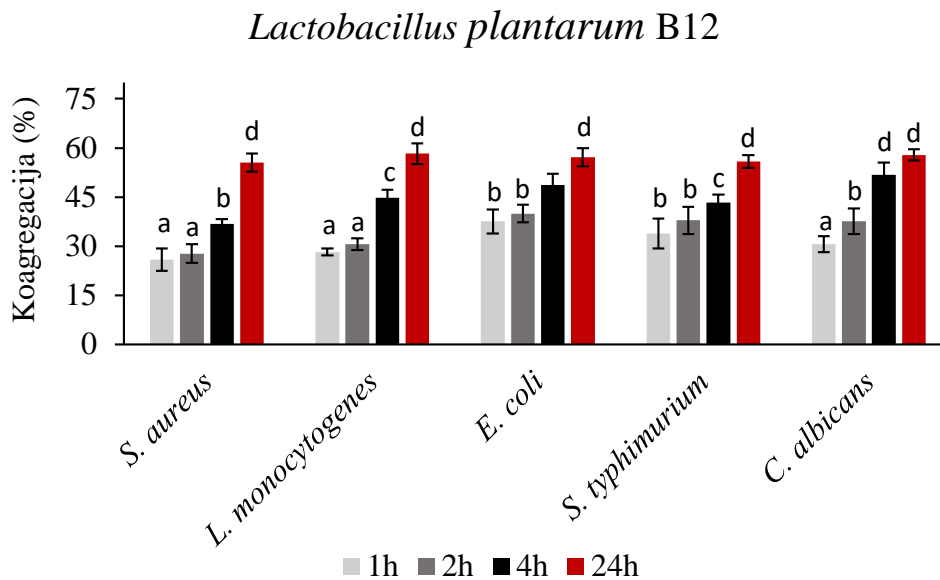
**B**



C



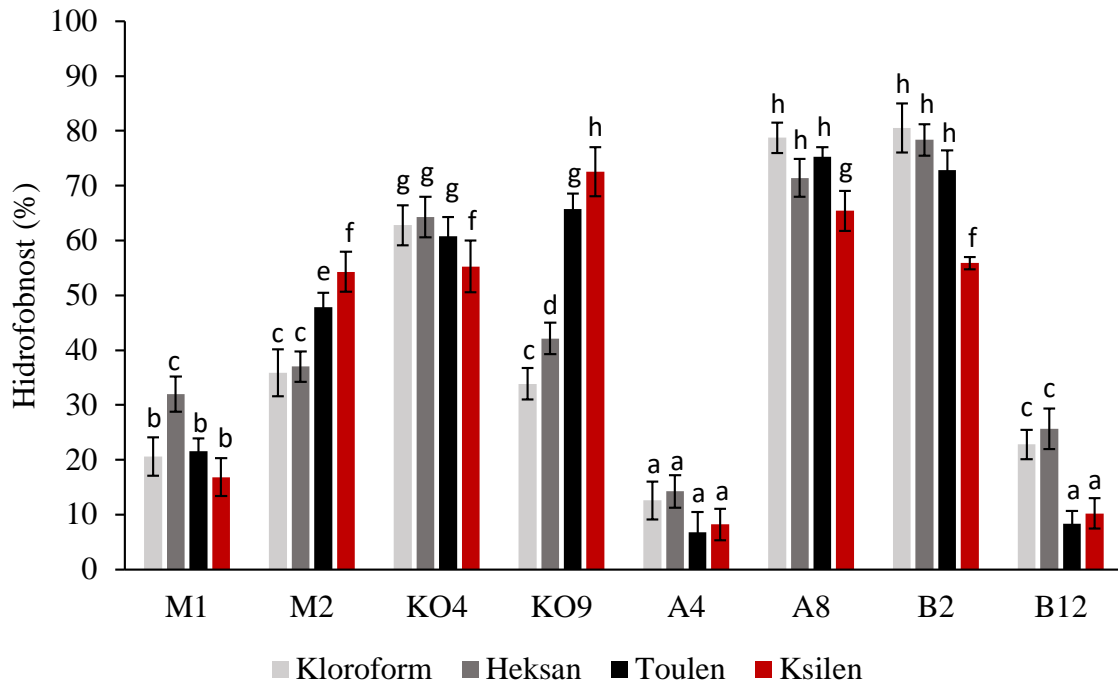
D



**Slika 5.** Sposobnost koagregacije odabranih izolata bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta s ispitanim patogenim mikroorganizmima u vremenskim intervalima tijekom 24 h inkubacije prikazana kao postotak  $\pm$  SD. <sup>a,b,c,d,e,f</sup>različita slova označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).



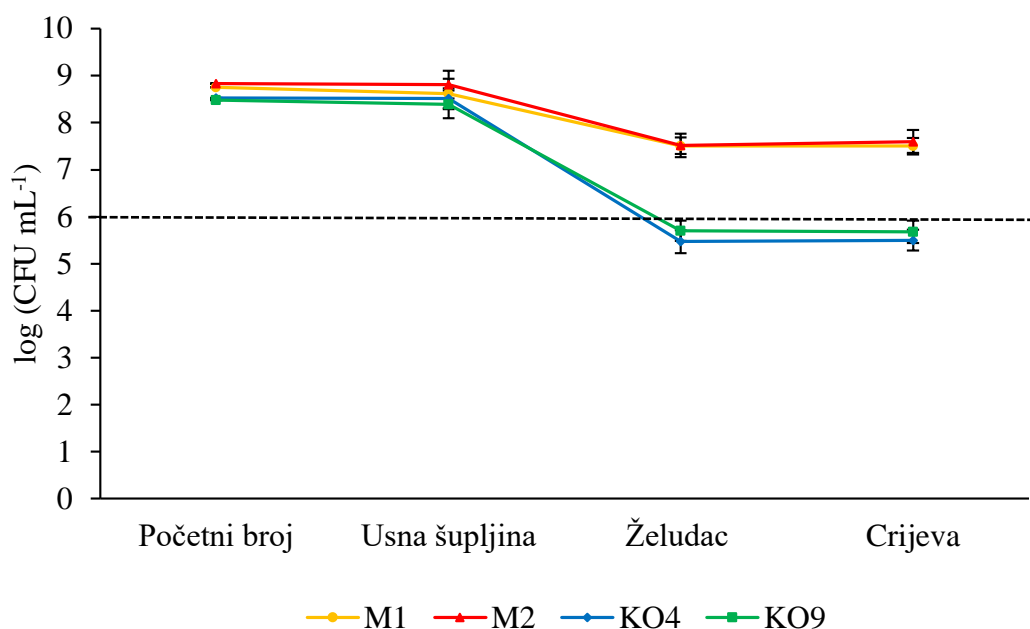
Kako bi se ispitala hidrofobnost površine stanica izolata, ispitana je njihova adhezija na ugljikovodike: kloroform, heksan, toulen i ksilen te se smatra da viši postotak adhezije ukazuje na jaču hidrofobnost površine bakterijskih stanica (slika 6).



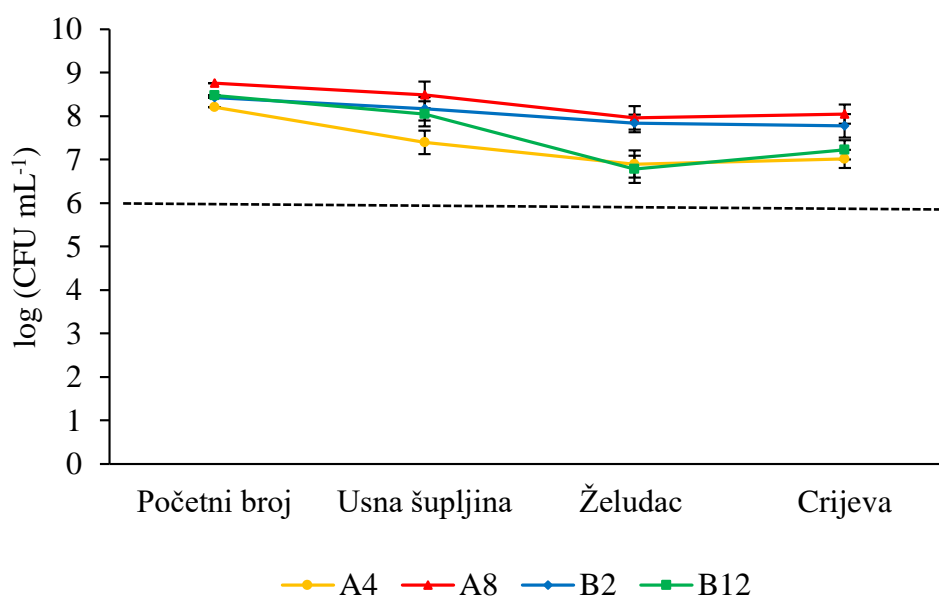
**Slika 6.** Hidrofobnost stanične površine izolata bakterija mliječne kiseline na ispitane ugljikovodike izražena kao postotak  $\pm$  SD. <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup> različita slova označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Važan preduvjet probiotičke aktivnosti jest sigurna doprema živih probiotičkih stanica na ciljano mjesto u domaćinu. U različitim dijelovima gastrointestinalnog trakta prevladavaju specifični uvjeti koji mogu znatno smanjiti broj živih stanica probiotika, stoga je važan kriterij izbora probiotika, mogućnost preživljenja u navedenim uvjetima.

Ispitana je sposobnost izolata bakterija mliječne kiseline iz mlijeka magarice i kobile te stolice dojenčeta da prežive prolazak kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta. Mjereno je kontinuirano preživljenje nakon izlaganja simuliranim uvjetima usne šupljine, želuca i crijeva (slike 7 i 8).

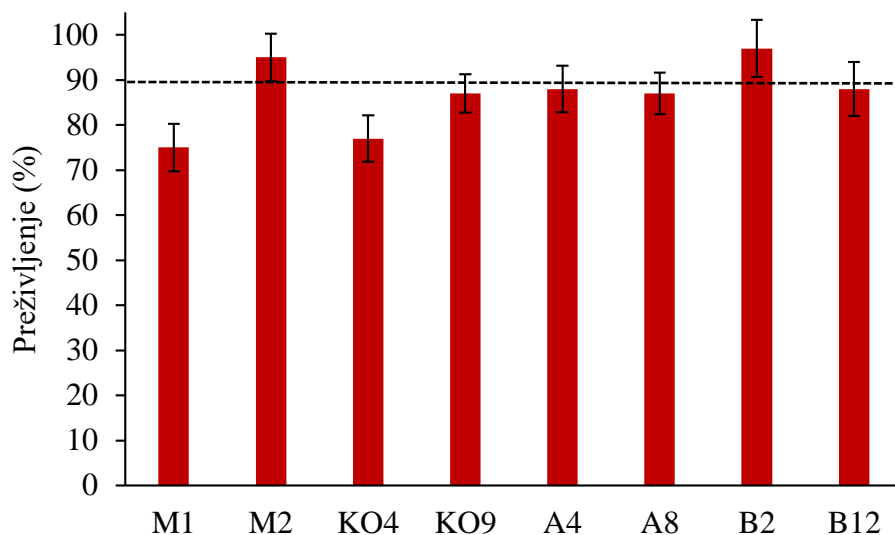


**Slika 7.** Preživljavanje bakterija mliječne kiseline izoliranih iz mlijeka magarice i kobile u uvjetima prolaska kroz simulirani gastrointestinalni sustav. Rezultati su prikazani kao log CFU mL<sup>-1</sup> ± SD. Isprekidana linija označava željeni stupanj preživljenja od 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.



**Slika 8.** Preživljavanje bakterija mliječne kiseline izoliranih iz stolice dojenčeta u uvjetima prolaska kroz simulirani gastrointestinalni sustav. Rezultati su prikazani kao log CFU mL<sup>-1</sup> ± SD. Isprekidana linija označava željeni stupanj preživljenja od 10<sup>6</sup> CFU mL<sup>-1</sup>.

Probiotički sojevi dostupni na tržištu vrlo često dolaze u obliku suhih pripravaka dobivenim postupkom liofilizacije. Često se u procesu liofilizacije dodaje obrano mlijeko koje služi kao lioprotektor. Obzirom na navedeno, ispitana je sposobnost preživljavanja izolata nakon procesa liofilizacije. Broj stanica prije i nakon postupka određen je indirektnom metodom, a rezultati su izraženi kao postotak preživljenja (slika 9.)



**Slika 9.** Postotak preživljenja izolata bakterija mliječne kiseline tijekom procesa liofilizacije  $\pm$  SD. Isprekidana linija označava željeni stupanj preživljenja od 90 %.

Kako bi probiotičke bakterije mogle ispoljavati korisne učinke na ciljanom mjestu u domaćinu moraju imati sposobnost adhezije i formiranja biofilmova kako bi kompeticijski isključile potencijalne patogene mikroorganizme. Obzirom na navedeno, ispitana je sposobnost formiranja biofilmova ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline. Temeljem mogućnost formiranja biofilmova pojedini sojevi su kategorizirani kao snažni, umjereni ili slabi producenti biofilmova (tablica 19).

**Tablica 19.** Kvantifikacija proizvodnje biofilmova izolata bakterija mliječne kiseline nakon 48h inkubacije.

Bakterijski soj	OD <sub>595</sub>	Klasifikacija
<i>Lb. plantarum</i> M1	0,442 ± 0,07	snažan producent biofilma
<i>Lb. plantarum</i> M2	0,338 ± 0,13	snažan producent biofilma
<i>Lb. plantarum</i> KO4	0,521 ± 0,05	snažan producent biofilma
<i>Lb. plantarum</i> KO9	0,425 ± 0,02	snažan producent biofilma
<i>Lb. plantarum</i> A4	0,542 ± 0,04	snažan producent biofilma
<i>Lb. rhamnosus</i> A8	0,631 ± 0,01	snažan producent biofilma
<i>Lb. plantarum</i> B2	0,315 ± 0,04	snažan producent biofilma
<i>Lb. plantarum</i> B12	0,292± 0,03	snažan producent biofilma
ODC (optička gustoća kontrole)	0,055 ± 0,08	
4 × ODC	0,241 ± 0,06	

#### 4.2. Probiotička karakterizacija za primjenu u zaštiti zuba i usne šupljine

U ovom radu istražen je potencijal dobivenih izolata bakterija mliječne kiseline za primjenu u zaštiti zuba i usne šupljine. Cilj je bio ispitati razinu koagregacije izolata s najčešćim uzročnicima oboljenja zuba i okolnih tkiva: *S. intermedius*, *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans* i *P. gingivalis* te odrediti potencijalnu antimikrobnu aktivnost i sposobnost razaranja biofilmova navedenih patogena.

Obzirom na prethodno prikazane rezultate, u ovom su dijelu odabrani bakterijski izolati koji su zadovoljili sve preliminarnu i sigurnosne probiotičke kriterije, pokazali značajan stupanj autoagregacije i preživljavanja u simuliranim uvjetima usne šupljine, a koji su imali značajan pad broja stanica prolaskom kroz uvjete želuca i crijeva te su time kandidati za oralnu upotrebu. Odabrani sojevi bakterija mliječne kiseline za ispitivanje potencijala zaštite zdravlja zuba su *Lb. plantarum* M1, izoliran iz mlijeka magarice i *Lb. plantarum* KO4 izolirani iz kobiljeg mlijeka.

Kako bi se ispitala mogućnost inhibicije biofilmova uzročnika bolesti zuba i okolnih tkiva prvo je kvantificirana sposobnost formiranja biofilmova patogenih mikroorganizama u eksperimentalnim uvjetima (tablica 20).

**Tablica 20.** Sposobnost formiranja biofilma bakterija uzročnika oboljenja zuba

Bakterijski soj	Rezultat <sup>a</sup>	Klasifikacija <sup>b</sup>
<i>Streptococcus intermedius</i> DSM 20573	0,404 ± 0,02	snažan producent biofilma
<i>Streptococcus mutans</i> DSM 20523	0,631 ± 0,01	snažan producent biofilma
ODC	0,087 ± 0,02	
4xODC	0,348 ± 0,06	
<i>Porhyromonas gingivalis</i> DSM 28984	0,372 ± 0,06	snažan producent biofilma
ODC	0,094 ± 0,03	
4xODC	0,376 ± 0,03	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0,521 ± 0,04	snažan producent biofilma
ODC	0,098 ± 0,03	
4xODC	0,392 ± 0,03	

<sup>a</sup>vrijednost OD<sub>595</sub>; <sup>b</sup>klasifikacija prema Borges i sur. (2012)

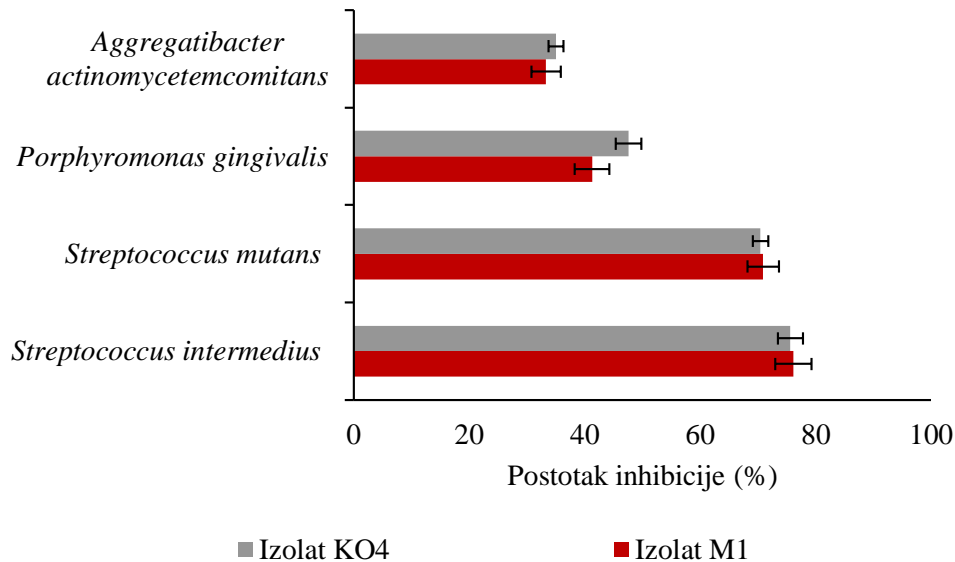
Kako bi se istražile interakcije ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline s patogenim bakterijama uzročnicima oboljenja zuba i okolnih tkiva, određena je razina autoagregacije patogenih bakterija te je uspoređena s koagregacijom patogena i bakterija mliječne kiseline (tablica 21).

**Tablica 21.** Sposobnost autoagregacije i koagregacije bakterija uzročnika bolesti zuba i ispitivanih izolata bakterija mliječne kiseline nakon 24 h inkubacije

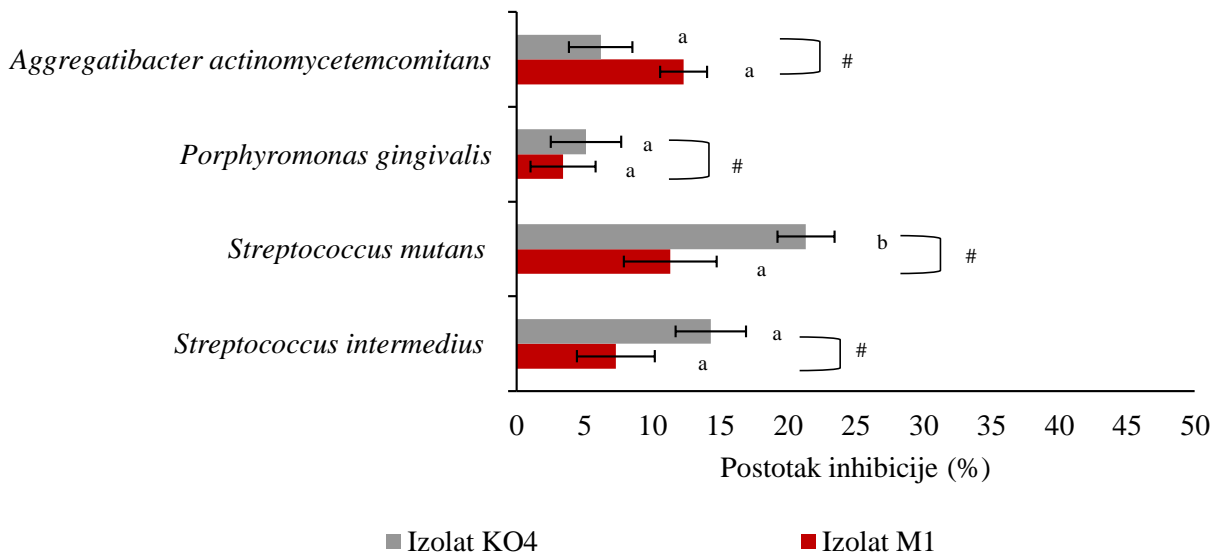
Test mikroorganizam	Autoagregacija (%)	Koagregacija (%)	
		M1	KO4
<i>S. intermedius</i>	52,16 ± 2,24	71,13 ± 2,11*	60,74 ± 2,03*
<i>S. mutans</i>	44,28 ± 1,87	66,95 ± 2,43*	55,61 ± 3,47*
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	63,67 ± 1,99	72,17 ± 3,31*	66,89 ± 2,32
<i>P. gingivalis</i>	43,11 ± 2,21	52,82 ± 1,91*	46,23 ± 3,12

\*statistički značajno naspram autoagregacije (p<0,05)

Određena je antimikrobna aktivnost netretiranog i neutraliziranog supernatanta kulture izolata na test mikroorganizme uzročnike oboljenja zuba. Rezultati su prikazani kao postotak inhibicije rasta patogena u prisutnosti neobrađenog (slika 10) i neutraliziranog supernatanta (slika 11).



**Slika 10.** Antimikrobna aktivnost supernatanta ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline naspram zubnih patogena nakon 24 h uzgoja izražena kao postotak  $\pm$  SD. Nisu uočene statistički značajne razlike među ispitivanim izolatima.



**Slika 11.** Antimikrobna aktivnost neutraliziranog supernatanta izolata bakterija mliječne kiseline naspram zubnih patogena nakon 24 h uzgoja izražena kao postotak  $\pm$  SD (<sup>a,b</sup> različita slova označuju značajnu ( $p < 0.05$ ) razliku među sojevima; # značajno ( $p < 0.05$ ) različito od netretiranog supernatanta na slici 10).

Navedenim izolatima iz magarećeg i kobiljeg mlijeka određena je sposobnost inhibicije formiranja biofilмова patogenih bakterija. Patogene bakterije, uzročnici zubnih oboljenja, inkubirani su u prisutnosti različitih razrijeđenja supernatanta kulture izolata kako bi se utvrdilo

postoji li koncentracijska ovisnost zapažene inhibicije. Rezultati su prikazani kao postotak formacije biofilma u usporedbi s kontrolnim uzorkom (tablica 22).

**Tablica 22.** Sposobnost formiranja biofilмова zubnih patogena u prisutnosti različitih razrijeđenja supernatanta izolata bakterija mliječne kiseline

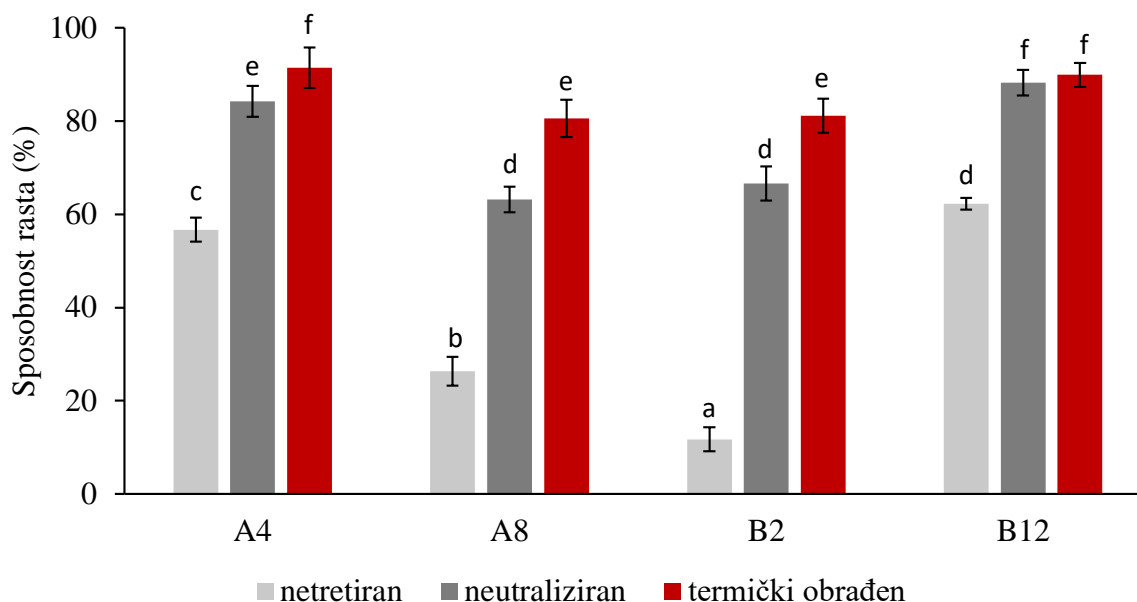
	<i>Lactobacillus plantarum</i> M1		
	original	3× razrijeđen	20× razrijeđen
<i>S. intermedius</i>	83,38 ± 3,52	75,41 ± 3,45*	50,21 ± 2,78*#
<i>S. mutans</i>	64,83 ± 2,11	16,69 ± 1,32*	9,17 ± 1,57*#
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	65,34 ± 4,52	15,78 ± 2,45*	4,34 ± 1,31*#
<i>P. gingivalis</i>	45,11 ± 3,72	12,17 ± 2,71*	2,65 ± 1,11*#
	<i>Lactobacillus plantarum</i> KO4		
	original	3× razrijeđen	20× razrijeđen
<i>S. intermedius</i>	80,81 ± 3,42	10,32 ± 1,54*	6,41 ± 2,12*#
<i>S. mutans</i>	43,61 ± 1,33	25,42 ± 2,42*	7,81 ± 1,14*#
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	13,97 ± 2,74	3,98 ± 1,42*	1,65 ± 0,91*#
<i>P. gingivalis</i>	17,31 ± 0,91	4,54 ± 0,91*	2,35 ± 0,91*#

\* statistički značajno različito od originalnog uzorka (p<0,05)

#### 4.3. Probiotička karakterizacija sojeva za primjenu u redukciji *Helicobacter pylori*

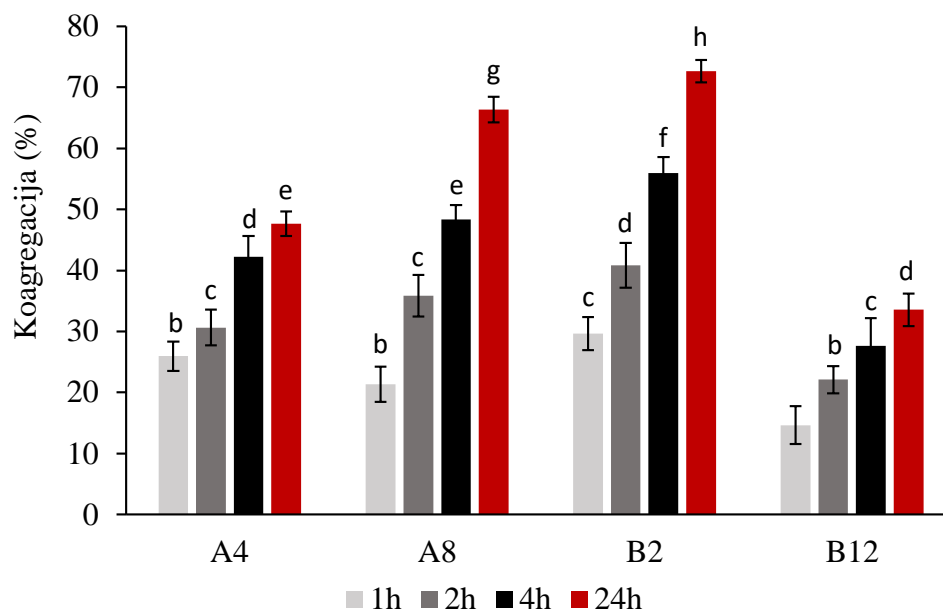
Izolirani sojevi bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta ispitani su na potencijal primjene u smanjenju oboljenja patogenom bakterijom *Helicobacter pylori*. Izolatima iz stolice dojenčeta, A4, A8, B2 i B12, koji su zadovoljili sve prethodno ispitane probiotičke kriterije određen je antagonistički potencijal prema *Helicobacter pylori* DSM®10242™.

Rezultati sposobnosti rasta *H. pylori* u prisutnosti netretiranog, neutraliziranog i termički obrađenog supernatanta hranjivog medija izolata prikazani su na slici 12.



**Slika 12.** Sposobnost rasta *Helicobacter pylori* DSM®10242™ u prisutnosti netretiranog, neutraliziranog i termički obrađenog supernatanta izolata bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta izražena kao postotak  $\pm$  SD. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> različita slova označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Osim antagonističkog potencijala, određena je i sposobnost koagregacije izolata iz stolice dojenčeta te je izražena kao postotak naspram kontrolnog uzorka u vremenima od 1h, 2h, 4h i 24h inkubacije (slika 13).

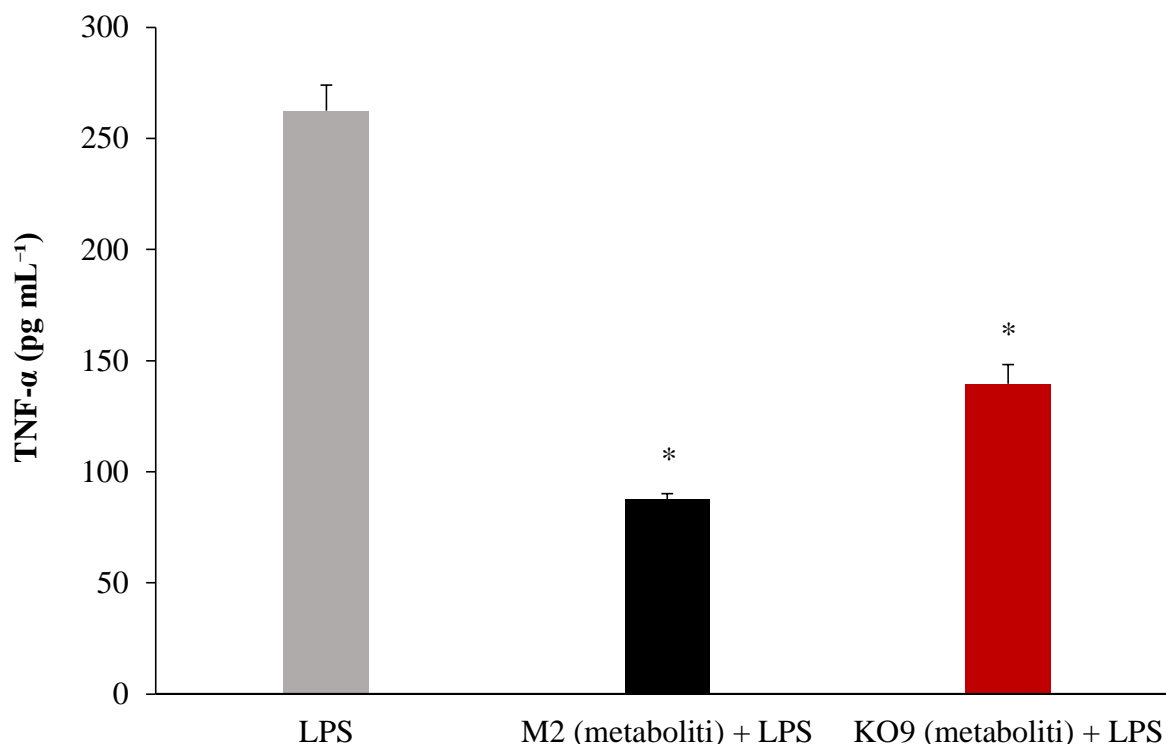


**Slika 13.** Sposobnost koagregacije ispitivanih izolata bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta s *Helicobacter pylori* DSM®10242™ izražena kao postotak  $\pm$  SD. <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup> različita slova označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).



#### 4.4. Probiotička karakterizacija sojeva s protuupalnom aktivnošću

Kako literaturni podaci ukazuju na protuupalnu aktivnost mlijeka magarice i kobile (Barreto i sur., 2019; Salimei i Fantuz, 2012) odabrana su dva izolata bakterija mliječne kiseline iz mlijeka magarice i kobile koji su pokazali najveći probiotički potencijal u prethodnim eksperimentima (M2 i KO9) te im je ispitan potencijalan protuupalni učinak. Nakon uzgoja bakterija, izdvojeni su proizvedeni metaboliti manji od 2000 Da, koji mogu proći crijevni epitel, i doći u kontakt s imunostimuliranim stanicama. Navedeni metaboliti dodani su u okruženje izoliranih ljudskih imunostimuliranih stanica periferne krvi kojima je inducirana upala pročišćenim LPS gram negativne *E. coli*. U uvjetima inducirane upale i u prisutnosti izdvojenih bakterijskih metabolita mjerena je količina proizvedenog proupalnog citokina tumorskog faktora nekroze (TNF $\alpha$ ). Rezultati su prikazani kao koncentracija TNF- $\alpha$  u uvjetima upale i u uvjetima upale uz prisutnost bakterijskih metabolita (slika 14).

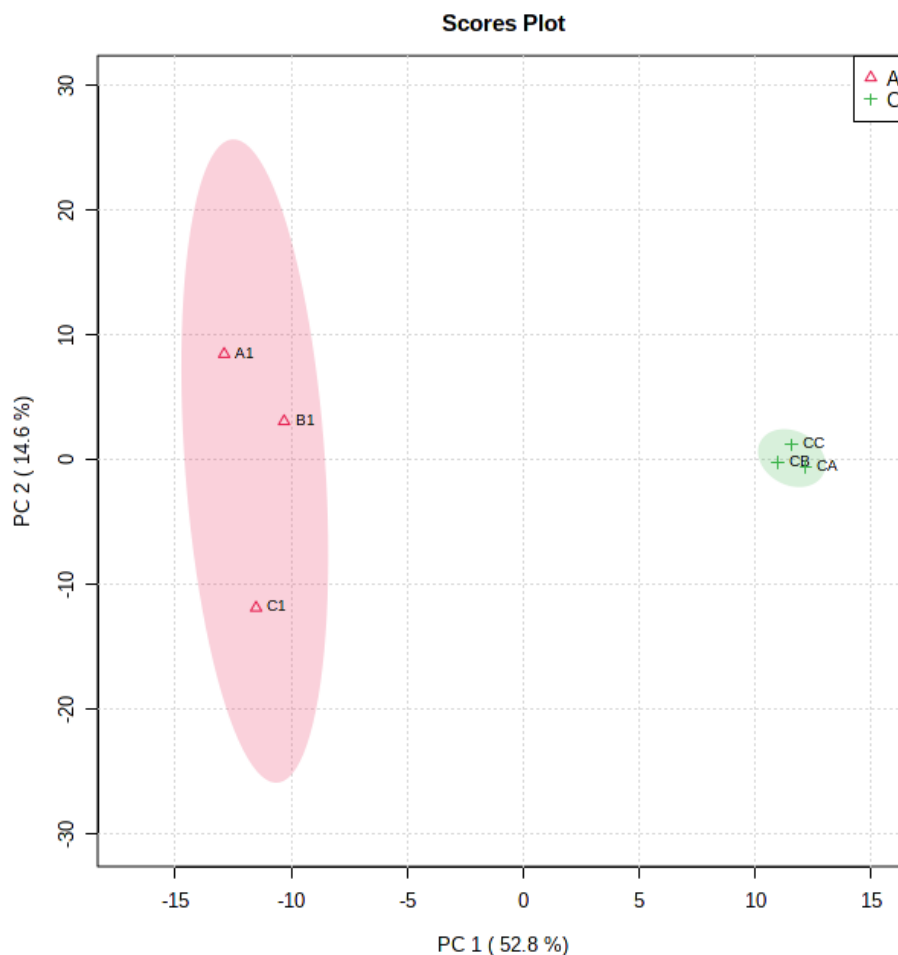


**Slika 14.** Koncentracija tumorskog faktora nekroze (TNF- $\alpha$ ) u izoliranim stanicama periferne krvi stimuliranih bakterijskim LPS-om u prisutnosti frakcija metabolita manjih od 2000 Da izolata bakterija mliječne kiseline. Rezultati su prikazani kao koncentracija TNF- $\alpha$  (pg mL<sup>-1</sup>)  $\pm$  SD (\*statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom,  $p < 0,05$ ).

Kako bi se ispitaio sadržaj aktivnih frakcija bakterijskih metabolita, provedena je metabolomička analiza frakcija metabolita bakterije *Lb. plantarum* M2 koja je pokazala najveću aktivnost supresije proizvodnje TNF- $\alpha$  u ljudskim mononuklearnim stanicama u induciranim

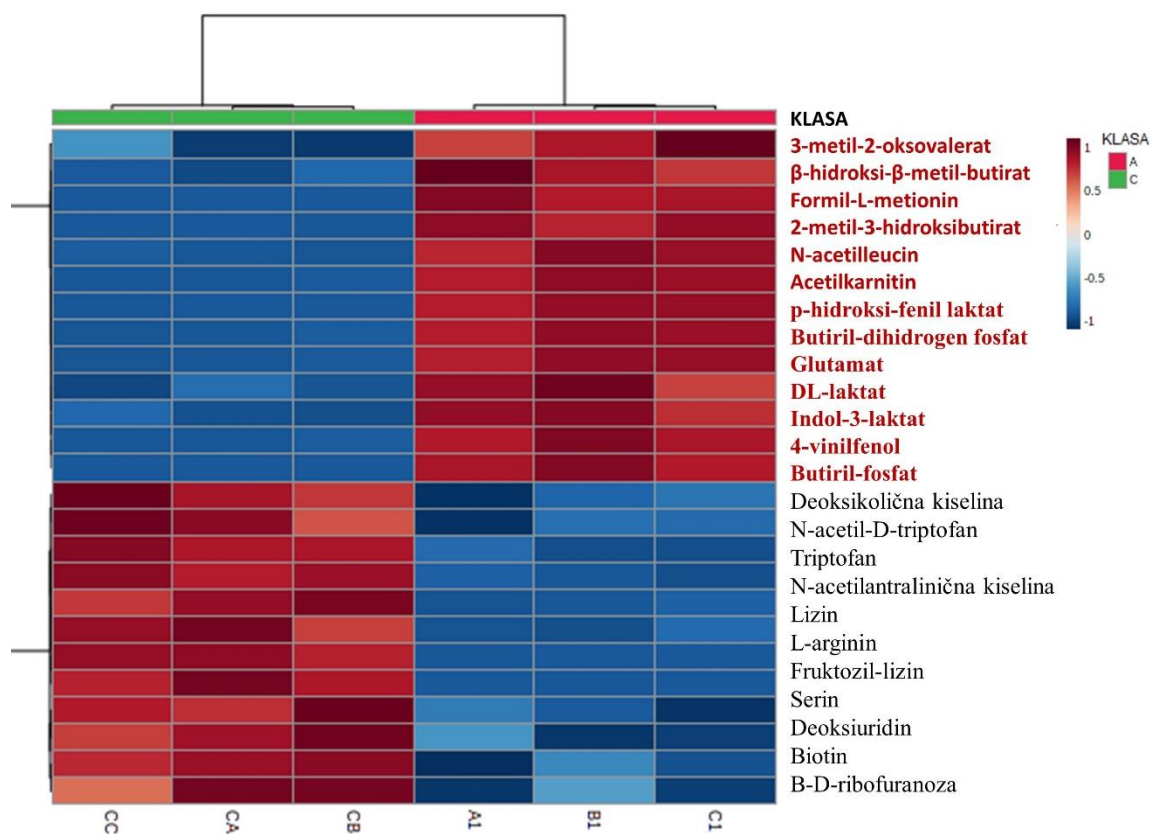
uvjetima upale. Analiza aktivnih frakcija metabolita i kontrolnog uzorka medija koji nije pokazao sposobnost supresije TNF- $\alpha$ , provedena je LC-MS metodom.

Nakon statističke obrade podataka, provedena je analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) detektiranih metabolita sa statistički značajnom razlikom između triplikata kontrolnih uzoraka (CA, CB i CC) i aktivnih frakcija (A1, B1 i C1) kako bi se odredilo statističko odvajanje aktivnih uzoraka i kontrole kada su u analizu uzeti svi metaboliti sa značajnom razlikom. Rezultati PCA analize prikazani su na slici 15.

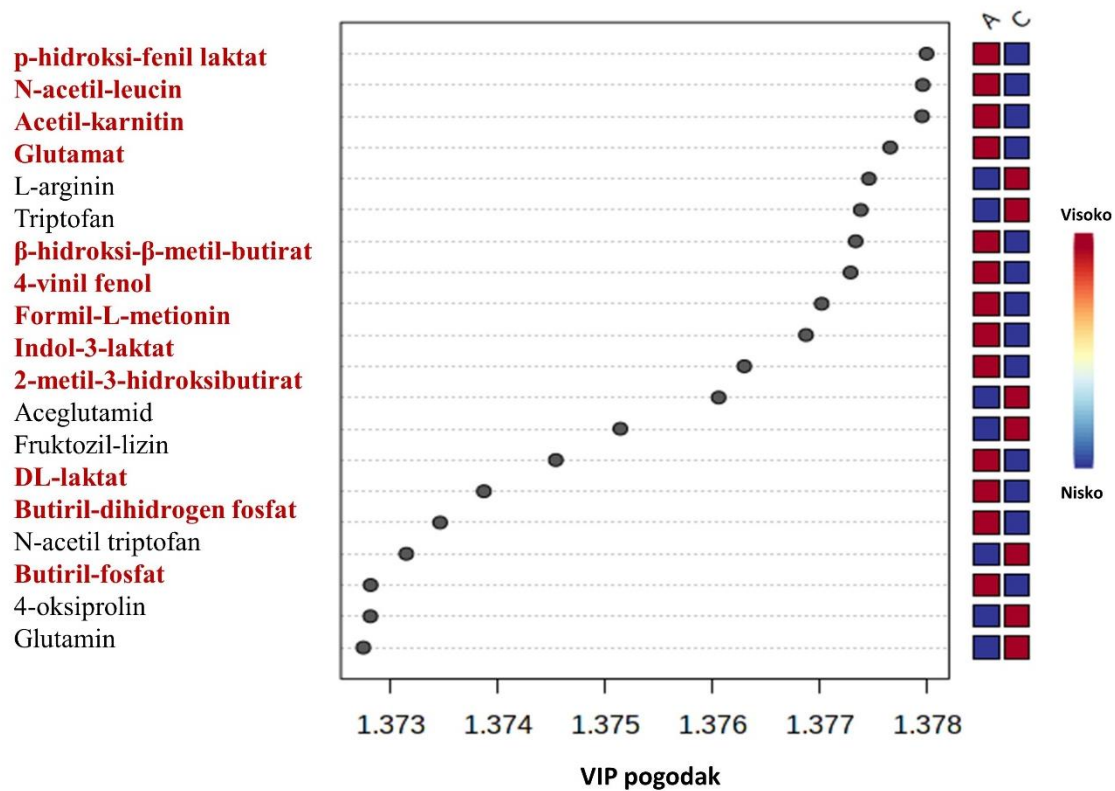


**Slika 15.** Analiza glavnih komponenti (PCA) metaboličkih produkata bakterije *Lb. plantarum* M2. U analizu su uključeni metaboliti koji su pokazali statistički značajnu razliku između kontrolnih uzoraka (CA, CB, CC) i aktivnih frakcija metabolita (A1, B1, C1).

Pomoću on-line bioinformatičkog sustava MetaboAnalyst 5.0 (Pang i sur., 2021) provedena je heatmap analiza statistički značajnih metabolita u kontrolnim i aktivnim uzorcima (slika 16) i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata navedenih metabolita (slika 17).



**Slika 16.** Heatmap analiza metaboličkih produkata bakterije *Lb. plantarum* M2. U analizu su uključeni metaboliti koji su pokazali statistički značajnu razliku između kontrolnih uzoraka (CA, CB, CC) i aktivnih frakcija metabolita (A1, B1, C1). Zeleno označena klasa označava kontrolni uzorak, a crveno označena klasa označava aktivnu frakciju. Unutar pojedine klase sstatistički značajno povećanje koncentracije određenih metabolita naznačeno je bojama od niske značajnosti (plavo) do tamno crvene boje koja predstavlja najvišu koncentraciju naspram druge klase.



**Slika 17.** Rezultati metode parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. partial least squares, PLS) metaboličkih produkata bakterije *Lb. plantarum* M2. U analizu su uključeni metaboliti koji su pokazali statistički značajnu razliku između kontrolnih uzoraka (C) i aktivnih frakcija metabolita (A). Crveno istaknuti metaboliti statistički su značajno povećani u aktivnoj frakciji (A) naspram kontrolnog uzorka (C).

Obzirom na preklapanja *Heatmap* analize i metode parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) izdvojeni su relevantni metaboliti aktivnih frakcija i prikazani u tablici 23.

**Tablica 23.** Metabolički produkti izolata M2 prisutnih u aktivnoj frakciji supernatanta.

<b>Relevantni metabolički produkti</b>
$\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metil-butirat
Formil-L-metionin
2-metil-3-hidroksibutirat
N-acetilleucin
Acetilkarnitin
<i>p</i> -hidroksi-fenil laktat
Glutamat
Indol-3-laktat
4-vinilfenol
DL-laktat

Provedena je stimulacija izoliranih mononuklearnih stanica iz venske krvi sudionika te je izoliranim stanicama stimulirana upala bakterijskim LPS-om. Indukcija upale provedena je u prisutnosti izdvojenih metabolita manjih od 2000 Da bakterija izoliranih iz mlijeka magarice. Nakon tretmana, mononuklearne stanice su odvojene te je provedena ekstrakcija proteina, pročišćavanje i digestija. Tako pripremljeni uzorci analizirani su na masenom spektrometru spregnutim s tekućinskom kromatografijom. Nakon analize i usporedbe s bazom podataka dobivene vrijednosti analizirane su pomoću mrežnog bioinformatičkog sustava Panther (Mi i Thomas, 2009; Mi i sur., 2021) kako bi se detektirale razlike u biološkim procesima mononuklearnih stanica u upali naspram upale u prisutnosti bakterijskih metabolita.

Pronađeni eksprimirani geni u uzorcima LPS-om induciranih mononuklearnih stanica u prisutnosti metabolita bakterije *Lb. plantarum* M2 prikazani su u tablici 24. Broj gena je razvrstan u kategorije bioloških procesa kako je dobiveno analizom u programu Panther.

**Tablica 24.** Broj pronađenih eksprimiranih gena u uzorcima LPS-om induciranih mononuklearnih stanica u prisutnosti metabolita bakterije *Lb. plantarum* M2. Broj gena je razvrstan u kategorije bioloških procesa kako je dobiveno analizom u bioinformatičkom sustavu *Panther* (Mi i Thomas, 2009; Mi i sur., 2021).

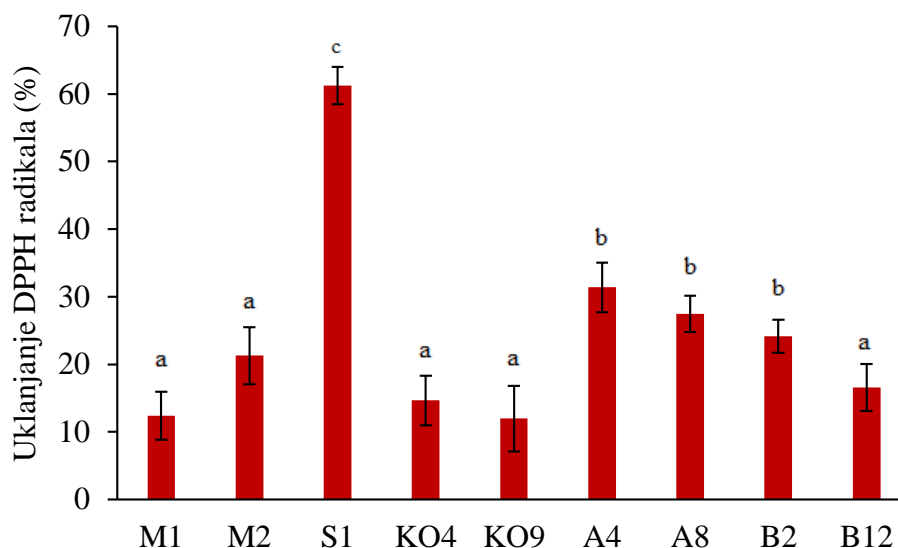
Kategorije bioloških procesa (Panther)	Broj detektiranih eksprimiranih gena (n)		
	Kontrola	Inducirana upala	Inducirana upala + M2 metaboliti
Biološka adhezija	1	4	1
Biološka regulacija	4	16	15
Stanični procesi	7	33	41
Razvojni procesi	1	4	6
Sustavni imunosni procesi	1	1	1
Lokalizacija	1	6	11
Inerspecijska interakcija	0	0	1
Pokretanje	0	1	3
Metabolički procesi	6	19	22
Multistanični procesi	1	5	7
Odgovor na stimulus	3	10	13
Signaling	0	6	8
Reproduktivni procesi	1	0	1

Kako bi se analizirale razlike u uzorcima provedeno je funkcionalno klasteriranje uzoraka u uvjetima inducirane upale i upale u prisutnosti probiotičkih metabolita pomoću bioinformatičkog sustava David.

U uzorcima inducirane upale u anotacijskom klasteru s pogodkom obogaćivanja 2.33 detektirano je poklapanje 5/12 gena za KEGG metabolički proces infekcije uzrokovane patogenom bakterijom *E. coli*. Otkriveni geni kodiraju za: beta podjedinicu integrina, tubulin alfa 1a, tubulin alfa 4a, tubulin alfa 1c, aktin beta. U uzorcima kontrole i upale u prisutnosti metabolita izolata M2 niti u jednom klasteru nije detektiran ovaj biološki proces.

#### 4.5. Probiotička karakterizacija sojeva s antioksidativnom aktivnošću

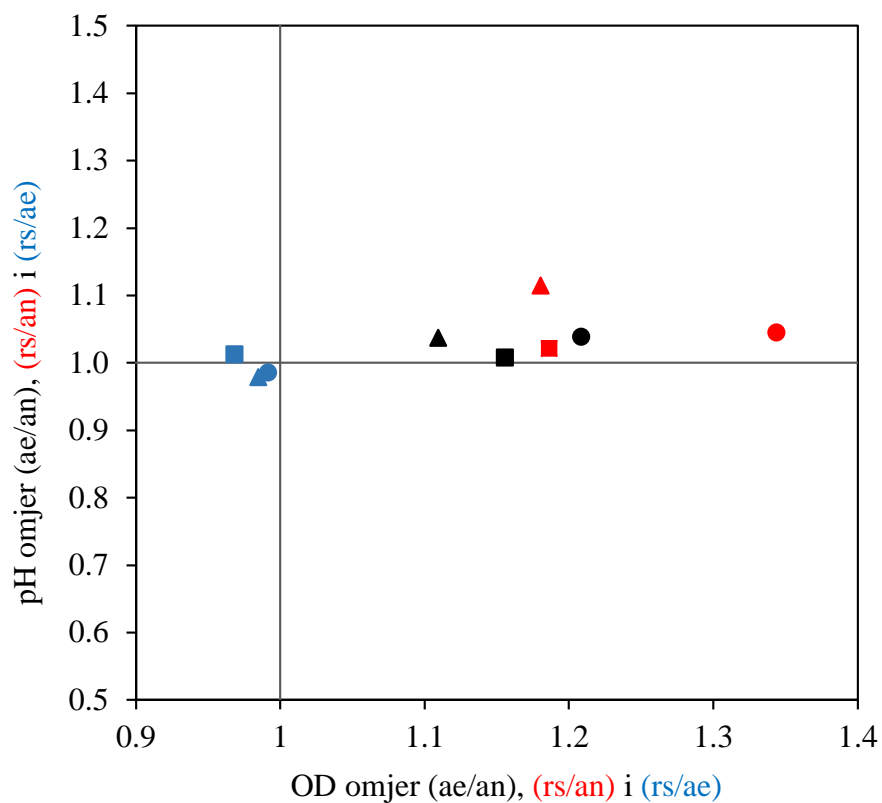
Provedeno je preliminarno ispitivanje antioksidativnog potencijala svih izolata koji su zadovoljili prethodno ispitane probiotičke kriterije (M1, M2, KO4, KO9, A4, A8, B2, B12, S1). Antioksidativni potencijal ispitan je određivanjem sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala (slika 18).



**Slika 18.** Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala izolata bakterija mliječne kiseline prikazana kao postotak  $\pm$  SD. <sup>a,b,c</sup>različita slova označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ).

Bakterijski soj *Lb. plantarum* S1, izoliran iz sirutke, pokazao je najveću razinu antioksidativnog potencijala u prethodno prikazanim rezultatima. Obzirom na navedeno spomenuti soj je detaljno ispitan na ostale antioksidativne parametre koji mogu opisati potencijal navedenog soja.

Navedenom bakterijskom soju ispitana je sposobnost rasta u uvjetima anaerobioze, respiracije i aerobnih uvjeta. U tim su uvjetima određene razine rasta i sniženje pH kao posljedice fermentacijske aktivnosti istraživanog soja. Gustoća rasta i pH vrijednost su stavljeni u omjere te prikazani za tri navedena uvjeta rasta (slika 19).

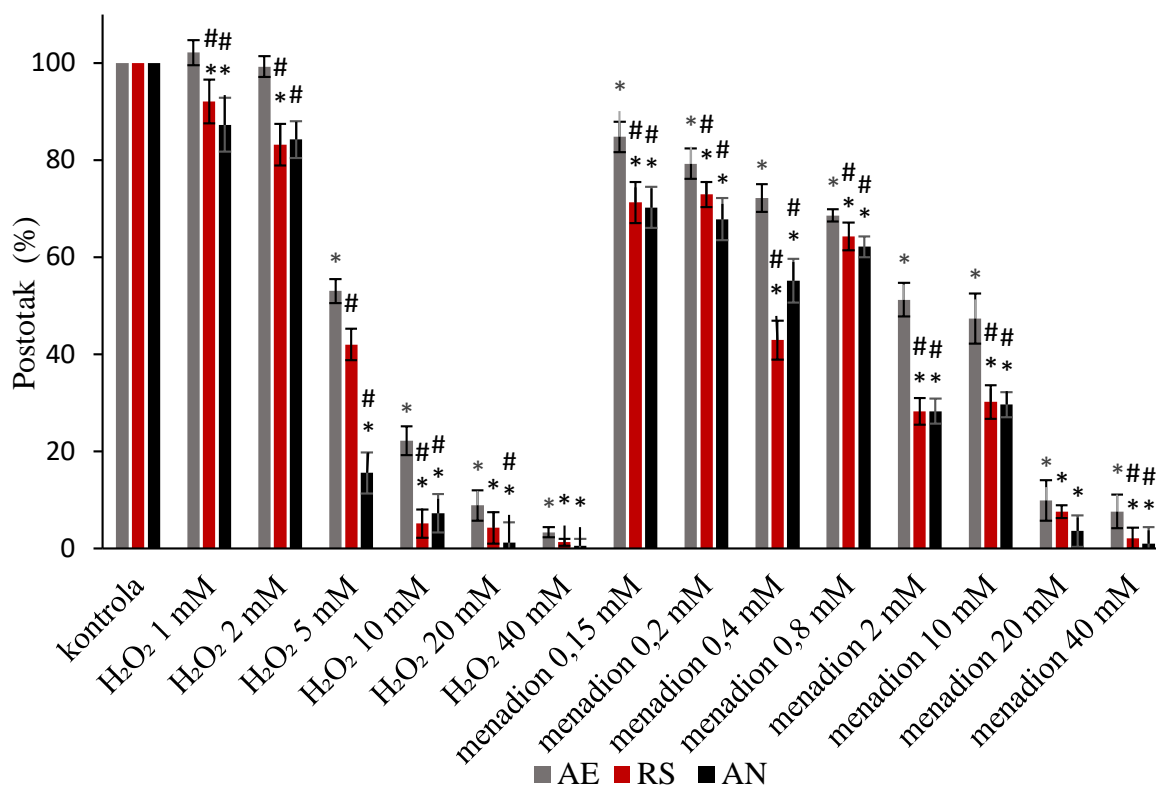


**Slika 19.** Prikaz omjera optičke gustoće i pH vrijednosti medija bakterije *Lb. plantarum* S1 uzgajane u aerobnim (ae), respiracijskim (rs) i anaerobnim (an) uvjetima.

Kako su omjeri optičke gustoće i pH u aerobnim i anaerobnim uvjetima veći od jedan, izolat je klasificiran kao tolerantan na kisik, a kako su isti omjeri u respiratornim i anaerobnim uvjetima isto veći od jedan, izolat je klasificiran kao sposoban za respiraciju. Navedene klasifikacije su provedene prema Maresca i sur. (2018).

Stanice bakterije *Lb. plantarum* S1 izložene su oksidativnom stresu tako što su u sva tri prethodno navedena uvjeta rasta izlagane rasponu koncentracija vodikovog peroksida i menadiona. U tim se uvjetima mjerila sposobnost rasta bakterijske kulture te su rezultati prikazani kao postotak rasta u usporedbi s kontrolnim uzorkom, koji nije bio izložen oksidativnom stresu (slika 20).





**Slika 20.** Rast bakterije *Lb. plantarum* S1 u MRS bujonu pri različitim koncentracijama vodikovog peroksida i menadiona. Rast je praćen u različitim uvjetima: aerobni (ae), respiracijski (rs) i anaerobni (an). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD (\*značajno različito od kontrole, #značajno različito od aerobnih uvjeta, p < 0,05) .

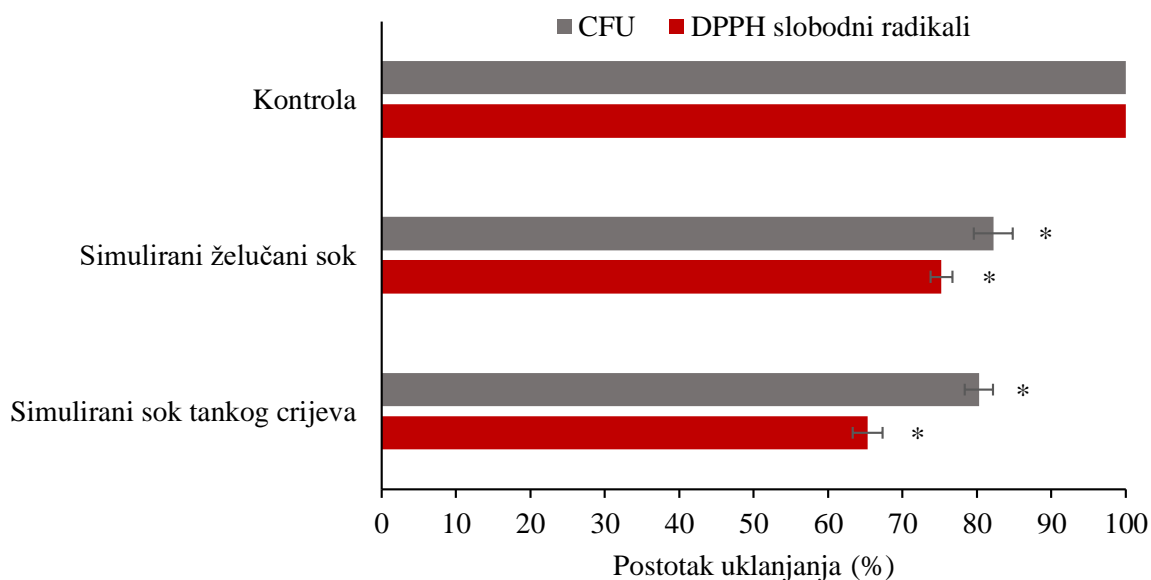
U aerobnim, anaerobnim i respiracijskim uvjetima rasta mjerila se i antioksidativna sposobnost *Lb. plantarum* S1 kako bi se utvrdilo mogu li različiti uvjeti rasta inducirati antioksidativnu aktivnost probiotičkih bakterija. Također, dodatno se odredila ukupna antioksidativna sposobnost toplinski inaktiviranih stanica različitim toplinskim tretmanima kako bi se odredio antioksidativni potencijal mrtvih probiotičkih stanica te utjecaj njihove strukture na vezanje slobodnih radikala. Rezultati su prikazani kao postotak uklonjenih radikala u odnosu na kontrolu (tablica 25).

**Tablica 25.** Sposobnost uklanjanja slobodnih DPPH radikala bakterije *Lactobacillus plantarum* S1 uzgajane u različitim uvjetima te sposobnost uklanjanja radikala toplinski inaktiviranih bakterijskih stanica.

Način uzgoja/vijabilnost	Postotak uklonjenih radikala
Aerobni uvjeti rasta	68,32 ± 1,18 <sup>a</sup>
Anaerobni uvjeti rasta	51,42 ± 2,57 <sup>b</sup>
Respiracijski uvjeti rasta	57,14 ± 1,51 <sup>c</sup>
Termički inaktivirane stanice (75°C, 60 min)	23,69 ± 1,79 <sup>d</sup>
Termički inaktivirane stanice (80°C, 20 min)	31,72 ± 2,47 <sup>e</sup>
Termički inaktivirane stanice (100°C, 10 min)	59,47 ± 2,14 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> različita slova označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ )

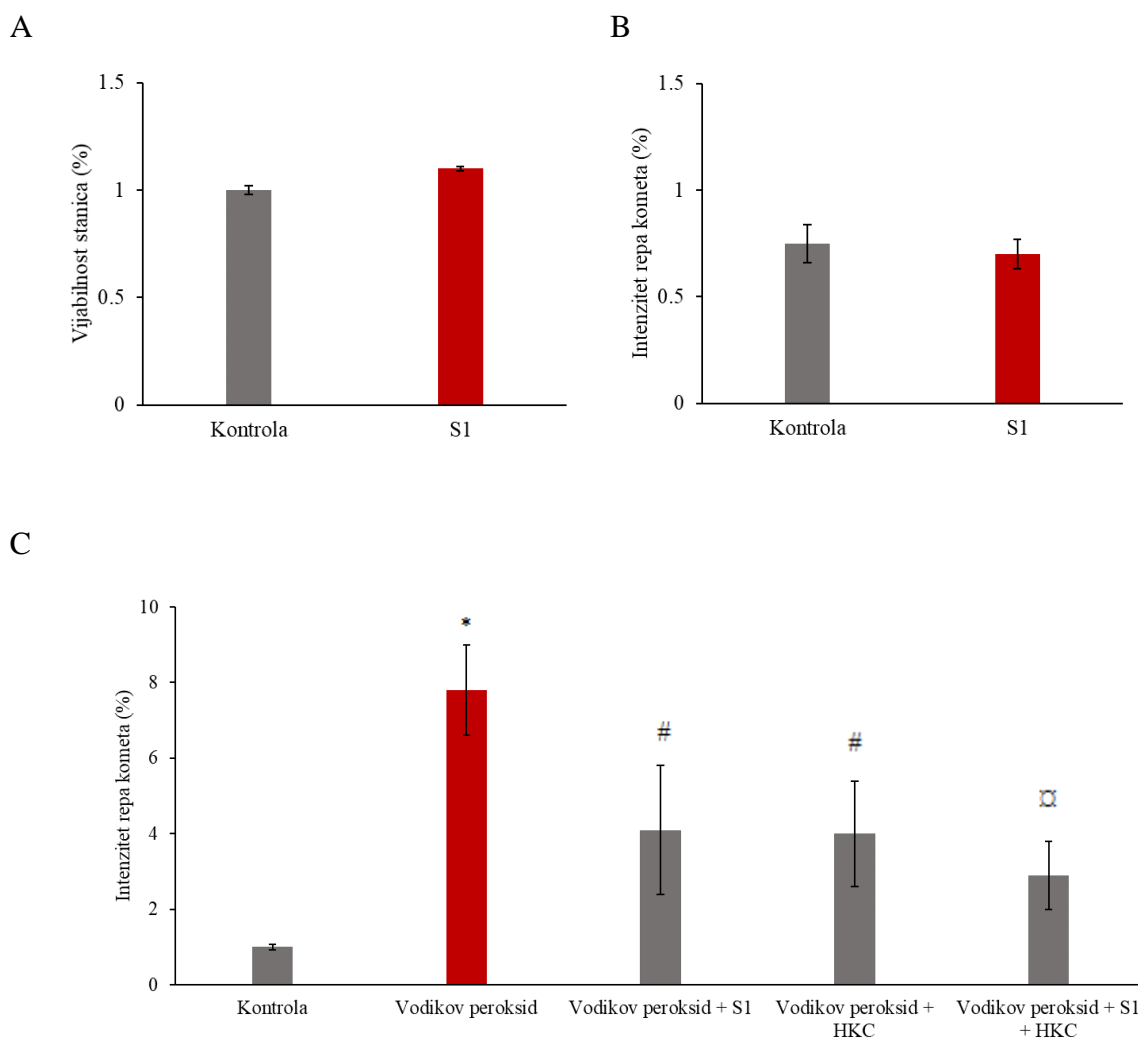
Kako bi se ispitala sposobnost uklanjanja slobodnih radikala, a time i ukupna antioksidativna aktivnost, određeno je uklanjanje DPPH slobodnih radikala nakon prolaska bakterije kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta. Rezultati su prikazani kao postotak uklanjanja radikala uz postotak preživljenja bakterijskih stanica u usporedbi s kontrolnim uzorkom koji nije izložen navedenim uvjetima (slika 21).



**Slika 21.** Uklanjanje slobodnih DPPH radikala te smanjenje CFU vrijednosti bakterije *Lb. plantarum* S1 nakon izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava (\*značajno različito od kontrole,  $p < 0,05$ ).

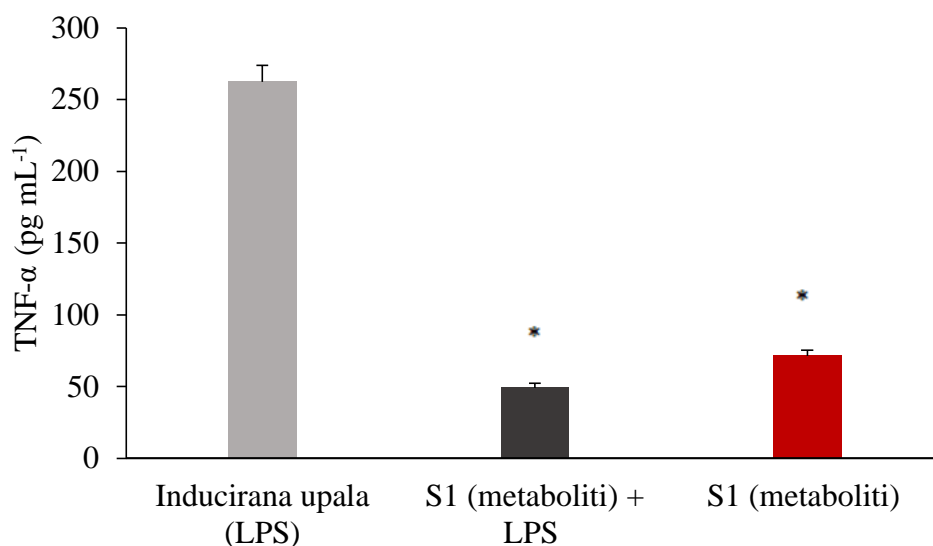
Kako bi se ispitala sigurnost primjene bakterijskog soja *Lb. plantarum* S1 određen je citotoksični učinak prema ljudskim stanicama periferne krvi (slika 22 A). Također je proveden test genotoksičnosti bakterijskih metabolita na ljudske stanice periferne krvi komet testom (slika 22 B). Frakcija metabolita *Lb. plantarum* S1 nije imala negativne citogenotoksične učinke na ljudske stanice periferne krvi.

Određena je i protektivna razina frakcija metabolita bakterije *Lb. plantarum* S1 manjih od 2000 Da i termički inaktiviranih stanica (100°C, 10 min) na mononuklearne stanice ljudske krvi koje su izložene oksidativnom stresu pomoću vodikovog peroksida. Rezultati protektivnog učinka su prikazani kao postotak repa u komet testu što je mjera oštećenja genetičkog materijala uslijed oksidativnog stresa (slika 22 C).



**Slika 22.** Toksikološka aktivnost frakcija metabolita bakterije *Lb. plantarum* S1: (A) nema citotoksičnog učinka prema humanim stanicama periferne krvi; (B) nema genotoksičnog učinka prema humanim stanicama periferne krvi; (C) protektivan učinak bakterijske frakcije metabolita i toplinski inaktiviranih stanica u uvjetima oksidativnog stresa induciranim vodikovim peroksidom. \*statistički značajno različito od kontrole, #značajno različito od kontrole i indukcije vodikovim peroksidom, ⊠značajno različito od indukcije vodikovim peroksidom,  $p < 0,05$ .

Kako bi se ispitaio protuupalni potencijal bakterije *Lb. plantarum* S1, određena je razina TNF- $\alpha$  u uvjetima inducirane upale LPS-om u prisutnosti bakterijskih metabolita manjih od 2000 Daltona (slika 23).



**Slika 23.** Koncentracija tumorskog faktora nekroze (TNF- $\alpha$ ) u izoliranim stanicama periferne krvi stimuliranih bakterijskim LPS-om u prisutnosti frakcija metabolita manjih od 2000 Daltona izdvojenih od bakterije *Lb. plantarum* S1. Rezultati su prikazani kao koncentracija TNF- $\alpha$  (pg mL<sup>-1</sup>)  $\pm$  SD (\*značajno različito od kontrole,  $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Višeslojna mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva

Pripremljene su troslojne probiotičke mikro kapsule tehnikom geliranja. Dobivene mikro kapsule nakon oblaganja alginatne jezgre kitozanom prikazane su na slici 24 A, a kapsule nakon dodavanja biomase probiotika za zaštitu zuba na slici 24 B.

**A**

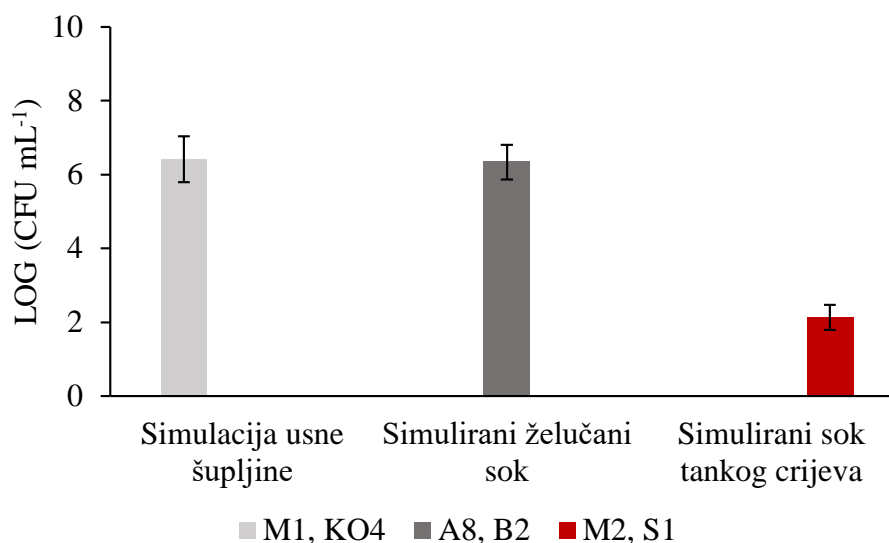


**B**



**Slika 24.** Dobivene mikro kapsule tijekom procesa geliranja - nakon oblaganja alginatne jezgre kitozanskim slojem (A) te nakon dodatka biomase sojeva za zaštitu zuba (B).

Nakon formuliranja i pripreme mikrokapsula koje sadržavaju odabrane izolate (M1, M2, KO4, A8, B2 i S1) izmjereno je ciljano otpuštanje izolata u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava (slika 25).



**Slika 25.** Otpuštanje izolata iz troslojnih mikrokapsula tijekom izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava.

Nakon 15 dana skladištenja na različitim temperaturama, u kapsulama je određen ukupan broj bakterija mliječne kiseline te je određena prisutnost patogenih bakterija kako bi se ispitala mogućnost kontaminacije postupka pripreme kapsula (tablica 26).

**Tablica 26.** Ukupan broj bakterija mliječne kiseline u troslojnom mikroinkapsulatu te prisutnost ostalih skupina mikroorganizama nakon 15 dana skladištenja na različitim temperaturama.

Početni broj BMK		Konačan broj BMK	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Kvasci	Plijesni
4 °C	2,4 × 10 <sup>9</sup>	1,1 × 10 <sup>8</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
-20 °C		2,1 × 10 <sup>9</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25 °C		4,5 × 10 <sup>7</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	d

n.d. – nije detektirano, d-detektirano

Kako u skladištenim uzorcima nisu detektirani mikroorganizmi uzročnici kvarenja niti patogene bakterije, uz izuzetak pojave plijesni u kapsulama skladištenim na sobnoj temperaturi, može se zaključiti da su mikrokapsule zadržale mikrobiološku ispravnost tijekom 15 dana skladištenja na -20 °C i 4 °C.

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Izolacija, karakterizacija i identifikacija dobivenih izolata

Cilj ovog rada bio je formirati bazu izolata bakterija mliječne kiseline iz različitih bioloških izvora: mlijeka magarice i kobile, stolice dojenčeta i fermentirane sirutke te provesti opću i ciljanu probiotičku karakterizaciju kako bi se pronašli probiotički sojevi koji pokazuju pozitivne učinke na stanja upale, oksidativnog stresa, infekcije uzrokovane *Helicobacter pylori* te na prevenciju oboljenja zubi i pridruženih tkiva.

Stolica dojenčeta prepoznata je kao potencijalan izvor probiotičkih bakterija te je dokazano da je crijevna mikrobiota dojenčadi dobar izvor bakterija mliječne kiseline sa sposobnošću kolonizacije i posljedično modulacijom imunskog sustava (Gheziel i sur., 2019). Crijevna mikrobiota dojenčadi potječe od majčinog mlijeka koje se može smatrati izvorom sigurnih za upotrebu i potencijalno probiotičkih bakterija mliječne kiseline za koje se smatra da mogu imati ulogu u prevenciji neonatalnih infektivnih bolesti (Martín i sur., 2003). Prijašnja istraživanja potvrdila su kako je stolica dojenčadi dobar izvor bakterija mliječne kiseline s probiotičkim potencijalom (Plaza-Diaz i sur., 2013; Tarrah i sur., 2019; Wang i sur., 2021). Iako se općenito smatra kako bi se za upotrebu u ljudi trebali koristiti probiotici ljudskog podrijetla zbog bolje prilagođenosti uvjetima gastrointestinalnog trakta čovjeka (O'Sullivan, 2001), brojna znanstvena istraživanja ukazuju kako se uz pravilnu karakterizaciju mogu pronaći bakterije s velikim probiotičkim potencijalom i u drugim nišama, kao što su mlijeka životinja (Mahmoudi i sur., 2016; Reuben i sur., 2020), fermentirane namirnice (Frece i sur., 2014; Parlindungan i sur., 2021), sokovi od voća (De Albuquerque i sur., 2018), povrća (Vitali i sur., 2012) i mnogi drugi izvori. Mlijeko magarice od davnina se smatra blagotvornim za zdravlje te se u zadnjih nekoliko godina počelo detaljnije istraživati. Dostupni podaci ukazuju na korisne učinke preko modulacije imunskog sustava, antialergijskog i antioksidativnog djelovanja te značajne antimikrobne aktivnosti. Poznato je da ima relativno nizak sadržaj bakterija što je rezultat anatomskih karakteristika i prisutnosti prirodnih antimikrobnih komponenti kao što su lizozim, imunoglobulini, laktoperoksidaza i laktoferin (Aspri i sur., 2017). Većina istraživanja je usmjerena na direktne korisne učinke konzumacije mlijeka, dok je trenutno relativno malo dostupnih podataka o probiotičkim svojstvima prirodno prisutnih bakterija u mlijeku. Dostupni podaci ukazuju na prisutnost bakterija probiotičkog potencijala, posebice izraženih antimikrobnih aktivnosti prema patogenim bakterijama (Murua i sur., 2013; Rastogi i sur., 2020). Kobilje mlijeko je također tradicionalno prepoznato preko svojih korisnih učinaka na zdravlje. Razlikuje se od mlijeka ostalih životinja i često je podloga za proizvodnju tradicionalnih fermentiranih proizvoda po čitavom svijetu. Sadrži vrijedne nutrijente te se



preporuča u olakšavanju određenih zdravstvenih tegoba posebice jer ima smanjena alergena svojstva u usporedbi s kravljim mlijekom (Jastrzębska i sur., 2017). Također je potencijalan izvor probiotika, u fermentiranom ili svježem obliku (Shi i sur., 2012). Kao što je spomenuto, fermentirane namirnice, posebice mliječne, mogu biti probiotički izvori visokog potencijala. Primjerice, tijekom fermentacije sirutke pomoću bakterija roda *Lactobacillus* dokazan je razvoj antioksidativne aktivnosti sirutke (Osuntoki i Korie, 2010), a pokazano je kako su takvi korisni učinci ovisni o pojedinom soju (Virtanen i sur., 2007).

U ovom radu ukupno je izolirano 60 bakterijskih izolata te im je pridružen autohtoni soj *Lb. plantarum* S1 izoliran iz sirutke koji je već pokazao probiotički potencijal u ranijim istraživanjima (Potočnjak i sur., 2017). Iz mlijeka magarice i kobile izolirano je po deset morfološki različitih kolonija, a iz prikupljenog uzorka stolice dojenčeta 40 izolata. Smanjena raznolikost bakterija mliječne kiseline u mlijeku magarice bila je očekivana budući da je ranije pokazano kako navedeno mlijeko ima sniženi broj laktobacila, što se stavlja na teret povišenog udjela lizozima u mlijeku, kao i tome što laktobacili imaju sniženu otpornost na lizozim kao je navedeno u studiji Carminati i sur. (2014) koji su pokazali relativno slabu raznolikost populacije laktobacila u mlijeku magarice.

Dobiveni izolati su morfološki i fenotipski okarakterizirani. Svi izolati su se pokazali kao gram pozitivne, štapićaste bakterije te je potvrđena čistoća izoliranih kultura. Kako bi se provela selekcija potencijalnih kandidata bakterija mliječne kiseline, provedena je preliminarna karakterizacija koja je uključivala ispitivanje sposobnosti preživljenja nakon izlaganja uvjetima niskog pH te na širem temperaturnom rasponu. Kao što je vidljivo iz tablica 7 i 8 samo je sedam izolata iz mlijeka magarice i kobile preživjelo izlaganje uvjetima niskog pH u zadanom stupnju od 95 % i više, te osam izolata iz stolice dojenčeta. Ukupno se radi o vrlo niskom postotku visoko otpornih sojeva, svega 13 % od ukupnog broja izolata. Željena aktivnost probiotičkih bakterija ispoljava se primarno u intestinalnom dijelu probavnog sustava, stoga je vrlo važna sigurna doprema vijabilnih stanica do donjeg dijela gastrointestinalnog trakta. Konzumacijom probiotičkih pripravaka, stanice moraju zadržati vijabilnost prolaskom kroz želudac u kojem prevladavaju uvjeti pH 2,0 i niže. Također, problematičnim se pokazalo da tržišno dostupni probiotici ne pokazuju zadovoljavajući stupanj preživljenja nakon izlaganja niskim pH vrijednostima (Sahadeva i sur., 2011), stoga je u ovom istraživanju provedena preliminarna selekcija bakterijskih izolata i zadan isključujući kriterij od 95 % preživljenja. Klorovodična kiselina, koja se nalazi u želudcu djeluje oksidirajuće na mnoge biomolekule i ometa njihovu redukciju (Sahadeva i sur., 2011). Pan i sur. (2009) su primjetili potpuni gubitak vijabilnosti

bakterije *Lb. acidophilus* NIT, izolirane iz stolice dojenčeta, nakon dva sata izloženosti uvjetima pH 2. Slični rezultati primjećeni su i u istraživanju Wang i sur. (2010) gdje je 7 od 11 izolata iz stolice dojenčeta i fermentiranog kupusa preživjelo izlaganje pH 2, i to sa stupnjem preživljenja od 75 % i više. U ovom istraživanju nije primjećena razlika u stupnju preživljenja obzirom na mjesto izolacije te se može zaključiti kako je sposobnost preživljenja svojstvo karakteristično za soj, a ne za mjesto izolacije. Obzirom na zadani kriterij i s ciljem odabira sojeva s najvećim probiotičkim potencijalom, iz daljnjih analiza isključeni su izolati koji su pokazali stupanj preživljenja manji od 95 %.

Kako bi se odabrali izolati koji će moći biti uključeni u širok raspon probiotičkih proizvoda, ispitana je sposobnost održavanja vijabilnosti bakterija na rasponu temperatura od 4 °C do 45 °C. Odmakom od optimalnih uvjeta rasta pri 37 °C promatrala se vijabilnost stanica na rasponu s graničnih 4 °C što odgovara rashladnom čuvanju velikog broja mliječnih proizvoda, te sve do 45 °C što prelazi i moguće biološke temperaturne ekstreme u ljudskom organizmu, a uključuje i potencijalne procesne parametre u proizvodnji različitih probiotičkih pripravaka. Svi ispitani izolati preživjeli su izlaganje zadanim uvjetima (tablice 10 i 11). Kako je prethodno navedno, početni broj za sve izolate bio je reda veličine  $10^9$  stanica po mililitru, te je obzirom na to zadani kriterij koji ne dopušta smanjenje broja stanica od jednog reda veličine, preciznije  $10^8$  stanica po mililitru. Svi ispitani izolati preživjeli su izlaganje navedenom temperaturnom rasponu. Zadani kriterij je ispunilo 9 od 11 ispitanih izolata zadržavajući visok broj stanica ( $\geq 10^8$  st mL) na cijelom rasponu ispitanih temperatura. Ovakav rezultat nije iznenađujuć jer su i u ranijim studijama bakterije mliječne kiseline pokazale mogućnost preživljenja na širem rasponu temperatura (Maragkoudakis i sur., 2009; Pundir i sur., 2013). Sposobnost preživljenja primjećen je i na višim temperaturama, primjerice, Kim i sur. (2008) su dokazali sposobnost preživljenja (s početnih  $10^7$  na  $10^4$ ) bakterije *Lb. acidophilus* ATTC®43121™ nakon izlaganja temperaturi od 65 °C. Obzirom na navedeno, u ovom su istraživanju iz daljnjih analiza isključeni su sojevi s padom broja stanica ispod  $10^8$  po mililitru suspenzije.

Kako bi se dodatno okarakterizirali dobiveni izolati, ispitani su na sigurnosni parametar hemolitičke aktivnosti te su podvrgnuti katalaza testu.

Određivanje hemolitičke aktivnosti čest je sigurnosni parametar prilikom probiotičke karakterizacije. Poznato je kako su neke bakterije mliječne kiseline pokazale hemolitičku aktivnost koja može rezultirati stimulacijom liziranja crvenih krvnih stanica kao i probojem toksičnih patogenih elemenata što za posljedicu može imati citotoksične učinke i tešku krvavu

dijareju (Koh i sur., 2018). Obzirom na navedeno vrlo je važno ispitati postoji li proizvodnja hemolizina metodom na krvnom agaru. U ovom istraživanju, niti jedan od testiranih izolata nije pokazao hemolitičku aktivnost (tablica 12) jer oko poraslih kultura nije bilo vidljivih hemolitičkih zona (nedostatak zona klasificira se kao  $\gamma$ -hemoliza), stoga se ispitani izolati smatraju sigurnima za upotrebu u ljudi. Svi izolati su katalaza negativni (tablica 12) što, uz morfologiju stanica, upućuje na njihovu pripadnost rodu *Lactobacillus* (Pot i sur., 2014).

Pomoću API 50 CHL testa, koji se koristi za identifikaciju bakterija roda *Lactobacillus*, dobiveni su fermentacijski profili odabranih bakterijskih izolata i prikazani su u tablici 13. Na osnovu analize fermentacijskih profila sojevi su identificirani (tablica 14). Dobiveni izolati identificirani su sa visokim postotkom preklapanja (99,5 % - 99,6 %) kao *Lb. plantarum*, uz iznimku izolata KO4 i A8 koji su identificirani kao *Lb. rhamnosus*. Genetička identifikacija 16S rRNA sekvencioniranjem potvrdila je dobivene rezultate biokemijske identifikacije.

Procjena sigurnosti probiotičkih sojeva uključuje nužan kriterij ispitivanja osjetljivosti na antibiotike (Klein, 2011). Navedeni kriterij je iznimno važan kako bi se otklonilo povećanje antibiotske rezistencije i potencijalno prijenos gena koji nose rezistenciju na patogene bakterije jer prijašnje studije pokazuju kako i kratkotrajna primjena antibiotika može dovesti do stabilizacije rezistentnih populacija u intestinalnom sustavu koja može opstajati godinama (Sharma i sur., 2014).

Disk difuzijskom metodom ispitana je osjetljivost bakterijskih izolata na odabrane antibiotike (kloramfenikol, klindamicin, tetraciklin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, gentamicin, ampicilin i vankomicin) za koje je određeno nužno ispitivanje u EFSA-inim naputcima iz 2012. godine. Obzirom na promjere nastalih zona uslijed inhibicije rasta, izolati su okarakterizirani kao osjetljivi, umjereno osjetljivi ili rezistentni (tablica 16). Rezultati osjetljivosti prikazani su u tablici 16. Svi ispitani sojevi su pokazali osjetljivost ili umjerenu osjetljivost na sve testirane antibiotike osim vankomicina i aminoglikozidnih antibiotika (kanamicin, gentamicin i streptomycin) za koje je veći dio izolata pokazao stupanj rezistencije. Bakterije roda *Lactobacillus* pokazuju rezistenciju na vankomicin što se smatra korisnim u selekciji iz mješovitih kultura. Mehanizam rezistencije na vankomicin povezuje se s građom peptidoglikana i prisutnošću određenih ligaza, a posljedica je točkaste mutacije (Ouweland i sur., 2016). Takva konstitutivna, kromosomski kodirana rezistencija ne predstavlja opasnost jer nije prenosiva na druge bakterijske sojeve (Shao i sur., 2015). Detektirana rezistencija na aminoglikozidne antibiotike (kanamicin, gentamicin i streptomycin) i ranije je primjećena u nekoliko vrsta roda *Lactobacillus* te se smatra intrinzičnom (Ouweland i sur., 2016) i ne

predstavlja opasnost od prijenosa rezistencije te je uvjetovana nedostatkom citokrom posredovanih prijenosa elektrona koji ima ulogu u transportu antibiotika (Fraqueza, 2015). Obzirom na navedeno dobiveni rezultati potvrđuju kako su svi izolirani sojevi sigurni za primjenu u ljudi.

Antimikrobna aktivnost prema patogenim mikroorganizmima je važno svojstvo prilikom odabira probiotičkih bakterija i ima ulogu u održavanju mikrobne ravnoteže gastrointestinalnog sustava (Shokryazdan i sur., 2014). Uloga antimikrobnih spojeva koje sintetiziraju probiotičke bakterije te njihov profilaktički učinak na enteroinfekcije je ključan (Šušković i sur., 2010), i mogu imati dodatna funkcionalna svojstva u domaćinu (Butorac i sur., 2020). Mehanizmi antimikrobnog djelovanja uključuju proizvodnju organskih kiselina, primjerice mliječne i octene, koje imaju snažan inhibitorni učinak na gram-negativne bakterije te se smatraju najviše zaslužnima za inhibitornu aktivnost probiotika prema patogenim mikroorganizmima (Bermudez-Brito i sur., 2012). Organske kiseline mogu ući u stanicu patogena i disociirati unutar citoplazme, snižavajući pH ili akumulirajući se u stanici mogu rezultirati uništavanjem stanice (Ouwehand i Vesterlund, 2004). Drugi organski spojevi s antimikrobnom aktivnošću su vodikov peroksid, etanol, diacetil i acetaldehid (Šušković i sur., 2010). Mnogi sojevi bakterija mliječne kiseline proizvode antimikrobne peptide kao što su bakteriocini za koje je dokazano kako mogu biti inhibirajući prema patogenima u namirnicama (Bermudez-Brito i sur., 2012). Mehanizmi bakteriocina uključuju uništavanje stanica formiranjem pora na stanici patogena i/ili inhibicijom sinteze stanične stijenke (Hassan i sur., 2012).

U ovom je istraživanju ispitana antimikrobna aktivnost izolata bakterija mliječne kiseline prema najčešćim patogenim mikroorganizmima: *E. coli* ATCC®25922™, *S. aureus* ATCC®25932™, *S. typhimurium* ATCC®27853™, *L. monocytogenes* ATCC®2356™ i *C. albicans* ATCC®10231™. Antimikrobna aktivnost određena je turbidimetrijskom metodom prateći rast patogenih mikroorganizama u prisutnosti supernatanta izolata. Kako bi se odredio utjecaj sniženja pH kao rezultat proizvodnje organskih kiselina, inhibicija je određena i u prisutnosti neutraliziranog supernatanta te konačno, kako bi se procijenili učinci inhibicije proteinskih komponenti, dio supernatanta je neutraliziran i termički obrađen rezultirajući denaturacijom potencijalnih proteinskih komponenti.

Izolati iz mlijeka magarice iskazali su visoki stupanj inhibicije svih testiranih patogena (63 % – 97 %) u prisutnosti netretiranog supernatanta. Kod izolata M1, nakon neutralizacije, inhibicija je statistički značajno smanjena te je iznosila maksimalnih 9 % za *S. aureus*. Nakon

neutralizacije, više nije bila prisutna inhibicija *S. typhimurium*. Nakon termičke obrade supernatanta nije bila više prisutna inhibicija *C. albicans*, te je uočena i statistički značajno manji učinak inhibicije *E. coli*, no inhibitorni učinak prema *S. aureus* i *L. monocytogenes* se nije statistički značajno promijenjen. Supernatant kulture izolata M2 pokazao je značajno veću razinu inhibicije koja je nakon neutralizacije i termičke obrade iznosila više od 60 % za *S. aureus* i *S. typhimurium* što upućuje na prisutnost antimikrobnih metabolita koji ne djeluju preko sniženja pH te ne podliježu inaktivaciji toplinskom denaturacijom.

Izolati iz kobiljeg mlijeka značajno su inhibirali ispitane patogene mikroorganizme u uvjetima netretiranog supernatanta, no nakon neutralizacije i termičke obrade, izolat KO4 značajno je izgubio inhibitorna svojstva te nisu bila detektabilna, uz iznimku vrlo niske inhibicije od 1,6 % za *S. typhimurium*. Izolat KO9 je uz statistički značajno smanjenje inhibicije, iskazao visoki postotak inhibicije *S. typhimurim* od 73 % nakon neutralizacije i toplinske obrade. Prema ostalim patogenima, stupanj inhibicije je bio manji, no detektabilan za sve patogene osim za *C. albicans*.

Izolati iz stolice dojenčeta pokazali su različite stupnjeve inhibicije patogena (tablica 18). Sumarno gledajući, inhibicije netretiranog supernatanta bile su visoke za sve ispitane izolate. Izolati A4, B12 i B16 pokazali su skoro potpuni gubitak sposobnosti inhibicije nakon neutralizacije i tretmana što upućuje da je vjerojatno glavni mehanizam inhibicije navedenih izolata utemeljen na snižavanju pH vrijednosti proizvodnjom organskih kiselina. Izolati A8 i B2 zadržali su sposobnost inhibicije svih patogena osim *S. typhimurium* i to u širem rasponu postotka inhibicije (12 % - 37 %). Najznačajnije inhibicije određene su za izolat A8 koji je nakon tretmana inhibirao *E. coli* preko 36 %, i *C. albicans* oko 30 %. Izolat B2 je naime, zadržao preko 30 % inhibirajuće sposobnosti prema *E. coli* i *C. albicans* dok su inhibicije ostalih patogena bile u rasponu od 11 do 15%.

Visok stupanj inhibicije netretiranog supernatanta svih izolata ukazuje kako je sniženje pH proizvodnjom organskih kiselina najzastupljeniji mehanizam inhibicije ispitanih izolata. Navedeno je u skladu s istraživanjem Choi i sur. (2018), gdje je dokazano inhibitorno djelovanje od prosječno 90 % patogenih bakterija *E. coli* O157:H7 ATCC®35150™, *Salmonella enteritidis* KCCM 12021, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925 i *S. aureus* KCCM 11335 u prisutnosti netretiranog supernatanta bakterija mliječne kiseline izoliranih iz fermentiranog proizvoda. Navedeni autori također primjećuju gubitak inhibitorne aktivnosti nakon neutralizacije te zaključuju kako bakteriocini nisu uključeni u inhibiciju istraživanih sojeva već da je mliječna kiselina glavni mehanizam inhibicije ispitivanih sojeva. U ovom istraživanju, korištenim

metodama se ne može potpuno isključiti potencijalna proizvodnja bakteriocina jer je dio izolata zadržao inhibitorno djelovanje nakon tretmana, što daje naznaku kako su potencijalno prisutni termostabilni spojevi. Termostabilne bakteriocine mogu proizvesti bakterija roda *Lactobacillus* te mogu imati inhibitorno djelovanje prema *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* i *S. typhimurium* (Ratsep, 2014). U rezultatima ovog istraživanja, ističe se zadržana antimikrobna aktivnost izolata M2, KO9, A8 i B2 prema istraženim patogenima. Zadržana inhibitorna aktivnost izolata A8 i B2 prema kvascu *C. albicans* ukazuje na mogućnost antifungalne aktivnosti. Slične aktivnosti zabilježene su u istraživanju Jørgensen i sur. (2017) gdje je supernatant kulture oba istraživana soja *Lactobacillus reuteri* uspješno inhibirao rast *C. albicans* u *in vitro* uvjetima te navode kako uz sniženje pH postoji mogućnost inhibicije proizvodnjom antifungalnih molekula. Također, Rönnqvist i sur. (2007) pokazali su značajnu inhibiciju *C. albicans* izolatima bakterija roda *Lactobacillus* ljudskog podrijetla. Obzirom na rezultate ovog istraživanja može se zaključiti kako svi ispitani izolati značajno inhibiraju patogene mikroorganizme putem proizvodnje organskih kiselina uslijed sniženja pH, a izolati M2, KO9, A8, i B2 pokazuju dodatnu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost prema ispitanim patogenima te time iskazuju značajan probiotički potencijal u suzbijanju infekcija i oboljenja uzrokovanih ispitanim patogenima.

Kako bi se ispoljili korisni učinci probiotika u donjem dijelu gastrointestinalnog sustava, nužan je zadovoljavajući stupanj zadržavanja na ciljanom mjestu, kako bi se unatoč peristaltici, omogućila njihova kompetitivna prednost (Kos i sur., 2003). Autoagregacija probiotičkih bakterija smatra se nužnom za adheziju na stanice epitela i mukozne površine stoga ima važnu ulogu u kolonizaciji gastrointestinalnog sustava i istraživanja pokazuju kako je ključan fenotip za adheziju i prvi korak u procesu adhezije, omogućujući bakterijama formiranja barijere i onemogućavanja adhezije nepoželjnih mikroorganizama (Krausova i sur., 2019). Agregacija podrazumijeva proces reverzibilne akumulacije stanica bakterija istog soja što rezultira taloženjem u suspenziji, dok je ekvivalentan proces koagregacije koja podrazumijeva nakupljanje stanica različitih mikroorganizama te se smatra da se posljedično koagregaciji formira barijera koja onemogućuje kolonizaciju patogenih mikroorganizama (Janković i sur., 2012).

U ovom istraživanju, ispitana su autoagregacijska svojstva izolata bakterija mliječne kiseline te njihova sposobnost koagregacije s patogenim test mikroorganizmima (*E. coli* ATCC®25922™, *S. aureus* ATCC®25923™, *S. typhimurium* ATCC®29631™, *L. monocytogenes* ATCC®23074™ i *C. albicans* ATCC®10231™). Sposobnost autoagregacije

izolata prikazana je na slici 3. Iz rezultata je vidljivo kako je autoagregacija ovisna o vremenu te su najviše vrijednosti detektirane u 24. satu inkubacije. Najviše vrijednosti autoagregacije primjećene su kod izolata M2, KO4, A8 i B2 te su iznosile preko 65 %. Rezultati su u skladu s istraživanjem Krausova i sur. (2019) gdje su zapaženi najviši stupnjevi autoagregacije preko 60 % za izolate bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta i životinja. U navedenom istraživanju, kao i ovom, primjećene su razlike u stupnju autoagregacije među sojevima iz čega se zaključuje kako je autoagregacijska sposobnost specifična za pojedini soj. Slične vrijednosti autoagregacije, koje su kod nekih sojeva dostizale i 95 % u 24. satu prikazali su Nikolic i sur. (2010) za bakterije roda *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Obzirom na navedeno, istaknuti izolati u ovom istraživanju (M2, KO4, A8 i B2) pokazali su najviši stupanj autoagregacije te se može smatrati kako time ispoljavaju najviši potencijal za epitelnu adheziju i kompeticiju s patogenim mikroorganizmima.

Iz rezultata je vidljivo kako je sposobnost koagregacije varijabilna među sojevima, ali ovisi i o patogenom mikroorganizmu. Prema rezultatima, stupanj koagregacije je ovisan o vremenu koinkubacije te je zamijećeni raspon koagregacije izolata iz mlijeka magarice i kobile u 24. satu bio između 31 % i 58 %. Prilikom analize izolata iz stolice dojenčeta, također je primjećena ovisnost koagregacije o vremenu i o ispitivanim sojevima te je ukupni detektirani raspon koagregacije u 24. satu iznosio od 40 % do 62 %. Bakterijski izolati iz stolice dojenčeta pokazali su viši stupanj koagregacije nego izolati iz mlijeka magarice i kobile te se izolat A4 ističe jer je određen postotak koagregacije sa *S. typhimurium* od 65 %. U usporedbi sa sličnim istraživanjima, dobiveni rezultati ukazuju na probiotički zadovoljavajući stupanj koagregacije s patogenim mikroorganizmima (Choi i sur., 2018). Slične rezultate za koagregaciju bakterija roda *Lactobacillus* dobili su Tareb i sur. (2013) ispitivajući stupanj koagregacije s istim patogenima *S. typhimurium*, *E. coli* i *L. monocytogenes*, te je raspon koagregacije iznosio od 30 % do oko 40 % za *S. typhimurium*, *E. coli* i *L. monocytogenes* te do 60 % za *C. jejuni* što potvrđuje ovisnost koagregacije o soju probiotika. Također, izolati roda *Lactobacillus* su u istraživanju Pithva i sur. (2014) pokazali visok stupanj koagregacije s *Candida* spp. i enterobakterijama te su već nakon 4 h iskazivali stupanj koagregacije u rasponu od 39 do 74 %. Dobra sposobnost autoagregacije i koagregacije omogućava adheziju, kolonizaciju te omogućuje korisne antipatogene učinke na ciljanom mjestu. U ovom istraživanju, ispitani izolati pokazuju visoku sposobnost autoagregacije i koagregacije te ostvaruju preduvjete probiotičkog djelovanja na željenom mjestu u domaćinu.

Osim autoagregacije, hidrofobnost stanične površine stanica je također ključan faktor u procjeni kolonizacijskog potencijala probiotika (Rokana i sur., 2018). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako bakterije s većim stupnjem hidrofobnosti površine stanice bolje adheziraju na stanice epitela te se svojstvo izražene hidrofobnosti smatra jednim od nužnih svojstava u prvom kontaktu bakterija i stanica domaćina (Krausova i sur., 2019). Početne nespecifične fizikalno-kemijske interakcije mikroorganizama baziraju se na elektrostatskim, van der Waalsovima, vodikovim i hidrofobnim interakcijama (Beaussart i sur., 2014). Navedene interakcije definirane su sastavom i svojstvima bakterijske površine te uključuju egzopolisaharide, glikoproteine, lipoproteine, lipoteične kiseline, proteine S sloja (Rokana i sur., 2018). Kako bi se odredila hidrofobnost stanične površine razvijene su različite metode, a jedna od često korištenih je određivanje bakterijske adhezije na ugljikovodike (Otero i sur., 2004).

U ovom istraživanju određena je hidrofobnost stanične površine bakterijskih izolata određivanjem sposobnosti adhezije na dva alifatska (kloroform, heksan) i dva aromatska (toulen i ksilen) otapala. Svi ispitani izolati osim A4, B12 i M1 pokazali su postotak hidrofobnosti veći od 50 % barem za jedan ugljikovodik (slika 6). Izolati iz stolice dojenčeta, B2 i A8, pokazali su najviše stupnjeve adhezije na kloroform, heksan i toulen, bez statističke razlike među ugljikovodicima, ali statistički značajno sniženu adheziju na ksilen iako je i ona iznosila više od 65 %. Izolati A4 i B12 imaju najniži stupanj hidrofobnosti te uz izolat iz mlijeka magarice (M1) iskazuju manje od 35 % hidrofobnosti. Ostali izolati iz mlijeka magarice i kobile pokazali su visok stupanj adhezije na ispitane ugljikovodike. Obzirom na rezultate može se zaključiti kako je svojstvo hidrofobnosti specifično za pojedini soj, a ne za izvor izolacije. Dobiveni rezultati su u skladu s Rokana i sur. (2018) gdje je raspon hidrofobnosti za izolate bakterija roda *Lactobacillus* također varijabilan obzirom na ispitivani ugljikovodik te su najviši zabilježeni postotci bili u rasponu od 75 % do 98 %. U navedenoj studiji, koja je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, sojevi koji su pokazali visok stupanj hidrofobnosti, iskazali su ga prilikom ispitivanja adhezije na oba tipa ugljikovodika. Širok raspon hidrofobnosti probiotičkih kandidata roda *Lactobacillus* primjećen je i u istraživanju Kotzamanidis i sur. (2010) gdje je uočena poveznica između visoke hidrofobnosti i autoagregacije. U ovom istraživanju, ta pretpostavka je ispunjena za izolate A8 i B2 koji su bili visokog stupnja autoagregacije i hidrofobnosti, dok su izolati B12 i A4 bili najnižeg stupnja u oba slučaja.

Kako bi probiotički sojevi uspješno adhezirali te ispoljili korisne učinke u donjem dijelu gastrointestinalnog sustava, nužan je uvjet zadržavanja vijabilnosti prolaskom kroz stresne uvjete želudca i tankog crijeva. Stupanj preživljenja nakon prolaska kroz stresne uvjete niskog



pH želudca i u uvjetima prisutnosti žučnih soli i probavnih enzima u tankom crijevu, ključan je parametar kod razvoja novih probiotika, ali i konačnog proizvoda, jer daje informaciju o potrebi ugradnje bakterija u zaštitne nosače. Tijekom karakterizacije potencijalnih probiotika, stavlja se naglasak na ispitivanje dva fundamentalna svojstva: otpornost na pH želudca i žučne soli (Naissinger da Silva i sur., 2021).

U ovom istraživanju, izolati su izloženi simuliranim uvjetima usta, želudca i crijeva te je određen stupanj preživljenja nakon izlaganja trima navedenim uvjetima (slike 7 i 8). Izolati iz mlijeka magarice i kobile pokazali su sposobnost preživljenja u svim ispitanim uvjetima. Najveći pad broja vijabilnosti vidljiv je nakon izlaganja simuliranom soku želudca. Izolati M1 i M2 pokazali su najmanju osjetljivost na ispitane uvjete, s preživljenjem većim od  $10^7$  st mL<sup>-1</sup>, dok je kod izolata KO4 i KO9 vidljiv značajniji pad broja stanica s konačnim vrijednostima oko  $10^5$  st mL<sup>-1</sup>. Obzirom da je u simuliranim uvjetima želudca pH snižen na 2,0, te uz činjenicu da su svi ispitani sojevi navedenu pH vrijednost preživjeli u postotku većem od 95 % u prethodnom eksperimentu, pad broja stanica na 85 % (M1, M2) i 64 % (KO4, KO9) u ovom eksperimentu može se pripisati prisutnosti pepsina. Kod izolata iz stolice dojenčeta (slika 8) zabilježen je manji pad broja stanica nakon izlaganja simuliranom želučanom soku. Izolati A8 i B2 pokazali su najveću sposobnost preživljavanja svih ispitanih uvjeta, dok je kod izolata B12 vidljiv pad broja stanica od 14 % u uvjetima želuca. Svi izolati pokazali su dobro preživljavanje u uvjetima usne šupljine te tankog crijeva gdje je kod većine izolata primjećen i porast broja stanica. Dobiveni rezultati su u skladu s Jang i sur. (2019) gdje su korišteni isti uvjeti te je preživljenje bakterija *Lb. brevis* KU15153 i *L. rhamonsus* GG iznosilo 71 % i 52 % nakon izlaganja uvjetima želudca, te se broj stanica u uvjetima tankog crijeva povećao. Slične podatke su dobili i Son i sur. (2017) gdje je stupanj preživljenja bakterija roda *Lactobacillus* nakon izlaganja želudca iznosio preko 80 %, uz povećanje broja u prisutnosti žučnih soli. Uz navedeno, brojne druge studije također pokazuju kako je svojstvo otpornosti na uvjete gastrointestinalnog sustava ovisno o soju te kako postoje sojevi koji pokazuju izvrsnu otpornost na izlaganje navedenim stresorima (Vizoso Pinto i sur., 2006; Lo Curto i sur., 2011) te kako već probiotički okarakterizirani sojevi pokazuju znatno viši stupanj preživljenja nego druge bakterije (Millette i sur., 2008), što ide u korist nužnog ispitivanja ovog kriterija prilikom razvoja novih probiotika. Bakterije mliječne kiseline su potencijalno dobar izvor takvih, otpornih sojeva jer je dokazano da bakterije producenti mliječne kiseline podnose i rastu u uvjetima niskog pH zbog pojačanog transporta mliječne kiseline i protona van stanice (Vijayakumar i sur., 2015). U usporedbi s navedenim podacima, rezultati ovog istraživanja

ukazuju kako su ispitani izolati sposobni u velikom broju preživjeti izlaganje uvjetima gastrointestinalnog sustava i time upućuju na potencijal ispoljavanja korisnih, probiotičkih učinaka.

Probiotičke bakterije dostupne su u koncentriranim formulacijama najčešće priređenim liofilizacijom, mikroinkapsulacijom ili sušenjem pomoću raspršivanja jer se smatra kako su u takvim oblicima stanice otpornije na stres tijekom proizvodnih postupaka (Her i sur., 2015). Liofilizacija je postupak sušenja u smrznutom stanju, i jedan je od najčešće korištenih postupaka sušenja sastojaka osjetljivih na visoku temperaturu. Tijekom postupka, smrznuta voda se uklanja procesom sublimacije stoga je smanjeno oštećenje bioloških struktura (Capela i sur., 2006). Liofilizacija omogućuje očuvanje vijabilnosti stanica dulje vrijeme uz zadržavanje funkcionalnih svojstava (Reddy i sur., 2009). Razlike u svojstvima površine mikroorganizama te u građi stanične stijenke i membrane rezultiraju različitim razinama otpornosti probiotika na uvjete liofilizacije (Capela i sur., 2006). Kako bi se smanjila oštećenja stanica tijekom postupka, često se koriste zaštitni lioprotektanti kao primjerice obrano mlijeko, disaharidi, manitol, sorbitol, proteini ili aminokiseline (Rathnayaka, 2013). Ispitivanje preživljenja liofilizacije važan je probiotički kriterij jer omogućava procjenu tehnoloških svojstava ispitivanog soja. Zbog navedenih razloga provedena je liofilizacija izolata iz mlijeka magarice, kobile i stolice dojenčeta u prisutnosti obranog mlijeka kao lipoprotektora te je određen stupanj preživljenja nakon postupka (slika 9). Svi izolati osim M1 i KO4 pokazali su visok stupanj preživljenja s više od 80 %. Najveću otpornost na proces liofilizacije imali su sojevi M2 i B2 te im je preživljenje iznosilo više od 90 %. Dobiveni rezultati su u skladu s Reddy i sur. (2009) gdje je preživljenje bakterija roda *Lactobacillus* bilo više od 90 % u procesu liofilizacije u obranom mlijeku. Rezultati G-Alegría i sur. (2004) potvrđuju kako je svojstvo preživljenja ovisno o soju te kako korištenje obranog mlijeka štiti bakterijske sojeve od uvjeta liofilizacije. Obzirom na navedeno, u ovom istraživanju svi sojevi pokazuju značajnu otpornost na proces liofilizacije.

Važno korisno svojstvo probiotika je sposobnost formiranja biofilmova jer im omogućava otpornost na promjene u okolišnim uvjetima što dovodi do uspješne kolonizacije, kompetitivne inhibicije patogena i interakcije s imunim sustavom domaćina (Salas-Jara i sur., 2016).

Biofilmovima se smatraju zajednice mikroorganizama pričvršćenih na podlogu koji u procesu vezanja u biofilm prolaze promjene prelaskom iz planktonskog oblika u kompleksnu zajednicu što rezultira ispoljavanjem novih fenotipskih svojstava posebice u interakciji s okolinom (Toole i sur., 2000). Kako se formacija biofilma smatra korisnim probiotičkim

svojstvom, mnoga istraživanja su provedena kako bi se odredila sposobnost stanica probiotičkih *Lactobacillus* sojeva da stvaraju biofilme (Jones i Versalovic, 2009; Ambalam i sur., 2012; Terraf i sur., 2012). U ovom istraživanju ispitana je sposobnost formacije biofilмова te su izolati, obzirom na formirani biofilm, klasificirani prema Borges i sur. (2012) kao snažni, slabi ili umjereni producenti biofilma (tablica 19). Svi ispitani izolati klasificirani su kao snažni producenti biofilma nakon 48 h inkubacije. Dobiveni rezultati su u skladu s Kubota i sur. (2008) gdje je ispitano svojstvo proizvodnje biofilмова velikog broja izolata roda *Lactobacillus* i velik broj izolata je pokazao kako su snažni producenti biofilma na različitim supstratima te nije bilo ovisnosti razvoja biofilma o prisutnosti kisika. Navedeno govori kako potencijal određen metodologijom u ovom istraživanju zaista ukazuje na potencijal izolata za probiotičku primjenu te kako postoje indikacije da bi i uvjetima u crijevima domaćina ispitani izolati mogli formirati biofilme i ispoljavati korisne učinke.

## **5.2. Probiotička karakterizacija izolata za primjenu u zaštiti zuba i usne šupljine**

Većina istraživanja u području probiotika usmjerena je na interakcije s crijevnom mikrobiotom i opisivanje mehanizama ostvarenih korisnih učinaka koji rezultiraju kao posljedica tih interakcija. Iako u porastu, istraživanja uloge probiotika i njihova primjena za zaštitu zuba i usne šupljine pridobiva znatno manje pažnje (Chen i sur., 2020). Dosadašnja istraživanja ukazuju na tri ključna načina djelovanja probiotika u usnoj šupljini: modulacija upanih odgovora domaćina te direktni i indirektni učinci na patogene bakterije (Laleman i Teughels, 2015). Klinička ispitivanja su djelomično dokazala kako se probiotička aktivnost ostvaruje kroz antagonizam, koagregaciju, modulaciju biofilma, antikariogene učinke te posljedično ograničavanjem parodontitisa, gingivitisa te jačanjem rezistencije na infekcije (Mahasneh i Mahasneh, 2017). Iz navedenog je jasno kako je ključan parametar interakcija probiotika s patogenim ili potencijalno patogenim mikroorganizmima u ustima.

S ciljem pronalaska bakterijskih sojeva koji bi mogli ispoljavati korisne učinke u zaštiti zuba i usne šupljine, odabrani su izolati koji su zadovoljili sve prethodno ispitane sigurnosne kriterije, te s visokim stupnjem koagregacije s patogenima no pokazali najmanji stupanj preživljenja u uvjetima u želudcu i crijevima te time ostvarili potencijal za primjenu u zaštiti zuba. Kako bi se provela ciljana probiotička karakterizacija izoliranih sojeva u navedene svrhe, odabran je pristup ispitivanja međuutjecaja izolata i bakterija koje najčešće uzrokuju zdravstvene probleme povezane sa zubima i okolnim tkivima. Obzirom na navedeno, ispitana su koagregacijska svojstva naspram test mikroorganizama *S. intermedius*, *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans* i *P. gingivalis*, antimikrobna aktivnost proizvedenih metabolita izolata

te sposobnost disrupcije biofilmova test mikroorganizama. U prethodnim eksperimentima svi izolati su pokazali sposobnost preživljavanja u simuliranoj slini što je preduvjet za daljnja istraživanja ispoljavanja korisnih učinaka u usnoj šupljini pacijenta. Uvjeti u usnoj šupljini, u korelaciji s uvjetima u gastrointestinalnom traktu, nisu značajno stresni, stoga je i očekivan rezultat prema kojem je ustanovljeno da svim ispitanim sojevima ne pada vijabilnost nakon izlaganja. Navedeno potvrđuje i istraživanje Haukioja i sur. (2006) u kojem su svi ispitivani sojevi rodova *Lactobacillus* (n=17) i *Bifidobacterium* (n=7) preživjeli izlaganje u uvjetima simulirane sline.

U svrhu potvrde eksperimentalnih uvjeta ispitivanja utjecaja na test mikroorganizme, određena je sposobnost formiranja biofilomva uzročnika oboljenja zubi i pridruženih tkiva (tablica 20). Svi ispitani patogeni mikroorganizmi su snažni producenti biofilma u eksperimentalnim uvjetima te je time ostvaren preduvjet ispitivanja utjecaja na iste. U biološkim sustavima svi ispitani mikroorganizmi pokazuju mogućnost formiranja biofilmova te posljedično i negativne učinke na zdravlje (Petersen i sur., 2004; Yoshida i Kuramitsu, 2002; Alvarenga i sur., 2015; Gerits i sur., 2017).

Sposobnost koagregacije je jedan od ključnih mehanizama u razvoju biofilmova i važna prilikom stvaranja zubnog plaka stoga se smatra kao izražena koagregacijska svojstva probiotičkih bakterija onemogućavaju kolonizaciju patogenih bakterija (Twetman i sur., 2009). U ovom radu ispitana je sposobnost autoagregacije i koagregacije test mikroorganizama dentalnih patogena s izolatima M1 i KO4 (tablica 21). Oba izolata pokazala su visoki stupanj koagregacije s test mikroorganizmima u uvjetima simulirane sline. Sposobnost koagregacije izolata M1 je kod svih test mikroorganizama statistički značajno veća nego sama autoagregacija test mikroorganizama. Kod izolata KO4 statistički značajno povećanje ustanovljeno je kod bakterija roda *Streptococcus*. U slučaju takvog povećanja rezultati ukazuju kako je formiranje agregata izolat-patogen veće i brže nego formiranje agregata patogen-patogen što je koristan učinak jer otežava formiranje biofilmova patogena. Rezultati su u skladu s istraživanjem Twetman i sur. (2009) u kojem je šest probiotičkih bakterija pokazalo značajna koagregacijska svojstva s uzročnicima karijesa iz roda *Streptococcus*. U navedenom istraživanju bile su relativno male razlike u sposobnosti koagregacije, a soj najvišeg potencijala, *L. acidophilus* CUG5917 koagregirao je s patogenima u rasponu od 38 % do 71 %. Istraživanje Snel i sur. (2011) pokazalo je visoku sposobnost bakterije *L. salivarius* da koagregira s *P. gingivalis* dok je primjerice istraživanje Samot i sur. (2017) dokazalo nemogućnost devet bakterija roda *Lactobacillus* da koagregira s istim patogenom što ukazuje kako je sposobnost koagregacije

svojstvo ovisno o soju. Visoka sposobnost koagregacije bakterija roda *Lactobacillus* s uzročnikom parodontitisa, *A. actinomycetemcomitans* primjećena je i u istraživanju Soppatha i sur. (2020).

Kako bi se ispitali ostali učinci izolata na test mikroorganizme, određena je antimikrobna aktivnost supernatanta kulture izolata nakon prekonoćnog uzgoja (slika 10). Također, ispitana je i inhibitorna aktivnost neutraliziranog supernatanta kako bi se utvrdio utjecaj sniženja pH na inhibitornu aktivnost (Slika 11). Ispitani izolati pokazali su najveću inhibitornu aktivnost prema bakterijama roda *Streptococcus* dok su značajno slabije inhibirali ostale test mikroorganizme. Među izolatima nije bilo značajne razlike u inhibiciji svih test mikroorganizama. Nakon neutralizacije supernatanta, inhibitorna aktivnost značajno je smanjena. Najviša inhibitorna vrijednost nakon neutralizacije ustanovljena je za *S. mutans* i *S. intermedius* koje je izolat KO4 značajnije inhibirao s maksimalnom inhibicijom kariogenog *S. mutans* (21 %). Također, izolat M1 je nakon neutralizacije ostvario 12 %-tnu inhibiciju *A. actinomycetemcomitans*. Prethodne studije potvrđuju kako je primarna antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline uzrokovana sniženjem pH kao posljedice proizvodnje mliječne kiseline (Bungenstock i sur., 2020). Unatoč tome, istraživanje inhibitornog utjecaja *Lactobacillus reuterii* na dentalne patogene ukazuje kako sniženje pH nije jedinstven mehanizam inhibitornog djelovanja (Yang i sur., 2021). Ovo istraživanje to potvrđuje jer je zadržana značajna inhibitorna aktivnost *S. mutans* nakon neutralizacije supernatanta.

Kako je supernatant kulture izolata pokazao antimikrobni potencijal, i uz pretpostavku tranzitne kolonizacije probiotika u ustima na koju ukazuju neka istraživanja (Ravn i sur., 2012), istražena je sposobnost inhibicije formiranja biofilмова test mikroorganizama pomoću različitih razrijeđenja supernatanta izolata M1 i KO4 (tablica 22). Razrijeđenjem je značajno smanjena sposobnost inhibicije što direktno upućuje na koncentracijsku ovisnost inhibicije. Inhibicija je direktno vezana uz antimikrobnu aktivnost supernatanta što se očituje u podudaranju visoke antimikrobne aktivnosti prema bakterijama roda *Streptococcus* te inhibicijom njihovih biofilмова. Rezultati ukazuju kako je antimikrobna aktivnost snižavanja pH glavni mehanizam inhibicije biofilмова no ne isključuju druge mehanizme djelovanja. Inhibicija formiranja biofilмова često uključuje kompleksne mehanizme i posljedica je mnogih molekularnih i okolišnih parametara. Navedeni mehanizmi nisu do kraja razjašnjeni no može se pretpostaviti kako su ovisni i o probiotičkom soju i o patogenu. Ishikawa i sur. (2020) otkrili su redukciju biofilma *P. gingivalis* uzrokovanu probioticima te pretpostavili mehanizam koji uključuje regulaciju transkripcije i virulentne faktore. Literatura upućuje na potencijal

probiotičke redukcije oralnih patogenih biofilmova. Primjerice, u skladu s ovim istraživanjem, i ranije je primjećena visoka sposobnost inhibicije biofilmova *S. mutans* u prisutnosti bakterija roda *Lactobacillus* (Jeong i sur., 2018) kao i smanjenje kolonizacijske sposobnosti *A. actinomycetemcomitans* u prisutnosti probiotičkih metabolita. Obzirom na navedeno oba izolata (M1 i KO4) ispunila su kriterije za upotrebu u zaštiti zuba i pridruženih tkiva s potencijalom redukcije patogenih bakterija i disrupcijom njihovih biofilmova.

### **5.3. Probiotička karakterizacija sojeva za primjenu u redukciji *Helicobacter pylori***

Patogena bakterija *Helicobacter pylori* smatra se ključnim čimbenikom u razvoju gastritisa i ulkusne bolesti te predstavlja faktor rizika u razvoju malignih oboljenja želuca (Hamilton-Miller, 2003). Mnoga istraživanja opisuju procjenu probiotičke uloge u tretmanu protiv *H. pylori*. Primjerice, sojevi bakterija roda *Lactobacillus* i njihovi metabolički produkti, pokazali su sposobnost inhibicije *H. pylori* (Lorca i sur., 2001; Boyanova i sur., 2009; Midolo i sur., 1995). Iako mnoga istraživanja uključuju probiotičke sojeve iz različitih izvora, u literaturi je istaknut potencijal probiotika izoliranih iz stolice dojenčeta (Gao i sur., 2021; Nam i sur., 2002).

Obzirom na navedeno, u ovom je istraživanju ispitana antimikrobna aktivnost izolata iz stolice dojenčeta (A4, A8, B2 i B12) i koagregativna svojstva naspram *Helicobacter pylori* DSM<sup>®</sup>10242<sup>™</sup>. Određena je antimikrobna aktivnost supernatanta kulture izolata prema *H. pylori* (slika 12). Kako bi se pretpostavio način inhibicije ispitana je mogućnost rasta *H. pylori* u prisutnosti netretiranog, neutraliziranog i termički obrađenog supernatanta. Najmanja sposobnost rasta *H. pylori* bila je u prisutnosti netretiranog, kiselog supernatanta kod svih izolata. Uočene su značajne razlike u sposobnosti inhibicije među izolatima te su izolati A8 i B2 najviše inhibirali rast patogene bakterije. Nakon neutralizacije, sposobnost rasta *H. pylori* značajno se povećala kod svih izolata, no izolati A8 i B2 zadržali su oko 30 % inhibicije patogena. Termička obrada je samo kod izolata A8 i B2 statistički značajno smanjila sposobnost inhibicije te je rast *H. pylori* iznosio oko 80 % kontrolnog rasta. Kod izolata A4 i B12 nakon neutralizacije gotovo je izgubljena mogućnost inhibicije te je ostala nepromijenjena i nakon termičke obrade. Iz rezultata se može zaključiti kako je osnovni mehanizam inhibicije uzrokovan sniženjem pH uslijed proizvodnje organskih kiselina, no kod određenih sojeva postoje naznake kako su uz navedeno potencijalno prisutni i drugi mehanizmi djelovanja. Prijašnja istraživanja o utjecaju bakterija roda *Lactobacillus* na *H. pylori* također potvrđuju kako sniženje pH proizvodnjom mliječne kiseline čini većinski udio antimikrobne aktivnosti (Bhatia i sur., 1989; Aiba i sur., 1998), no novije studije ukazuju kako postoje i dodatni

mehanizmi djelovanja kao što su autolizini (Lorca i sur., 2001). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s Boyanova i sur. (2009) gdje je također zadržan dio inhibitorne aktivnosti te su inhibitorna svojstva specifična za pojedini soj. Iz rezultata ovog istraživanja može se potvrditi kako bi u inhibiciju mogle biti uključene proteinske molekule obzirom da se nakon termičke obrade značajno gubi inhibitorna aktivnost.

Osim antimikrobne aktivnosti, određena je sposobnost koagregacije izolata s *H. pylori* (slika 13). Svi izolati pokazali su visok stupanj koagregacije te vremensku ovisnost navedenog procesa. Izolati A8 i B2 pokazali su najviši stupanj koagregacije koja je u 24. satu iznosila preko 60 % za oba izolata. Rezultati koagregacije prate najviše razine antimikrobne aktivnosti istih izolata te se na osnovu rezultata može pretpostaviti kako međusobne interakcije izolata A8 i B2 s *H. pylori* sudjeluju u ukupnom antagonističkom djelovanju. Koagregacija bakterija roda *Lactobacillus* s *H. pylori* smatra se rijetkim specifičnim svojstvom, neovisna je o prisutnosti šećera i pH vrijednosti okoline te je ovisna o površinskim svojstvima laktobacila (Holz i sur., 2015). Istraživanje Chen i sur. (2010) pokazuje kako je sposobnost koagregacije bakterija roda *Lactobacillus* s *H. pylori* nakon 24 sata inkubacije u intervalu od 48 % do 60 % što je usporedivo s rezultatima ovog istraživanja. Smatra se kako stupanj koagregacije ima važnu ulogu u uklanjanju patogena iz gastrointestinalnog sustava (Todorov i sur., 2008) i može se koristiti za preliminarnu selekciju probiotika u suzbijanju patogena (Vlková i sur., 2008). Dostupna literatura ukazuje kako se korištenje probiotika u eliminaciji *H. pylori* bazira na nekoliko mogućih mehanizama: proizvodnja antimikrobnih molekula što uključuje organske kiseline i moguće proteinske molekule, kompeticija za adheziju, indukcija gena za sekreciju mukusa te mogući imunološki mehanizmi koji uključuju regulaciju upalnih odgovora domaćina (Lesbros-Pantoflickova i sur., 2007). Obzirom na rezultate ovog istraživanja i literaturno dostupne podatke može se smatrati kako izolati A8 i B2, izolirani iz stolice dojenčeta, pokazuju najveći probiotički potencijal upotrebe u redukciji *H. pylori* koji ostvaruju antimikrobnom aktivnošću i visokim stupnjem koagregacije s navedenim patogenom.

#### **5.4. Probiotička karakterizacija sojeva s protuupalnom aktivnošću**

Probiotički sojevi koji u dovoljnom broju prežive stresne uvjete probavnog sustava i uspješno koloniziraju crijevni epitel, osim direktnih interakcija s potencijalnim patogenim mikroorganizmima, u kontaktu su s imunostimulirajućim sustavom domaćina. Interakcije probiotika i imunostimulirajućeg sustava su kompleksne te su osnovni mehanizmi nedovoljno istraženi. Pojedina istraživanja upućuju kako probiotičke bakterije imaju potencijalnu protuupalnu primjenu (Isolauri i sur., 2002; O'Sullivan i sur., 2005; Lorea Baroja i sur., 2007). Istraživanja su

pokazala kako bakterija *Lb. reuteri* proizvodi molekule koje moduliraju proizvodnju TNF- $\alpha$  u uvjetima inducirane upale (Liu i sur., 2010).

Obzirom na dobivene rezultate i indikacije prethodnih istraživanja o protuupalnim svojstvima mlijeka magarice i kobile (Kushugulova i sur., 2018; Yvon i sur., 2018; Li i sur., 2021) odabrani su izolati M2 i KO9 te su se istražila njihova protuupalna svojstva. Eksperimenti su provedeni temeljem hipoteze kako je barem dio dokazanih i tradicionalno poznatih zdravstveno korisnih učinaka mlijeka magarice i kobile povezan sa prirodno prisutnim probiotičkim bakterijama. Određeni korisni učinci već su prethodno navedeni i potvrđeni rezultatima ovog rada, te su još dodatno ispitana moguća protuupalna svojstva.

Ispitana je sposobnost proizvodnje malih metabolita, veličine do 2000 Da, koji mogu proći crijevni epitel i doći u kontakt s imunostanicama (Ménard i sur., 2004). Navedeni metaboliti izolata M2 i KO9 stavljeni su u okruženje ljudskih mononuklearnih stanica kojima je inducirana upala LPS-om *E. coli* te je određena razina proupalnog citokina TNF- $\alpha$  (slika 14). Oba izolata značajno su suprimirala proizvodnju TNF- $\alpha$  te time ostvarili protuupalni učinak. Izolat M2 pokazao je najveći protuupalni potencijal suprimirajući lučenje TNF- $\alpha$  za više od 65 %. Rezultati su u skladu s Ménard i sur. (2004) gdje su također bakterije mliječne kiseline inhibirale proizvodnju TNF- $\alpha$  u uvjetima inducirane upale, statistički značajnije nego komenzalne bakterije. Prethodna istraživanja ukazuju kako navedena supresija proupalnih citokina nije ograničena samo na TNF- $\alpha$  nego uključuje i interleukine. Upravo prema De Marco i sur. (2018) jedan od mehanizama imunomodulacijskog djelovanja je direktni kontakt metabolita sa stanicama epitela i makrofagima. Iako je veliki broj istraživanja usmjeren na kontakt samih probiotičkih stanica i epitela, postoje studije koje ukazuju na protuupalna svojstva samih metabolita. Primjerice, prema istraživanju Maghsood i sur. (2018) supernatant laktobacila modulira imunosti odgovor u stanju upale preko modulacije ekspresije gena uključenih u upalne procese.

Kako bi se detaljnije ispitaio sastav frakcija metabolita provedena je metabolomička analiza te su statističkom obradom detektirani metaboliti čija je koncentracija značajno veća u frakcijama koje su pokazale protuupalnu aktivnost naspram neaktivne kontrole. Analiza glavnih komponenti (engl. principal component analysis, PCA) potvrdila je kako značajno odvajanje metaboličkih produkata aktivnog uzorka i kontrole (slika 15). Heatmap analiza (slika 16) i metoda najmanjih parcijalnih kvadrata (slika 17) odvojile su statistički značajne metabolite. Identificirani metaboliti prikazani su u tablici 23.



Iz tablice 23 je vidljivo kako navedeni metaboliti pripadaju različitim metaboličkim putevima. Navedeni se metaboliti mogu grupirati u četiri okvirna segmenta: vezani uz metabolizam i pregrađivanje aminokiselina ( $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metil-butirat, formil-L-metionin, 2-metil-3-hidroksibutirat, N-acetilleucin, glutamat, indol-3-laktat), metabolizam polifenola (p-hidroksi-fenil laktat, 4-vinilfenol), metabolizam karnitina (acetilkarnitin) i metabolizam mliječne kiseline (DL-laktat). Iako je glutamat sastavni dio RPMI 1640 medija, značajno je viša koncentracija pronađena u aktivnom uzorku u kojem je bila prisutna metabolička aktivnost bakterija. Navedeno sugerira kako je potencijalno došlo do sineze glutamina pomoću izolata. Prisutnost *gdh* gena odgovornog za sintezu glutamata već je ranije dokazana kod bakterija mliječne kiseline te je prekursor drugih aminokiselina no i biološki aktivnih molekula kao što su  $\gamma$ -aminobutirična kiselina i glutation. Ranija istraživanja su pokazala kako hidroksibutiratni spojevi imaju protuupalni učinak te je u *in vitro* uvjetima djelovanjem  $\beta$ -hidroksibutirata smanjena razina mRNA proupalnih citokina, uključujući i TNF- $\alpha$  (Kim i sur., 2019). Bakterije roda *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Streptococcus* i ranije su pokazale sposobnost proizvodnje i akumulacije hidroksibutirata (Yüksekda i sur., 2003). Indol-3-laktat je protuupalna molekula proizvedena od triptofana koju proizvodi *Bifidobacterium infantis* ATCC®15697™ (Meng i sur., 2020). Nastanak p-hidroksi-fenil laktata u domaćinu detektiran je kod rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* te se smatra kako je jedan od mogućih načina nastajanja preko metabolizma razgradnje fenolnih spojeva i preko intermedijera 3,4 – dihidroksifenil acetata (Beloborodov i sur., 2009). U istraživanju je pokazano kako su bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* *in vitro* proizvele znatne količine hidroksifenillaktata te kako navedeni spoj smanjuje proizvodnju reaktivnih kisikovih radikala u mitohondrijima i neutrofilima (Fedotcheva i sur., 2012). *Lb. reuteri* jer pokazao sposobnost pozitivne regulacije proizvodnje acetil karnitina kod miševa (Yuying Liu i sur., 2019). U istraživanju je dokazana protuupalna i antioksidativna aktivnost acetil-karnitina i utvrđeno je kako se navedeni učinci ispoljavaju preko inhibicije ekspresije gena za upalne faktore i oksidativni stres tj. smanjenjem razine mRNA i proteina za CRP, TNF- $\alpha$ , i IL-1 $\beta$  (Wang i sur., 2020). Laktat je i u ranijim istraživanjima prepoznat kao potencijalna efektorska molekula u prijenosu upalnih procesa. Laktat ima ulogu u modulaciji nekoliko signalnih puteva i transkripcijskih faktora te dostupni dokazi upućuju kako laktat sudjeluje u stimulaciji različitih proton-osjetljivih receptora te je uključen u modulaciju imunskih odgovora i onemogućava provođenje određenih signalnih kaskada upalnih procesa (Monosalva i sur., 2021). Mehanizmi ispoljavanja protuupalnih učinaka su kompleksni i najčešće uključuju više od jednog faktora, stoga su potrebna daljnja

istraživanja kako bi se za svaki od relevantnih metabolita istražio mehanizam djelovanja i interakcija s mononuklearnim stanicama u upali.

Nakon analize bakterijskih metabolita, pri istoj indukciji upale provedena je ekspresijska analiza tretiranih mononuklearnih stanica. Kako je najveću sposobnost redukcije TNF- $\alpha$  u prošlom eksperimentu pokazao izolat M2, provedena je analiza stanica nakon tretmana metaboličkim frakcijama navedenog izolata. Primarno je analiziran broj detektiranih eksprimiranih gena po kategorijama bioloških procesa zadanih u mrežnom sustavu *Panther* (tablica 24). U uvjetima inducirane upale najveća razlika u broju eksprimiranih gena bila je u procesima biološke regulacije, staničnih procesa, metaboličkih procesa te odgovora na stimulus. U uvjetima upale u prisutnosti metabolita izolata M2 dogodile su se promjene u broju eksprimiranih gena kod većine bioloških procesa. Kako bi se iz dobivenih podataka pronašli najznačajniji geni za upalni proces, provedeno je funkcionalno klasteriranje uzoraka u upali pomoću mrežnog sustava *David*. U anotacijskom klasteru detektiran je metabolički proces vezan za upalu s *E. coli* što je potvrda upale inducirane LPS-om u uzorcima u eksperimentu. U kontrolnom uzorku niti u prisutnosti metabolita izolata M2, ovaj put infekcije nije detektiran. Detektirani upalni geni kodiraju za beta podjedinicu integrina, tubulin alfa 1a, tubulin alfa 4a, tubulin alfa 1c i aktin beta. Integrini spadaju u porodicu ubikvitiranih heterodimernih receptora te imaju ključnu ulogu u staničnoj proliferaciji, infekciji, upali i oporavku tkiva (Mezu-Ndubuisi i Maheshwari, 2021). Beta integrini mogu inducirati unutarstanične signalne puteve neutrofila i makrofaga te posljedično stimulirati proizvodnju i otpuštanje citokina direktno ili preko toll-like receptora (Wolf i sur., 2018). Remodeliranje aktinskog citoskeleta sudjeluje u mehanizmu odgovora na disrupciju epitelne barijere u upanim procesima mukoznog tkiva (Lechuga i Ivanov, 2021). U upalnom procesu izazvanim *C. difficile* dokazano je kako toksin A može uzrokovati deacetilaciju tubulina što dovodi do depolimerizacije i narušavanja funkcije epitelnih stanica (Nam i sur., 2010). Povećana razina tubulina u skladu je s istraživanjem gdje je dokazano kako vezanje LPS-a inducira agregaciju tubulina te postoje određeni dokazi kako tubulin ima ulogu u LPS induciranoj aktivaciji stanica no mehanizmi i način vezanja još nisu dovoljno istraženi (Dziarski i sur., 2000). Rezultati ovog istraživanja utvrdili su najvažnije upalne procese u tretiranim stanicama te su ti procesi utišani u uzorcima s bakterijskim metabolitima. Buduća istraživanja trebaju se usredotočiti na mehanizam onemogućavanja prijenosa upalnog signala koji je u uvjetima eksperimenta detektiran.

## 5.5. Probiotička karakterizacija sojeva s antioksidativnom aktivnošću

S ciljem pronalaska izolata s najvećim antioksidativnim potencijalom, provedeno je preliminarno ispitivanje ukupne antioksidativne aktivnosti kao sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala. Izolat S1 iz fermentirane sirutke pokazao je najveći potencijal antioksidativnog djelovanja (slika 18). Mliječni proizvodi, fermentirani s pomoću probiotičkih bakterija i ranije su pokazali antioksidativni potencijal (Osuntoki i Korie, 2010). Također, fermentacija pomoću bakterija roda *Lactobacillus* može pojačati antioksidativna svojstva i smanjiti oštećenje DNA (Xiao i sur., 2015).

Osim detekcije potencijala, u ovom je istraživanju ispitan utjecaj uvjeta uzgoja za ispoljavanje antioksidativne aktivnosti. Ispitana je sposobnost rasta i provođenja fermentacije u aerobnim, anaerobnim i respiratornim uvjetima (slika 19). Izolat je tolerantan na kisik i sposoban provoditi respiraciju te im je najveći rast zabilježen u aerobnim uvjetima. Slično je ranije zapaženo kod sojeva izoliranih iz stolice dojenčeta (Maresca i sur., 2018). Literatura navodi rast u aerobnim uvjetima može izazvati oštećenja stanica, ali u nekih sojeva to može potaknuti otpornost na oksidativni stres (Amaretti i sur., 2013). Kako bi se navedeno svojstvo ispitalo za izolat S1, stanice su izložene uzgoju u uvjetima oksidativnog stresa (slika 20). Vodikov peroksid i menadiona dokazani su uzročnici oksidativnog stresa na bakterijske stanice (Arcanjo i sur., 2019; Ianniello i sur., 2015). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako izolat S1 pokazuje najveću otpornost na oksidativni stres u uvjetima aerobnog rasta. Pri koncentraciji vodikova peroksida od 5 mM uočen je pad broja stanica za otprilike 50 % dok je pri višim koncentracijama značajno slabiji rast te je iznad 20 mM rast manji od 10 % naspram kontrole. Pri izlaganju različitim koncentracijama menadiona, pad manji od 10 % uočen je kod koncentracija od 20 do 40 mM. Rezultati su u skladu s Maresca i sur. (2018) gdje je utvrđena maksimalna koncentracija pri kojoj je detektirano preživljenje bakterija mliječne kiseline te je iznosila 20 mM za vodikov peroksid i 10 mM za menadion u aerobnim uvjetima.

Kako bi se utvrdila ovisnost uvjeta uzgoja i sposobnost vezanja radikala inaktiviranih stanica, ponovno je ispitana sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala za sve navedene uvjete rasta i za termički inaktivirane stanice. Odabrana su tri načina zagrijavanja kako bi se ispitalo koji način povećava potencijal uklanjanja radikala (tablica 25). Izolat S1 uzgojen u aerobnim uvjetima pokazao je značajno najveću sposobnost uklanjanja slobodnih radikala (68 %). Druga najviša vrijednost primjećena je kod termički inaktiviranih stanica na 100°C tijekom 10 minuta obrade (59 %). Probiotička antioksidativna svojstva termički inaktiviranih stanica roda *Lactobacillus* primjećena su i ranije u istraživanju Jang i sur. (2018). Obzirom da se radi

o mrtvim stanicama, vezanje slobodnih radikala direktno je povezano sa staničnom površinom. Istraživanje Li i sur. (2012) pokazalo je kako uklanjanje površinskih proteina značajno smanjuje sposobnost uklanjanja slobodnih radikala. Može se zaključiti kako je antioksidativna aktivnost specifična za pojedini soj, te da način inaktivacije utječe na razinu antioksidativne aktivnosti. Navedeno je dokazano u istraživanju Song i sur. (2020) gdje su inaktivirane stanice (85 °C, 30 min) uklonile značajno manje DPPH radikala nego vijabilne stanice, a suprotno tome, u istraživanju Ramalho i sur. (2019) inaktivirane stanice su uklonile više radikala, no inaktivacija je bila pri višoj temperaturi od 95 °C kroz 30 min što je temperatura bliža korištenoj u ovom istraživanju.

Obzirom da promjene na površini stanice utječu na antioksidativnu sposobnost, ispitan je utjecaj prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog sustava na antioksidativni kapacitet (slika 21). Nakon aerobnog uzgoja i izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava primjećen je pad antioksidativne aktivnosti i broja stanica. Prolaskom kroz stresne uvjete pad antioksidativne aktivnosti prati pad broja stanica što je i očekivano jer je ukupna aktivnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala direktno vezana uz broj stanica (Li i sur., 2012).

Daljnja analiza obuhvatila je izolaciju metabolita manjih od 2000 Daltona te ispitivanje citotoksičnosti na ljudske stanice, također, ispitana je genotoksičnost bakterijskih metabolita na stanice ljudske krvi. Ovaj stanični model odabran je zbog svoje relativno lake dostupnosti, stabilnog genoma, sinkroniziranoj fazi staničnog ciklusa te dobroj ekstrapolaciji rezultata za druga tkiva. Metaboliti izolata S1 nisu pokazali citotoksičan učinak na stanice ljudske krvi (Slika 22A) niti je zapažena genotoksičnost metabolita naspram kontrole (slika 22B).

Mononuklearnim stanicama izoliranim iz ljudske krvi izazvani su uvjeti oksidativnog stresa indukcijom pomoću vodikovog peroksida te je mjerena genotoksičnost u prisutnosti metabolita, toplinski inaktiviranih stanica te kombinacijom inaktiviranih stanica i metabolita (slika 30C). Oštećenja DNA vidljiva su kao povećanje intenziteta repa kometa. Uočena oštećenja posljedica su jednolančanih i dvolančanih lomova u DNA, lomovi povezani s nepotpunim ekscizijskim popravkom, unakrsna povezivanja u DNA i mjesta osjetljiva na lužine (Tice i sur., 2000). Prema rezultatima ovog istraživanja oksidativno oštećenje je vidljivo u induciranom uzorku te kako je značajno smanjeno oštećenje DNA u prisutnosti metabolita izolata S1 i inaktiviranih stanica. Izrazit potencijal uočen je analizom učinka kombinacije inaktiviranih stanica i metabolita, jer je ustanovljeno značajno smanjenje oštećenja nego upotrebom zasebnih komponenti. Mogući mehanizam spomenutog djelovanja potencijalno uključuje simultano vezanje reaktivnih kisikovih radikala (Nataraj i sur., 2020) i indukciju gena za popravak DNA. Značaj ovakvih

rezultatata je u mogućoj primjeni inaktiviranih paraprobiotika koji su otporniji na procesne parametre (de Almada i sur., 2016).

Dodatno je ispitana protuupalna aktivnost metabolita S1 u indukciji upale LPS-om (slika 23). Metaboliti su značajno inhibirali proizvodnju TNF- $\alpha$  te su time rezultati slični onima već objašnjenima za izolat M2. Prema rezultatima se može zaključiti kako izolat S1 izoliran iz sirutke ima značajan potencijal primjene kao paraprobiotik te u kombinaciji inaktiviranih stanica i metabolita može se primjenjivati za obranu od nastalog oksidativnog i upalnog stresa u crijevima.

### **5.6. Višeslojna mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva**

Obzirom na rezultate istraživanja, najpotentniji izolati (M1, M2, KO4, A8, B2 i S1) uspješno su inkapsulirani u alginatni i kitozanski nosač. Površina kapsula obložena je biomasom izolata M1 i KO4 kako bi se osiguralo njihovo brzo otpuštanje u ustima jer su pokazali potencijal primjene u zaštiti zuba i pridruženih tkiva. Ispod sloja biomase navedenih sojeva, nalazi se kitozanski omotač u kojemu su sadržani izolati A8 i B2 koji su pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost prema *H. pylori*. Iako postoje indikacije da kitozan ne pruža mehaničku zaštitu od uvjeta gastrointestinalnog sustava (Suvarna i sur., 2018), računajući na svojstvo otapanja u kiselom mediju (Pardo-Castaño i Bolaños, 2019) u ovom je istraživanju odabran kao nosač izolata čije je otpuštanje u kiselom mediju želuca potrebno kako bi se ispoljili dokazani učinci u inhibiciji *H. pylori*. Naposljetku, u trećem dijelu mikroinkapsulata nalazi se alginatna jezgra u kojoj su imobilizirani izolati M2 i S1 kako bi se ciljanim otpuštanjem u crijevima ispoljili protuupalni i antioksidativni učinci. Pripremljene mikrokapsule prikazane su na slici 24.

Kako bi se utvrdilo otpuštanje željenih izolata u ciljanom dijelu gastrointestinalnog sustava, pripremljene su testne mikrokapsule koje su sadržavale sve spomenute slojeve matriksa, ali su za svaki tip sadržavale izolate u jednom sloju, dok su druga dva bila prazna kako bi se preciznije izmjerilo otpuštanje iz svakog sloja. Broj otpuštenih stanica iz 1,30 g mikrokapsula (što odgovara jednoj dozi) u svakom dijelu simuliranog gastrointestinalnog sustava prikazan je na slici 25. U prva dva odjeljka broj stanica veći je od  $10^6$  stoga je zadovoljen preduvjet za probiotičke preparate jer se generalno smatra kako broj stanica  $> 10^6$  omogućuje ispoljavanje korisnih probiotičkih učinaka (Nualkaekul i sur., 2012). Najmanje otpuštanje zabilježeno je u simuliranom soku tankog crijeva što je u skladu s literaturom jer se alginatne kapsule razgrađuju tek u debelom crijevu te se ondje ciljano otpuštaju probiotičke bakterije

(Zhang i sur., 2021). Obzirom na rezultate može se zaključiti kako je ostvareno ciljano otpuštanje dovoljnog broja inkapsuliranih izolata u domaćinu, te su probiotičke bakterije sadržane u alginatnom sloju u većem postotku ostale u nosaču te se njihovo otpuštanje provodi u debelom crijevu gdje mogu ispoljiti dokazane korisne učinke.

Pripremljene mikrokapsule skladištene su 15 dana na različitim temperaturama (-20 °C, +4°C te na sobnoj temperaturi). Nakon vremena skladištenja, kapsule su depolimerizirane te je određen broj stanica i mikrobiološka ispravnost kapsula (tablica 26). Iz rezultata je vidljivo kako je broj bakterija mliječne kiseline zadovoljavajući na svim ispitanim temperaturama. Najveći pad detektiran je na sobnoj temperaturi no ukupan broj stanica zadovoljava probiotički kriterij. U uzorcima nije detektirana prisutnost patogenih bakterija te se postupak može smatrati mikrobiološki ispravnim.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Uspješno je izolirano 60 izolata bakterija mliječne kiseline iz uzoraka mlijeka magarice i kobile te stolice dojenčeta te su izolati koji su iskazali najveći probiotički potencijal (M1, M2, KO4, KO9, A4, A8, B2, B12, B16) nakon osnovne karakterizacije identificirani kao pripadnici roda *Lactobacillus* kojima je provedena usmjerena probiotička karakterizacija.

2. *Lactobacillus plantarum* M1 i *Lactobacillus plantarum* KO4 pokazali su značajan potencijal primjene u zaštiti zuba i pridruženih tkiva preko visokog stupnja koagregacije s patogenim bakterijama uzročnicima oboljenja zuba te antimikrobne aktivnosti i sposobnosti inhibicije biofilmova patogena.

3. Izolati A8 i B2 izolirani iz stolice dojenčeta pokazali su najbolju sposobnost u inhibiciji rasta *Helicobacter pylori* te visokim stupnjem koagregacije stoga iskazuju potencijal u zaštiti od želučanih oboljenja uzrokovanih tom patogenom bakterijom.

4. Izolati M2 i KO9 iskazali su protuupalni potencijal suprimirajući proizvodnju proupalnog citokina TNF- $\alpha$  u uvjetima inducirane upale. Kako je izolat M2, iz mlijeka magarice, pokazao veći stupanj protuupalne aktivnosti, metabolomičkom analizom je detektirano deset metabolita koji su prisutni u aktivnoj frakciji metabolita te potencijalno sudjeluju u protuupalnim mehanizmima.

5. Ekspresijskom analizom limfocita izoliranih iz ljudske krvi u uvjetima upale u prisutnosti metabolita izolata M2 ustanovljeno je da blokiraju metabolički proces infekcije s patogenom *E. coli*. Navedeno je zaključeno jer ekspresija gena koji sudjeluju u tom procesu (beta podjedinica integrina, tubulin alfa 1a, tubulin alfa 4a, tubulin alfa 1c, aktin beta), a vidljivi su u kontrolnom uzorku, nisu detektirani u prisutnosti metabolita izolata M2.

6. Izolat S1 pokazao je najveći antioksidativni potencijal te su u aerobnom uzgoju bakterijske stanice najotpornije na oksidativni stres. S1 proizvodi metabolite manje od 2000 Daltona koji u uvjetima oksidativnog stresa imaju protektivan učinak na DNA ljudskih mononuklearnih stanica. Najveći stupanj zaštite pri oksidativnom stresu zabilježen je u prisutnosti metabolita izolata S1 i termički inaktiviranih stanica. Osim antioksidativnog, izolat S1 pokazao je i protuupalni potencijal inhibirajući proizvodnju TNF- $\alpha$  u induciranoj upali.

7. Izolati koji su pokazali najveći potencijal prilikom ciljane probiotičke karakterizacije (M1, KO4, A8, B2, M2, S1) uspješno su mikroinkapsulirani u višeslojnu probiotičku kapsulu



korištenjem matriksa, alginata i kitozana. Proizvedene kapsule ciljano su otpustile izolate M1 i KO4 u simuliranim uvjetima usne šupljine, izolate A8 i B2 u simuliranom želučanom soku te izolate M2 i S1 u simuliranom soku tankog crijeva.

## **7. LITERATURA**

- Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A.M.A., Takagi, A., Koga, Y. (1998) Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *American Journal of Gastroenterology*. **93**(11), 2097–2101.
- Al-Ansari, M.M., Sahlah, S.A., AlHumaid, L., Ranjit Singh, A.J. (2021) Probiotic lactobacilli: Can be a remediating supplement for pandemic COVID-19. A review. *Journal of King Saud University - Science*. **33**(2), 101286.
- Alard, J., Peucelle, V., Boutillier, D., Breton, J., Kuylle, S., Pot, B., Holowacz, S., Grangette, C. (2018) New probiotic strains for inflammatory bowel disease management identified by combining *in vitro* and *in vivo* approaches. *Beneficial Microbes*. **9**(2), 317–331.
- Albuquerque-Souza, E., Balzarini, D., Ando-Suguimoto, E.S., Ishikawa, K.H., Simionato, M.R.L., Holzhausen, M., Mayer, M.P.A. (2019) Probiotics alter the immune response of gingival epithelial cells challenged by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontal Research*. **54**(2), 115–127.
- de Albuquerque, T.M.R., Garcia, E.F., De Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., De Souza, E.L. (2018) *In Vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **10**(4), 704–716.
- de Almada, Caroline N., Almada, Carine N., Martinez, R.C.R., Sant’Ana, A.S. (2016) Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in Food Science & Technology*. **58**, 96–114.
- Alvarenga, L.H., Prates, R.A., Yoshimura, T.M., Kato, I.T., Suzuki, L.C., Ribeiro, M.S., Ferreira, L.R., Pereira, S.A. dos S., Martinez, E.F., Saba-Chujfi, E. (2015) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. **12**(1), 131–135.
- Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., Bordoni, A. (2013) Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *In vitro* and *in vivo* activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **97**(2), 809–817.
- Ambalam, P., Kondepudi, K.K., Nilsson, I., Wadström, T., Ljungh, Å. (2012) Bile stimulates cell surface hydrophobicity, Congo red binding and biofilm formation of *Lactobacillus* strains.

*FEMS Microbiology Letters*. **333**(1), 10–19.

Anandharaj, M., Sivasankari, B. (2014) Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **118**(2), 153–159.

De Angelis, M., Gobbetti, M. (2016) *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. *Reference Module in Food Science*. 1-12.

Arcanjo, N.O., Andrade, M.J., Padilla, P., Rodríguez, A., Madruga, M.S., Estévez, M. (2019) Resveratrol protects *Lactobacillus reuteri* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and stimulates antioxidant defenses through upregulation of the dhaT gene. *Free Radical Biology and Medicine*. **135**, 38–45.

Askari, G., Aghajani, M., Salehi, M., Najafgholizadeh, A., Keshavarzpour, Z., Fadel, A., Venkatakrishnan, K., Salehi-sahlabadi, A., Hadi, A., Pourmasoumi, M. (2020) The effects of ginger supplementation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Herbal Medicine*. **22**, 102–111.

Aspri, M., Economou, N., Papademas, P. (2017) Donkey milk: An overview on functionality, technology, and future prospects. *Food Reviews International*. **33**(3), 316–333.

Attri, S., Singh, N., Nadda, A.K., Goel, G. (2021) Probiotics and their potential applications: an introduction. U: *Advances in Probiotics for Sustainable Food and Medicine* (Goel, G., Kumar, A., ured.), *Microorganisms for Sustainability* (volumen 21, Kumar Arora, N., ured.). Springer Nature, Singapur, str. 1–26.

Azad, M.A.K., Sarker, M., Li, T., Yin, J. (2018) Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed Research International*. **2018**, 9478630.

Badehnoosh, B., Karamali, M., Zarrati, M., Jamilian, M., Bahmani, F., Tajabadi-Ebrahimi, M., Jafari, P., Rahmani, E., Asemi, Z. (2018) The effects of probiotic supplementation on biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. **31**(9), 1128–1136.

Balmeh, N., Mahmoudi, S., Fard, N.A. (2021) Manipulated bio antimicrobial peptides from probiotic bacteria as proposed drugs for COVID-19 disease. *Informatics in Medicine Unlocked*. **23**, 100515.

- Bankoglu, E.E., Stipp, F., Gerber, J., Seyfried, F., Heidland, A., Bahner, U., Stopper, H. (2021) Effect of cryopreservation on DNA damage and DNA repair activity in human blood samples in the comet assay. *Archives of Toxicology*. **95**(5), 1831–1841.
- Bao, Y., Zhang, Yanchao, Zhang, Yong, Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., Zhang, H. (2010) Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*. **21**(5), 695–701.
- Baothman, O.A., Zamzami, M.A., Taher, I., Abubaker, J., Abu-Farha, M. (2016) The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids in Health and Disease*. **15**(1), 1–8.
- Barreto, Í.M.L.G., Rangel, A.H.D.N., Urbano, S.A., Bezerra, J. da S., Oliveira, C.A. de A. (2019) Equine milk and its potential use in the human diet. *Food Science and Technology*. **39**, 1–7.
- Beaussart, A., El-Kirat-Chatel, S., Sullan, R.M.A., Alsteens, D., Herman, P., Derclaye, S., Dufrière, Y.F. (2014) Quantifying the forces guiding microbial cell adhesion using single-cell force spectroscopy. *Nature Protocols*. **9**(5), 1049–1055.
- Beloborodov, N. V., Khodakova, A.S., Bairamov, I.T., Olenin, A.Y. (2009) Microbial origin of phenylcarboxylic acids in the human body. *Biochemistry (Moscow)*. **74**(12), 1350–1355.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A. (2012) Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. **61**(2), 160–174.
- Bhatia, S.J., Kochar, N., Abraham, P., Nair, N.G., Mehta, A.P. (1989) *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pylori* *in vitro*. *Journal of Clinical Microbiology*. **27**(10), 2328–2330.
- Bintsis, T. (2018) Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology and Mycology*. **6**(2), 89–94.
- Borges, S., Silva, J., Teixeira, P. (2012) Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. *Antonie van Leeuwenhoek*. **101**(3), 677–682.
- Borruel, N., Carol, M., Casellas, F., Antolín, M., De Lara, F., Espín, E., Naval, J., Guarner, F., Malagelada, J.R. (2002) Increased mucosal tumour necrosis factor  $\alpha$  production in Crohn's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. *Gut*. **51**(5), 659–664.

- Boyanova, L., Stephanova-Kondratenko, M., Mitov, I. (2009) Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains: preliminary report. *Letters in Applied Microbiology*. **48**(5), 579–584.
- Buckenhüskes, H.J. (1993) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*. **12**(1–3), 253–271.
- Bungenstock, L., Abdulmawjood, A., Reich, F. (2020) Evaluation of antibacterial properties of lactic acid bacteria from traditionally and industrially produced fermented sausages from Germany. *PLoS ONE*. **15**(3), 1–15.
- Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Durgo, K., Oršolić, N., Kukolj, M., Radović, S., Scalabrin, S., Žučko, J., Starčević, A., Šušković, J., Kos, B. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microbial Cell Factories*. **19**(1), 1–16.
- Cagetti, M.G., Mastroberardino, S., Milia, E., Cocco, F., Lingström, P., Campus, G. (2013) The use of probiotic strains in caries prevention: A systematic review. *Nutrients*. **5**(7), 2530–2550.
- Calinoiu, L.F., Ștefanescu, B.E., Pop, I.D., Muntean, L., Vodnar, D.C. (2019) Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. *Coatings*. **9**(3), 1–21.
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P. (2006) Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*. **39**(2), 203–211.
- Carminati, D., Tidona, F., Fornasari, M.E., Rossetti, L., Meucci, A., Giraffa, G. (2014) Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. *Letters in Applied Microbiology*. **59**(3), 299–305.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002) The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. **28**(4), 281–370.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F., Villarán, M. del C. (2010) Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. **142**(1–2), 185–189.
- Chen, M.J., Chen, K.N. (2007) Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products.

*Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 83–112.

Chen, X., Tian, F., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H.P., Zhang, H., Chen, W. (2010) *In vitro* screening of lactobacilli with antagonistic activity against *Helicobacter pylori* from traditionally fermented foods. *Journal of Dairy Science*. **93**(12), 5627–5634.

Chen, Y.T., Hsieh, P.S., Ho, H.H., Hsieh, S.H., Kuo, Y.W., Yang, S.F., Lin, C.W. (2020) Antibacterial activity of viable and heat-killed probiotic strains against oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. **70**(4), 310–317.

Choi, A.R., Patra, J.K., Kim, W.J., Kang, S.S. (2018) Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in Microbiology*. **9**, 1–12.

Conlon, M.A., Bird, A.R. (2015) The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. **7**(1), 17–44.

Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. (2012) Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. **162**(1), 56–67.

Cox, A.J., West, N.P., Cripps, A.W. (2015) Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. **3**(3), 207–215.

Cui, H.H., Chen, C.L., Wang, J. De, Yang, Y.J., Cun, Y., Wu, J.B., Liu, Y.H., Dan, H.L., Jian, Y.T., Chen, X.Q. (2004) Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*. **10**(10), 1521–1525.

Cui, Y., Qi, S., Zhang, W., Mao, J., Tang, R., Wang, C., Liu, J., Luo, X.M., Wang, H. (2019) *Lactobacillus reuteri* ZJ617 culture supernatant attenuates acute liver injury induced in mice by lipopolysaccharide. *Journal of Nutrition*. **149**(11), 2046–2055.

Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J.R., Faulks, R.M., John Wickham, M.S. (2011) Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion. *Food Microbiology*. **28**(7), 1359–1366.

D'Souza, A.L., Rajkumar, C., Cooke, J., Bulpitt, C.J. (2002) Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *British Medical Journal*. **324**(7350), 1361–1364.

Dai, C., Zheng, C.Q., Jiang, M., Ma, X.Y., Jiang, L.J. (2013) Probiotics and irritable bowel

syndrome. *World Journal of Gastroenterology*. **19**(36), 5973–5980.

Daliri, E.B.M., Lee, B.H. (2015) New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*. **4**(2), 56–65.

Dhar, D., Mohanty, A. (2020) Gut microbiota and Covid-19 possible link and implications. *Virus Research*. **285**, 198018.

Ding, W.K., Shah, N.P. (2009) Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*. **74**(2), M100-M107.

Dobrogosz, W.J., Peacock, T.J., Hassan, H.M. (2010) Evolution of the probiotic concept: from conception to validation and acceptance in medical science. *Advances in Applied Microbiology* **72**, 1-41.

Drago, L., Panelli, S., Bandi, C., Zuccotti, G., Perini, M., D'auria, E. (2019) What pediatricians should know before studying gut microbiota. *Journal of Clinical Medicine*. **8**, 1206.

Drago, L., Rodighiero, V., Celeste, T., Rovetto, L., de Vecchi, E. (2010) Microbiological evaluation of commercial probiotic products available in the USA in 2009. *Journal of Chemotherapy*. **22**(6), 373–377.

Dziarski, R., Rasenick, M.M., Gupta, D. (2000) Bacterial peptidoglycan binds to tubulin. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. **1524**(1), 17–26.

Engelbrektson, A., Korzenik, J.R., Pittler, A., Sanders, M.E., Klaenhammer, T.R., Leyer, G., Kitts, C.L. (2009) Probiotics to minimize the disruption of faecal microbiota in healthy subjects undergoing antibiotic therapy. *Journal of Medical Microbiology*. **58**(5), 663–670.

Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E. (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry*. **312**(2), 224–227.

Fang, H., Elina, T., Heikki, A., Seppo, S. (2000) Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **29**(1), 47–52.

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

Fedotcheva, T.A., Kruglov, A.G., Teplova, V. V., Fedotcheva, N.I., Rzheznikov, V.M., Shimanovskii, N.L. (2012) Effect of steroid hormones on production of reactive oxygen species in mitochondria. *Biophysics (Russian Federation)*. **57**(6), 792–795.



Felley, C., Michetti, P. (2003) Probiotics and *Helicobacter pylori*. *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*. **17**(5), 785–791.

Foligné, B., Daniel, C., Pot, B. (2013) Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*. **16**(3), 284–292.

Francino, M.P. (2016) Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in Microbiology*. **6**, 1–11.

Fraqueza, M.J. (2015) Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. **212**, 76–88.

Frece, J. (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

Frece, J., Cvrtila, J., Topič, I., Delaš, F., Markov, K. (2014) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as potential functional starter culture. *Food Technology and Biotechnology*. **52**(4), 489–494.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šušaković, J. (2009) Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *Journal of Dairy Research*. **76**(1), 98–104.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I.K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušaković, J. (2005) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*. **98**(2), 285–292.

Frece, J., Markov, K., Čvek, D., Kovačević, D., Krcivoj, T. (2010) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz “slavonskog kulena” kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *MESO: The first Croatian meat journal*. **XII**(4), 210–216.

Frece, J., Markov, K., Kovačević, D. (2011) Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*. **XII**(2), 92–98.

Fuller, R. (1992) History and development of probiotics. U: *Probiotics*, str. 1–8.

G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J.I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F. (2004) High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS*

*Microbiology Letters*. **230**(1), 53–61.

Gajski, G., Gerić, M., Domijan, A.M., Garaj-Vrhovac, V. (2016) Combined cyto/genotoxic activity of a selected antineoplastic drug mixture in human circulating blood cells. *Chemosphere*. **165**, 529–538.

Gao, F., Sui, L., Mu, G., Qian, F., Zhu, X. (2021) Screening of potential probiotics with anti-*Helicobacter pylori* activity from infant feces through principal component analysis. *Food Bioscience*. **42**, 101045.

Gao, Y., Li, D., Liu, S., Liu, Y. (2012) Probiotic potential of *L. sake* C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage. *European Food Research and Technology*. **234**(1), 45–51.

Gerits, E., Verstraeten, N., Michiels, J. (2017) New approaches to combat *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of Oral Microbiology*. **9**(1), 0–11.

Gheziel, C., Russo, P., Arena, M.P., Spano, G., Ouzari, H.I., Kheroua, O., Saidi, D., Fiocco, D., Kaddouri, H., Capozzi, V. (2019) Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from algerian infant feces: towards the design of probiotic starter cultures tailored for developing countries. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **11**(1), 113–123.

Govender, M., Choonara, Y.E., Kumar, P., Du Toit, L.C., Van Vuuren, S., Pillay, V. (2014) A review of the advancements in probiotic delivery: conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS PharmSciTech*. **15**(1), 29–43.

Guo, L., Li, T., Tang, Y., Yang, L., Huo, G. (2016) Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microbial Biotechnology*. **9**(6), 737–745.

Guo, S., Gillingham, T., Guo, Y., Meng, D., Zhu, W., Allen Walker, W., Ganguli, K. (2017) Secretions of *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus acidophilus* protect intestinal epithelial barrier function. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. **64**(3), 404–412.

Guzy, C., Sturm, A. (2008) Probiotics in inflammatory bowel diseases: Presentation of possible mechanisms of action. *Verdauungskrankheiten*. **26**(4), 198–204.

Halder, D., Mandal, M., Chatterjee, S.S., Pal, N.K., Mandal, S. (2017) Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicines*. **5**(2), 1–11.

- Haller, D., Bode, C., Hammes, W.P., Pfeifer, A.M.A., Schiffrin, E.J., Blum, S. (2000) Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*. **47**(1), 79–87.
- Hamilton-Miller, J.M.T. (2003) The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **22**(4), 360–366.
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., Lotfipour, F. (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*. **113**(4), 723–736.
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., Enshasy, H. El (2018) Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*. **365**(20), 1–20.
- Haukioja, A., Yli-Knuutila, H., Loimaranta, V., Kari, K., Ouwehand, A.C., Meurman, J.H., Tenovu, J. (2006) Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology*. **21**(5), 326–332.
- Her, J.Y., Kim, M.S., Lee, K.G. (2015) Preparation of probiotic powder by the spray freeze-drying method. *Journal of Food Engineering*. **150**(October), 70–74.
- Hoffmann, A., Kleniewska, P., Pawliczak, R., Sci, A.M. (2019) Antioxidative activity of probiotics. *Archives of Medical Science*. **17**(3), 792–804.
- Holz, C., Busjahn, A., Mehling, H., Arya, S., Boettner, M., Habibi, H., Lang, C. (2015) Significant reduction in *Helicobacter pylori* load in humans with non-viable *Lactobacillus reuteri* DSM17648: a pilot study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **7**(2), 91–100.
- Hori, T., Matsuda, K., Oishi, K. (2020) Probiotics: A dietary factor to modulate the gut microbiome, host immune system, and gut–brain interaction. *Microorganisms*. **8**(9), 1–24.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009a) Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*. **37**(1), 1–13.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. **4**(1), 44–57.
- Ianniello, R.G., Ricciardi, A., Parente, E., Tramutola, A., Reale, A., Zotta, T. (2015) Aeration and supplementation with heme and menaquinone affect survival to stresses and antioxidant

capability of *Lactobacillus casei* strains. *Lwt.* **60**(2), 817–824.

Iizumi, T., Battaglia, T., Ruiz, V., Perez Perez, G.I. (2017) Gut microbiome and antibiotics. *Archives of Medical Research.* **48**(8), 727–734.

Ishikawa, K.H., Mita, D., Kawamoto, D., Nicoli, J.R., Albuquerque-Souza, E., Lorenzetti Simionato, M.R., Mayer, M.P.A. (2020) Probiotics alter biofilm formation and the transcription of *Porphyromonas gingivalis* virulence-associated genes. *Journal of Oral Microbiology.* **12**(1), 1805553.

Ishimwe, N., Daliri, E.B., Lee, B.H., Fang, F., Du, G. (2015) The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics. *Molecular Nutrition and Food Research.* **59**(1), 94–105.

Isolauri, E., Kirjavainen, P. V., Salminen, S. (2002) Probiotics: A role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut.* **50**(Suppl 3), iii54-iii59.

Izano, E.A., Wang, H., Rangunath, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J.B. (2007) Detachment and killing of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilms by dispersin B and SDS. *Journal of Dental Research.* **86**(7), 618–622.

Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology.* **21**(29), 8836–8847.

Jang, H.J., Lee, N.K., Paik, H.D. (2019) Probiotic characterization of *Lactobacillus brevis* KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology.* **28**(5), 1521–1528.

Jang, H.J., Song, M.W., Lee, N.K., Paik, H.D. (2018) Antioxidant effects of live and heat-killed probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln1 isolated from kimchi. *Journal of Food Science and Technology.* **55**(8), 3174–3180.

Janković, T., Frece, J., Abram, M., Gobin, I. (2012) Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Sanitary Engineering Research.* **6**(1), 19–24.

Jastrzębska, E., Wadas, E., Daszkiewicz, T., Pietrzak-Fiećko, R. (2017) Nutritional value and health-promoting properties of mare's milk - A review. *Czech Journal of Animal Science.* **62**(12), 511–518.

- Jeong, D., Kim, D.H., Song, K.Y., Seo, K.H. (2018) Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Lactobacillus kefiranofaciens* DD2 against oral pathogens. *Journal of Oral Microbiology*. **10**(1), 1472985.
- Jeong, J.H., Lee, C.Y., Chung, D.K. (2016) Probiotic lactic acid bacteria and skin health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **56**(14), 2331–2337.
- Jones, S.E., Versalovic, J. (2009) Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*. **9**, 1–9.
- Jørgensen, M.R., Kragelund, C., Jensen, P.Ø., Keller, M.K., Twetman, S. (2017) Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species *in vitro*. *Journal of Oral Microbiology*. **9**(1), 1–8.
- Kang, H.J., Im, S.H. (2015) Probiotics as an immune modulator. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. **61**, S103–S105.
- Kathene, C., Johnson-Henry, D.J., Mitchell, B., Avitzur, Y., Galindo-Mata, E., Jones, N.L., Sherman, P.M. (2004) Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Digestive Diseases and Sciences*. **49**(8), 1095–1102.
- Kim, D.H., Park, M.H., Ha, S., Bang, E.J., Lee, Y., Lee, A.K., Lee, J., Yu, B.P., Chung, H.Y. (2019) Anti-inflammatory action of  $\beta$ -hydroxybutyrate via modulation of PGC-1 $\alpha$  and FoxO1, mimicking calorie restriction. *Aging*. **11**(4), 1283–1304.
- Kim, H.S., Jeong, S.G., Ham, J.S., Chae, H.S., Lee, J.M., Ahn, C.N. (2006) Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. **19**(9), 1335–1341.
- Kim, J., Muhammad, N., Jhun, B.H., Yoo, J.W. (2016) Probiotic delivery systems: a brief overview. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. **46**(4), 377–386.
- Kim, S.J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.J., Shin, I.S., Cha, D.S., Park, H.J. (2008) Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT - Food Science and Technology*. **41**(3), 493–500.
- Klein, G. (2011) Antibiotic resistance and molecular characterization of probiotic and clinical *Lactobacillus* strains in relation to safety aspects of probiotics. *Foodborne Pathogens and Disease*. **8**(2), 267–281.

- Koh, W.Y., Utra, U., Ahmad, R., Rather, I.A., Park, Y.H. (2018) Evaluation of probiotic potential and anti-hyperglycemic properties of a novel *Lactobacillus* strain isolated from water kefir grains. *Food Science and Biotechnology*. **27**(5), 1369–1376.
- König, H., Fröhlich, J. (2017) Lactic Acid Bacteria. U: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine* (König, H., Uden, G., Fröhlich, J., ured.), Springer Nature, Švicarska, str. 3-41.
- Korpela, K., Salonen, A., Vepsäläinen, O., Suomalainen, M., Kolmeder, C., Varjosalo, M., Miettinen, S., Kukkonen, K., Savilahti, E., Kuitunen, M., De Vos, W.M. (2018) Probiotic supplementation restores normal microbiota composition and function in antibiotic-treated and in caesarean-born infants. *Microbiome*. **6**(1), 1–11.
- Kos, B., Šuskovic, 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., Gerić, M., Gajski, G., Markov, K., Domijan, A.M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Svetec, I.K., Žunar, B., Frece, J. (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.
- Kostelac, D., Vrdoljak, M., Markov, K., Delaš, I., Jug, T., Kljusurić, J.G., Jakopović, Ž., Čanak, I., Jelić, M., Frece, J. (2020) SPME-GC-MS and multivariate analysis of sensory properties of cheese in a sack matured with probiotic starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*. **58**(2), 128–137.
- Kotzamanidis, C., Kourelis, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., Yiangou, M. (2010) Evaluation of adhesion capacity, cell surface traits and immunomodulatory activity of presumptive probiotic *Lactobacillus* strains. *International Journal of Food Microbiology*. **140**(2–3), 154–163.
- Krausova, G., Hyrslova, I., Hynstova, I. (2019) *In vitro* evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. *Fermentation*. **5**(4), 100.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H. (2008) Biofilm Formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **106**(4), 381–386.

- Kumar, A., Wu, H., Collier-Hyams, L.S., Hansen, J.M., Li, T., Yamoah, K., Pan, Z.Q., Jones, D.P., Neish, A.S. (2007) Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO Journal*. **26**(21), 4457–4466.
- Kumari, A., Angmo, K., Monika, Bhalla, T.C. (2016) Probiotic attributes of indigenous *Lactobacillus* spp. isolated from traditional fermented foods and beverages of north-western Himalayas using *in vitro* screening and principal component analysis. *Journal of Food Science and Technology*. **53**(5), 2463–2475.
- Kushugulova, A., Kozhakhmetov, S., Sattybayeva, R., Nurgozhina, A., Ziyat, A., Yadav, H., Marotta, F. (2018) Mare's milk as a prospective functional product. *Functional Foods in Health and Disease*. **8**(11), 548.
- Kwak, M.J., Kwon, S.K., Yoon, J.K., Song, J.Y., Seo, J.G., Chung, M.J., Kim, J.F. (2016) Evolutionary architecture of the infant-adapted group of *Bifidobacterium* species associated with the probiotic function. *Systematic and Applied Microbiology*. **39**(7), 429–439.
- Laleman, I., Teughels, W. (2015) Probiotics in the dental practice: a review. *Quintessence international*. **46**(3), 255–264.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. U: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackebrandt E., Goodfellow M., ured.). Wiley & Sons, SAD, str. 115–175.
- Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Sierra, S., Miguel Rodríguez, J., Boza, J., Xaus, J. (2007) Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *British Journal of Nutrition*. **98**(S1), S96–S100.
- Lechuga, S., Ivanov, A.I. (2021) Actin cytoskeleton dynamics during mucosal inflammation: a view from broken epithelial barriers. *Current Opinion in Physiology*. **19**, 10–16.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. **15**(2), 67–78.
- Lesbros-Pantoflickova, D., Corthésy-Theulaz, I., Blum, A.L. (2007) *Helicobacter pylori* and probiotics. *Journal of Nutrition*. **137**(3), 1–7.
- Li, H., Cao, Y. (2010) Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*. **39**(5), 1107–1116.
- Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z., Wang, Q. (2012)

Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*. **135**(3), 1914–1919.

Li, Y., Ma, Q., Liu, G., Wang, C. (2021) Effects of donkey milk on oxidative stress and inflammatory response. *Journal of Food Biochemistry*. e13935.

Lima, E.M.F., Quecan, B.X.V., Cuhna, L.R., Franco, B.D.G.M.F., Pinto, U.M. (2020) Cell-cell communication in lactic acid bacteria: potential mechanisms. U: *Lactic acid bacteria: a functional approach* (de Albuquerque, M.A.C., de LeBlanc, A. de M., LeBlanc, J.G., ured.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, SAD, str. 1-14.

Lin, P.W., Myers, L.E.S., Ray, L., Song, S.C., Nasr, T.R., Berardinelli, A.J., Kundu, K., Murthy, N., Hansen, J.M., Neish, A.S. (2009) *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling *in vivo* via reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine*. **47**(8), 1205–1211.

Listgarten, M.A. (1986) Pathogenesis of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. **13**(5), 418–425.

Liu, J., Cook, B., Roux, S. (2020) The challenges in commercialisation of Probiotic API manufacturing. *Microbiology Australia*. **41**(2), 82–85.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., Sun, S.C. (2017) NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. **2**, 17023.

Liu, Y., Fatheree, N.Y., Mangalat, N., Rhoads, J.M. (2010) Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. **299**(5), 1087–1096.

Lohrasbi, V., Abdi, M., Asadi, A., Rohani, M., Esghaei, M., Talebi, M., Amirmozafari, N. (2020) The effect of improved formulation of chitosan-alginate microcapsules of *Bifidobacteria* on serum lipid profiles in mice. *Microbial Pathogenesis*. **149**, 104585.

Lorca, G.L., Wadström, T., Font de Valdez, G., Ljungh, Å. (2001) *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* *in vitro*. *Current Microbiology*. **42**(1), 39–44.

Lorea Baroja, M., Kirjavainen, P. V., Hekmat, S., Reid, G. (2007) Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clinical and Experimental Immunology*. **149**(3), 470–479.



- Macedo, F., Fredua-Agyeman, M. (2016) Evaluation of Commercial Probiotic Products. *British Journal of Pharmacy*. **1**(1), 84–89.
- Maghsood, F., Mirshafiey, A., Farahani, M.M., Modarressi, M.H., Jafari, P., Motevaseli, E. (2018) Dual effects of cell free supernatants from *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* GG in regulation of MMP-9 by Up-regulating TIMP-1 and down-regulating CD147 in PMA-differentiated THP-1 cells. *Cell Journal*. **19**(4), 559–566.
- Mahasneh, S.A., Mahasneh, A.M. (2017) Probiotics: A promising role in dental health. *Dentistry Journal*. **5**(4), 1–10.
- Mahmoudi, I., Moussa, O. Ben, Khaldi, T.E.M., Kebouchi, M., Soligot, C., Le Roux, Y., Hassouna, M. (2016) Functional *in vitro* screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*. **137**, 91–98.
- Maier, L., Goemans, C. V., Wirbel, J., Kuhn, M., Eberl, C., Pruteanu, M., Müller, P., Garcia-Santamarina, S., Cacace, E., Zhang, B., Gekeler, C., Banerjee, T., Anderson, E.E., Milanese, A., Löber, U., Forslund, S.K., Patil, K.R., Zimmermann, M., Stecher, B., Zeller, G., Bork, P., Typas, A. (2021) Unravelling the collateral damage of antibiotics on gut bacteria. *Nature*. **599**(7883), 120–124.
- Manosalva, C., Quiroga, J., Hidalgo, A. I., Alarcón, P., Anseoleaga, N., Hidalgo, M. A., Burgos, R.A. (2021). Role of lactate in inflammatory processes: friend or foe. *Frontiers in Immunology*. **12**, 808799-808799.
- Maragkoudakis, P.A., Mountzouris, K.C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M.D., Tsakalidou, E. (2009) Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*. **130**(3), 219–226.
- de Marco, S., Sichetti, M., Muradyan, D., Piccioni, M., Traina, G., Pagiotti, R., Pietrella, D. (2018) Probiotic cell-free supernatants exhibited anti-inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 1756308.
- Maresca, D., Zotta, T., Mauriello, G. (2018) Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains. *Frontiers in Microbiology*. **9**, 157.

- Marques, M.R.C., Loebenberg, R., Almukainzi, M. (2011) Simulated Fluids. *Dissolution Technologies*. **18**(3), 15–28.
- Martín-Platero, A.M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. (2007) Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein ‘salting-out’ procedure. *Analytical Biochemistry*. **366**(1), 102–104.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*. **143**(6), 754–758.
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J.M. (2005) Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*. **21**(1), 8–17.
- Matsuzaki, T., Chin, J. (2000) Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunology and Cell Biology*. **78**(1), 67–73.
- McFarland, L. V., Evans, C.T., Goldstein, E.J.C. (2018) Strain-specificity and disease-specificity of probiotic efficacy: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*. **5**, 124.
- Mei, F., Xie, M., Huang, X., Long, Y., Lu, X., Wang, X., Chen, L. (2020) *Porphyromonas gingivalis* and its systemic impact: current status. *Pathogens*. **9**(11), 1–23.
- Mekonnen, S.A., Merenstein, D., Fraser, C.M., Marco, M.L. (2020) Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Current Opinion in Biotechnology*. **61**, 226–234.
- Ménard, S., Candalh, C., Bambou, J.C., Terpend, K., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M. (2004) Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut*. **53**(6), 821–828.
- Meng, D., Sommella, E., Salviati, E., Campiglia, P., Ganguli, K., Djebali, K., Zhu, W., Walker, W.A. (2020) Indole-3-lactic acid, a metabolite of tryptophan, secreted by *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* is anti-inflammatory in the immature intestine. *Pediatric Research*. **88**(2), 209–217.
- Mezu-Ndubuisi, O.J., Maheshwari, A. (2021) The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric Research*. **89**(7), 1619–1626.

- Mi, H., Ebert, D., Muruganujan, A., Mills, C., Albu, L.P., Mushayamaha, T., Thomas, P.D. (2021) PANTHER version 16: A revised family classification, tree-based classification tool, enhancer regions and extensive API. *Nucleic Acids Research*. **49**(D1), D394–D403.
- Mi, H., Thomas, P. (2009) PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. U: Protein networks and pathway analysis (Nikolsky Y., Bryant, J., ured.), U: Methods in Molecular Biology (Walker, J.M., ured.), Humana Press, New Jersey, SAD, str. 123-140.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P.H., Brassart, D., Verdu, E., Herranz, M., Felley, C., Porta, N., Rouvet, M., Blum, A.L., Corthésy-Theulaz, I. (1999) Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion*. **60**(3), 203–209.
- Midolo, P.D., Lambert, J.R., Hull, R., Luo, F., Grayson, M.L. (1995) *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *The Journal of applied bacteriology*. **79**(4), 475–479.
- Millette, M., Luquet, F.M., Ruiz, M.T., Lacroix, M. (2008) Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Science and Technology*. **88**(6), 695–705.
- Mishra, V., Prasad, D.N. (2005) Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. **103**(1), 109–115.
- Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., Prajapati, J. (2015) Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **63**(14), 3615–3626.
- Møller, P., Azqueta, A., Boutet-Robinet, E., Koppen, G., Bonassi, S., Milić, M., Gajski, G., Costa, S., Teixeira, J.P., Pereira, C.C., Dusinska, M., Godschalk, R., Brunborg, G., Gutzkow, K.B., Giovannelli, L., Cooke, M.S., Richling, E., Laffon, B., Valdiglesias, V., Basaran, N., Bo', C. Del, Zegura, B., Novak, M., Stopper, H., Vodicka, P., Vodenkova, S., Andrade, V.M. de, Sramkova, M., Gabelova, A., Collins, A., Langie, S.A.S. (2020) Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*. **15**, 3817–3826.
- Mukai, T., Asasaka, T., Sato, E., Mori, K., Matsumoto, M., Ohori, H. (2002) Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*.

*FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **32**(2), 105–110.

Murua, A., Todorov, S.D., Vieira, A.D.S., Martinez, R.C.R., Cencič, A., Franco, B.D.G.M. (2013) Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. *Journal of Applied Microbiology*. **114**(6), 1793–1809.

Naeem, M., Ilyas, M., Haider, S., Baig, S., Saleem, M. (2012) Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. *Pakistan Journal of Botany*. **44**, 323–328.

Nagpal, R., Tsuji, H., Takahashi, T., Nomoto, K., Kawashima, K., Nagata, S., Yamashiro, Y. (2017) Ontogenesis of the gut microbiota composition in healthy, full-term, vaginally born and breast-fed infants over the first 3 years of life: A quantitative bird's-eye view. *Frontiers in Microbiology*. **8**, 1–9.

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

Nam, H., Ha, M., Lee, E., Lee, Y. (2002) Effect of *Enterococcus faecalis* strain PL9003 on adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **12**(5), 746–752.

Nam, H.J., Kang, J.K., Kim, S.K., Ahn, K.J., Seok, H., Park, S.J., Chang, J.S., Pothoulakis, C., Lamont, J.T., Kim, H. (2010) *Clostridium difficile* toxin A decreases acetylation of tubulin, leading to microtubule depolymerization through activation of histone deacetylase 6, and this mediates acute inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. **285**(43), 32888–32896.

Nataraj, B.H., Ali, S.A., Behare, P. V., Yadav, H. (2020) Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*. **19**(1), 1–22.

Nikolic, M., Jovicic, B., Kojic, M., Topisirovic, L. (2010) Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *European Food Research and Technology*. **231**(6), 925–931.

Nogueira, T., David, P.H.C., Pothier, J. (2019) Antibiotics as both friends and foes of the human gut microbiome: The microbial community approach. *Drug Development Research*. **80**(1), 86–97.

- Nualkaekul, S., Deepika, G., Charalampopoulos, D. (2012) Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. *Food Research International*. **48**(2), 627–633.
- O’Sullivan, D.J. (2001) Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**(4), 1751–1760.
- O’Sullivan, G., Kelly, P., O’Halloran, S., Collins, C., Collins, J., Dunne, C., Shanahan, F. (2005) Probiotics: An Emerging Therapy. *Current Pharmaceutical Design*. **11**(1), 3–10.
- Oelschlaeger, T.A. (2010) Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology*. **300**(1), 57–62.
- Olaimat, A.N., Aolymat, I., Al-Holy, M., Ayyash, M., Abu Ghoush, M., Al-Nabulsi, A.A., Osaili, T., Apostolopoulos, V., Liu, S.Q., Shah, N.P. (2020) The potential application of probiotics and prebiotics for the prevention and treatment of COVID-19. *npj Science of Food*. **4**, 17.
- Osuntoki, A., Korie, I. (2010) Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*. **48**(4), 505–511.
- Otero, M.C., Ocaña, V.S., Elena Nader-Macías, M. (2004) Bacterial surface characteristics applied to selection of probiotic microorganisms. *Methods in molecular biology*. **268**, 435–440.
- Ouwehand, A.C., Forssten, S., Hibberd, A.A., Lyra, A., Stahl, B. (2016) Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine*. **48**(4), 246–255.
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S. (2004) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. U: *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (Salimen, S., von Wright, A., Ouwehand, A., ured.), 3. izdanje, str. 375–395.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O. (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*. **5**(7), 1556–1573.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., Zhao, Z. (2009) The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*. **20**(6), 598–602.
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., De Lima Morais, D.A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P.É., Li, S., Xia, J. (2021) MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra

and functional insights. *Nucleic Acids Research*. **49**(W1), W388–W396.

Pardo-Castaño, C., Bolaños, G. (2019) Solubility of chitosan in aqueous acetic acid and pressurized carbon dioxide-water: Experimental equilibrium and solubilization kinetics. *Journal of Supercritical Fluids*. **151**, 63–74.

Park, K.Y., Jeong, J.K., Lee, Y.E., Daily, J.W. (2014) Health benefits of kimchi (korean fermented vegetables) as a probiotic food. *Journal of Medicinal Food*. **17**(1), 6–20.

Park, S.Y., Lim, S.D. (2015) Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* FH185 isolated from human feces. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. **35**(5), 615–621.

Parlindungan, E., Lugli, G.A., Ventura, M., van Sinderen, D., Mahony, J. (2021) Lactic acid bacteria diversity and characterization of probiotic candidates in fermented meats. *Foods*. **10**(7), 1519.

Patel, A.R. (2017) Probiotic fruit and vegetable juices- recent advances and future perspective. *International Food Research Journal*. **24**(5), 1850–1857.

Petersen, F.C., Pecharki, D., Scheie, A.A. (2004) Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide. *Journal of Bacteriology*. **186**(18), 6327–6331.

Pithva, S., Shekh, S., Dave, J., Vyas, B.R.M. (2014) Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **173**(1), 259–277.

Plaza-Diaz, J., Gomez-Llorente, C., Campaña-Martin, L., Matencio, E., Ortuño, I., Martínez-Silla, R., Gomez-Gallego, C., Periago, M.J., Ros, G., Chenoll, E., Genovés, S., Casinos, B., Silva, Á., Corella, D., Portolés, O., Romero, F., Ramón, D., Perez de la Cruz, A., Gil, A., Fontana, L. (2013) Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB Study. *PLoS ONE*. **8**(10), 1–11.

Pot, B., Felis, G.E., Bruyne, K. De, Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., Vandamme, P. (2014) The genus *Lactobacillus*. U. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* (Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B., ured.), John Wiley and Sons, New Jersey, SAD, str. 249–353.

Potočnjak, M., Pušić, P., Frece, J., Abram, M., Jankovic, T., Gobin, I. (2017) Three new

*Lactobacillus plantarum* strains in the probiotic toolbox against gut pathogen *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. *Food Technology and Biotechnology*. **55**(1), 48–54.

Pundir, R.K., Rana, S., Kashyap, N., Kaur, A. (2013) Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from food samples: An *in vitro* study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **3**(3), 85–93.

Purchiaroni, F., Tortora, A., Gabrielli, M., Bertucci, F., Gigante, G., Ianiro, G., Ojetti, V., Scarpellini, E., Gasbarrini, A. (2013) The role of intestinal microbiota and the immune system. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. **17**(3), 323–333.

Quigley, E.M.M. (2017) Microbiota-brain-gut axis and neurodegenerative diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. **17**(12), 94.

Ramalho, J.B., Soares, M.B., Spiazzi, C.C., Bicca, D.F., Soares, V.M., Pereira, J.G., Da Silva, W.P., Sehn, C.P., Cibin, F.W.S. (2019) *In vitro* probiotic and antioxidant potential of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* II95 and its effect in mice behaviour. *Nutrients*. **11**(4), 901.

Ramirez, J., Guarner, F., Bustos Fernandez, L., Maruy, A., Sdepanian, V.L., Cohen, H. (2020) Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **10**, 572912.

Rastogi, S., Mittal, V., Singh, A. (2020) *In Vitro* evaluation of probiotic potential and safety assessment of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from donkey's lactation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **12**(3), 1045–1056.

Rathnayaka, R.M.U.S.K. (2013) Effect of freeze - drying on viability and probiotic properties of a mixture of probiotic bacteria. *ARPN journal of science and technology*. **3**(11), 1074–1078.

Ratsep, M. (2014) Effect of *Lactobacillus plantarum* strains on clinical isolates of *Clostridium difficile* *in vitro*. *Journal of Probiotics & Health*. **2**(1), 1000119.

Ravn, I., Dige, I., Meyer, R.L., Nyvad, B. (2012) Colonization of the oral cavity by probiotic bacteria. *Caries Research*. **46**(2), 107–112.

Reddy, K.B.P.K., Awasthi, S.P., Madhu, A.N., Prapulla, S.G. (2009) Role of cryoprotectants on the viability and functional properties of probiotic lactic acid bacteria during freeze drying. *Food Biotechnology*. **23**(3), 243–265.

Reid, G., Gadir, A.A., Dhir, R. (2019) Probiotics: Reiterating what they are and what they are

not. *Frontiers in Microbiology*. **10**, 424.

Reid, G., Kort, R., Alvarez, S., Bourdet-Sicard, R., Benoit, V., Cunningham, M., Saulnier, D.M., Van Hylckama Vlieg, J.E.T., Verstraelen, H., Sybesma, W. (2018) Expanding the reach of probiotics through social enterprises. *Beneficial Microbes*. **9**(5), 707–715.

Reid, G., Sybesma, W., Matovu, W., Onyango, A., Westerik, N., Kort, R. (2020) Empowering women through probiotic fermented food in East Africa. *Journal of Global Health*. **10**(1), 1–5.

Reuben, R.C., Roy, P.C., Sarkar, S.L., Rubayet Ul Alam, A.S.M., Jahid, I.K. (2020) Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *Journal of Dairy Science*. **103**(2), 1223–1237.

Riedel, C.U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B.J., Blum, S. (2006) Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- $\kappa$ B activation. *World Journal of Gastroenterology*. **12**(23), 3729–3735.

Rokana, N., Singh, B.P., Thakur, N., Sharma, C., Gulhane, R.D., Panwar, H. (2018) Screening of cell surface properties of potential probiotic lactobacilli isolated from human milk. *Journal of Dairy Research*. **85**(3), 347–354.

Rönnqvist, D., Forsgren-Brusk, U., Husmark, U., Grahn-Håkansson, E. (2007) *Lactobacillus fermentum* Ess-1 with unique growth inhibition of vulvo-vaginal candidiasis pathogens. *Journal of medical microbiology*. **56**(11), 1500–1504.

Rouèche, E., Serris, E., Thomas, G., Périer-Camby, L. (2006) Influence of temperature on the compaction of an organic powder and the mechanical strength of tablets. *Powder Technology*. **162**(2), 138–144.

Ruggiero, P. (2014) Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. **5**(4), 384.

Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E. V., Wong, S.Y.W., Chan, H.K. (2011) Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. *International Food Research Journal*. **18**(4), 1515–1522.

Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M., García, A. (2016) Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*. **4**(3), 35.

Salimei, E., Fantuz, F. (2012) Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal*.



24(2), 130–142.

Samot, J., Belkhelda, H., Haddioui, L., Badet, C. (2017) Probiotic properties of lactobacilli that could be used against periodontitis. *Journal of Probiotics & Health*. **5**(3), 1000180.

Sanap, D., Garje, M., Godge, G. (2019) Probiotics, their health benefits and applications for development of human health: a review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. **9**(4-s), 631–640.

Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., Margolles, A. (2017) Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*. **61**(1), 1–15.

Sang-Ngoen, T., Czumbel, L.M., Sadaeng, W., Mikó, A., Németh, D.I., Mátrai, P., Hegyi, P., Tóth, B., Csupor, D., Kiss, I., Szabó, A., Gerber, G., Varga, G., Kerémi, B. (2021) Orally administered probiotics decrease *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* but not other periodontal pathogenic bacteria counts in the oral cavity: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*. **12**, 682656.

Sathyabama, S., Vijayabharathi, R., Bruntha devi, P., Ranjith kumar, M., Priyadarisini, V.B. (2012) Screening for probiotic properties of strains isolated from feces of various human groups. *Journal of Microbiology*. **50**(4), 603–612.

Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bolton, E., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., Federhen, S., Feolo, M., Fingerman, I.M., Geer, L.Y., Helmberg, W., Kapustin, Y., Landsman, D., Lipman, D.J., Lu, Z., Madden, T.L., Madej, T., Maglott, D.R., Marchler-Bauer, A., Miller, V., Mizrachi, I., Ostell, J., Panchenko, A., Phan, L., Pruitt, K.D., Schuler, G.D., Sequeira, E., Sherry, S.T., Shumway, M., Sirotkin, K., Slotta, D., Souvorov, A., Starchenko, G., Tatusova, T.A., Wagner, L., Wang, Y., Wilbur, W.J., Yaschenko, E., Ye, J. (2011) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*. **39**(s1), D38–D51.

Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H. (2013) The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological Research*. **69**(1), 52–60.

Shao, Y., Zhang, W., Guo, H., Pan, L., Zhang, H., Sun, T. (2015) Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*. **50**, 250–258.

- Sharma, P., Tomar, S.K., Goswami, P., Sangwan, V., Singh, R. (2014) Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*. **57**, 176–195.
- Shi, T., Nishiyama, K., Nakamata, K., Aryantini, N.P.D., Mikumo, D., Oda, Y., Yamamoto, Y., Mukai, T., Sujaya, I.N., Urashima, T., Fukuda, K. (2012) Isolation of potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains from traditional fermented mare milk produced in Sumbawa Island of Indonesia. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **76**(10), 1897–1903.
- Shibolet, O., Podolsky, D.K. (2007) TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. **292**(6), 1469–1473.
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Faseleh Jahromi, M., Ho, Y.W. (2014) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*. **2014**, 927268.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. **175**(1), 184–191.
- Sjögren, Y.M., Jenmalm, M.C., Böttcher, M.F., Björkstén, B., Sverremark-Ekström, E. (2009) Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clinical and Experimental Allergy*. **39**(4), 518–526.
- Snel, J., Marco, M.L., Kingma, F., Noordman, W.M., Rademaker, J., Kleerebezem, M. (2011) Competitive selection of lactic acid bacteria that persist in the human oral cavity. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(23), 8445–8450.
- Soa, S.S.Y., Wana, M.L.Y., El-Nezami, H. (2017) Probiotics-mediated suppression of cancer. *Current Opinion in Oncology*. **29**(1), 62–72.
- Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P. de S., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., Yamaguishi, C.T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., Thomaz-Soccol, V. (2010) The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*. **48**(4), 413–434.
- Sommer, F., Bäckhed, F. (2013) The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. **11**(4), 227–238.
- Son, S., Lewis, B.A. (2002) Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food*

*Chemistry*. **50**(3), 468–472.

Son, S.H., Jeon, H.L., Jeon, E.B., Lee, N.K., Park, Y.S., Kang, D.K., Paik, H.D. (2017) Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of  $\beta$ -galactosidase and antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology*. **85**, 181–186.

Song, M.W., Chung, Y., Kim, K.T., Hong, W.S., Chang, H.J., Paik, H.D. (2020) Probiotic characteristics of *Lactobacillus brevis* B13-2 isolated from kimchi and investigation of antioxidant and immune-modulating abilities of its heat-killed cells. *Lwt*. **128**, 109452.

Songisepp, E., Kals, J., Kullisaar, T., Mändar, R., Hütt, P., Zilmer, M., Mikelsaar, M. (2005) Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. *Nutrition Journal*. **4**, 22.

Sopha, B., Piwat, S., Teanpaisan, R. (2020) Adhesion, anti-adhesion and aggregation properties relating to surface charges of selected *Lactobacillus* strains: study in Caco-2 and H357 cells. *Archives of Microbiology*. **202**(6), 1349–1357.

Stašková, A., Sendorová, M., Nemcová, R., Kačírová, J., Mad'ar, M. (2021) Antimicrobial and antibiofilm activity of the probiotic strain *Streptococcus salivarius* K12 against oral potential pathogens. *Antibiotics*. **10**(7), 793.

Sun, L., Zhang, X., Zhang, Y., Zheng, K., Xiang, Q., Chen, N., Chen, Z., Zhang, N., Zhu, J., He, Q. (2019) Antibiotic-induced disruption of gut microbiota alters local metabolomes and immune responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **9**, 99.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K., Matoć, S. (2010) Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. **48**(3), 296–307.

Suvarna, S., Dsouza, J., Ragavan, M.L., Das, N. (2018) Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. *Food Science and Biotechnology*. **27**(3), 745–753.

Swain, M.R., Anandharaj, M., Ray, R.C., Parveen Rani, R. (2014) Fermented fruits and vegetables of asia: a potential source of probiotics. *Biotechnology Research International*. 250424.

Takanashi, N., Tomosada, Y., Villena, J., Murata, K., Takahashi, T., Chiba, E., Tohno, M., Shimazu, T., Aso, H., Suda, Y., Ikegami, S., Itoh, H., Kawai, Y., Saito, T., Alvarez, S.,

- Kitazawa, H. (2013) Advanced application of bovine intestinal epithelial cell line for evaluating regulatory effect of lactobacilli against heat-killed enterotoxigenic *Escherichia coli*-mediated inflammation. *BMC Microbiology*. **13**, 54.
- Tambekar, D.H., Bhutada, S.A., Choudhary, S.D., Khond, M.D. (2009) Assessment of potential probiotic bacteria isolated from milk of domestic animals. *Journal of Applied Biosciences(JABs)*. **15**, 815–819.
- Tang, C., Lu, Z. (2019) Health promoting activities of probiotics. *Journal of Food Biochemistry*. **43**(8), 1–16.
- Tang, W., Xing, Z., Li, C., Wang, J., Wang, Y. (2017) Molecular mechanisms and in vitro antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. *Food Chemistry*. **221**, 1642–1649.
- Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J.P. (2013) *In vitro* characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology*. **62**(4), 637–649.
- Tarrach, A., da Silva Duarte, V., de Castilhos, J., Pakroo, S., Lemos Junior, W.J.F., Luchese, R.H., Fioravante Guerra, A., Rossi, R.C., Righetto Ziegler, D., Corich, V., Giacomini, A. (2019) Probiotic potential and biofilm inhibitory activity of *Lactobacillus casei* group strains isolated from infant feces. *Journal of Functional Foods*. **54**, 489–497.
- Terraf, M.C.L., Juárez Tomás, M.S., Nader-Macías, M.E.F., Silva, C. (2012) Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology*. **113**(6), 1517–1529.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*. **35**(3), 206–221.
- Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzapfel, W.H., Dicks, L.M.T. (2008) Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. **104**(2), 465–477.
- Toole, G.O., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. **54**, 49–79.

Torriani, S., Felis, G.E., Dellaglio, F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**(8), 3450–3454.

Twetman, L., Larsen, U., Fiehn, N.E., Steckésn-Blicks, C., Twetman, S. (2009) Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: an *in vitro* study. *Acta Odontologica Scandinavica*. **67**(5), 284–288.

Uroić, K., Novak, J., Hynönen, U., Pietilä, T.E., 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 Science and Technology*. **69**, 623–632.

Vijayakumar, M., Ilavenil, S., Kim, D.H., Arasu, M.V., Priya, K., Choi, K.C. (2015) *In-vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 isolated from Italian rye-grass (*Lolium multiflorum*) forage. *Anaerobe*. **32**, 90–97.

Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H. (2007) Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. **102**(1), 106–115.

Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C.G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M., Di Cagno, R. (2012) Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiology*. **31**(1), 116–125.

Vizoso Pinto, M.G., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (2006) *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*. **109**(3), 205–214.

Vlková, E., Rada, V., Šmehilová, M., Killer, J. (2008) Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica*. **53**(3), 263–269.

de Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010) Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. **20**(4), 292–302.

Wagner, K.W., Schön, R., Schumacher, M., Schmelzeisen, R., Schulze, D. (2006) Case report: brain and liver abscesses caused by oral infection with *Streptococcus intermedius*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. **102**(4), 2005–

2007.

Wang, C.Y., Lin, P.R., Ng, C.C., Shyu, Y.T. (2010) Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*. **16**(6), 578–585.

Wang, H., Lee, I.S., Braun, C., Enck, P. (2016) Effect of probiotics on central nervous system functions in animals and humans: A systematic review. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*. **22**(4), 589–605.

Wang, J., Zhang, H., Chen, X., Chen, Y., Menghebilige, Bao, Q. (2012) Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *Journal of Dairy Science*. **95**(4), 1645–1654.

Wang, S., Xu, J., Zheng, J., Zhang, X., Shao, J., Zhao, L., Hao, J. (2020) Anti-inflammatory and antioxidant effects of acetyl-L-carnitine on atherosclerotic rats. *Medical Science Monitor*. **26**, e920250.

Wang, X., Wang, W., Lv, H., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, M., Wang, Y., Tan, Z. (2021) Probiotic potential and wide-spectrum antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from infant feces. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **13**(1), 90–101.

Wang, Yang, Wu, Y., Wang, Yuanyuan, Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Yibing, Li, W. (2017) Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*. **9**(5), 521.

Wasfi, R., Abd El-Rahman, O.A., Zafer, M.M., Ashour, H.M. (2018) Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **22**(3), 1972–1983.

Wolf, D., Anto-Michel, N., Blankenbach, H., Wiedemann, A., Buscher, K., Hohmann, J.D., Lim, B., Bäuml, M., Marki, A., Mauler, M., Duerschmied, D., Fan, Z., Winkels, H., Sidler, D., Diehl, P., Zajonc, D.M., Hilgendorf, I., Stachon, P., Marchini, T., Willecke, F., Schell, M., Sommer, B., Von Zur Muhlen, C., Reinöhl, J., Gerhardt, T., Plow, E.F., Yakubenko, V., Libby, P., Bode, C., Ley, K., Peter, K., Zirlik, A. (2018) A ligand-specific blockade of the integrin Mac-1 selectively targets pathologic inflammation while maintaining protective host-defense. *Nature Communications*. **9**, 525.

Wright, A. von, Axelsson, L. (2019) Lactic acid bacteria: an introduction. U: *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects* (Vinderola, G., Ouwehand, A.C., Salminen,

S., Wright, A.V., ured.),. CRC Press, SAD, str. 1–16.

Wu, C., Huang, J., Zhou, R. (2017) Genomics of lactic acid bacteria: current status and potential applications. *Critical Reviews in Microbiology*. **43**(4), 393–404.

Wulandari, E., Yurmiati, H., Subroto, T., Suradi, K. (2020) Quality and probiotic lactic acid bacteria diversity of rabbit meat Bekasam-fermented meat. *Food Science of Animal Resources*. **40**(3), 362–376.

Xia, J., Psychogios, N., Young, N., Wishart, D.S. (2009) MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*. **37**, W652–W660.

Xiao, Y., Wang, L., Rui, X., Li, W., Chen, X., Jiang, M., Dong, M. (2015) Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. *Journal of Functional Foods*. **12**, 33–44.

Yamamoto, Y., Gaynor, R. (2005) Role of the NF- $\kappa$ B Pathway in the pathogenesis of human disease states. *Current Molecular Medicine*. **1**(3), 287–296.

Yanagida, F., Chen, Y.S., Shinohara, T. (2006) Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil. *Journal of General and Applied Microbiology*. **52**(1), 21–28.

Yang, K.M., Kim, J.S., Kim, H.S., Kim, Y.Y., Oh, J.K., Jung, H.W., Park, D.S., Bae, K.H. (2021) *Lactobacillus reuteri* AN417 cell-free culture supernatant as a novel antibacterial agent targeting oral pathogenic bacteria. *Scientific Reports*. **11**, 1631.

Yeo, S.-K., Ewe, J.-A., Tham, C.S.-C., Liong, M.-T. (2011) Carriers of probiotic microorganisms. U: Probiotics (Liong, M.-T., ured.), Springer, Cham, Švicarska, str. 191–220.

Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A. (2020) Assessment of socio-demographic factors, health status and the knowledge on probiotic dairy products. *Food Science and Human Wellness*. **9**(3), 272–279.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J. (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **67**(5), 1613–1617.

Yoshida, A., Kuramitsu, H.K. (2002) Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**(12), 6283–6291.

- Yu, H.J., Liu, W., Chang, Z., Shen, H., He, L.J., Wang, S.S., Liu, L., Jiang, Y.Y., Xu, G.T., An, M.M., Zhang, J.D. (2015) Probiotic BIFICO cocktail ameliorates *Helicobacter pylori* induced gastritis. *World Journal of Gastroenterology*. **21**(21), 6561–6571.
- Yüksekda, Z.N., Beyatli, Y., Aslim, B. (2003) Determination of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by some mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria. *Turkish Journal of Biology*. **27**(1), 37–42.
- Yuying Liu, X., Tian, X., He, B., Hoang, T.K., Taylor, C.M., Blanchard, E., Freeborn, J., Park, S., Luo, M., Couturier, J., Tran, D.Q., Roos, S., Wu, G., Marc Rhoads, J. (2019) *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 feeding of healthy newborn mice regulates immune responses while modulating gut microbiota and boosting beneficial metabolites. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **317**, 824–838.
- Yvon, S., Olier, M., Leveque, M., Jard, G., Tormo, H., Haimoud-Lekhal, D.A., Peter, M., Eutamène, H. (2018) Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *European Journal of Nutrition*. **57**(1), 155–166.
- Zhang, Z., Gu, M., You, X., Sela, D.A., Xiao, H., McClements, D.J. (2021) Encapsulation of bifidobacterium in alginate microgels improves viability and targeted gut release. *Food Hydrocolloids*. **116**, 106634.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. (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.
- Zhu, B., Macleod, L.C., Kitten, T., Xu, P. (2018) *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiology*. **13**(8), 915–932.
- Zommiti, M., Feuilloley, M.G.J., Connil, N. (2020) Update of probiotics in human world: A nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*. **8**(12), 1907.
- Zotta, T., Ricciardi, A., Ianniello, R.G., Parente, E., Reale, A., Rossi, F., Iacumin, L., Comi, G., Coppola, R. (2014) Assessment of aerobic and respiratory growth in the *Lactobacillus casei* group. *PLoS ONE*. **9**(6), e99189.



## ŽIVOTOPIS

Deni Kostelac, mag. ing. biotechn. rođen je Zagrebu, 03.08.1991. godine. Diplomirao je 2016. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Molekularna biotehnologija. Od 2017. godine zaposlen je u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Koautor je četiri znanstvena rada skupine a1, jednog stručnog rada, sveučilišnog udžbenika te poglavlja u znanstvenoj knjizi. Sudjelovao je na deset znanstvenih skupova te na brojnim tečajevima i radionicama. Dobitnik je dekanove nagrade za najbolji ostvareni prosjek u generaciji na diplomskom studiju. Član je Hrvatskog mikrobiološkog društva, Hrvatskog društva za Biotehnologiju, Hrvatskog genetičkog društva te Europskog društva za mutagenezu okoliša i genomiku. Suradnik je na predmetima: Mikrobiologija, Mikrobiologija namirnica, Bakteriologija i Mikologija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te na predmetu Primjena mikroba u proizvodnji i zaštiti autohtonih prehrambenih proizvoda, na Sveučilištu Sjever u Koprivnici. Sudjeluje na dva projekta: „Integrirani sustav uzgoja alternativnih vrsta školjkaša u uvjetima klimatskih promjena“, financiran sredstvima EU (KK.05.1.1.02.0012.) i „Tehnologija preprekama i 3D printanje za okolišno prihvatljivu proizvodnju funkcionalnih voćnih sokova“ (HRZZ IP-2019-04-2105). Sudjelovao je na projektu društveno korisnog učenja: „U društvu mikroba“, Hrvatskog mikrobiološkog društva gdje je imao funkciju mentora. Obnašao je funkciju zamjenskog člana Upravnog odbora COST akcije CA16112. Nagrađen je zlatnom medaljom na 19. međunarodnoj izložbi inovacija ARCA 2021 te posebnim priznanjem za zdravstveni značaj inovacije na Salonu inovacija Bjelovar 2021. za razvijenu probiotičku kapsulu. Član je Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Vijeća biotehničkog područja Sveučilišta u Zagrebu i tehnički je urednik časopisa „Croatian journal of food technology, biotechnology and nutrition“.

### **Znanstveni radovi skupine A1:**

1. Kostelac, D., Gerić, M., Gajski, G., Markov, K., Domijan, A. M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Svetec, I.K.S., Žunar, B., Frece, J. (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.
2. Kostelac, D., Vrdoljak, M., Markov, K., Delaš, I., Jug, T., Gajdoš Kljusurić, J., Jakopović, Ž., Čanak, I., Jelić, M., Frece, J. (2020) SPME-GC-MS and multivariate analysis of sensory properties of cheese in a sack matured with probiotic starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*. **58**(2), 128-137.
3. Kostelac, D., Putnik, P., Markov, K., Frece, J., Kovačević, D. B. (2020) Effects of electrotechnologies on enzymes in foods and food model systems. *Current Opinion in Food Science*. **31**, 47-56.
4. Čanak, I., Markov, K., Melvan, E., Starčević, A., Živković, M., Zadavec, M., Pleadin, J., Jakopović, Ž., Kostelac, D., Frece, J. (2018) Isolation and characterisation of *L. plantarum* O1 producer of plantaricin as potential starter culture for the biopreservation of aquatic food products. *Food Technology and Biotechnology*. **56**(4), 581-589.

### **Znanstveni radovi skupine A3:**

1. Čanak, I., Markov, K., Jakopović, Ž., Kostelac, D., Čolak, S., Mejdandžić, D., Živković, M., Ježek, D. (2019) *In vitro* Characterization of *Lactobacillus plantarum* O1 isolated from gut of sea bream (*Sparus aurata*) as potential fish probiotic. Proceedings of 4th I.C. FABI 2019 (Petros, K.; Leontopoulos, S., ured.). Kreta, Grčka, University of Thessaly, str. 170-175.