

Funkcionalna uloga egzopolisaharida i bakteriocina u probiotičkoj aktivnosti autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline

Butorac, Katarina

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:159:076642>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Katarina Butorac

**FUNKCIONALNA ULOGA
EGZOPOLISAHARIDA I BAKTERIOCINA U
PROBIOTIČKOJ AKTIVNOSTI
AUTOHTONIH SOJEVA BAKTERIJA
MLIJEČNE KISELINE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Katarina Butorac

**FUNCTIONAL ROLE OF
EXOPOLYSACCHARIDES AND
BACTERIOCINS IN THE PROBIOTIC
ACTIVITY OF AUTOCHTHONOUS LACTIC
ACID BACTERIA STRAINS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: PhD, Jasna Novak, Full Professor

Zagreb, 2022.

Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost: „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini” IP-2014-09-700, voditeljice prof. dr. sc. Blaženke Kos, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak. Eksperimenti određivanje strukture egzopolisaharida provedeni su na Department of Life Sciences, University of Trieste, Italija, u sklopu FEMS-ove stipendije “Isolation and characterisation of exopolysaccharides from selected autochthonous Lactobacillus strain” FEMS-GO-2017-004, u suradnji s doc. dr. sc. Paolom Cescutti.

Informacije o mentoru:

Prof. dr. sc. Jasna Novak, redovita profesorica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

ŽIVOTOPIS

Prof. dr. sc. Jasna Novak zaposlena je od 2003. u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Na istom fakultetu je diplomirala smjer Biokemijsko inženjerstvo, te doktorirala u području Molekularne Biotehnologije. Nekoliko puta se znanstveno usavršavala na eminentnim europskim institucijama. Prvi puta 2006. kao doktorand boravila je tijekom 18 mjeseci na istraživačkom institutu French National Institute for Agricultural Research, INRA, Proteomics Platform PAPSS: Protein Structure and Biochemistry Unit, Pariz. 2011. odlazi na poslijedoktorsko usavršavanje na Department of Veterinary Bioscience, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, zatim 2011. u Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Beograd, te 2014. na Katedru za biotehnologiju, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Aktivna je i kao gostujući nastavnik na Department of Biotechnology and Life Science, University of Insubria u okviru ERASMUS programa mobilnosti. Sudjelovala u realizaciji ukupno 18 znanstvenih i stručnih/tehnolojskih nacionalnih ili međunarodnih projekta. Objavila je 33 izvorna znanstvena rada, te je sudjelovala sa 6 predavanja i 38 postera na znanstvenim skupovima. Redovito sudjeluje u recenzijama znanstvenih radova časopisa s visokim učinkom odjeka (ukupno recenzirala više od 60 znanstvenih radova), a članica je Uredničkog odbora znanstvenih časopisa *Frontiers in Microbiology*, *Food Bioscience*, *American Journal of Microbiological Research* i *BioMed Research International - Microbiology*. Suradnik je na nekoliko modula koji se izvode na preddiplomskim i diplomskim studijima, te na doktorskom studiju *Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam* Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Bila je mentor tijekom izrade 2 doktorska rada, 19 diplomskih i 23 završna rada, te 1 magistarskog rada prema prijašnjem programu dokorskog studija. Redovito sudjeluje u programima popularizacije znanosti (Festival znanosti, 2016; XII Ljetna tvornica znanosti, 2018; Znanstveni kvart, 2018; PANDA, 2019; Festival znanosti, 2021). Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatske mljekarske udruge, European Biotechnology Thematic Network

Association i Hrvatskog mikrobiološkog društva, a od 2021. predsjednica Sekcije za primijenjenu mikrobiologiju. Obnaša dužnost koordinatorice studijskog smjera Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo na poslijediplomskom sveučilišnom (doktorskom) studiju Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam, te je predsjednica Povjerenstva za upravljanje kvalitetom Fakulteta, član je Vijeća biotehničkog područja Sveučilišta u Zagrebu. U dva navrata 2005. i 2007. dodijeljene su joj potpore Biotehničke zaklade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, a 2007. je sudjelovala kao koautor na radovima koji su nagrađeni Prvom Nagradom Saveza inovatora Poljske i autora tehničkih unapređenja na 5. međunarodnoj izložbi ARCA 2007, te 2017. Srebrenom medaljom na 9. međunarodnom sajmu inovacija Agro Arca. Dobitnica je i Nagrade mladom znanstveniku „Vera Johanides“ za 2011. godinu koju dodjeljuje Akademija tehničkih znanosti Hrvatske. Njezin znanstveni rad obuhvaća funkcionalnu karakterizaciju različitih metabolita i makromolekularnih staničnih struktura odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline kao molekularnih čimbenika funkcionalnosti probiotičkih sojeva, s potencijalnim učinkom na intestinalnu mikrobiotu domaćina, koja su temelj za definiranje interakcija probiotičkih bakterija s domaćinom *in situ*, u gastrointestinalnom traktu kao ciljnom mjestu djelovanja.

ZAHVALA

Zahvaljujem dr. sc. Jagodi Šušković, prof. emerita, na prenesenom bogatom znanstveno-istraživačkom, ali i životnom iskustvu, koja me svojim savjetima tijekom proteklih godina uveseljavala i usmjeravala na pravi put.

Veliko hvala prof. dr. sc. Blaženki Kos, na stručnom i kritičnom vodstvu tijekom provedbe projekta u sklopu kojeg je izrađen ovaj Doktorski rad, čiji su poslovni, ali i privatni savjeti bili od velike pomoći tijekom mog osobnog i profesionalnog razvoja.

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Novak, na svim korisnim savjetima, razumijevanju, motivaciji, podršci i pomoći tijekom rada u Laboratoriju, pripremanja i pisanja Dokorskog rada. Hvala joj za svaki trenutak koji mi je beskompromisno posvetila, pri čemu me svojim pristupom i odnosom poticala na daljnji razvoj i kreativnost.

Zahvaljujem se svojim kolegicama doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc, doc. dr. sc. Kseniji Uroić, dr. sc. Martini Banić i Nini Čuljak, mag. ing. biotechn., na prijateljstvu, smijehu i onim posebnim zajedničkim trenutcima, u nadi da će se ih u budućnosti biti još i više.

Veliko hvala prof. dr. sc. Robertu Rizzu, doc. dr. sc. Paoli Cescutti, dr. sc. Barbari Bellich i dr. sc. Marcu DiStefanu na neprocjenjivom prenesenom znanju, strpljenju i ugodnom druženju zbog kojih mi je boravak u Trstu jedno od najljepših iskustava u životu.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima, što su bili uz mene kada je to bilo potrebno, razumijeli i pomagali da prebrodim one teške, ali i proslavim one najljepše trenutke.

Neizmjereno hvala najboljim roditeljima i bratu, koji su mi usadili najbitnije životne vrijednosti, koji su uvijek stajali uz mene i gurali me prema naprijed znajući da imam njihovu bezuvjetnu podršku. Hvala vam na svemu!

Najveća hvala mojim najdražim dečkima, mom Ivanu bez kojeg danas ne bi bila ono što jesam i mojoj najvećoj pobjedi, mojem najslađem i najdražem anđelu Gabrielu koji će mi uvijek biti motivacija da ništa u životu nije nemoguće, samo kad vjeruješ! Volim vas!

Tema doktorskog rada prihvaćena je na redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akad. god. 2018./2019. održanoj dana 28. veljače 2019. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 10. prosinca 2019. godine.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Disertacija

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

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

UDK: 543.635.25:543.645.6:579.67:579.864(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

FUNKCIONALNA ULOGA EGZOPOLISAHARIDA I BAKTERIOCINA U PROBIOTIČKOJ AKTIVNOSTI AUTOHTONIH SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Kratki sažetak:

Funkcionalne biomolekule posreduju u funkcionalnosti probiotičkih bakterija *in vivo*. Ciljanom selekcijom autohtonih bakterija mliječne kiseline (BMK) iz znanstveno etablirane bakterijske kolekcije probiotičkih sojeva i funkcionalnih starter kultura odabrani su sojevi sa specifičnim svojstvima biosinteze bakteriocina i egzopolisaharida (EPS-a) te sojevi koji ekspimiraju proteaze za razgradnju kazeina do biopeptida. Glavni istraživački cilj je strukturna i funkcionalna karakterizacija ovih biomolekula kao postbiotika za definiranje molekularnih mehanizama probiotičke aktivnosti sojeva producenata. Sojevi koji su pokazali fenotip sinteze biomolekula, identificirani su potpunim sekvencioniranjem genoma. Producent bakteriocina, *Lactiplantibacillus plantarum* D13, koji inhibira *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ i *Staphylococcus aureus* 3048, u genomu sadrži *pln* genski klaster za biosintezu plantaricina. Trodimenzionalne strukture plantaricina PlnJK i PlnEF određene su *in silico*. *Limosilactobacillus fermentum* D12, sintetizira EPS-e, glikogen i razgranati heteropolisaharid koji sadrži t-Glcp i 2,6-vezane Galf, u omjeru 1:12. *eps* klaster sadrži gene potrebne za biosintezu EPS-a *gtf*, *epsA*, *B*, *C*, *C'*, *D* i *E*, gene odgovorne za polimerizaciju i transport *wzx* i *wzy* te gene za aktivaciju prekursora molekula *galE*, *galT*, *galU*, *rfbB*, *pgm* i *glf*. Dokazano je da EPS-i posreduju u adhezijskim i autoagregacijskim svojstvima soja producenta D12 te imaju zaštitnu ulogu tijekom liofilizacije i mikroinkapsulacije. *Lactobacillus* i *Enterococcus faecium* sojevi imaju kazeinolitičko djelovanje. Primjena konzorcija BMK kao funkcionalne starter kulture u kontroliranoj fermentaciji, rezultirala je biosintezom 15 biopeptida iz kazeina. *In vitro* i *in vivo* ispitivanjem funkcionalnosti konzorcija BMK utvrđen je kolonizacijski potencijal i učinak na modulaciju sastava intestinalnog mikrobioma. Optimirana je biotehnološka proizvodnja funkcionalnih mikroformulacija konzorcija BMK. Primjena definiranog konzorcija BMK doprinjela je proizvodnji fermentiranog produkta s dodanom funkcionalnom vrijednošću i omogućila je proizvodnju inovativnog napitka na bazi nusproizvoda fermentacije, sirutke s povećanim sadržajem biopeptida. Zaključno, plantaricin D13, odnosno EPS D12, imaju potencijal probiotičkih molekula nove generacije te uz biokatalitički potencijal sustava proteaza obećavajući su postbiotici koji djeluju kao okidačke molekule za specifične funkcionalnosti sojeva producenata.

Broj stranica: 185

Broj slika: 43

Broj tablica: 28

Broj literaturnih navoda: 255

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *probiotici, biopeptidi, Lactobacillus, bakteriocin, egzopolisaharidi, biomolekule, proteaze, nova generacija sekvencioniranja, mikrobiota, mikroformulacija*

Datum obrane: 04. srpnja 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Jagoda Šušković, prof. emerita
2. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
3. dr. sc. Ivanka Jerić, znanstveni savjetnik
4. prof. dr. sc. Jadranka Frece (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 Sveučilište u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Ph.D. thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

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

UDK: 543.635.25:543.645.6:579.67:579.864(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

THE FUNCTIONAL ROLE OF EXOPOLYSACCHARIDES AND BACTERIOCINS IN THE PROBIOTIC ACTIVITY OF AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA STRAINS

Katarina Butorac, MSc

Thesis performed in Laboratory of Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Culture Technologies, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

Supervisor: PhD Jasna Novak, Full Professor

Short abstract:

Functional biomolecules mediate the functionality of probiotic bacteria *in vivo*. Targeted selection of autochthonous lactic acid bacteria (LAB) from the scientifically established bacterial collection of probiotic strains and functional starter cultures was undertaken to identify strains with specific properties of bacteriocin and exopolysaccharide (EPS) biosynthesis, and those expressing proteases, that degrade casein to biopeptides. The main research goal was the structural and functional characterization of these biomolecules as postbiotics for defining the molecular mechanisms of probiotic activity of the producer strain. Strains with the desired phenotype of biomolecule synthesis were identified by whole-genome sequencing. The bacteriocin producer, *Lactiplantibacillus plantarum* D13, inhibits *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ and *Staphylococcus aureus* 3048, contains the *pln* gene cluster for the biosynthesis of plantaricin. The three-dimensional structures of plantaricin PlnJK and PlnEF were determined *in silico*. *Limosilactobacillus fermentum* D12, synthesizes EPSs, glycogen and branched heteropolysaccharide containing t-Glcp and 2,6-linked Galp, in a ratio of 1:12. *eps* cluster contains genes required for the biosynthesis of EPSs *gfp*, *epsA*, *B*, *C*, *C'*, *D* and *E*, genes responsible for the polymerization and transport *wzx* and *wzy*, and genes for the activation of precursor molecules *galE*, *galT*, *galU*, *rfbB*, *pgm* and *glf*. EPSs mediate the adhesion and autoaggregation ability of D12-producer strain and has a protective role during exposure to freeze-drying and microencapsulation. *Lactobacillus* and *Enterococcus faecium* strains have caseinolytic activity. When LAB consortium was applied as a functional starter culture in fermentation, an increase in the biosynthesis of 15 biopeptides from casein was detected. Colonization potential and the biomodulation capacity, through monitoring the changes in the intestinal microbiome composition, were determined by *in vitro* and *in vivo* functionality studies of the LAB consortium. The biotechnological production of functional microformulations of the LAB consortium has been optimized. Designed LAB consortium has contributed to the production of a fermented product with added functional value and enabled the production of an innovative beverage based on fermentation by-product, whey with increased content of biopeptides. Plantaricin D13 and EPS D12, have the potential for next generation of probiotic molecules, and with the biocatalytic potential of protease system, promise as postbiotics that act as trigger molecules for the specific functionalities of producer strains.

Number of pages: 185

Number of figures: 43

Number of tables: 28

Number of references: 255

Original in: Croatian

Key words: *probiotics, biopeptides, Lactobacillus, bacteriocins, exopolysaccharides, biomolecules, proteases, Next Generation Sequencing, microbiota, microformulation*

Date of the thesis defense: 04th July, 2022

Reviewers:

1. PhD Jagoda Šušković, Professor emeritus
2. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor
3. PhD Ivanka Jerić, Scientific Adviser
4. PhD Jadranka Frece, Full Professor (substitute member)

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

PROŠIRENI SAŽETAK

Cilj ovog doktorskog rada bio je između autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) izoliranih iz različitih mikrokoliša skladištenih kao znanstveno okarakterizirana kolekcija industrijski važnih mikroorganizama, probiotika i funkcionalnih starter kultura provesti *in vitro* selekciju sojeva sa specifičnim svojstvima biosinteze bakteriocina i egzopolisaharida (EPS-a) te sojeva koji eksprimiraju proteaze koje kataliziraju reakcije biosinteze peptida iz kazeina. Prema literaturi EPS-i, bakteriocini i biopeptidi su probiotičke biomolekule jer se istražuju kao ključni čimbenici poticanja molekularnih mehanizama specifičnih korisnih učinaka probiotičkih bakterija na zdravlje domaćina (Novak i sur., 2022b; Butorac i sur., 2021; Butorac i sur., 2020). Nakon *in vitro* selekcije sojeva producenata ovih specifičnih biomolekula, za daljne eksperimente karakterizacije funkcionalnosti odabrani su *Lactiplantibacillus plantarum* D13, producent plantaricina i *Limosilactobacillus fermentum* D12, producent EPS-a, koji sadrže specifičan sustav proteaza kao i *Enterococcus faecium* ZGZA7-10. Taksonomska identifikacija odabranih izolata na razini soja i detekcija klastera za ekspresiju i sintezu bakteriocina, EPS-a te proteina koji sudjeluju u proteolitičkoj aktivnosti, provedena je temeljem fenotipskih karakteristika i primjenom potpunog sekvencioniranja genoma (*engl.* whole genome sequencing), dok je njihova funkcionalna uloga detaljno istražena. Fenotipskom karakterizacijom antagonističkog djelovanja, ustanovljeno je da soj *L. plantarum* D13 iskazuje širok spektar antimikrobnog djelovanja, uključujući bakteriostatsko djelovanje prema *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ i *Staphylococcus aureus* 3048. Upravo antilisterijsko djelovanje kao značajno funkcionalno svojstvo probiotičkih sojeva može se pripisati sintezi bakteriocina. Genom soja D13 sadrži *pln* genski klaster odgovoran za biosintezu i transport plantaricina te ekspresiju gena odgovornih za imunost soja D13. Trodimenzionalne strukture plantaricina A, plantaricina EF i JK predviđene su *in silico* modeliranjem metodom za prepoznavanje sličnosti pomoću SWISS-MODEL, čija su fizikalna svojstva i redosljed aminokiselina α -uzvojnica određena pomoću HeliQuest. *L. fermentum* D12 je producent EPS-a. Primjenom suvremenih tehnika spektroskopije GC, GC-MS i ¹H-NMR određena je struktura EPS-a *L. fermentum* D12. Ustanovljeno je da D12 sintetizira dva strukturno različita EPS-a i to homopolisaharid glikogen i razgranati heteropolisaharid koji sadrži gradivne jedinice terminalne glukoze u konfiguraciji piranoze i 2,6-vezanu galaktozu u konfiguraciji furanoze u molarnom omjeru 1:12. Komparativnom genomskom analizom definiran je *eps* genski klaster za biosintezu

EPS-a *L. fermentum* D12, koji sadrži gene za biosintezu, polimerizaciju i transport te gene odgovorne za aktivaciju prekursora molekula. Prema rezultatima istraživanja, purificirane molekule EPS-a prepoznate su kao potencijalni adhezini jer posreduju u autoagregaciji i adheziji, što predstavlja jedno od važnijih funkcionalnih svojstava probiotičkog soja, ali i u zaštiti bakterijskih stanica D12 tijekom liofilizacije *in vitro*. Analizom biokatalitičkog potencijala, uz kazein kao primarni supstrat u rekonstituiranom obranom mlijeku, ustanovljeno je da D12 i D13 te soj roda *Enterococcus* posjeduju sustav proteaza. Karakterizacija kazeinolitičke aktivnosti odabranih BMK s potencijalom sinteze biopeptida provedena je u cilju proizvodnje sušenog svježeg sira s dodanom funkcionalnom vrijednošću. Kod sojeva *L. plantarum* D13 i *L. fermentum* D12 te kod soja *E. faecium* ZGZA7-10, ustanovljena je proteolitička aktivnost uz koju je vezan i Fmc⁺ (*engl.* fast milk-coagulating, Fmc) fenotip. Pri tome soj *E. faecium* ZGZA7-10 iskazuje značajniju biokatalitičku aktivnosti proteaze određenu Ansonovom metodom. BMK su uspješno koagulirale obrano mlijeko tijekom prekonoćne kultivacije, a hidroliza kazeina potvrđena je s Tricin-SDS-PAGE. Proteomički pristupi su primijenjeni za karakterizaciju enzima proteolitičkog sustava tandemskom spektrometrijom masa. MALDI-TOF/TOF i PCR analizama potvrđeno je da soj *E. faecium* ZGZA7-10 sadrži intragensku regiju odgovornu za ekspresiju proteinaza i enzimatsku aktivnost sustava koji se sastoji od 7 proteaza, 5 peptidaza i 3 transportna proteina koji sudjeluju u razgradnji dostupnih proteina poput kazeina iz mlijeka do biopeptida. Relativna kvantifikacija sintetiziranih biopeptida soja ZGZA7-10 određena je primjenom ciljane spektrometrije masa LC-MS/MS-MRM. Radi se o 7 ciljanih peptida nastalih razgradnjom α - i β -kazeina s potencijalnim bioaktivnim djelovanjem nakon pretraživanja MBPDB baze podataka. Detektiranim peptidima je pretpostavljeno svojstvo imunomodulatornog, antitrombotskog, antimikrobnog, ACE-inhibitornog ili protuuplanog djelovanja. Krajnji cilj je bio racionalni dizajn optimiranja sastava mješovite funkcionalne starter kulture kako bi se definirao znanstveno okarakteriziran konzorcij za proizvodnju inovativnih fermentiranih proizvoda - sušenog svježeg sira i sirutke. Stoga je provedena karakterizacija fermentacijske aktivnosti odabranih sojeva BMK nakon uzgoja u obranom mlijeku uz dodatak različitih koncentracija natrijeva klorida i kvantifikacija utrošene laktoze i produkata metabolizma, laktata, acetata i diacetila primjenom kromatografskih metoda, HPLC-UV/VIS-DAD i GC-FID. Jedan od ključnih kriterija prilikom odabira probiotičkih bakterija je ispitivanje preživljavanja sojeva u uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT). Stoga su provedena *in vitro* i *in vivo* istraživanja na Caco-2 staničnoj liniji i na

eksperimentalnim životinjama kako bi se ustanovio kolonizacijski potencijal i mogući funkcionalni učinak združene starter kulture koja sadrži odabrana tri soja autohtonih BMK i soj *Levilactobacillus brevis* D6 koji eksplicira površinske S-proteine u nepovoljnim uvjetima GIT-a (Uroić i sur., 2016).

Nakon intervencije združenog konzorcija, kolonizacijski potencijal i biomodulacijski učinak praćen je analizom sastava intestinalnog mikrobioma primjenom tehnika nove generacije sekvencioniranja. *In vivo* analizom aktivnosti odabrane združene funkcionalne starter kulture utvrđen je značajan utjecaj na sastav intestinalne mikrobiote štakora jer je postignut učinak povećanja bioraznolikosti i porasta udjela mnogih komensalnih i korisnih bakterija u intestinalnoj mikrobioti. Na razini koljena značajna je relativna zastupljenost bakterija predstavnika *Thermoplasmata*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobiota*, *Verrucomicrobiota* i *Parabasalia*, na razini porodica predstavnika *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* i *Rikenellaceae* te bakterija roda *Alloprevotella*, *Prevotella* i *Roseburia*. Dodatno, prema rezultatima intervencije konzorcijem, ustanovljena je redukcija relativne zastupljenosti ispod limita detekcije nepoželjnih bakterija rodova *Streptococcus*, *Candidatus Saccharimonas* i bakterija iz porodice *Methanobacteriaceae*.

Tijekom proizvodnje suhih aktivnih mikroformulacija funkcionalnih starter kultura komponentnih sojeva BMK definiranog konzorcija, a s ciljem postizanja visokog broja metaboličkih aktivnih bakterijskih stanica u liofiliziranom pripravku, provedena je mikroinkapsulacija bakterijskih stanica združenih sojeva u bionosačima alginatu, κ -karagenanu i kazeinu djelovanjem transglutaminaze te liofilizacija uz dodatak obranog mlijeka, sorbitola, saharoze, laktoze i inulina kao lioprotektora. Postupci mikroinkapsulacije i liofilizacije doprinjeli su većem broju preživjelih bakterijskih kolonija (CFU/g) pri čemu je postignut potencijal zaštite bakterijskih stanica konzorcija BMK tijekom prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a *in vitro*. S ciljem kreiranja inovativne funkcionalne starter kulture dizajniran je konzorcij BMK za kontroliranu fermentaciju sušenog svježeg sira. Analiza proizvedenog sušenog svježeg sira je pokazala da se radi o ekstratvrdom siru sniženog udjela mliječne masti. Prema parametrima kvalitete, sastavu peptida, senzorskim svojstvima i mikrobiološkim analizama, određenim nakon proizvodnje i tijekom skladištenja, sušeni svježi sirevi proizvedeni kontroliranom fermentacijom, napitak na bazi sirutke i koncentrirani pripravak sirutke su okarakterizirani kao mikrobiološki sigurni i visokokvalitetni proizvodi. Proteomičkom analizom provedenom primjenom kvantitativne LC-MRM-MS analize

ciljanih peptida, prema preliminarnim rezultatima, u proizvedenim fermentiranim proizvodima detektirano je 16 peptida s potencijalnim bioaktivnim djelovanjem. S aspekta održivosti u cilju proizvodnje novih proizvoda i postizanja ekološkog učinka, priređen je inovativan napitak na bazi sirutke zaostale nakon proizvodnje sira i koncentrirani pripravak sirutke postupkom liofilizacije. Inovativni napitak na bazi sirutke proizveden je kao tekući napitak s dodatkom aroma vanilije ili maline. Analiza tekuće sirutke pokazala je da se radi o kiseljoj sirutki s niskim udjelima masti i laktoze s povećanim sadržajem biopetida. Identifikacija inokuliranih starter kultura i mikrobne populacije BMK u proizvedenim sirevima i izdvojenim sirutkama potvrđena je RAPD-PCR i DGGE-PCR metodama. Mikrobiom sira, odnosno analiza sastava autohtone mikrobiote prirodno prisutne u mlijeku određena je Illumina MiSeq sekvencijiranjem. Sušeni svježi sirevi proizvedeni u laboratorijskom mjerilu uz dodatak konzorcija BMK optimiranog sastava u kontroliranim uvjetima s ciljem evaluacije potencijalne industrijske proizvodnje odlikuju se poželjnim senzorskim svojstvima te su ustanovljene povoljne karakteristike povezane s brzinom acidifikacije kao rezultat metaboličke aktivnosti autohtone mikrobne populacije, zatim prinosa sira, sadržaja masti i iskoristivost laktoze. Broj živih bakterijskih stanica u inovativnim proizvodima iznosio je više od 10^6 CFU/mL što je minimalni broj bakterijskih stanica propisan za postizanje funkcionalnog učinka. Inovativni fermentacijski proizvodi imaju potencijal funkcionalne hrane zbog sadržanih probiotičkih sojeva koji sintetiziraju funkcionalne biomolekule. Konačni proizvod je bez mikrobioloških kontaminacija, poželjnih senzorskih svojstava, visoke kvalitete s povećanim sadržajem bioaktivnih peptida i visokim brojem probiotičkih stanica (iznad 10^6 CFU/mL).

EXTENDED SUMMARY

The aim of this Ph.D. thesis was to conduct *in vitro* selection of autochthonous lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from different microenvironments stored as a scientifically characterized collection of industrially important microorganisms, probiotics and functional starter cultures, with specific properties of bacteriocin and exopolysaccharides (EPSs) biosynthesis, and strains expressing proteases that produce biopeptides from casein. According to the literature, EPSs, bacteriocins and biopetides are defined as probiotic biomolecules since they are investigated as key factors in promoting molecular mechanisms of specific beneficial effects of probiotic bacteria to the host health (Novak et al., 2022b; Butorac et al., 2021; Butorac et al., 2020). After *in vitro* selection of strains producing these specific biomolecules, *Lactiplantibacillus plantarum* D13, producer of plantaricin and *Limosilactobacillus fermentum* D12, producer of EPSs, both containing a specific protease system, as well as *Enterococcus faecium* ZGZA7-10, were selected for further analyses of characterizing their functionality. Taxonomic identification of selected isolates at the strain level and detection of clusters responsible for expression and synthesis of bacteriocins, EPSs, and proteins participating in proteolytic activity, was performed based on their phenotypic characterisation and by whole genome sequencing, while their functional role has been investigated in detail. Based on the phenotypic characterization of antagonistic activity, strain *L. plantarum* D13 exhibited wide range of antimicrobial activity, including bacteriostatic activity against *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ and *Staphylococcus aureus* 3048. Antilisterial effect as a significant functional property of probiotic strains can be attributed to the synthesis of bacteriocins. The genome of D13 strain contains the *pln* gene cluster responsible for the biosynthesis and transport of plantaricin and the expression of genes responsible for the immunity of strain D13. The three-dimensional structures of plantaricin A, plantaricin EF and JK were predicted by *in silico* modeling based on the similarity recognition method using SWISS-MODEL, while physical properties and amino acid sequence of α -helixes were determined by HeliQuest. *L. fermentum* D12 is a producer of EPSs. The structures of *L. fermentum* D12 EPSs were determined using novel spectroscopy techniques GC, GC-MS and ¹H-NMR.

D12 synthesizes two structurally distinct EPSs, homopolysaccharide glycogen and a branched heteropolysaccharide containing terminal glucose in the pyranosidic configuration and 2,6-linked galactose in the furanoside configuration, in their molar ratio 1:12. The *eps* gene cluster responsible

for the biosynthesis of *L. fermentum* D12 EPSs was defined by comparative genome analysis, which contains genes for biosynthesis, polymerization and transport, and genes for the activation of precursors molecules. According to the results, purified EPSs molecules are recognized as potential adhesins since they mediate in autoaggregation and adhesion ability, which is one of the most important functional properties of the probiotic strain, but also in protecting D12 bacterial cells during *in vitro* lyophilization. Analysis of the biocatalytic potential with casein as the primary substrate in reconstituted skim milk revealed that D12 and D13, and a strain of the genus *Enterococcus*, possess a protease system. Characterization of caseinolytic activity of selected LAB with potential synthesis of biopeptides was performed in order to produce dried fresh cheese with added functional value. The proteolytic activity to which the Fmc + (fast milk-coagulating) phenotype is associated was established in strains *L. plantarum* D13, *L. fermentum* D12 and *E. faecium* ZGZA7-10. The strain *E. faecium* ZGZA7-10 showed significant biocatalytic protease activity determined by Anson's method. LAB successfully coagulated skimmed milk during overnight cultivation, and casein hydrolysis was confirmed by Tricin-SDS-PAGE. Proteomic approaches have been applied to characterize enzymes of the proteolytic system by tandem mass spectrometry. An intragenic region of *E. faecium* ZGZA7-10 strain responsible for proteinase expression and enzymatic activity was confirmed by MALDI-TOF/TOF and PCR analyses. This system consists of 7 proteases, 5 peptidases and 3 transport proteins involved in the breakdown of available proteins such as casein from milk to biopeptides. The relative quantification of the synthesized biopeptides by ZGZA7-10 strain was determined using targeted LC-MS/MS-MRM mass spectrometry. There are 7 target peptides formed by the degradation of α - and β -casein with potential bioactive activity after searching the MBPDB database. Detected peptides are presumed to have immunomodulatory, antithrombotic, antimicrobial, ACE-inhibitory or anti-inflammatory activity. The ultimate goal was optimizing the composition of the mixed functional starter culture in order to define a scientifically characterized consortium following the production of innovative fermented products - dried fresh cheese and whey. Therefore, fermentation characterization activity of selected LAB strains was performed after the cultivation in skimmed milk upon the addition of different concentrations of sodium chloride, and also the quantification of consumed lactose and other metabolic products such as lactate, acetate and diacetyl using chromatographic methods, HPLC-UV / VIS-DAD and GC-FID. One of the key criteria in probiotic bacteria selection was the assessment of the strain's survival in the gastrointestinal tract (GIT). Therefore *in vitro* and *in vivo*

studies on Caco-2 cell line and on experimental animals were performed in order to establish colonization potential and possible functional effect of the mixed starter culture containing the selected three strains of autochthonous LAB and a *Levilactobacillus brevis* D6 strain, which expresses surface S-proteins under adverse GIT conditions (Uroić et al., 2016).

Following the intervention of the mixed consortium, the colonization potential and biomodulation effect were monitored by analyzing the composition of the intestinal microbiome using new generation sequencing techniques. *In vivo* activity analysis of the selected mixed functional starter culture revealed a significant effect on the intestinal microbiota composition of rats, which resulted in increasement of biodiversity and the proportion of many commensal and beneficial bacteria in the intestinal microbiota. At the phylum level there was a significant relative abundance of bacteria *Thermoplasmata*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobiota*, *Verrucomicrobiota* and *Parabasalia*, at the family level representatives of *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* and *Rikenellaceae*, and bacteria at the genus level *Alloprevotella*, *Prevotella* and *Roseburia*. Additionally, according to the results of the consortium intervention, a reduction in relative abundance below the limit of detection of undesirable bacteria at the genus level *Streptococcus*, *Candidatus Saccharimonas* and bacteria from the family *Methanobacteriaceae* was established.

During the production of dry active microformulations using defined consortium of LAB, with the aim of achieving a high number of metabolically active bacterial cells in the lyophilized preparation, microencapsulation of bacterial cells in biocarriers alginate, κ -carrageenan and casein by the action of transglutaminase was performed, followed by freeze-drying upon the addition of skimmed milk, sorbitol, sucrose, lactose, and inulin as lyoprotectants. Microencapsulation and lyophilization procedures contributed to a higher number of viable bacterial colonies (CFU/g) with the potential to protect bacterial cells of the LAB consortium during passage through simulated GIT conditions *in vitro*. In order to create an innovative functional starter culture, a LAB consortium was designed for the controlled fermentation of dried fresh cheese. The analysis of the produced dried fresh cheese showed that it is an extra hard cheese with a reduced content of milk fat. According to the quality parameters, peptide composition, sensory properties and microbiological analyzes determined after the production and during the storage, dried fresh cheeses produced by the controlled fermentation, whey-based beverage and concentrated whey preparation were characterized as microbiologically safe and high quality products. According to

the preliminary results, in the produced fermented products, 16 peptides with potential bioactive activity were detected by proteomic analysis performed using quantitative LC-MRM-MS analysis of target peptides. From the aspect of sustainability, in order to produce new products and achieve environmental impact, an innovative beverage based on whey remained after cheese production and a concentrated freeze-dried whey preparation, were prepared. Innovative whey-based beverage is produced as a liquid beverage with the addition of vanilla or raspberry flavor. Analysis of liquid whey showed that it is an acidic whey with low fat and lactose content and increased biopeptide content. Identification of inoculated starter cultures and LAB microbial populations in produced cheeses and isolated wheys was confirmed by RAPD-PCR and DGGE-PCR methods. The cheese microbiome, i.e. the composition analysis of the autochthonous microbiota naturally present in the milk, was determined by Illumina MiSeq sequencing. Dried fresh cheeses are produced in a laboratory scale upon the addition of a LAB consortium of optimized composition under controlled conditions, in order to evaluate the potential industrial production, with desirable sensory properties and favorable characteristics associated with acidification rate as a result of metabolic activity of autochthonous microbial population, cheese yield, fat content and lactose utilization. The number of live bacterial cells in innovative products was more than 10^6 CFU/mL which is the minimum number of active bacterial cells prescribed to achieve a functional effect. Innovative fermentation products have the potential as functional foods due to the encompassed probiotic cells that synthesize functional biomolecules. The final product is free of microbiological contaminations, with desirable sensory properties, high quality with increased content of bioactive peptides and a high number of probiotic cells (above 10^6 CFU/mL).

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	5
2.1. Bakterije mliječne kiseline kao probiotici	5
2.2. Funkcionalne biomolekule probiotičkih bakterija kao postbiotici	8
2.2.1. Bakteriocini probiotičkih bakterija.....	10
2.2.2. Egzopolisaharidi probiotičkih bakterija	14
2.2.3. Proteolitička aktivnost probiotičkih bakterija i bioaktivni peptidi.....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Materijali.....	25
3.1.1. Mikroorganizmi.....	25
3.1.2. Stanična linija.....	26
3.1.3. Hranjive podloge	27
3.1.4. Kemikalije	28
3.1.5. Aparatura i pribor	31
3.2. Metode rada	34
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	34
3.2.2. Određivanje bakteriocinskog djelovanja autohtonih sojeva BMK	34
3.2.2.1. Metoda difuzije s rupama u agaru (<i>engl.</i> agar well-diffusion method)	34
3.2.2.2. Metoda s dvostrukim slojem agara (<i>engl.</i> agar spot-test method).....	34
3.2.2.3. Detekcija gena koji kodiraju za bakteriocine PCR metodom.....	35
3.2.2.4. Induciranje bakteriocinske aktivnosti soja združenim uzgojem s test- mikroorganizmima	36
3.2.2.5. Utjecaj visoke temperature i proteinaze na bakteriocinsku aktivnost sojeva producenata.....	37
3.2.2.6. <i>In silico</i> analiza genskih klastera i 3D-strukture plantaricina.....	37
3.2.3. Izolacija i karakterizacija egzopolisaharida	38
3.2.3.1. Detekcija „ropy“ fenotipa.....	38
3.2.3.2. Izolacija egzopolisaharida	38
3.2.3.3. Strukturna karakterizacija egzopolisaharida.....	39
3.2.3.3.1. Određivanje čistoće UV/VIS spektrofotometrijom	39

3.2.3.3.2. ¹ H-NMR analiza	39
3.2.3.3.3. Kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica	40
3.2.3.3.4. Određivanje sastava egzopolisaharida provođenjem plinske kromatografije	40
3.2.3.4. <i>In silico</i> analiza <i>eps</i> genskog klastera.....	42
3.2.3.5. Morfološka karakterizacija SEM.....	42
3.2.3.6. Funkcionalna uloga egzopolisaharida	43
3.2.3.6.1. Utjecaj egzopolisaharida na adheziju bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa	43
3.2.3.6.2. Utjecaj egzopolisaharida na adheziju soja producenta na mucin	43
3.2.3.6.3. Utjecaj egzopolisaharida na adheziju soja producenta primjenom Caco-2 stanične linije.....	44
3.2.3.6.4. Utjecaj egzopolisaharida na autoagregacijskih svojstava soja producenta	45
3.2.3.6.5. Ispitivanje protektivnog učinka egzopolisaharida tijekom liofilizacije	46
3.2.4. Detekcija proteolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline	46
3.2.4.1. Određivanje acidifikacijskog kapaciteta.....	46
3.2.4.2. Određivanje Fmc ⁺ fenotipa.....	47
3.2.4.3. Određivanje proteolitičke aktivnosti	47
3.2.4.4. Analiza produkata razgradnje kazeina Tricin-SDS–PAGE.....	48
3.2.4.5. Identifikacija enzima proteolitičkog sustava pomoću MALDI-TOF/TOF..	49
3.2.4.6. Detekcija gena za proteinaze primjenom PCR metode	49
3.2.4.7. Određivanje fermentacijskih profila šećera pomoću API 50 CHL testa	50
3.2.4.8. Parametri fermentacije tijekom rasta u mlijeku.....	51
3.2.4.9. Kvantifikacija laktoze, laktata, acetata i diacetila	51
3.2.5. Sekvencioniranje cijelog genoma.....	52
3.2.6. <i>In vitro</i> ispitivanja adhezijskih svojstava na Caco-2 staničnoj liniji.....	53
3.2.7. Kolonizacijski potencijal autohtonih BMK <i>in vivo</i>	53
3.2.7.1. Priprema suspenzije bakterijskih stanica i kaniliranje štakora	53
3.2.7.2. Profiliranje mikrobiote fecesa štakora.....	54
3.2.8. Mikroinkapsulacija BMK u različitim matriksima	55
3.2.8.1. Mikroinkapsulacija bakterijskih stanica u κ-karagenanu	55

3.2.8.2. Mikroinkapsulacija bakterijskih stanica u kazeinu djelovanjem transglutaminaze	55
3.2.8.3. Mikroinkapsulacija bakterijskih stanica u alginatu	56
3.2.8.4. Mikroinkapsulacija u alginatu uz dodatak prebiotika.....	56
3.2.9. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica u alginatu	57
3.2.9.1. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica u alginatu s lioprotektorima.....	57
3.2.9.2. Preživljavanje mikrokroinkapsuliranih i liofiliziranih stanica BMK u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	57
3.2.9.3. Liofilizacija stanica <i>L. fermentum</i> D12 mikroinkapsuliranih u alginatu s prebiotičkim supstratima	58
3.2.9.4. Detekcija prisutnosti soja <i>L. fermentum</i> D12 u mikrokapsulama RAPD-PCR metodom	58
3.2.9.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	58
3.2.10. Kontrolirana fermentacija odabranim konzorcijem BMK	59
3.2.10.1. Analiza parametara kvalitete fermentiranih proizvoda	60
3.2.10.1.1. Određivanje prinosa i suhe tvari sušenog svježeg sira i sirutke	60
3.2.10.1.2. Mikrobiološka analiza fermentiranih proizvoda	61
3.2.10.1.3. Analiza kemijskih parametara u fermentiranim proizvodima	61
3.2.10.1.4. Analiza senzorskih svojstava fermentiranih proizvoda	61
3.2.10.2. Određivanje broja živih stanica mješovite starter kulture primjenom mikrobioloških metoda	62
3.2.10.3. Usporedba preživljavanja probiotičkih sojeva tijekom čuvanja tekuće sirutke liofiliziranog probiotičkog proizvoda na bazi sirutke.....	62
3.2.10.4. Karakterizacija ukupne DNA iz sira pomoću RAPD-PCR i DGGE-PCR metoda	63
3.2.10.5. Analiza bioaktivnih peptida.....	65
3.2.10.5.1. Identifikacija bioaktivnih peptida LC-MALDI-TOF/TOF metodom.	65
3.2.10.5.2. Relativna kvantifikacija bioaktivnih peptida LC-MRM-MS metodom	66
3.2.11. Statistička analiza	66
4. REZULTATI.....	67
4.1. Odabir sojeva producenata funkcionalnih biomolekula	67
4.1.1. Plantaricini autohtonih BMK kao funkcionalne biomolekule	67

4.1.2. Egzopolisaharidi autohtonih sojeva BMK kao funkcionalne biomolekule.....	75
4.1.3. Proteolitička aktivnosti BMK za biosintezu peptida kao funkcionalnih biomolekula.....	86
4.1.3.1. Analiza fermentacijske aktivnost odabranih sojeva BMK	93
4.1.4. Potpuno sekvencioniranje genoma autohtonih BMK.....	96
4.1.5. <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> ispitivanje učinkovitosti biomolekula funkcionalnih starter kultura.....	104
4.2. Tehnološki aspekti primjene funkcionalnih starter kultura	108
4.3. Proizvodnja funkcionalnih fermentiranih proizvoda definiranim konzorcijem.....	116
5. RASPRAVA.....	129
5.1. Karakterizacija sojeva producenata i njihovih biomolekula.....	129
5.2. Tehnološki aspekti primjene BMK sa svojstvom sinteze specifičnih biomolekula	138
5.3. Primjena BMK kao funkcionalnih starter kultura za fermentaciju inovativnih proizvoda	142
6. ZAKLJUČCI	148
7. LITERATURA	149
8. PRILOZI	180

1. UVOD

Recentna istraživanja u području probiotika su usmjerena na ciljanu karakterizaciju „novih“ funkcija sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK), poput biosinteze bakteriocina i egzopolisaharida (EPS-a), koje sintetiziraju većinom bakterije iz roda *Lactobacillus*. Karakterizacija funkcionalnosti probiotika u domaćina utemeljena je na naglom razvoju metodologija, prioriteto omičkih pristupa te primjene funkcionalne genomike i metagenomike za razvoj nove generacije probiotika kao živih bioterapijskih pripravaka (*engl.* live biotereupentic products, LBPs). Mehanizmi djelovanja probiotičkih sojeva su specifični i nisu još do kraja razjašnjeni. Komponente stanične stijenke i metaboliti koji se izlučuju u vanstanički prostor istražuju se kao ključni ligandi u interakciji s receptorima koji pri tome induciraju signalne reakcije, a očituju se probiotičkim djelovanjem (Balzaretta i sur., 2017). Dosadašnje spoznaje upućuju na važnost specifičnih biomolekula u funkcionalnosti probiotičkih bakterija. Kao funkcionalne biomolekule probiotičkih sojeva prepoznate su stanične strukture poput pila, površinskih S-proteina, egzopolisaharida, lipoteihonskih kiselina, ali i metaboliti nižih molekularnih masa poput bakteriocina (Fontana i sur., 2019; Castro-Bravo i sur., 2018; Baptista i sur., 2018; Chikindas i sur., 2017). Sinteza bakteriocina, može se indirektno smatrati probiotičkim svojstvom zbog mogućeg trostrukog djelovanja: antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama što omogućava kolonizacijsku i kompeticijsku prednost soja producenta u intestinalnom mikrookolišu i autoindukcija proizvodnje bakteriocina (*engl.* quorum sensing) u funkciji signalnih molekula (Cotter i sur., 2013). Bakteriocini imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervansi, no u novije vrijeme se istražuje i njihova potencijalna primjena kao terapijskih molekula (Bali i sur., 2016) i alternativa antibioticima (Chikindas i sur., 2017; Mills i sur., 2017). Stoga će se u ovom doktorskom radu ispitati bakteriocinska aktivnost odabranih autohtonih sojeva BMK prema patogenim Gram-pozitivnim bakterijama, *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™ i *Staphylococcus aureus* 3048, što je jedan od važnijih selekcijskih kriterija za odabir probiotičkih i funkcionalnih starter kultura.

BMK su među najčešće definiranim probiotičkim sojevima koji posjeduju staničnu stijenku izgrađenu od tankog sloja peptidoglikana isprepletenog s proteinima, teihonskim kiselinama i polisaharidima koji mogu imati funkciju mikrobnih molekularnih obrazaca koje specifično prepoznaju receptori definirani kao MAMP (*engl.* microbe-associated molecular patterns). Upravo EPS-i osim doprinosa tehnološkim svojstvima fermentiranog proizvoda i industrijske primjene, pridonose i korisnim učincima probiotičkih bakterija poput imunomodulacijskog djelovanja ili

antiviralne aktivnosti, koji su vrlo specifični s obzirom na bioraznolikost mikrobnih sojeva koji ih sintetiziraju (Balzaretta i sur., 2017). Stoga se biomolekule EPS-a posebice iz roda *Lactobacillus* često istražuju zbog moguće funkcionalne uloge na zdravlje intestinalnog trakta (IT) domaćina. Odlikuju se raznolikošću u kemijskom sastavu i strukturi što utječe na njihov specifični učinak u otpornosti stanica producenta u nepovoljnim uvjetima mikrookoliša, u adhezijskim svojstvima i imunomodulacijskom učinku. Prepoznata je i funkcionalna uloga u snižavanju razine kolesterola, te antimikrobni učinak. Mogu biti prebiotički supstrati u debelom crijevu te na taj način selektivno poticati rast poželjnih sudionika intestinalne mikrobiote, što utječe na sastav intestinalne mikrobiote i usmjeravanje metabolizma prema sintezi korisnih metabolita poput kratkolančanih masnih kiselina. Stoga će se u svrhu definiranja moguće funkcionalne uloge egzopolisaharida provesti analiza strukture EPS-a soja producenta te će biti ispitan učinak ovih površinskih makromolekula u zaštiti stanica tijekom stresnih uvjeta liofilizacije, autoagregacije soja producenta, adhezije bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa, glikoprotein mucin i Caco-2 stanice.

Enzimska aktivnost probiotičkih bakterija, bilo u smislu sinteze funkcionalnih biomolekula primjerice djelovanjem proteaza ili specifičnog katalitičkog djelovanja poput laktaze ili hidrolaze žučnih soli prepoznate su kao čimbenici molekularnih mehanizama probiotičkog djelovanja (Lebeer i sur., 2018; Pessione i Cirrincione, 2016). Spoznaje nedavnih istraživanja upućuju na važnost ovih biomolekula kao okosnice za molekularne mehanizme probiotičkog djelovanja zbog posredovanja u molekularnim interakcijama probiotičkih bakterija s domaćinom (Lebeer i sur., 2018). Stoga, združena primjena sojeva koji sintetiziraju bioaktivne molekule *in situ* može doprinjeti razvoju novih fermentiranih proizvoda s poboljšanim nutritivnim svojstvima i dodanom funkcionalnom vrijednošću proizvoda, s ciljem isključivanja primjene prehrambenih konzervansa ili aditiva, što predstavlja prirodnu alternativu, privlačnu suvremenim potrošačima uz postizanje ekonomskog učinka značajnog u biotehnološkoj industriji. S pretpostavkom moguće sinteze bioaktivnih peptida, hidrolizom proteina prisutnih u autohtonom sušenom svježem siru djelovanjem BMK, ispitat će se proteolitička aktivnost odabranih sojeva, Ansonovom metodom i Tricin-SDS-PAGE metodom. Geni za proteinaze detektirat će se pomoću PCR metode sa specifičnim početnicama za ekspresiju proteinaza, a identifikacija i kvantifikacija proteina koji su dio proteolitičkog sustava provest će se MALDI-TOF/TOF analizom.

Sojevi BMK, producenti bakteriocina, odnosno egzopolisaharida i bioaktivnih peptida, identificirat će se pristupom sekvencioniranja čitavog bakterijskog genoma (*engl.* whole genome sequencing, WGS), a funkcionalna anotacija genoma će se provesti primjenom RAST (*engl.* rapid annotations using subsystems technology) servera. Komparativnom genomskom analizom, definirat će se nakupine gena odgovorne za ekspresiju ciljanih biomolekula (*engl.* plantaricin gene cluster ili *engl.* exopolysaccharide gene cluster). Karakteristike potpuno sekvencioniranih genoma će se analizirati primjenom PATRIC baze podataka. Za *in silico* identifikaciju biosinteze bakteriocina primjenit će se računalni programski alat BAGEL 4.0 kako bi se definirali svi potencijalni geni uključeni u biosintezu, potencijalni geni za autoimunost soja producenta te za transport bakteriocina. Trodimenzionalne strukture i fizikalna svojstva bakteriocina predvidjet će se modeliranjem pomoću metode za prepoznavanje sličnosti dostupne na SWISS-MODEL i HeliQuest poslužiteljima. Tako okarakterizirani sojevi BMK, s poželjnim svojstvima sinteze biomolekula egzopolisaharida, bakteriocina i bioaktivnih peptida, će biti ispitani *in vitro* primjenom Caco-2 stanične linije i na *in vivo* modelu pokusnih životinja, obzirom na kolonizacijski potencijal i učinak na sastav intestinalne mikrobiote. Analiza sastava intestinalne mikrobiote provest će se naprednim sekvencioniranjem pomoću Illumina's MiSeq 2500 i obradom podataka pomoću bioinformatičkog računalnog alata QIIME 2™. Kako bi odabrane funkcionalne starter kulture u što većem broju došle do ciljnog mjesta djelovanja, debelog crijeva, gdje *in situ* proizvode okarakterizirane biomolekule, provest će se tehnološki procesi mikroinkapsulacije u različitim vrstama polimernih nosača i liofilizacije uz dodatak različitih lioprotektora te dodatak prebiotičkih supstrata kako bi se u konačnom pripravku funkcionalne starter kulture zadržao visok broj metabolički aktivnih bakterijskih stanica tijekom biotehnoške proizvodnje, transporta odnosno skladištenja. Nakon karakterizacije funkcionalne uloge pojedinih biomolekula u njihovoj probiotičkoj aktivnosti, odabrani sojevi BMK biti će združeni u dizajniran konzorcij BMK koji će se primijeniti za proizvodnju sušenog svježeg sira s dodanom funkcionalnom vrijednošću, a pri tome će se sirutka, koja zaostaje kao nusproizvod tijekom fermentacije, iskoristiti za proizvodnju inovativnog funkcionalnog napitka. Također će se odrediti parametri važni tijekom proizvodnje sira, i to utrošak laktoze te sinteza mliječne i octene kiseline tekućinskom kromatografijom, a koncentracija diacetila primjenom plinske kromatografije. Istražiti će se i potencijalna prisutnost i kvantifikacija bioaktivnih peptida nastalih proteolitičkom aktivnošću odabranih starter kultura u proizvedenim fermentiranim proizvodima LC-MALDI-TOF/TOF i LC-MRM-MS metodama. Genomska

stabilnost i reizolacija primijenjenih starter kultura, te raznolikost dominantne spontano prisutne mikrobne populacije BMK će se ustanoviti primjenom RAPD-PCR i DGGE-PCR molekularnih tehnika te sekvencioniranjem Illumina's MiSeq 2500 i obradom podataka pomoću bioinformatičkog računalnog alata QIIME 2™.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline kao probiotici

Bakterije mliječne kiseline su skupina Gram-pozitivnih bakterija koje su dio autohtone bakterijske populacije u fermentiranim proizvodima, te se primjenjuju kao starter kulture u prehrambenoj industriji. Određene vrste ove skupine bakterija, uglavnom one koje pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* su prirodno prisutne ili se primjenjuju u industrijskoj proizvodnji funkcionalne hrane (Linares i sur., 2017). BMK se kroz povijest usko povezuju s ljudskom primjenom zbog svojih poželjnih pozitivnih učinaka na fermentiranu hranu u kojoj se nalaze, uključujući poboljšanje senzorskih svojstava te sigurnost i kvalitetu samog proizvoda (Holzapfel i Wood, 2014). Glavni proizvod fermentacije ugljikohidrata BMK je mliječna kiselina pri čemu je metabolički put razgradnje glukoze homofermentativan, no kod pojedinih sojeva može biti i heterofermentativan jer uz mliječnu kiselinu, nastaju i drugi produkti metabolizma, etanol i ugljikov dioksid. Uslijed proizvodnje mliječne i drugih organskih kiselina, dolazi do snižavanja pH vrijednosti okolnog medija, što ima vrlo važnu ulogu u inhibiciji patogena (Šušković i sur., 2010).

Prema definiciji, probiotici su jedna ili više kultura živih mikroorganizama koje djeluju korisno na domaćina, bilo čovjeka ili životinju, tako što poboljšavaju svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava (Šušković, 1996). Probiotici imaju ulogu u uspostavljanju ravnoteže narušene intestinalne mikrobiote, regulirajući odgovarajuću intestinalnu funkciju, pri čemu mogu biti učinkoviti u prevenciji ili tretmanu nekoliko gastrointestinalnih poremećaja kao što su akutna infektivna dijareja, dijareja kao posljedica terapije antibioticima, sindrom iritabilnog crijeva ili Chronova bolest (Abraham i Quigley, 2020). Pojedini probiotički sojevi izolirani iz fermentiranih mliječnih proizvoda iskazuju imunomodulatorni učinak poput *Lacticaseibacillus casei* CRL431, imaju funkciju snižavanja razine kolesterola u serumu poput *Limosilactobacillus reuteri* NCIMB 30242 i antihipertenzivni učinak poput *Lactiplantibacillus plantarum* TENSIA™ (Aragon i sur., 2014; Jones i sur., 2012). Prilikom odabira potencijalnih probiotičkih sojeva potrebno je ispitati da li odabrani soj ispunjava niz selekcijskih kriterija, prikazanih na slici 1. Jedan od tih kriterija je da minimalna efektivna dnevna količina koju je potrebno konzumirati bude 10^6 - 10^9 živih mikrobnih stanica iako to ovisi o soju i namirnici u kojoj se nalaze (Watson i Preedy, 2015).

Sigurnost

- humano ili životinjsko porijeklo
- izolirani iz gastrointestinalnog trakta zdravih pojedinaca
- povijest sigurne upotrebe
- točna fenotipska i genotipska identifikacija
- bez podataka o povezanosti s infektivnim bolestima
- bez podataka o sposobnosti cijepanja soli žučnih kiselina
- bez nuspojava
- odsutnost gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju

Funkcionalnost

- sposobnost kompeticije s mikrobiotom i mikrobnim vrstama (uključujući srodne vrste) prisutnim u intestinalnom ekosustavu
- mogućnost preživljavanja, održavanja metaboličke aktivnosti i rasta na ciljanom mjestu
- otpornost na žučne soli i enzime
- otpornost na nisku pH vrijednost
- antagonistička aktivnost prema patogenim mikroorganizmima (npr. *H. pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*)
- otpornost na bakteriochine i kiseline drugih sudionika intestinalne mikrobiote
- adhezija i sposobnost kolonizacije određenih mjesta unutar organizma domaćina i odgovarajuća stopa preživljavanja u gastrointestinalnom sustavu

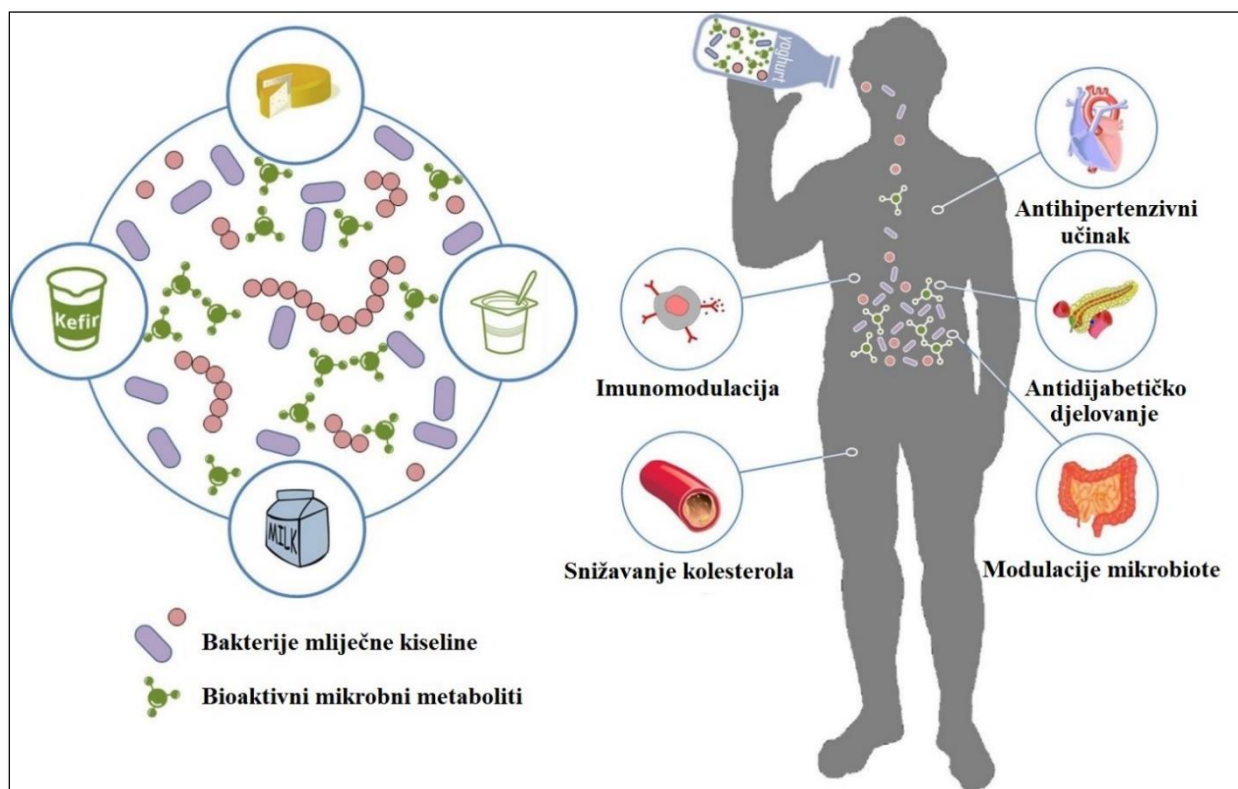
Tehnološka iskoristivost

- jednostavna proizvodnja velike količine biomase i visoka produktivnost kultura
- vijabilnost i stabilnost željenih svojstava probiotičkih bakterija tijekom zamrzavanja, liofilizacije, pripreme i distribucije probiotičkih produkata
- visoka stopa preživljavanja u gotovim proizvodima (u aerobnim i mikroerofilnim uvjetima)
- jamstvo poželjnih senzorskih svojstava gotovog proizvoda (u slučaju prehrambene industrije)
- genetička stabilnost
- otpornost na bakteriofage

Slika 1. Selekcijski kriterij za odabir probiotičkih kultura (prilagođeno prema EFSA, 2005; FAO/WHO, 2002; Šušković, 1996)

Fermentirana hrana je glavni izvor probiotičkih kultura (slika 2), osobito fermentirani mlječni proizvodi (Giraffa, 2012). Sir zbog svojih specifičnih kemijskih i fizikalnih karakteristika, koji za razliku od fermentiranog mlijeka ima veću pH vrijednost, nižu titracijsku kiselost, veći puferski kapacitet, veći sadržaj masti, veću dostupnost hranjivih tvari, niži sadržaj kisika i gušću teksturu, predstavlja pogodan medij za primjenu probiotičkih kultura. Ovi uvjeti povećavaju tolerantnost

prema niskim pH vrijednostima i preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt (Karimi i sur., 2011).



Slika 2. Korisni učinci probiotičkih BMK i bioaktivnih metabolita u fermentiranim mliječnim proizvodima na zdravlje čovjeka (Linares i sur., 2017; uz dopuštenje izdavača)

Dodatno, različite vrste prebiotičkih supstrata stimuliraju rast bakterija prisutnih u debelom crijevu (Chung i sur., 2016). Prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane koji korisno djeluju na zdravlje domaćina selektivom stimulacijom rasta i/ili aktivnosti jedne bakterijske vrste ili ograničenog broja poželjnih bakterijskih vrsta već prisutnih u debelom crijevu (Šušković, 1996). Fermentacijom prebiotičkih supstrata u debelom crijevu nastaju kratkolančane masne kiseline (*engl.* short chain fatty acids, SCFA) koje među svojim brojnim ulogama sudjeluju i u zaštiti od patogenih bakterija snižavanjem intestinalne pH vrijednosti (Crittenden i Playne, 2009). Da bi se pojedini dodatak prehrani smatrao prebiotikom ne smije biti probavljiv ili barem djelomično probavljiv u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta, te otporan na kisele uvjete koji prevladavaju u želucu i djelovanje probavnih enzima (Maccfarlane i sur., 2008). S obzirom na strukturu različite su vrste prebiotika.

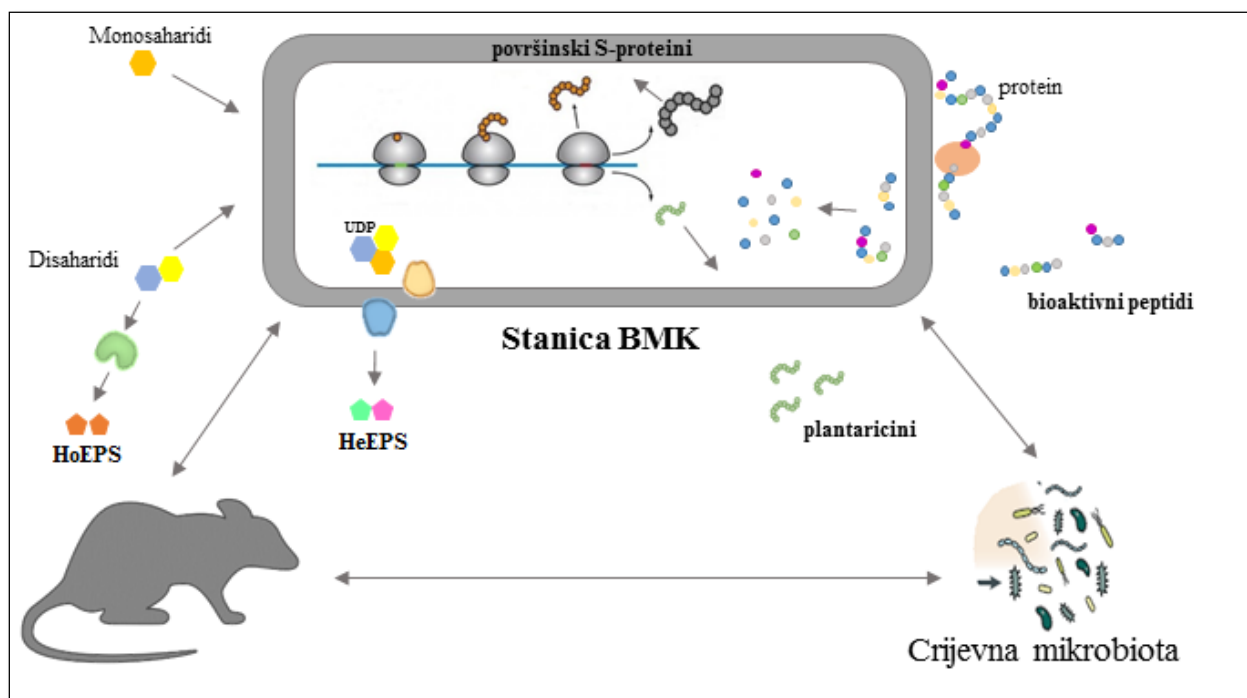
Razlikuju se poliloli odnosno šećerni alkoholi (ksilitol, sorbitol, manitol), disaharidi (laktuloza, laktitol), oligosaharidi (rafinosa, sojini oligosaharid, fruktooligosaharidi (FOS), galaktooligosaharidi (TOS-transgalaktozilirani oligosaharid), drugi ne-probavljivi poligosaharidi (palatinoza, izomalto-oligosaharidi, laktosukroza) i polisaharidi (inulin i rezistentni škrob).

Potreba potrošača za tradicionalnim fermentiranim mliječnim prehrambenim proizvodima obogaćenim probiotičkim bakterijama i prebiotičkim supstratima se povećava zbog njihove dokazane gastronomske kvalitete i pozitivnih fizioloških učinaka na ljudsko zdravlje. Međutim, strogi propisi o sigurnosti hrane dovode do smanjenja fleksibilnosti proizvodnje, homogenosti u proizvodnji hrane, gubitka raznolikosti hrane i tradicionalne specifičnosti. Stoga je od presudne važnosti priprema dobro definiranih funkcionalnih autohtonih starter kultura za proizvodnju tradicionalnih fermentiranih mliječnih proizvoda, kao što su različite vrste sireva u kontroliranim uvjetima, uz primjenu standardizirane tradicionalne tehnologije (Terzić-Vidojević i sur., 2015).

2.2. Funkcionalne biomolekule probiotičkih bakterija kao postbiotici

Sve veće zanimanje potrošača za zdravim načinom života te prirodnim proizvodima koji promoviraju zdravlje potaknulo je proizvodnju funkcionalnih mliječnih proizvoda, s obogaćenim bioaktivnim dodacima i prirodno prisutnim mikroorganizmima tijekom fermentacije mlijeka (Linares i sur., 2017). BMK se tradicionalno primjenjuju kao starter kulture, no osobito je značajna biotehnološka primjena roda *Lactobacillus* kao probiotičkih ili funkcionalnih starter kultura (Alvarez-Siero i sur., 2016). U novije vrijeme znanstvena zajednica usmjerena je na razvoj živih bioterapijskih pripravaka što podrazumijeva razvoj nove generacije probiotika, koji se primjenjuju, kao živi lijekovi. Iako su brojna istraživanja usmjerena na praktične, *in vitro* rezultate s probioticima, detaljni mehanizmi koji su temelj za dokazivanje pozitivnih učinaka probiotičkih bakterija *in vivo* još uvijek nisu razjašnjeni. U prilog razjašnjavanju preciznih mehanizama probiotičkog djelovanja ide razvoj funkcionalne genomike i metagenomike uz stalno povećanje broja potpuno sekvencioniranih genoma probiotičkih sojeva, što pridonosi definiranju ključnih biosintetskih putova i molekularnih mehanizama probiotičkog djelovanja. Mehanizmi probiotičkog djelovanja su specifični za soj i nisu još do kraja razjašnjeni, a dosadašnje spoznaje upućuju na važnost specifičnih biomolekula u molekularnim mehanizmima ovih bakterija, koje nazivamo postbionicima. Sintetiziraju ih funkcionalne starter kulture u samom fermentiranom

proizvodu ili ih nakon konzumacije probiotičke bakterije mogu proizvesti *in situ* u IT-u domaćina. Primjeri takvih funkcionalnih biomolekula koje sintetiziraju probiotičke bakterije su površinski S-proteini, pili, lipoteihonske kiseline, egzopolisahardi (EPS-i), bakteriocini te metaboliti nastali enzimatskim djelovanjem probiotičkih bakterija poput bioaktivnih peptida (slika 3), ali i pojedini metaboliti vezani uz sintezu triptofana i histamina te regije DNA bogate CpG dinukleotidnim sekvencama nazvane CpG otoci, no za funkcionalnost probiotičkih sojeva mogu biti značajne i njihove enzimatske aktivnost ostvarene djelovanjem hidrolaza žučnih soli ili primjerice laktaze (Baptista i sur., 2018; Castro-Bravo i sur., 2018; Lebeer i sur., 2018; Chikindas i sur., 2017).



Slika 3. Potencijalni funkcionalni učinak probiotičkih bakterija koji proizlazi iz interakcija s domaćinom posredovanim funkcionalnim biomolekulama poput bakteriocina, egzopolisaharida, površinskih S-proteina, te proteazne aktivnosti na molekularnoj razini *in vivo* (prilagođeno prema Butorac i sur., 2020)

2.2.1. Bakteriocini probiotičkih bakterija

Većinu bakteriocina probiotičkih sojeva sintetiziraju upravo bakterije roda *Lactobacillus* (Hegarty i sur., 2016), iako ih proizvode i BMK roda *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*. Sinteza bakteriocina može se indirektno smatrati probiotičkim svojstvom koje se očituje kroz tri moguća mehanizma djelovanja: antimikrobnim djelovanjem prema patogenim bakterijama, omogućavanjem kompeticijske prednosti soja producenta u intestinalnom mikrookolišu i autoindukcijom proizvodnje bakteriocina (*engl.* quorum sensing) u funkciji signalnih molekula (Cotter i sur., 2013). Bakteriocini su antimikrobni ribosomski sintetizirani peptidi/proteini s bakteriocidnim i/ili bakteriostatskim djelovanjem prema srodnim Gram-pozitivnim bakterijama, a sam soj producent nije osjetljiv na proizvedeni bakteriocin (Hegarty i sur., 2016). Tradicionalno je prepoznata njihova primjena kao biokonzervansa za sprječavanje kontaminacije patogenim bakterijama poput *Listeria monocytogenes* u hrani, te su prepoznati kao učinkovita alternativa raznim kemijskim postupcima koji mogu uzrokovati promjene sastava, nutritivnih i organoleptičkih svojstava hrane koji mogu imati štetan učinak na zdravlje čovjeka. Jedno od važnih funkcionalnih svojstava probiotičkih bakterija je antimikrobno djelovanje koje podrazumijeva sintezu antimikrobnih molekula, prema tome i bakteriocina, što soju producentu omogućuje kompetitivnu prednost tijekom kolonizacije i kompeticije u IT-u. Osim njihove primjene kao prirodnih konzervansa za prehrambenu industriju, istražuje se i potencijalna primjena bakteriocina kao terapijskih molekula, odnosno primjena probiotičkih sojeva producenata ovih biomolekula kao novih terapijskih strategija s ciljem sprječavanja infekcija patogenim sojevima uzročnika različitih poremećaja u IT-u (Bali i sur., 2016). Obzirom na učestalu pojavu širenja antibiotske rezistencije, zahvaljujući njihovom inhibicijskom djelovanju, bakteriocinske molekule se istražuju i kao alternativa antibioticima (Chikindas i sur., 2017; Mills i sur., 2017). Stoga, upotreba bakteriocina koje sintetiziraju BMK, predstavlja alternativnu antimikrobnu strategiju u borbi protiv antibiotske rezistencije (Šušković i sur., 2010). Prvu klasifikaciju bakteriocina koje proizvode BMK predložio je Klaenhammer (1993), a sve kasnije podjele se zaničaju na njoj. Podjela bakteriocina koje sintetiziraju BMK utemeljena je na njihovoj primarnoj strukturi, molekularnoj masi, posttranslacijskim modifikacijama i genetskim karakteristikama, no trenutno ne postoji njihova jedinstvena klasifikacijska podjela. Razlikuju se četiri klase bakteriocina, dok ih neki autori dijele i na tri, iako postoje jako male razlike u opisu među pod-klasama. Prva klasa

bakteriocina su mali (< 5 kDa), termostabilni peptidi, nazvani lantibiotici. Druga klasa bakteriocina su također mali (< 10 kDa), termostabilni, nemodificirani, kationski, hidrofobni peptidi, a podijeljeni su na klasu IIa i IIb. Klasa IIa sadrži peptide slične pediocinu (*engl.* „pediocin-like“), koji su aktivni prema bakterijama roda *Listeria* (Perez i sur., 2014). Bakteriocini klase IIb, kako bi iskazali svoje antimikrobno djelovanje, zahtijevaju sinergističku aktivnost dva komplementarna peptida, poput plantaricina A, EF i JK (Butorac i sur., 2020; Diep i sur., 2009a). Bakteriocini klase III su termolabilni proteini većih molekulskih masa (> 30 kDa), a glavni predstavnik je helveticin J.

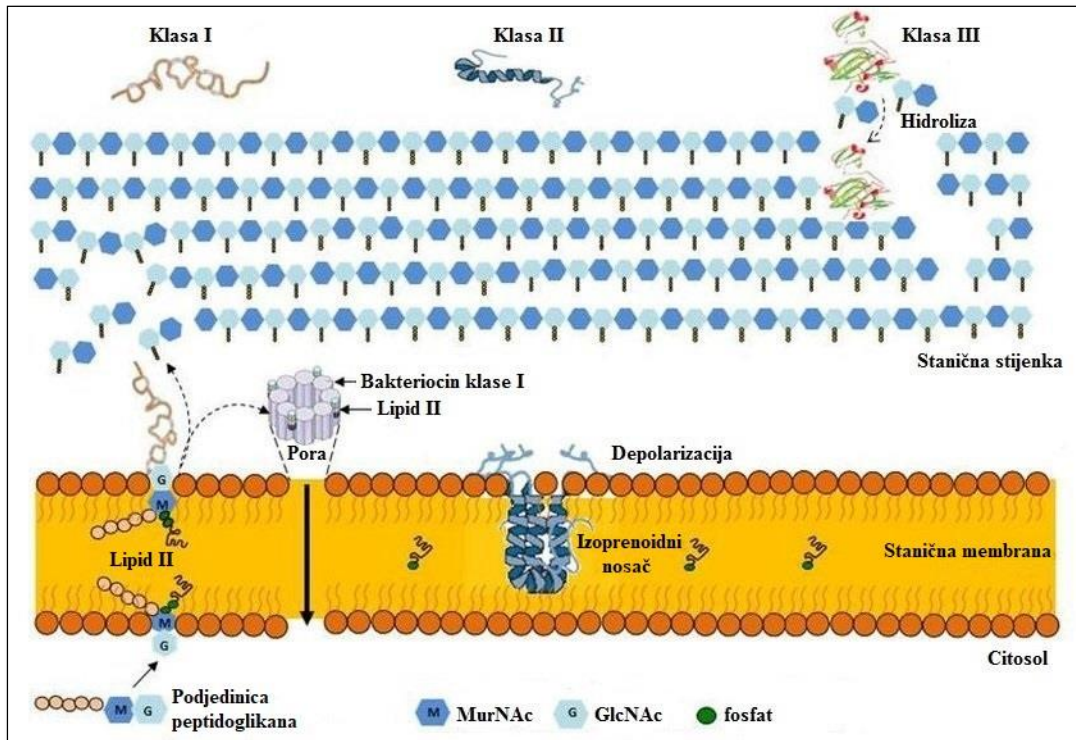
Biosinteza bakteriocina razlikuje se ovisno o soju, te se može optimirati uvjetima uzgoja s obzirom da se sintetiziraju u vrlo niskim koncentracijama u fiziološkim uvjetima. Općenito, geni koji kodiraju za proizvodnju bakteriocina i imunost su organizirani u operonske klastere, a mogu se nalaziti na kromosomima i pokretnim genetičkim elementima, kao što su transpozoni i plazmidi. Novo-sintetizirani bakteriocini sadrže signalnu sekvencu na N-terminalnom kraju, koja se tijekom translokacije u izvanstanični prostor modificira enzimima kodiranim na genima unutar zajedničke nakupine gena za biosintezu bakteriocina. Proizvodnja bakteriocina je regulirana međustaničnom komunikacijom-autoindukcijom (*engl.* quorum sensing), mehanizmom pomoću autoinducirajućih peptida (Chanos i Mygind, 2016). Quorum sensing je izraz koji opisuje regulaciju ekspresije gena koja je posredovana komunikacijom među stanicama, kada je postignuta njihova odgovarajuća gustoća. Komunikacija je omogućena direktnim kontaktom među stanicama ili pomoću malih molekula glasnika, koje su proizvedene i izmjenjene među stanicama (Williams i sur., 2007). Indukcija biosinteze bakteriocina primjenom QS je identificirana kod klase I (lantibiotici) i klase II (*engl.* „pediocin-like“) bakteriocina BMK. U proizvodnju lantibiotika je uključen dvokomponentni regulatorni sustav, odnosno histidin kinaza, regulator odziva i induktor (antimikrobni peptid). Molekula bakteriocina se veže na transmembransku histidin kinazu soja producenta i uzrokuje aktivaciju i fosforilaciju regulatora odziva koji uzrokuje inicijaciju transkripcije gena uključenih u ekspresiju bakteriocina (Kleerebezem, 2004). Sličan mehanizam indukcije sinteze bakteriocina uočen je i kod tzv. „pediocin-like“ bakteriocina, odnosno trikomponentnog regulatornog sustava koji se sastoji od peptidnog induktora, transmembranske histidin kinaze i citosolnog regulatora odziva. U ovom slučaju, signalni peptid ima ulogu u indukciji biosinteze bakteriocina, nasuprot dvokomponentnog regulatornog sustava, gdje molekula bakteriocina djeluje kao induktor. Gen za peptidni induktor se nalazi blizu gena koji kodira za strukturni bakteriocin, i eksprimira se izvan

stanice u malim koncentracijama. Kada je određeni „quorum“ postignut, odnosno kada je koncentracija peptidnog induktora postignuta u dovoljnoj količini, ekstracelularni dio histidin kinaze se aktivira procesom fosforilacije. Nakon aktivacije histidin kinaze, regulator odziva koji se nalazi su citosolu stanice je transfosforiliran, što dovodi do njegovog vezanja na specifične promotore koji su odgovorni za ekspresiju bakteriocina i njegovog induksijskog faktora (Belguesmia i sur., 2011; Drider i sur., 2006). Prva QS regulacija kod laktobacila je dokazana na plantaricinu A, sakacinu A i sakacinu P, kod kojih je plantaricin A izoliran iz *L. plantarum* C11 (Nissen-Meyer i sur., 1993).

Prema Diep i sur. (1996) genom soja *L. plantarum* C11 sadrži 5 različitih plantaricin A inducirajućih operona: *plnABCD*, *plnEFI*, *plnJKLR*, *plnMNOP* i *plnGHSTUV*. Operoni *plnEFI* i *plnJKLR* kodiraju za dva različita plantaricina PlnEF i PlnJK, od koji svaki sadrži dva peptida, te odgovarajuće proteine odgovorne za imunost soja producenta na vlastiti plantaricin (Butorac i sur., 2020; Ekblad i sur., 2016; Oppegård i sur., 2016). Regulatorni operon *plnABCD* sudjeluje u regulaciji ekspresije svih gena na *pln* lokusu. Ovaj operon kodira za inducirajući peptid plantaricin A (PlnA) koji je zapravo induksijski signal za proizvodnju bakteriocina (Diep i sur., 2009b). Operon *plnMNOP* sadrži gen *plnN*, koji kodira za prekursor plantaricina N. Nakon *plnN* gena, slijedi *plnO* gen koji kodira za polipeptid. Imunosni proteini na ovom operonu su kodirani sa genima *plnM* i *plnP*. Konačno, *plnGHSTUVW* operon sadrži gene odgovorne za procesiranje i ekstracelularni transport bakteriocina i drugih proteina s još nepoznatim funkcijama, uključenih u sintezu bakteriocina. Pretraživanjem homologije s drugim genima, otkriveno je da *plnG* i *plnH* geni kodiraju za proteine koji su dio dvo-proteinske obitelji, tzv. ABC transporteri i njihovi pomoćni proteini. Slični *pln* genski klasteri su prisutni i u drugim *L. plantarum* sojevima, kao što su WCFS1 (Kleerebezem i sur., 2003), NC8 (Maldonado i sur., 2003), J23 (Rojo-Bezares i sur., 2008), J51 (Navarro i sur., 2008), V90 (Diep i sur., 2009b) i I-UL4 (Tai i sur., 2015).

Većina bakteriocina koje proizvode BMK su kationski peptidi jer sadrže u strukturi aminokiseline lizina, arginina i histidina, hidrofobne prirode zbog prisutnosti alanina, valina, leucina, izoleucina, prolina, metionina, fenilalanina i triptofana te amfifilnih svojstava (Diep i Nes, 2002). Iz navedenih svojstava proizlazi i njihova aktivnost kada iskazuju djelovanje na citoplazmatsku membranu bakterijske stanice, gdje se pozitivno nabijeni proteini vežu na negativno nabijene fosfolipide u membrani stanice, dok je prolaz bakteriocina kroz membranu omogućen zbog njihove amfifilne strukture.

Klasa I i klasa II bakteriocina su aktivni u kiselim i neutralnim uvjetima, ali se inaktiviraju djelovanjem proteaza, uključujući tripsin i kimotripsin iz gušterače i pepsin iz želuca, iako podnose ekstremne pH vrijednosti, visoke temperature i koncentracije soli. Inhibicijsko djelovanje bakteriocina većine BMK utemeljeno je na formiranju pora u staničnoj membrani što dovodi do kolapsa protonske sile u bakterijskoj stanici. Gram-negativne bakterije su zaštićene od bateriocidnog djelovanja bakteriocina BMK jer u usporedbi sa staničnom stijenkom Gram-pozitivnih bakterija sadrže dodatnu vanjsku membranu. Prilikom interakcije s staničnom membranom, kationski N-terminalni kraj bakteriocina formira strukturu nalik ploči koja se veže na površinu stanice, dok hidrofobni C-terminalni kraj u obliku heliksa prodire kroz hidrofobnu strukturu stanične membrane i veže se na manoza fosfotransferaznu permeazu što rezultira propusnošću membrane. Pojedini bakteriocini koji pripadaju klasi I imaju dvostruki mehanizam djelovanja. Prema jednom mehanizmu, vežu se na prekursor biosinteze peptidoglikana Lipid II koji omogućuje transport peptidoglikana iz citoplazme do stanične stijenke, i time uzrokuju smrt bakterijske stanice jer sprječava sintezu stanične stijenke bakterija. Imaju i mogućnost vezanja na Lipid II i ugradnje u staničnu membranu, pri čemu formiraju poru, što dovodi do lize i konačne smrti bakterijske stanice. Amfifilna struktura u obliku heliksa klase II bakteriocina omogućuje njihovu gotovo neometanu ugradnju u staničnu membranu osjetljivog mikroorganizma, što uzrokuje depolarizaciju membrane i smrt stanice. Bakteriocini klase III, odnosno bakteriolizini hidroliziraju staničnu stjenku Gram-pozitivnih bakterija, što uzrokuje smrt stanice (Alvarez-Cisneros i sur., 2011) (slika 4).



Slika 4. Mehanizam djelovanja bakteriocina bakterija mliječne kiseline (Alvarez-Cisneros i sur., 2011; uz dopuštenje autora)

2.2.2. Egzopolisaharidi probiotičkih bakterija

Pojedine BMK sintetiziraju EPS-e, visokomolekularne ugljikohidratne polimere koji se sastoje od monosaharidnih podjedinica međusobno povezanih glikozidnom vezom (Zeidan i sur., 2017). Glikanski polimeri mogu biti čvrsto vezani na površinu stanice pri čemu formiraju kapsularne polisaharide, mogu biti slabo vezani na ekstracelularnu površinu, ili potpuno izlučeni u okoliš stanice kao egzopolisaharidi. Kod bakterija, ovi polimeri imaju poseban značaj, jer imaju vrlo važnu ulogu u njihovoj interakciji s domaćinom (Poole i sur., 2018). Prema sastavu i mehanizmu sinteze, egzopolisaharidi se dijele na heteropolisaharide (HeEPS-e) i homopolisaharide (HoEPS-e), koji se sastoje od (razgranatih) ponavljajućih jedinica šećera i šećernih derivata (Zannini i sur., 2016). Postoje također i dodatne modifikacije šećernih lanaca, koje mogu imati pozitivan ili negativan učinak na fizikalno-kemijska i biološka svojstva EPS-a. Neke od njih su sulfonacija, fosforilacija, acetilacija i selenizacija (Zhou i sur., 2018).

Pojedini sojevi roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* imaju mogućnost sinteze EPS-a. Sojevi producenti EPS-a se mogu detektirati makroskopskim opažanjem bakterijskih kolonija poraslih na površini hranjive podloge pri čemu se uočavaju pravilne, glatke i sjajne kolonije, od kojih neke od njih imaju tzv. “ropy” fenotip, koji se očituje formiranjem dugih niti nakon doticanja kolonija. Prinos EPS-a prati ekspanzionalnu fazu soja producenta, dok u stacionarnoj fazi rasta nije uočena daljnja proizvodnja (Ismail i Nampoothiri, 2010). Prema literaturi, najveći prinos EPS-a ostvaruju mezofilni sojevi, *Lactobacillus rhamnasus* 9595M (1200 mg/L) i *Lactobacillus sakei* 0-1 (1375 mg/L) (Mozzi i sur., 2003).

Postoje četiri mehanizma sinteze EPS-a opisana kod bakterija: (i) Wzx/Wzy-ovisni put; (ii) ABC-transporter ovisni put; (iii) sintaza-ovisni put i (iv) ekstracelularna sinteza primjenom samo jednog proteina sukraze. Prilikom prva tri spomenuta puta, biosinteza EPS-a kreće iz molekula prekursora, odnosno aktiviranih šećera/šećerne kiseline koje se proizvode raznim reakcijama unutar stanice. Heteropolisaharidi se sintetiziraju Wzx/Wzy-ovisnim putem, dok se ABC-transporter ovisnim putem većinom sintetiziraju kapsularni polisaharidi, koji nisu pravi predstavnici egzopolisaharida jer su vezani na površinu stanice (Whitney i Howell, 2013). Kod Wzx/Wzy ovisnog puta, aktivirani šećeri se povezuju u specifičan slijed pomoću glikoziltransefraze na lipidnom nosaču u unutarnjoj membrani, dok se polimerizacija koja uključuje Wzy protein, odvija na vanjskoj membrani. Kod Wzx/Wzy-neovisnog puta (ABC-transporter ovisni put) polimerizacija se odvija na citoplazmatskoj strani unutarnje membrane. Za sintezu homopolisaharida se koristi sintaza ovisni put (Rehm, 2010) i ekstracelularna sinteza primjenom proteina sukraze. Sintaza ovisnim putem se cijeli polimerni lanac izlučuje kroz membranu i staničnu stijenku, tj. neovisan je o flipazi za translokaciju ponavljajućih jedinica. Polimerizacija i translokacija se odvija istovremeno samo uz pomoć proteina sintaze, membranski vezane glikozil transferaze. Koristi se za sintezu homopolimera kojima je potrebna samo jedna vrsta šećernog prekursora kao npr. kurdlan koji se od β -(1 \rightarrow 3) vezane glukoze ili celuloza koja se sastoji od β -(1 \rightarrow 4) vezane glukoze (Schmid i sur., 2015). Kod ekstracelularne sinteze, reakcija polimerizacije se odvija kao prijenos monosaharida iz disaharida saharoze u rastući polisaharidni lanac, primjenom enzima glikan sukraze (glikozidna hidrolaza).

Općenito, EPS-ni klaster organiziran je u operon veličine 11-22 kb, koji sadrži 13-23 specifične funkcionalne regije (Zeidan i sur., 2017). EPS-ni klasteri mogu biti smješteni na plazmidu ili na kromosomskoj DNA. Biosinteza HeEPS-a kontrolirana je genima koji kodiraju za

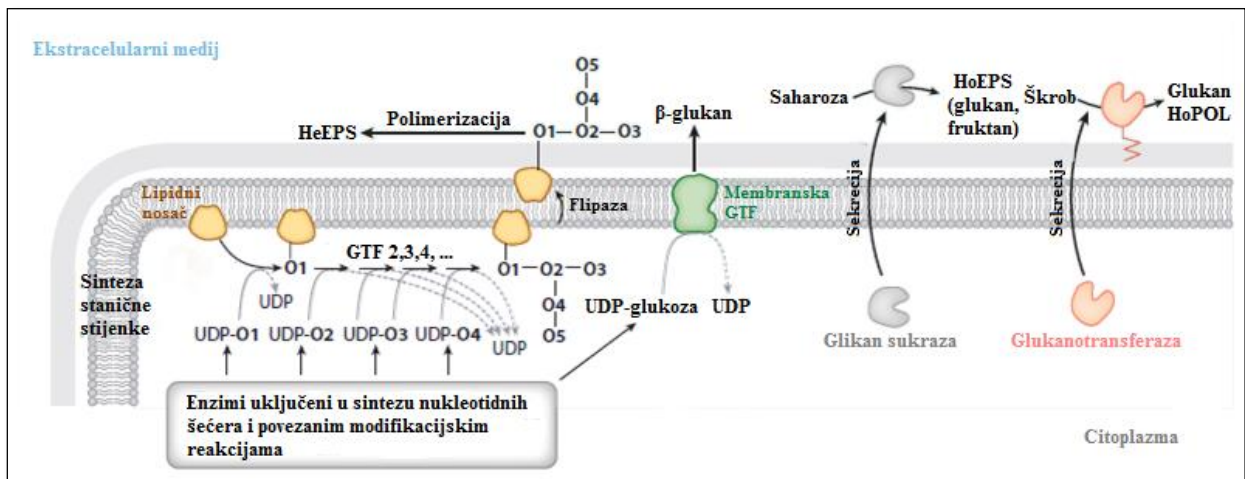
glikoziltransferazu, zajedno s genima uključenim u regulaciju, određivanje duljine lanca, polimerizaciju i eksport, koji su organizirani u zajednički operon i formiraju tzv. EPS-ni biosintetski klaster, dok enzimi koji sudjeluju u prva dva koraka sinteze većinom nisu kodirani na istoimenom klasteru. Velika raznolikosti HeEPS-a koje proizvode BMK su posljedica raznolikosti gena koji kodiraju za glikoziltransferaze (Zeidan i sur., 2017; Nourikyan i sur., 2015; Werning i sur., 2012). Kod mezofilnih BMK, kao što su npr. *Lactococcus* vrste, EPS-ni klasteri se nalaze na plazmidima, dok se kod termofilnih sojeva kao što su *Streptococcus* i *Lactobacillus*, nalaze na kromosomu (Mende i sur., 2016).

HeEPS-i se sastoje od više vrsta ponavljajućih monosaharidnih jedinica, najčešće D-glukoze, D-galaktoze i L-ramnoze, ali i drugi monosaharidi mogu biti prisutni, poput fruktoze, fukoze, manoze, N-acetilglukozidaza i glukuronske kiseline, kao i neke neugljikohidratne komponente fostatne ili acetilne skupine (London i sur., 2014; Werning i sur., 2012), pri čemu broj različitih monosaharidnih jedinica može varirati od dva do osam (Werning i sur., 2012). HeEPS-e proizvode različiti rodovi BMK, kao što su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium*. Heteropolisaharidi se sintetiziraju polimerizacijom šećernih-nukletidnih prekursora (UDP-glukoza i UDP-galaktoza) koji se proizvode unutar stanice, a čija funkcija nije samo proizvodnja EPS-a, već su uključeni i u sintezu drugih polisaharida (Welman i Maddox, 2003) (slika 5).

Sinteza HeEPS-a Wzx/Wzy-ovisnim putem se odvija u nekoliko faza (Yother, 2011):

- 1.) **Transport i fosforilacija monosaharida i disaharida (glukoza, galaktoza, laktoza).** Monosaharidi i disaharidi se unose u stanicu fosfotransferaznim sustavom (PTS) ili pomoću permeaza. Tijekom transporta PTS sustavom odvija se transport i fosforilacija, dok se aktivnošću permeaza odvija samo transport, a za fosforilaciju je odgovorna specifična kinaza (Boels i sur., 2001).
- 2.) **Formiranje šećernih nukleotida, odnosno aktivacija monosaharida.** Fosfoglukomutaza i galaktoza-1-fosfat uridiltransferaza posreduju prijelazu glukoza-6-fosfata i galaktoza-1-fosfata do glukoza-1-fosfata, koji se prevodi u UDP-glukozu, UDP-galaktozu i dTDP-ramnozu djelovanjem UDP-glukoza pirofosforilaze, UDP-galaktoza 4-epimeraze, dTDP-glukoza pirofosforilaze, dTDP-glukoza 4,6-dehidrataze i dTDP-4-dehidroramnoza 3,5-epimeraze (Laws i sur., 2001).

- 3.) **Sinteza ponavljajućih jedinica.** Pojedinačne ponavljajuće jedinice vezane na tzv. „undecaprenol diphosphate anchor (C55)“ u unutarnjoj membrani, se uzastopno povezuju pomoću glikoziltransferaza (Schmid i sur., 2015).
- 4.) **Translokacija ponavljajućih jedinica iz unutrašnosti na vanjsku površinu stanice.** Ponavljajuće jedinice se transportiraju u periplazmatski prostor ili na vanjsku membranu djelovanjem flipaze Wzx (Becker, 2015; Islam i Lam, 2014).
- 5.) **Polimerizacija ponavljajućih jedinica i otpuštanje lanca.** Ponavljajuće jedinice se povezuju u dugački polimerizacijski lanac pomoću Wzy proteina na vanjskoj membrani, a duljina lanca regulirana je proteinom koji regulira duljinu lanca (Islam i Lam, 2014; Cuthbertson i sur., 2009). Sintetizirani EPS se otpušta u okolni medij stanice.



Slika 5. Mehanizam sinteze heteropolisaharida (HeEPS-a), homopolisaharida (HoEPS-a) i β -glukana kod bakterija mliječne kiseline; GTF - glikoziltransferaza; UDP - uridin difosfat; O1-O5 - glikozid 1-glikozid 5 (Lynch i sur., 2018; uz dopuštenje autora)

Pri optimalnim uvjetima rasta HeEPS-i se sintetiziraju u rasponu od 150-600 mg/L, a molekularna masa im je u rasponu od 10^4 do 10^6 Da (Ryan i sur., 2015). Na prinos i molekularna svojstva HeEPS-a koje proizvode BMK, utječu brojni faktori, kao što su sastav medija (ugljik, dušik i anorganski izvori dušika), uvjeti rasta (pH vrijednost, temperatura i kisik) te vrijeme inkubacije (Zannini i sur., 2016). Kod BMK, HoEPS-i se sastoje od jedne vrste ponavljajućih jedinica monosaharida, D-glukoze ili D-fruktoze, zbog čega se i nazivaju glukani (α - i β -glukani), odnosno fruktani (β -fruktani). Sintetiziraju se ekstracelularno iz saharoze djelovanjem enzima glikan

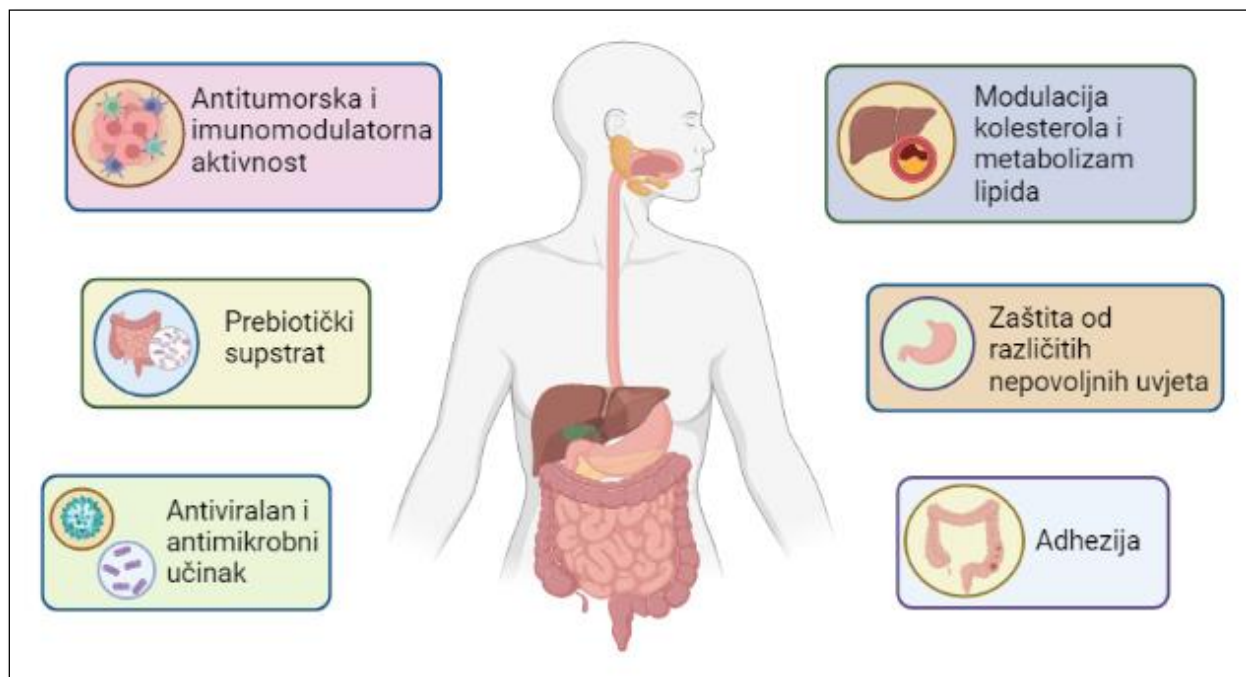
sukraze (Zeidan i sur., 2017; Zannini i sur., 2016). Homopolisaharide proizvode brojni rodovi BMK, uključujući *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella* (Dimopoulou i sur., 2016; van Hijum i sur., 2006). Daljnja klasifikacija HoEPS-a se zasniva na prevladavajućoj glikozidnoj ili fruktozidnoj vezi koja se nalazi u okosnici polimera. Dekstran i reuteran su α -glukani, dok kod dekstrana prevladava α -(1 \rightarrow 6), a kod reuterana α -(1 \rightarrow 4) veza među jedinicama glukoze. Slično tome, inulin i levan su fruktani povezani β -(2 \rightarrow 1) i β -(2 \rightarrow 6) vezama (Monsan i sur., 2001). Ekstracelularna sinteza homopolisaharida primjenom proteina sukraze je jednostavnija u usporedbi sa sintezom heteropolisaharida, jer ne uključuje šećerne nukleotidne prekursore i posredovana je enzimom glikan sukrazom koji je kodiran na jednom genu (Badel i sur., 2011). α -glukani HoEPS-a sintetizirani na ovaj način se razlikuju od β -glukana koje proizvode neki rodovi BMK, kao što su *Pediococcus*, *Oenococcus* i *Lactobacillus*. Proizvodnja β -glukana je slična proizvodnji HeEPS-a, jer se polimer sintetizira unutar stanice djelovanjem glikoziltransferaze koja koristi UDP-glukozu kao ponavljajuću jedinicu (Werning i sur., 2012). Većina BMK koje proizvode HoEPS-e, sadrže samo jednu glikan sukrazu, ali neke od njih sadrže više od jednog gena koji kodiraju za ovaj enzim, stoga ti sojevi mogu sintetizirati više od jednog tipa HoEPS-a. Molekulska masa HoEPS-a je veća od 10^6 Da (Ruas-Madiedo i sur., 2009), i proizvode se u većoj količini od HeEPS-a, u rasponu do 10 g po litri medija. Za primjenu u prehrani, potrebna je proizvodnja od 10–15 g/L, kako bi se osigurala ekonomska održivost, pri čemu je kao i kod HeEPS-a, za postizanje maksimalnog prinosa, potrebna optimizacija sastava medija i uvjeta uzgoja (Ruas-Madiedo i sur., 2009). Dodatno, kod sojeva *Lactobacillus reuteri*, identificiran je enzim koji umjesto saharoze kao donora glukoze koristi škrob i maltodekstrin za sintezu α -glukana. Enzim se nalazi unutar stanice i zove se transglikozilacijska 4,6- α -glukanotransferaza koja sintetizira α -glukanske polimere značajno većeg udjela α -(1 \rightarrow 6) veza u usporedbi sa supstratnim molekulama škroba. Kod soja *L. reuteri* 121, gen koji kodira ovaj enzim nalazi se u blizini gena za glikan sukrazu koji kodira za proizvodnju reuterana iz saharoze (Lynch i sur., 2018).

Tehnološko-funkcionalni aspekti primjene EPS-a u prehrambenim proizvodima povezani su s njihovim svojstvom da vežu vodu i zadržavaju vlagu unutar proizvoda tj. djeluju kao hidrokoloide (Costa i sur., 2010). Takva svojstva proizlaze iz molekularnih karakteristika polisaharida, sastava, molekulske mase, konformacije lanca, prisutnosti i gustoće grananja te unutarnje viskoznosti (Mende i sur., 2016). Primjena EPS-a je značajna u prehrambenoj industriji i to osobito u mliječnoj i pekarskoj industriji te u proizvodnji žitarica, gdje se istražuje primjena starter kultura,

producenata EPS-a, kao prirodna zamjena za aditive kao što su hidroksipropil metilceluloza (HPMC) (Galle i sur., 2012), guar guma i ksantan guma. Egzopolisaharidi BMK-e se tradicionalno primjenjuju u svrhu poboljšanja teksture, stabilnosti i okusa fermentiranih mliječnih proizvoda (Mende i sur., 2016). Primjena starter kultura koje *in situ* sintetiziraju EPS-e ne zahtijeva dodatno označavanje na proizvodu što predstavlja najveću prednost njihove primjene u prehrambenoj industriji (Waldherr i Vogel, 2009).

U novije vrijeme istražuje se i funkcionalna uloga EPS-a na zdravlje IT-a domaćina (Castro-Bravo i sur., 2018; Zannini i sur., 2016) (slika 6). Naime, biomolekule EPS-a sojeva roda *Lactobacillus* odlikuju se raznolikošću u kemijskom sastavu i strukturi što utječe na njihovu specifičnu ulogu u funkcionalnosti probiotičkih sojeva, primjerice u adhezijskim svojstvima, otpornosti u nepovoljnim uvjetima mikrookoliša (teški metali, osmotski šok, niski pH, desikacija), zatim prilikom interakcije sa sudionicima intestinalne mikrobiote ili pak prilikom interakcije sa specifičnim receptorima obrambenog sustava domaćina, odnosno u imunomodulacijskom učinku (Limoli i sur., 2015). Pretpostavlja se da ovi polimeri sudjeluju u interakciji probiotičkih bakterija s prisutnom mikrobiotom u intestinalnom mikrookolišu (Fontana i sur., 2019; Lebeer i sur., 2018). EPS-i imaju biološku ulogu u adheziji na različite površine i u stvaranju bakterijskog biofilma, što pridonosi kolonizaciji bakterijskog soja u različitim ekosustavima (Zanini i sur., 2016; Dertli i sur., 2015). Pojedini autori ističu moguće biološke uloge EPS-a u snižavanju razine kolesterola, antitumorskom djelovanju kao posljedica inaktivacije cikličkih amina, ali i u antimikrobnom i antiviralnom učinku (Zeidan i sur., 2017). Prema Kim i sur. (2009) EPS-i probiotičkih bakterija utječu na smanjenje stvaranja biofilma patogenih bakterija i moduliraju adheziju na epitelne stanice. EPS-i su prepoznati i kao mogući izvor prebiotičkih supstrata, koji se ne mogu apsorbirati niti probaviti u gornjem dijelu IT-a, a u debelom crijevu selektivno potiču rast poželjnih sudionika intestinalne mikrobiote što utječe na modulaciju sastava intestinalne mikrobiote i usmjeravanje metabolizma prema sintezi korisnih metabolita poput kratkolančanih masnih kiselina (Salazar i sur., 2016). Posljednih godina sve je više znanstvenih publikacija čiji rezultati idu u prilog imunomodulacijskom učinku EPS-a koje sintetiziraju različiti sojevi iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Stoga, definiranje uloge ovih površinskih makromolekula u funkcionalnim svojstvima probiotičkih bakterija može pridonijeti njihovoj primjeni kao živim bioterapijskim pripravcima, ali i razvoju novih funkcionalnih starter kultura, čija će primjena, uz poboljšanje tehnoloških karakteristika, rezultirati postizanjem dodatne funkcionalnosti konačnog proizvoda.

Štoviše, *in situ* sinteza EPS-a pomoću biomase probiotičkih laktobacila može pridonjeti poželjnim senzorskim svojstima fermentiranog proizvoda, čime se ciljano može zamijeniti primjena prehrambenih aditiva poput hidrokoloida, kolagena ili alginata (Ryan i sur., 2015).



Slika 6. Funkcionalne uloge egzopolisaharida na zdravlje intestinalnog trakta domaćina izoliranih iz bakterija mliječne kiseline, dobiveno primjenom Biorender.com

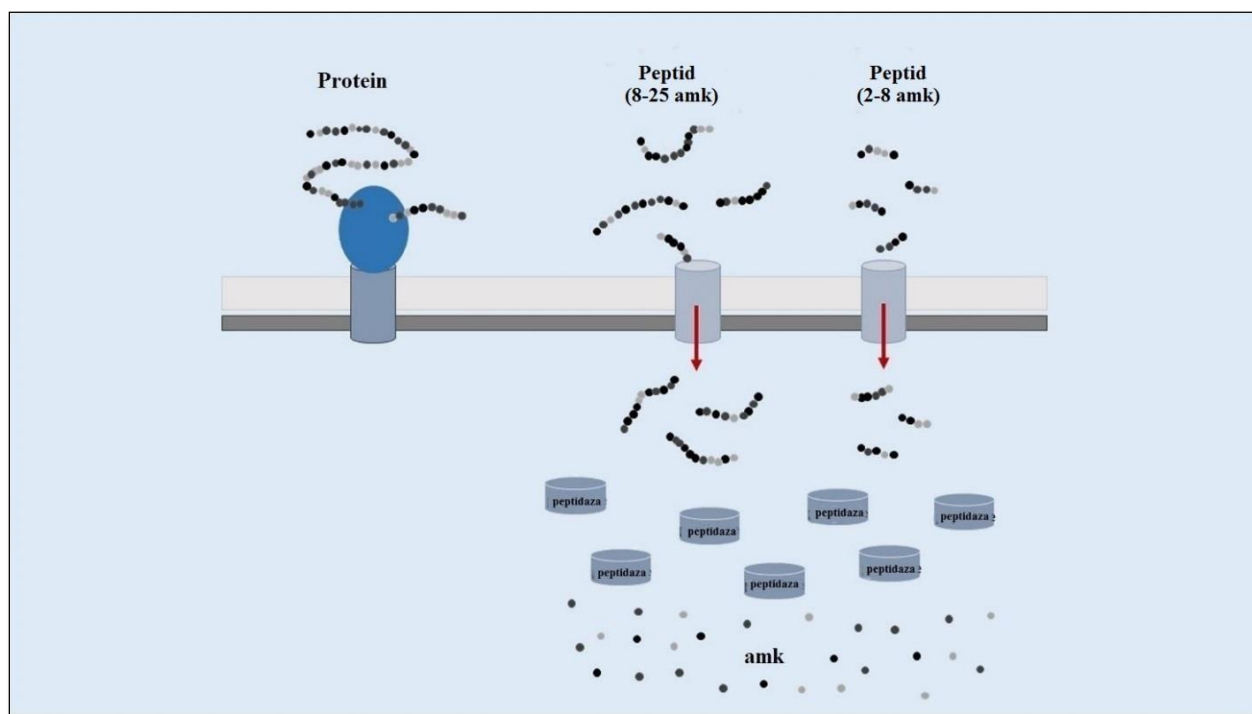
2.2.3. Proteolitička aktivnost probiotičkih bakterija i bioaktivni peptidi

Razgradnja proteina kod BMK započinje djelovanjem proteinaza koje se nalaze na površini stanica, koje razgrađuju proteine do oligopeptida. Nastali oligopeptidi se pomoću specifičnog sustava za transport peptida transportiraju unutar stanice, nakon čega se odvija njihova daljnja razgradnja do kraćih peptida i aminokiselina, zajedničkim djelovanjem različitih unutarstaničnih peptidaza (Pessione i Cirrincione, 2016) (slika 7).

BMK sintetiziraju proteinaze u obliku preproteina koji se sastoje od ~2000 aminokiselinskih ostataka, dok u konačnom obliku, od amino do karboskilnog kraja sadrže sedam funkcionalnih domena: S, PP, PR, A, B, H i W. PP predstavlja pre-pro domenu koja sadrži tipičnu signalnu sekvencu za transport proteinaze izvan stanice. PR domena sadrži unutarnju (I) domenu i ima

katalitičku ulogu, B domena ima stabilizirajuću ulogu, H domena je helikalni spacer, W domena predstavlja hidrofилni spacer stanične stijenke, odnosno vezujuću domenu, dok A domena ima nepoznatu ulogu (Tagliazucchi i sur., 2019). Postoje tri različita načina vezanja proteinaza na površinu stanice; nekovalentno vezanje pomoću SLAP domene (*engl.* S-layer anchoring domain), LPXTG motiv koji je uključen u kovalentno vezanje na peptidoglikan i derivati LPXTG motiva. Kod BMK postoji pet različitih tipova proteinaza, koji su okarakterizirane kao PrtP iz *L. lactis*, *L. casei*, *L. paracasei*, PrtH i PrtH2 iz *L. helveticus*, PrtR iz *L. rhamnosus*, PrtS iz *S. thermophilus* i PrtB iz *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Pessione i Cirrcione, 2016; Beganović i sur, 2013; Liu i sur., 2010). Kod laktokoka, *prtP* gen može biti kodiran na plazmidu, dok su sve ostale proteinaze karakteristične za laktobacile, uključujući i PrtP proteinazu, kodirane na kromosomu (Siezen i sur., 2005). Kod *L. lactis* vrsta, *prtP* genu prethodi divergentno transkribiran gen koji kodira za membransko-vezani lipoprotein (PrtM), esencijalan za autokatalitičko sazrijevanje PrtP proteina (Liu i sur., 2010), dok kod *L. helveticus*, *L. bulgaricus* i *S. thermophilus*, *prtM* gen nije identificiran u regijama gena koje kodiraju za proteinaze koje se nalaze na površini stanica (Fernandez-Espla i sur., 2000). Drugi korak u razgradnji kazeina uključuje transport peptida unutar stanice pomoću specifičnih oligopeptidnih transportera (Opp sustav) i di- i tripeptidnih transportera (Dpp, DtpP i DtpT sustavi) (Picon i sur., 2010). Nakon transporta peptida unutar stanice, dolazi do njihove razgradnje zajedničkim djelovanjem peptidaza (Pessione i Cirrincione, 2016). Supstrat za proteinaznu aktivnost BMK mogu biti proteini mlijeka, koji većinom obuhvaćaju različite vrste kazeina slične strukture i proteini sirutke (β -laktoglobulin i α -laktalbumin). Relativna molekulska masa kazeina je između 25 i 35 kDa, dok je molekulska masa većine β -laktoglobulina oko 18 kDa, a α -laktalbumina oko 14 kDa (Hurley, 2010). Tijekom fermentacije mlijeka, djelovanjem proteolitičkog sustava BMK priskrbljuju potrebne egzogene izvore aminokiselina ili peptida, a koji nastaju razgradnjom kazeina, kao glavnog proteina mlijeka. Razlikuju se α -S1-, α -S2-, β -, i κ -kazein, od kojih svaki sadrži veliki broj prolinskih ostataka koji sprječavaju formiranje α -uzvojnice i β -nabrane ploče, te potiču formiranje micela. Ove karakteristike sekundarne strukture, dovode do formiranja molekule na koju djeluju proteinaze BMK. Proteinaze su prema specifičnosti za određeni supstrat podijeljene na PI-, PI/PII i PIII-tipove enzima. PI-tip primarno razgrađuje β -kazein koji se cijepa na više od 100 različitih oligopeptida čija veličina varira od 4-30 aminokiselinskih ostataka. PI/PII-tip proteinaza hidrolizira β -kazein, i u manjoj mjeri α S1-kazein, dok PIII-tip može jednako dobro cijepati α -S1-, α -S2-, β -, i κ -kazeine (Tagliazucchi i sur., 2019).

Osim istražene proteolitičke aktivnosti *Lactococcus* i *Lactobacillus* vrsta, prepoznat je potencijal još jedne skupine BMK kojoj pripadaju bakterije vrste *Enterococcus*. Unatoč prisutnosti virulentnih faktora i antibiotičke rezistencije kod nekih *Enterococcus* vrsta, recentna istraživanja upućuju na sposobnost sinteze bakteriocina s antimikrobnim djelovanjem prema patogenim bakterijama i uzročnicima kvarenja hrane, proteolitičke aktivnosti koja pridonosi senzorskim svojstvima fermentiranih mliječnih proizvoda, kao i bioaktivnih peptida zbog čega se sve više primjenjuju kao farmaceutski probiotici u području mliječne industrije i biotehnologije (Worsztynowicz i sur., 2019). Najzastupljenije vrste roda *Enterococcus* u mikrobioti mliječnih proizvoda su *E. faecium* i *E. faecalis* (Olvera-García i sur., 2018; Kelleher i sur., 2015; Leboš i sur., 2012), koji su većinom dio autohtone mikroflore sa specifičnim doprinosom mikrobiološkoj sigurnosti fermentiranih proizvoda, obzirom da neki od sojeva pokazuju antilisterijsku aktivnost (Olvera-García i sur., 2018).



Slika 7. Proteolitički sustav (sustav proteinaza, peptidaza i membranskih transportnih proteina) koji omogućava bakterijama mliječne kiseline iskorištavanje aminokiselina iz proteina prisutnih u mikrookolišu bakterijske stanice (Pessione i Cirrincione, 2016; uz dopuštenje autora i izdavača)

Kako je proteolitički sustav BMK učinkovit u razgradnji proteina prisutnih u različitim prehrambenim proizvodima, kao produkt mogu nastati molekule s raznovrsnim bioaktivnim svojstvima. Bioaktivni peptidi su aminokiseline međusobno povezane kovalentnom amidnom odnosno peptidnom vezom. Aktivnost peptida određena je aminokiselinskim sastavom i sekvencom nakon otpuštanja s prekursor proteina (Fields i sur., 2009).

Bioaktivni peptidi imaju slična svojstva koja uključuju duljinu peptida između 2-20 aminokiselina, prisutnost hidrofobnih aminoskupina uz aminokiseline prolin, lizin i arginin te otpornost na djelovanje probavnih peptidaza (Kitts i Weiler, 2003). U novije vrijeme, bioaktivni peptidi se smatraju novom generacijom biološki aktivnih regulatora koji mogu spriječiti oksidacijsku i mikrobnu razgradnju hrane, te se mogu koristiti za liječenje raznovrsnih medicinskih oboljenja (Pessione i Ciricione, 2016). Bioaktivni peptidi su identificirani i izolirani iz raznovrsnih prirodnih izvora, pri čemu meso, kravlje mlijeko, jaja, sir i mliječni proizvodi predstavljaju najveći izvor bioaktivnih proteina i peptida podrijetlom iz hrane (Sánchez i Vázquez, 2017; Mohanty i sur., 2016), vjerojatno zbog toga što mliječni proteini imaju širok spektar bioloških aktivnosti, kao npr. imunoglobulini koji imaju imunoprotektivni učinak, ili laktoferin (Lf) koji pokazuje antibakterijsku aktivnost. Mliječni proteini su bogat izvor biološki aktivnih peptida dobivenih mikrobnom proteolizom koji se otpuštaju tijekom probave u gastrointestinalnom traktu ili procesiranjem hrane (Tagliacruzchi i sur., 2019). Peptidi dobiveni fermentacijom mliječnih proteina pokazuju višestruke fiziološke aktivnosti, poput antimikrobne, antioksidativne, antitrombotske, opioidne, antihipertenzijske aktivnosti, modulacije probavnih enzima, apsorpcije hranjivih tvari i imunološkog odgovora (Tagliacruzchi i sur., 2019; Ricci-Cabello i sur., 2012). Stoga, razgradnja mliječnih proteina, primjenom BMK, predstavlja atraktivan pristup za proizvodnju funkcionalne hrane obogaćene bioaktivnim peptidima zbog ekonomičnosti procesa i zbog pozitivnog prehrambenog značaja povezanog s različitim fermentiranim mliječnim proizvodima, kao što su jogurt, kefir i sirevi. Bioaktivni peptidi u sirevima nastaju enzimskom hidrolizom kazeina, glavnog proteina u mlijeku, tijekom fermentacije i zrenja (Baptista i sur., 2018), a iskazuju značajne pozitivne fiziološke učinke na zdravlje domaćina, pri čemu pozitivno djeluju na probavni, endokrini, kardiovaskularni, imunosni i živčani sustav (Sánchez i Vázquez, 2017) (slika 8).



Slika 8. Fiziološke funkcije bioaktivnih peptida dobivenih iz mlijeka, kreirano primjenom Biorender.com

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu korišteni su sojevi BMK koji su dio Zbirke industrijskih mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-bioteknološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (SuZ). Sojevi BMK izolirani su iz različitih mikrookoliša. Nakon prvog selekcijskog kruga odabrani su sojevi navedeni u tablici 1 u kojoj su osim fermentacijskog mikrookoliša iz kojeg su izolirani, navedene i metode taksonomske identifikacije.

Tablica 1. Sojevi bakterija mliječne kiseline odabrani za istraživanje proizvodnje funkcionalnih biomolekula

IZOLAT	Izvor	Identifikacija	Metoda identifikacije
D3	Dimljeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	API 50 CHL
D4	Dimljeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje V1/V3 regije gena za 16S rRNA
D5	Dimljeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje V1/V3 regije gena za 16S rRNA
D7	Dimljeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje V1/V3 regije gena za 16S rRNA
D6*	Dimljeni svježi sir	<i>Levilactobacillus brevis</i>	sekvencioniranje genoma
D8	Dimljeni svježi sir	<i>Enterococcus durans</i>	sekvencioniranje V1/V3 regije gena za 16S rRNA
D10	Dimljeni svježi sir	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	sekvencioniranje V1/V3 regije gena za 16S rRNA
D12*	Dimljeni svježi sir	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	sekvencioniranje genoma
D13*	Dimljeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje genoma
M2	Sušeni svježi sir	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	API 50 CHL
M4	Sušeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	API 50 CHL
M5	Sušeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje V1/V3 regije gena za 16S rRNA
MA2	Sušeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje V1/V3 regije gena za 16S rRNA
MA3	Sušeni svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	API 50 CHL
SF9B	Kiseli kupus	<i>Levilactobacillus brevis</i>	sekvencioniranje genoma
SF9C	Kiseli kupus	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje genoma
SF15B	Kiseli kupus	<i>Levilactobacillus brevis</i>	sekvencioniranje genoma
SF15C	Kiseli kupus	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje genoma
L3	Silaža	<i>Enterococcus faecium</i>	AFLP™
L4	Silaža	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	AFLP™

nastavak **Tablice 1.** Sojevi bakterija mliječne kiseline odabrani za istraživanje proizvodnje funkcionalnih biomolekula

IZOLAT	Izvor	Identifikacija	Metoda identifikacije
A7	Svježi sir	<i>Enterococcus faecium</i>	AFLP™
ZG1-K7	Svježi sir	<i>Levilactobacillus brevis</i>	sekvencioniranje genoma
ZG1C	Svježi sir	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje genoma
M92	Fermentirano mlijeko	<i>Lactobacillus helveticus</i>	sekvencioniranje genoma
M92C	Fermentirano mlijeko	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	sekvencioniranje genoma
ZGPR1-51	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGPR2-4	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGPR2-11	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGBP4-1	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGBP4-2	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGBP5-32	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGBP5-51	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGBP6-51	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGZA7-6	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGZA7-10*	Svježi sir	<i>Enterococcus faecium</i>	sekvencioniranje genoma
ZGZA9-2	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR
ZGZA9-11	Svježi sir	<i>Lactococcus lactis</i>	sekvencioniranje i rep-PCR

* rezultati identifikacije prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji

U eksperimentima ispitivanja antimikrobne aktivnosti kao test-mikroorganizmi odabrani su *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™.

3.1.2. Stanična linija

- Caco-2 stanična linija je kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela, priređene u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković

3.1.3. Hranjive podloge

U ovom radu korištene su slijedeće hranjive podloge:

- a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline roda *Lactobacillus*
- MRS (*engl.* De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode) (Biolife, Italija): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
 - MRS tekuća podloga je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline roda *Lactococcus*
- M17 agar sastava (g/L destilirane vode) (Biolife, Italija): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5,0; kvašćev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5,0; laktoza 5,0; natrijev glicerofosfat 19,0; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1.
 - M17 tekuća podloga je istog sastava kao podloga M17 agar, ali bez dodatka agara.
- c) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test-mikroorganizama
- BHI (*engl.* brain heart infusion) agar sastava (g/L destilirane vode) (Biolab, Mađarska): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
 - BHI tekuća podloga je istog sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.
 - Hranjivi agar sastava (g/L destilirane vode) (Biolife, Italija): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
 - Tekuća hranjiva podloga je istog sastava kao podloga hranjivi agar, ali bez dodatka agara.
- d) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterija roda *Staphylococcus*
- BP (*engl.* Baird-Parker) agar sastava (g/L destilirane vode) (Biolab, Mađarska): pepton iz kazeina 10; goveđi ekstrakt 5; kvašćev ekstrakt 1; natrijev piruvat 10; litijev klorid 5; glicin 12;

agar 17. pH podloge je 6,8, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta. Nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 5 % emulzije telurita i žumanjka.

e) selektivna hranjiva podloga za izolaciju *L. monocytogenes*

- ChromoBio® Listeria agar sastava (g/L destilirane vode) (Biolab, Mađarska): peptoni 34; glukoza 2; mineralne soli 15,5; natrijev piruvat 2; L- α -fosfatidilinositol 2; kromogeni supstrat 0,05; antibiotici 0,17; amfotericin B 0,01; puferi 3,5; agar 13. pH podloge je 6,8. 35 g podloge se resuspendira u 400 mL destilirane vode i zagrije, uz često miješanje, do vrenja. Nakon toga se provodi sterilizacija pri 121°C tijekom 15 minuta, a nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 100 mL tekućeg dodatka i jedna bočica selektivnog dodatka.

f) hranjiva podloga za kultivaciju staničnih linija

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) medij (Capricorn Scientific GmbH, Njemačka) obogaćenog s L-glutaminom (Merck, Njemačka) i 10 %-tnim FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, by Life Technologies, SAD) za kultivaciju Caco-2 stanične linije

3.1.4. Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- acetanhridid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma“, SAD
- alginat, „Fluka“, Švicarka
- amonij-perokosodisulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- anhidridni natrijev acetat, „Sigma-Aldrich“, SAD
- API 50 CHL strip i medij, „BioMérieux“, Francuska
- D₂O, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Dcode dye solution, „Bio-Rad“, SAD
- diacetil, „Sigma-Aldrich“, SAD
- diamond boja, „Promega“, SAD

- dimetil sulfoksid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- D-laktoza monohidrat, „Sigma-Aldrich“, SAD
- dNTP, „TaKaRa“, SAD
- EmeraldAmp, Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „Takara“, Japan
- etanol, 70 %, „Kemika“, Hrvatska
- etanol, apsolutni, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Njemačka
- fetalni goveđi serum (*engl.* Fetal Bovine Serum, FBS) „Gibco, by Life Technologies“, SAD
- Folin-Ciocalteu Fenol reagens, „Merck“, Njemačka
- formamid, „Bio-Rad“, SAD
- fosfatni pufer, „Gibco, by Life Technologies“, SAD
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- fruktoza, „Kemika“, Hrvatska
- galaktoza, „Kemika“, Hrvatska
- Genomic Wizard kit, „Promega“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- HCl:MeOH, „Supelco“, SAD
- HMDS:TMCS-Piridin, „Supelco“, SAD
- Incucyte Nuclight Rapid crvena boja, „PHI AB“, SAD
- inulin i fruktooligosaharid (FOS), „Magdis d.o.o.“, Hrvatska
- inulin, „Difco“, SAD
- kazein, „Sigma“, SAD
- klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kristal violet, „Kemika“, Hrvatska
- laktoza, „Kemika“, Hrvatska
- laktuloza, „Calbiochem“, SAD
- L-glutamin, „Merck“, Njemačka
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- manitol, „Difco“, SAD

- Maxwell[®] DNA Cell kit, „Promega”, SAD
- Maxwell[®] DNA Tissue kit, „Promega”, SAD
- metanol, „Sigma“, SAD
- metil jodid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- mikrotitarska pločica s 96 jažica, „Greiner Bio-One”, Austrija
- mikrotitarske pločice tretirane fibronektinom, lamininom, kolagenom, „Corning[®] BioCoat[™]”, SAD
- mili-Q voda, „Sigma-Aldrich, Merck”, SAD
- mineralno ulje, „BioMérieux”, Francuska
- mliječna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- mucin, „Sigma“, SAD
- natrijev citrat, „T.T.T.”, Hrvatska
- natrijev karbonat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev sulfat, „Merck”, SAD
- natrijeva lužina, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev-D,L-laktat, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- obrano mlijeko, „Fluka”, Njemačka
- octena kiselina, „Carlo Erba“, Italija
- pankreatin, „Fluka”, Švicarska
- paraformaldehid, „Gibco, by Life Technologies”, SAD
- pepsin, „Sigma“, SAD
- piridin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- početnice, „Invitrogen“, SAD
- proteinaza K, „Invitrogen”, SAD
- ReadyPrep Total Protein Extraction Kit, „Bio-Rad“, SAD,
- Ringerova otopina, „Merck”, Njemačka
- saharoza, „Kemika“, Hrvatska
- sorbitol, „Kemika“, Hrvatska

- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletlen), „Sigma“, SAD
- trifluorocetna kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- triklorocetna kiselina, „Fisher Scientific“, SAD
- Triton X-100, „AppliChem“, Darmstadt, Njemačka
- Tween 20, „Sigma“, SAD
- urea, „Bio-Rad“, SAD
- Viafluor 488 boja, „Biotium“, SAD
- žučna sol, „Difco“, SAD
- κ-karagenan, „Sigma“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

3.1.5. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- bag mixer, „Interscience“, Francuska
- BioSpec Nano spektrofotometar, „Shimadzu“, Japan
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- CO₂ inkubator za uzgoj stanica i tkiva u kulturi, „Brouwer“, Švicarska
- denzitometar, „BioMérieux“, Francuska
- detektor refraktivnog indeksa K-2301, „Knauer“, Njemačka
- DGGE-PCR sustav, „Bio-Rad“, Austrija
- Dionex Ultimate 3000 RSLC nano System uređaj uz UV/VIS detector, „Thermo Fischer Scientific“, SAD
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- elektroforetska kadica, „Bio-Rad“, SAD

- Eppendorf kivete, „Eppendorf“, SAD
- Epruvete, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmayer tikvice, „Gram-mol“, Hrvatska
- EVOS FLc Cell Imager, „ThermoFisher Scientific“, SAD
- filter veličine pora 0,2 μm, „Sigma-Aldrich, Merck“ SAD
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete za centrifugiranje; 15 mL, 50 mL
- kolektor frakcija, „LKB Bromma“, Austrija
- kolona za GC, „HP1 Agilent Technologies“, SAD
- kolona za LC, Acclaim PepMap 100 C18, „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- kromatograf isključenjem na osnovi veličine čestica, „Knauer“, Njemačka
- LC/MS 6460 TripleQuad, „Agilent Technologies“, SAD
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- liofilizator Modulyo Pirani 10, „Edwards“, Velika Britanija
- magnetna miješalica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- MALDI-TOF/TOF, „Bruker“, Njemačka
- Maxwell[®] 16 Research System instrument, „Promega“, SAD
- mikrobiološka ušica, „Syntesys“, Italija
- mikrotitrarske pločice (s 96 i 24 jažice), „Falcon[®]“, SAD
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio-Rad“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta, „Isolab“, Njemačka
- Plinski kromatograf, „Perkin-Elmer“, SAD
- Plinski kromatograf spregnut sa spektrometrijom masa, „Agilent-Technologies“, SAD
- Proteineer fcII sakupljač frakcija, „Bruker“, Njemačka
- Sephacryl S-300 kolona, „GE Healthcare“, UK

- Skenirajući elektronski mikroskop, „VEGA/TESCAN”, Češka
- sonikator Sonopuls mini20, „Bandelin”, Njemačka
- Spectra/Por membrane (10-14 kDa), „Spectrum Laboratories”, SAD
- stalci za Eppendorf kivete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- standardi peptida, „Thermo Fischer Scientific”, SAD
- stolni homogenizator Vortex V-1 plus, „BioSan”, Latvija
- sušionik, „Instrumentaria”, Hrvatska
- termostat pod vakuumom, „MPM Instruments”, Italija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNT”, Izrael
- tresilica, „New Brunswick Scientific”, SAD
- ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H, „Elma“, Njemačka
- UPLC BEH C18 kolona za tekući kromatograf ultra visoke djelotvornosti, „Waters Corporation”, SAD
- uređaj za NMR analizu, „VarianUNITY INOVA”, SAD
- uređaj za sekvencioniranje, „Illumina's MiSeq 2500” San Diego, CA
- UV/VIS spektrofotometar, „Pharmacia Biotech”, SAD
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vakuum uparivač, „Büchi”, Švicarska
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Inkolab”, Hrvatska
- zamrzivač (-80°C), „Eppendorf”, Njemačka

3.2. Metode rada

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi iz roda *Lactobacillus* i *Enterococcus* čuvani su pri -80°C u MRS tekućoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Test-mikroorganizmi su čuvani pri -80°C u tekućoj hranjivoj podlozi s 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u optimalnu podlogu, te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta.

3.2.2. Određivanje bakteriocinskog djelovanja autohtonih sojeva BMK

3.2.2.1. Metoda difuzije s rupama u agaru (*engl.* agar well-diffusion method)

Antimikrobno djelovanje supernatanta kultura odabranih sojeva BMK prema patogenim test-mikroorganizmima podrijetlom iz hrane *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC®19111™ ispitano je metodom difuzije u agar, na krutim hranjivim podlogama prema Šušković i Kos (2007). Odabrani sojevi BMK su inokulirani u MRS tekuću podlogu i inkubirani u anaerobnim uvjetima preko noći pri 37°C , nakon čega je provedeno centrifugiranje prekonoćnih kultura 5 min pri 9000 o/min. Prekonoćne bakterijske kulture test-mikroorganizama (100 μL) nacijepljene su u 12 mL krute Brain Heart Infusion (BHI) (Biolab, Mađarska) podloge s 1,5 % agara, prethodno otopljene i temperirane pri 50°C . Nakon što su se hranjive podloge skrutnule, sterilnim bušačem promjera 8 mm izbušene su „rupe“ u agaru u koje je nanešeno 50 μL supernatanta kulture ispitivane BMK. Nakon toga je slijedila inkubacija pri 37°C preko noći, te mjerenje promjera zona inhibicije.

3.2.2.2. Metoda s dvostrukim slojem agara (*engl.* agar spot-test method)

Antimikrobno djelovanje odabranih izolata BMK prema *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC®19111™ ispitano je metodom s dvostrukim slojem agara prema Kos i sur. (2011). Volumen od 5 μL prekonoćne bakterijske kulture odabranih sojeva BMK nacijepljeno je na MRS agar (Biolife, Italija), nakon čega je slijedila anaerobna inkubacija preko noći pri 37°C . Preko poraslih kolonija BMK je preliveno 10 mL BHI (Biolab, Mađarska) soft agra (0,7 % agara), prethodno otopljenog i ohlađenog na 50°C , inokuliranog sa 100 μL suspenzije test-mikroorganizma *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC®19111™. Aerobna inkubacija trajala je 24 sata pri 37°C , nakon

koje je slijedilo mjerenje bistrih zona inhibicije. Izmjereni su promjeri porasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID), te je izračunat efektivni inhibicijski odnos (EIR) prema slijedećem izrazu:

$$\mathbf{EIR = (ID-CD)/CD}$$

Ovisno o dobivenim vrijednostima, rezultati se interpretiraju prema slijedećem:

EIR < 0,5 → slaba inhibicija; 0,5 < **EIR** < 1,5 → srednja inhibicija; **EIR** > 1,5 → jaka inhibicija

3.2.2.3. Detekcija gena koji kodiraju za bakteriocine PCR metodom

Izolacija DNA odabranih sojeva BMK za daljnje istraživanje bakteriocinske aktivnosti je provedena pomoću kita za izolaciju DNA (QIAGEN, Njemačka) prema uputama proizvođača. Koncentracija DNA nakon izolacije je izmjerena na DNA BioSpec Nano (Shimadzu, Japan) uređaju. Koncentracije DNA su podešene na oko 150 ng/μL s ciljem dobivanja vrpce jednakog intenziteta nakon provođenja PCR reakcije i DNA elektroforeze. U PCR reakciji za detekciju gena koji kodiraju za plantaricine (oznaka *pln*) i enterocine (oznaka *ent*) odabrane su početnice prikazane u tablici 2, obzirom da su odabrani bakterijski izolati vrste *Lactiplantibacillus plantarum* i roda *Enterococcus*. U reakcijsku smjesu je dodan EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix) (Takara, Japan), voda (Takara, Japan), DNA i početnice, a reakcije su provedene u uvjetima kako je opisano u literaturi navedenoj u tablici 2 uz svaku početnicu. Kao negativna kontrola korišten je uzorak bez dodane bakterijske DNA kao provjera da DNA fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Kanada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD). Nakon završene reakcije uzorci su stavljeni na agarozni gel (1,5 %), a elektroforeza je provedena pri 150 V. Gel je nakon završetka elektroforeze obojan u otopini etidijevog bromida (Boehringer Mannheim GmbH, Njemačka) koncentracije 0,5 μg/mL, stavljen na UV transiluminator (DNR Bio-Imaging Systems, Izrael) pri valnoj duljini od 254 nm i vizualiziran upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 2. Početnice korištene u PCR reakcijama za amplifikaciju gena koji kodiraju za *pln* i *ent*

Ciljani gen	Bakteriocin	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Veličina PCR produkta	Literatura
<i>plnA</i>	Plantaricin A	GTACAGTACT AATGGGAG	CTTACGCCAATCT ATACG	450 bp	Ben Omar i sur. (2008)
<i>plnEF</i>	Plantaricin EF	GGCATAGTTA AAATTCCCCC	CAGGTTGCCGCA AAAAAAG	428 bp	Ben Omar i sur. (2008)
<i>plnJ</i>	Plantaricin J	TAACGACGGA TTGCTCTG	AATCAAGGAATT ATCACATTAGTC	475 bp	Ben Omar i sur. (2008)
<i>plnNC8</i>	Plantaricin NC8	GGTCTGCGTAT AAGCATCGC	AAATTGAACATA TGGGTGCTTTAA ATTC	207 bp	Maldonado i sur. (2004)
<i>plnS</i>	Plantaricin S	GCCTTACCAG CGTAATGCC	CTGGTGATGCAA TCGTTAGTTT	320 bp	Ben Omar i sur. (2008)
<i>plnW</i>	Plantaricin W	TCACACGAAA TATTCCA	GGCAAGCGTAAG AAATAAATGAG	165 bp	Holo i sur. (2001)
<i>entA</i>	Enterocin A	GGTACCACTC ATAGTGGAAA	CCCTGGAATTGC TCCACCTAA	138 bp	Foulquié Moreno i sur. (2003)
<i>entB</i>	Enterocin B	CAAATGTAA AAGAATTA GTACG	AGAGTATACATT TGCTAACCC	201 bp	Foulquié Moreno i sur. (2003)

3.2.2.4. Induciranje bakteriocinske aktivnosti soja združenim uzgojem s test-mikroorganizmima

Proveden je združeni uzgoj soja *L. plantarum* D13 s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048 prema Kos i sur. (2008), s modifikacijama. Nakon prekonocnog uzgoja, bakterijske stanice su isprane dva puta s fiziološkom otopinom. Inokulirano je 10⁷ CFU/mL soja producenta bakteriocina, dok su test-mikroorganizmi inokulirani u broju između 10³-10⁴ CFU/mL. Združeni uzgoj je proveden u 50 mL BHI (Biolab, Mađarska) tekuće podloge na način da su test-mikroorganizmi dodani 2 sata nakon probiotičkog soja. Proveden je i uzgoj svih ispitivanih sojeva zasebno u tekućoj BHI podlozi pri istim uvjetima. Inkubacija je provedena aerobno tijekom 48 h pri 37°C. Tijekom prvih 10 sati uzorci su uzeti svaka 2 sata, iz eksponencijalne faze rasta, te nakon 22 i 24 h inkubacije, iz stacionarne faze rasta. Nakon uzimanja svakog uzorka, izmjerena je pH vrijednost podloge. Broj živih stanica u uzrocima određen je na MRS (Biolife, Italija), Baird-Parker (Biolab, Mađarska) te ChromoBio® Listeria (Biolab, Mađarska) krutim hranjivim podlogama. MRS ploče su inkubirane anaerobno, dok su Baird-Parker i ChromoBio® Listeria ploče inkubirane aerobno tijekom 24 sata pri 37°C, te je nakon inkubacije određen broj bakterijskih stanica izražen kao log CFU/mL. Tijekom kokultivacije također je

provedeno ispitivanje bakteriocinske aktivnosti prema istim test-mikroorganizmima koji su korišteni za indukciju sinteze bakteriocina primjenom agar-spot-test metode (opisano pod poglavljem 3.2.2.2.). Ispitivanje bakteriocinske aktivnosti je provedeno nakon 4, 6, 8, 10, 22 i 24 sata inkubacije.

3.2.2.5. Utjecaj visoke temperature i proteinaze na bakteriocinsku aktivnost sojeva producenata

Supernatant prekonoćne kulture *L. plantarum* D13 tretiran je s 1 mg/mL proteinaze K (Invitrogen, SAD) tijekom 2 h pri 37°C i zagrijavanjem do 100°C tijekom 30 min (Elayaraja i sur., 2014). Nakon provedenih tretmana, antimikrobno djelovanje supernatanata kultura prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048 je ispitano metodom difuzije s rupama u agaru, kako je opisano u poglavlju 3.2.2.1. Kontrolni uzorak je supernatant kulture *L. plantarum* D13. U svrhu ispitivanja inhibicijskog djelovanja proizvedene mliječne kiseline, u MRS tekuću podlogu dodana je odgovarajuća koncentracija mliječne kiseline (Kemika, Hrvatska), te je tako priređenim uzorcima također ispitana antibakterijska aktivnost prema test-mikroorganizmima. Kao kontrola djelovanja proizvedene mliječne kiseline korištena je mliječna kiselina u istoj koncentraciji koja je određena u ispitanoj supernatantu kultura *L. plantarum* D13 nakon prekonoćnog uzgoja.

3.2.2.6. *In silico* analiza genskih klastera i 3D-strukture plantaricina

Bioinformatička analiza genskih klastera provedena je primjenom BAGEL 4.0 softwera (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) (van Heel i sur., 2018). Ulazna datoteka bila je sekvenca genoma *L. plantarum* D13 u fasta formatu. Predviđanje trodimenzionalne strukture plantaricina provedeno je primjenom SWISS-MODEL servera (<https://swissmodel.expasy.org/>), a karakterizacija svojstva α -uzvojnica primjenom HeliQuest servera (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py>), pri čemu je kao ulazna datoteka korištena aminokiselinska sekvenca plantaricina dobivena primjenom BAGEL 4.0 softwera.

3.2.3. Izolacija i karakterizacija egzopolisaharida

3.2.3.1. Detekcija „ropy“ fenotipa

Detekcija sojeva producenta EPS-a i izolacija EPS-a provedena je u LTAEPSK-a na PBF-u, SuZ, dok je karakterizacija strukture egzopolisaharida provedena na Department of Life Sciences, University of Trieste, Italija. Prema Cerning (1990.) prisutnost EPS-a određena je fenotipski doticanjem bakterijskih kolonija poraslih preko noći na MRS agaru uz dodatak 2 % glukoze. Prisutnost dugih rastezljivih niti, tipičnih za „ropy“ fenotip, upućuje na proizvodnju EPS-a.

3.2.3.2. Izolacija egzopolisaharida

Prekonoćna kultura soja *L. fermentum* D12 uzgojena je tijekom 2 dana u 400 mL tekuće MRS podloge uz dodatak 2 % izvora ugljika; glukoza, galaktoza, laktoza, fruktoza i saharoza pri 30°C. Nakon inkubacije, suspenzije stanica i supernatanta odvojene su centrifugiranjem tijekom 15 min pri 7500 g (4°C). Izolacija egzopolisaharida vezanih na površinu stanica i onih otpuštenih u medij, prilagođena je prema Tallon i sur. (2003) i Toba i sur. (1991).

Izolacija EPS-a vezanih na površinu stanica (EPS-b) provedena je na način da je talog dobiven centrifugiranjem suspenzije stanica suspendiran u 250 mL sterilne fiziološke otopine nakon čega je provedeno centrifugiranje tijekom 30 min pri 6000 o/min (4°C). Dobiveni talog suspendiran je u 50 mL sterilnog 1 M NaCl-a. U svrhu odvajanja potencijalnih EPS-a vezanih na površinu stanica, suspenzija je sonificirana 1 min pri 550 W (20°C) u ultrazvučnoj kupelji Elmasonic S 60 H. Netopljivi stanični materijali uklonjen je centrifugiranjem tijekom 30 min pri 6000 g (4°C). Egzopolisaharidi iz supernatanta istaloženi su dodatkom 4 volumena hladnog etanola u svrhu uklanjanja lipida, nakon čega je uslijedila prekonoćna inkubacija pri -20°C gdje dolazi do poticanja taloženja EPS-a. Nakon centrifugiranja, 30 min pri 6000 g (4°C), talog je suspendiran u 2 mL destilirane vode. Provedena je dijaliza suspenzije EPS-a otopljenog u destiliranoj vodi u Spectra/Por membrani (10-14 kDa) 1 dan uz 4 promjene 0,1 M otopine NaCl-a i tijekom 2 dana uz česte promjene dijalizata odnosno destilirane vode. Nakon dijalize uzorak je liofiliziran u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus.

Izolacija EPS-a otpuštenih u medij (EPS-r) provedena je na način da je supernatant dobiven centrifugiranjem suspenzije stanica tretiran trikloroocetnom kiselinom (Fisher Scientific, SAD) u

konačnoj koncentraciji od 20 %, te inkubiran 2 sata pri 4°C uz lagano miješanje na magnetnoj miješalici (New Brunswick Scientific, SAD). Nakon inkubacije provedeno je centrifugiranje tijekom 45 min pri 8000 g (4°C) u svrhu uklanjanja istaloženih proteina. Dobiveni supernatant tretiran je dodatkom 4 volumena hladnog etanola (95 %) u svrhu uklanjanja lipida, te inkubiran tijekom noći na -20°C pri čemu dolazi do poticanja taloženja egzopolisaharida. Poslije prekončne inkubacije supernatant je centrifugiran 30 minuta pri 6000 g (4°C) nakon čega je dobiveni talog suspendiran u 2 mL destilirane vode. Provedena je dijaliza suspenzije EPS-a otopljenog u destiliranoj vodi u Spectra/Por membrani (10-14 kDa) (Spectrum Laboratories, SAD) 1 dan uz 4 promjene 0,1 M otopine NaCl-a i tijekom 2 dana uz česte promjene dijalizata odnosno destilirane vode. Nakon dijalize uzorak je liofiliziran u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka).

Nakon izolacije i liofilizacije egzopolisaharida izoliranih sa površine stanica i onih otpuštenih u medij, masa EPS-a proizvedenih prilikom uzgoja u MRS hranjivoj podlozi suplementiranoj s različitim izvorima ugljika (2 % w/v glukoza, galaktoza, laktoza, fruktoza, saharoza) izvagana je na analitičkoj vagi (Scaltec, Njemačka).

3.2.3.3. Strukturna karakterizacija egzopolisaharida

3.2.3.3.1. Određivanje čistoće UV/VIS spektrofotometrijom

Koncentracija svakog uzorka EPS-a pripremljena je u konačnoj koncentraciji od 0,43 mg/mL. Uzorcima je izmjerena apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru (Pharmacia Biotech, SAD) pri valnim duljinama od 190 do 350 nm, pri čemu je kao slijepa proba korištena samo MiliQ voda (Sigma-Aldrich, Merck, SAD).

3.2.3.3.2. ¹H-NMR analiza

Analiza egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPS-r) koje sintetizira *L. fermentum* D12 tijekom uzgoja u MRS hranjivoj podlozi uz dodatak izvora ugljika u suvišku (2 % w/v glukoza, galaktoza, laktoza, fruktoza, saharoza), provedena je ¹H-NMR (*engl.* nuclear magnetic resonance) metodom. Uzorci su prethodno pripremljeni suspendiranjem 5 mg EPS-r u 99,96 %-tnom D₂O (Sigma-Aldrich, SAD), nakon čega je uslijedila liofilizacija uzorka u uređaju Modulyo Pirani 10 (Edwards,

Velika Britanija). Liofilizirani uzorci su suspendirani u 600 μL 99.96 %-tnog D_2O te stavljeni na tresilicu preko noći, a zatim podvrgnuti ^1H -NMR analizi na 500 MHz VarianUNITY INOVA NMR spektrofotometru (SAD), pri 50°C. Kemijski pomaci su izraženi u ppm primjenom acetona kao unutarnjeg standarda (2,225 ppm za ^1H). NMR spektri su obrađeni primjenom MestrelNova softwera.

3.2.3.3.3. Kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica

Smjesa združenog i pročišćenog uzorka EPS-a izoliranog iz supernatanta (EPS-r), s podešenom pH vrijednosti na 6,70 razdvojena je kromatografijom isključenjem na osnovi veličine čestica (*engl.* size-exclusion chromatography, SEC) (Knauer, Njemačka) pomoću Sephacryl S-400 HR kolone (GE Healthcare, UK) koja ima mogućnost razdvajanja molekula u rasponu od 1×10^4 - 2×10^6 Da, pri čemu je korišten detektor refraktivnog indeksa K-2301 (Knauer, Njemačka). Uzorci su otopljeni u 0,05 M otopini NaNO_3 -a u konačnoj koncentraciji od 5,1 mg/mL, a frakcije su se počele skupljati pomoću kolektora (LKB Bromma, Austrija) svakih 12 minuta uz protok od 8,2 mL/h. Nakon razdvajanja smjese združenog i pročišćenog uzorka EPS-a i nakon odabira frakcija, uzorci su koncentrirani pomoću vakuum uparivača (Büchi, Švicarska) i dijalizirani u destiliranoj vodi.

3.2.3.3.4. Određivanje sastava egzopolisaharida provođenjem plinske kromatografije

Sastav egzopolisaharida uzorka EPS-r2 određen je plinskom kromatografijom (*engl.* gas chromatography, GC) nakon provođenja kemijskih reakcija hidrolize, redukcije i peracetilacije. Reakcija hidrolize provedena je tijekom 1 sata pri 125°C dodatkom 2 M trifluoroctene kiseline. Redukcija je provedena tijekom 18 sati na sobnoj temperaturi s uzorcima osušenim pod dušikom, dodatkom destilirane vode, 100 μL NH_4OH (1 M), 50 μL inozitola (1 mg/mL) koji služi kao unutarnji standard, te dodatkom NaBD_4 . Reakcija je zaustavljena dodatkom 50 %-tne otopine octene kiseline i vode do prestanka proizvodnje mjehurića. Uzorci su zatim isprani tri puta u 10 %-tnoj otopini octene kiseline u metanolu i tri puta u metanolu, a između ispiranja je provedeno uparavanje pod vakuumom (Büchi, Švicarska). Uzorak osušen pod dušikom je dodatno osušen u termostatu pod vakuumom pri 50°C (MPM Instruments, Italija), nakon čega je provedena reakcija peracetilacije dodatkom 300 μL piridina (Sigma-Aldrich-SAD) i 1 mL acetanhridida (Sigma-Aldrich-SAD) tijekom 30 minuta pri 100°C. Uzorci su ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi

uz miješanje na magnetnoj miješalici. Reakcije redukcije i peracetilacije do dobivanja alditol acetata (AA) su provedene prema Albersheim i sur. (1967). Uzorci su zatim osušeni pod dušikom i ekstrahirani dodatkom kloroforma i vode, uz ispiranje sa vodom šest puta. Organska faza (kloroform) je uklonjena i profiltrirana uz dodatak natrijevog sulfata (Merck, SAD) preko staklene vune, nakon čega je uzorak osušen pod dušikom. Takav uzorak je sususpendiran u kloroformu i injektiran u kolonu za plinsku kromatografiju (HP1 Agilent Technologies, SAD) dugačku 30 metara, promjera 0,32 mm i debljinom ispune 0,25 μm . Plinska kromatografija je provedena na uređaju „Perkin-Elmer“ (SAD) sa plameno-ionizacijskim detektorom, helijem kao plinom nosačem i temperaturnim programom od 150°C (3 min) do 270°C (3°C/min, 2 min) i od 270 do 150°C (25°C/min, 2 min). Dobiveni spektar je uspoređen sa standardima, i prema retencijskom vremenu svakom piknu je dodijeljena vrsta šećera koja se nalazi u ispitivanom uzorku.

3.2.3.3.5. Određivanje tipa glikozidne veze pomoću plinske kromatografije i plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa

Vrsta glikozidnih veza prisutnih u uzorcima EPS-r1 i EPS-r2 određena je plinskom kromatografijom i plinskom kromatografijom združenom sa spektrometrijom masa (*engl.* gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS), nakon provođenja kemijskih reakcija permetilacije, hidrolize, redukcije i peracetilacije prema Harris i sur. (1984). Liofilizirani uzorak EPS-a osušen u termostatu pod vakuumom pri 50°C (MPM Instruments, Italija) je otopljen dodatkom 300 μL dimetil sulfoksida (Sigma-Aldrich, SAD) uz miješanje u vodenoj kupelji tijekom 30 min. Reakcija permetilacije je provedena dodatkom 300 μL otopine kalijevog metilsulfinilmetanida. Reakcija je provedena tijekom 30 minuta uz miješanje na stolnom homogenizatoru Vortex V-1 plus (BioSan, Latvija), nakon čega je uzorak ohlađen na ledu. Kalijev metilsulfinilmetanid je jaka baza koja služi za uklanjanje svih vodikovih iona vezanih na kisik u šećernom prstenu. U smrznuti uzorak dodano je 300 μL hladnog metil jodida (Sigma-Aldrich, SAD), nakon čega je uzorak odmrznut i miješan tijekom sljedećih 30 minuta. U ovom koraku dolazi do vezanja metilnih grupa na sve slobodne kisikove atome, kojima je prethodno uklonjen vodikov ion. Reakcija je zaustavljena dodatkom smjese kloroform:metanol u omjeru 2:1 (v/v) i destilirane vode. Smjesa je centrifugirana 10 minuta pri 1000 o/min, nakon čega je uklonjena vodena faza, a postupak ispiranja dodatkom destilirane vode je ponovljen 5 puta. Organska faza je osušena pod dušikom nakon čega su provedene reakcije

hidrolize, redukcije i peracetilacije kako je opisano u poglavlju 3.2.3.3.4., a derivati su nazvani djelomočno metilirani alditol acetati (PMAA). Takav uzorak je sususpendiran u kloroformu i injektiran u kolonu za plinsku kromatografiju (Phenomenex, SAD) dugačku 30 metara, promjera 0,25 mm i debljine ispune 0,25 μm . Plinska kromatografija je provedena na uređaju „Perkin-Elmer“ (SAD) s plameno-ionizacijskim detektorom, helijem kao plinom nosačem i temperaturnim programom od 125°C (1 min) do 240°C (4°C/min, 2 min) i od 240 do 125°C (25°C/min, 2 min). Analiza uzoraka je provedena na uređaju za plinsku kromatografiju združenu sa spektrometrijom masa („Agilent-Technologies“, SAD). Fragmenti odgovarajućih masa su uspoređeni s literaturom (Biermann i McGinnis, 1989) i bazom podataka (<https://www.cerc.uga.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html>), te je određen tip veze u uzorku.

3.2.3.4. *In silico* analiza *eps* genskog klastera

Kako bi se ustanovila prisutnost *eps* genskog klastera u genomu *L. fermentum* D12 provedena je pretraga gena koji sudjeluju u biosintezi egzopolisaharida. Provedena je anotacija aminokiselinskih sekvenci dobivenih pomoću RAST servera primjenom BLASTp (*engl.* basic local alignment search tool for proteins) algoritma u NCBI proteinskoj bazi podataka (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pripadajući klaster i pretpostavljeni model biosintetskog puta *eps* genskog klastera soja *L. fermentum* D12 keiran je primjenom BioRender software-a (<https://biorender.com/>). Usporedba *eps* genskih klastera soja *L. fermentum* D12 s drugim *L. fermentum* sojevima slične strukturne organizacije provedena je primjenom tBLASTx (*engl.* basic local alignment search tool for translated nucleotide) algoritma u NCBI nukleidnoj bazi podataka.

3.2.3.5. Morfološka karakterizacija SEM

Morfološka karakterizacija liofiliziranih EPS-a soja *L. fermentum* D12, provedena je primjenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM VEGA3 TESCAN, Češka) s ubrzanim naponom od 10kV, u Znanstvenom centru izvrsnosti za napredne materijale i senzore, Institut za fiziku, Zagreb.

3.2.3.6. Funkcionalna uloga egzopolisaharida

3.2.3.6.1. Utjecaj egzopolisaharida na adheziju bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa

Ispitan je utjecaj različitih koncentracija EPS-a na sposobnost adhezije soja *L. fermentum* D12 na proteine ekstracelularnog matriksa (ECM), odnosno na imobilizirani humani fibronektin/laminin/kolagen (Corning® BioCoat™, SAD), prema Antikainen i sur. (2002). Za ispitivanje adhezije korištene su bakterijske stanice uzgojene do kasne eksponencijalne faze u koncentraciji koja odgovara $OD_{620nm} = 1,0$ ($9,25 \cdot 10^9$ CFU/mL), suspendirane u fosfatnom puferu s dodanim EPS-a ima u različitim koncentracijama (0,2; 0,5 i 1 mg/mL). Kao kontrola su korištene bakterijske stanice suspendirane u 1 mL fosfatnog pufera. Polysorp pločice s 96 jažica ravnog dna su sadržavale 50 µg/mL imobiliziranog fibronektina/laminina/kolagena u karbonat/bikarbonatnom puferu koncentracije 50 mmol/L, pH vrijednosti 9,6. Jažice su isprane tri puta s fosfatnim puferom i blokirane tijekom 1 sata fosfatnim puferom s dodatkom 1 % Tween 20 (Sigma, SAD). 100 µL pojedinog uzorka soja *L. fermentum* D12 uz dodatak tri različite koncentracije EPS-a te kontrola, odnosno soj *L. fermentum* bez dodatka EPS-a, dodano je u svaku jažicu u tri paralele, nakon čega je slijedila prekonoćna inkubacija pri 4°C. Nakon uklanjanja neadheziranih stanica, ispiranjem tri puta s 200 µL fosfatnog pufera koji sadrži 0,05 % Tween 20 (Sigma, SAD), ploče su pažljivo osušene kroz sat vremena. Adhezirane bakterijske stanice detektirane su bojanjem kristal violetom (1 mg/ml) tijekom 45 min. Nakon ispiranja, bojilo je otpušteno dodavanjem 100 µL citratnog pufera (50 mmol/L, pH 4,0) u svaku jažicu. Apsorbancija je određena pri 620 nm na Infinite F Plex čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Švicarska). Prazne jažice, odnosno jažice u koje nisu dodane stanice nego samo fosfatni korištene su kao kontrola u svim eksperimentima te su njihove vrijednosti apsorbancije oduzimate od vrijednosti za jažice s adheziranim bakterijskim stanicama, pri čemu je veći intenzitet obojenja (veća apsorbancija) upućivao na veći broj adheziranih stanica.

3.2.3.6.2. Utjecaj egzopolisaharida na adheziju soja producenta na mucin

Ispitivanje utjecaja EPS-a na adheziju soja *L. fermentum* D12 na mucin u *in vitro* uvjetima provedeno je prema Antikainen i sur. (2002). U mikrotitarske pločice s 96 jažica dodano je (100

μL) 10 mg/mL otopine mucina u karbonat/bikarbonatnom puferu (50 mmol/L, pH=9,6) i inkubirano preko noći pri 4°C. Prekonoćna kultura soja *L. fermentum* D12 isprana je 2 puta s fosfatnim puferom. Koncentracija bakterijskih stanica je podešena na vrijednost $A_{620}=1$ otopinom odgovarajućih koncentracija EPS-a (0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL i 1 mg/mL) otopljenih u fosfatnom puferu (pH 7,4). Kao kontrola su korištene bakterijske stanice suspendirane samo u fosfatnom puferu (pH 7,4). Jažice s mucinom isprane su tri puta dodatkom 100 μL fosfatnog pufera, nakon čega je u svaku jažicu dodano po 100 μL fosfatnog pufera s 1%-tnim Tween 20 uz inkubaciju 1 sat pri sobnoj temperaturi s ciljem imobilizacije mucina. Iz jažica je pažljivo uklonjen fosfatni pufer s Tweenom, nakon čega je dodano po 100 μL prethodno pripremljenih suspenzija soja D12 u tri paralele. Osim u jažice s mucinom, suspenzije su dodane i u jažice bez mucina za kontrolu adhezije. Kao slijepa proba korišten je fosfatni pufer. Nakon prekonoćne inkubacije pri 37°C, neadhezirane stanice su uklonjene ispiranjem 3 puta s 200 μL 0,05 %-tnog Tween 20 u fosfatnom puferu. Pločica je ostavljena da se osuši tijekom 1 sata, nakon čega je dodano 100 μL kristal violeta (1 mg/mL) u svaku jažicu uz inkubaciju tijekom 45 min. Jažice su zatim isprane tri puta dodatkom 200 μL fosfatnog pufera. Dodatkom 100 μL citratnog pufera (50 mM, pH 4,0) provedeno je otpuštanje bojila vezanog na adhezirane stanice i izmjerena je apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica „Tecan Infinite F PLEX“ pri 620 nm (vrijednosti apsorbancije za slijepu probu oduzete su od vrijednosti za jažice tretirane s bakterijskim stanicama).

3.2.3.6.3. Utjecaj egzopolisaharida na adheziju soja producenta primjenom Caco-2 stanične linije

Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija EPS-a na *in vitro* adheziju soja *L. fermentum* D12 provedeno je na Caco-2 staničnoj liniji kako je opisano u Banić i sur. (2018) s modifikacijama. Caco-2 stanice su inokulirane u plastične pločice s 24 jažice (Falcon®, SAD) u koncentraciji od $1 \cdot 10^5$ stanica/mL i inkubirane tjedan dana uz izmjenu medija svaka 2 dana do dobivanja ujednačenog monosloja. Prije primjene, Caco-2 stanice su isprane 3 puta s fosfatnim puferom (pH 7,4). Stanice prekonoćne kulture soja producenta EPS-a *L. fermentum* D12 isprane su dva puta s fosfatnim puferom (pH 7,4), a optička gustoća stanica je podešena na vrijednost $OD_{620}=1$ uz dodatak različitih koncentracija EPS-a (0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL), pri čemu su kao kontrola korištene samo bakterijske stanice bez dodatka EPS-a. 1 mL tako pripremljenih bakterijskih suspenzija (10^9 CFU/mL) je dodan u svaku jažicu s prethodno uzgojenim Caco-2

stanicama, nakon čega je slijedila inkubacija tijekom 1 sata pri 37°C u 5 %-tnoj atmosferi CO₂ (Brouwer, Švicarska). Monosloj Caco-2 stanica je zatim ispran tri puta s fosfatnim puferom (pH 7,4), kako bi se uklonile neadhezirane bakterijske stanice. Ukupan broj adheziranih bakterijskih stanica u svakoj jažici je određen nakon liziranja Caco-2 stanica primjenom 0,05 % (v/v) Triton X-100 (AppliChem, Darmstadt, Njemačka) otopine tijekom 10 min pri 37°C. Broj živih stanica, adheziranih na Caco-2 stanice, određen je priređivanjem odgovarajućih razrjeđenja u fiziološkoj otopini i naciepljivanjem na MRS agar uz inkubaciju pri 37°C. Postotak adhezije je izračunat prema sljedećoj formuli:

$$\text{adhezija (\%)} = (\log\text{CFU/mL adheziranih bakterija} / \log\text{CFU/mL dodanih bakterija}) \times 100$$

3.2.3.6.4. Utjecaj egzopolisaharida na autoagregacijskih svojstava soja producenta

Utjecaj egzopolisaharida na autoagregacijska svojstva soja *L. fermentum* D12 ispitan je prema Kos i sur. (2003) s modifikacijama. Prekonočno uzgojene bakterijske stanice isprane su dva puta i suspendirane u fosfatnom puferu (pH=7,4) uz dodatak tri različite koncentracije EPS-a (0,2; 0,5 i 1 mg/mL), pri čemu je kao kontrola korišten uzorak bez dodatka EPS-a. Volumen od 4 mL suspenzije uzoraka bakterijskih stanica ($5 \cdot 10^8$ CFU/mL) odpipetiran je u Penicilinke te izmješan na stolnom homogenizatoru Vortex V-1 plus (BioSan, Latvija). Uzorak za ispitivanje bakterijske autoagregacije uzet je u nultom satu te nakon 5 h inkubacije pri sobnoj temperaturi. Autoagregacija je određena mjerenjem apsorbancije uzoraka pri 620 nm pomoću Infinite F Plex čitača mikrotitarskih pločica (Tecan, Švicarska). Mjerenje je provedeno na način da su s površine suspenzija koje su ostavljene mirovati tijekom 5 sati uzeti uzorci od 100 µL te preneseni u jažice na mikrotitarskoj pločici. Postotak autoagregacije je izračunat prema formuli:

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

gdje je:

A_t - apsorbancija u vremenu (tijekom 5 sati)

A_0 - apsorbancija u vremenu 0.

3.2.3.6.5. Ispitivanje protektivnog učinka egzopolisaharida tijekom liofilizacije

Zaštitni učinak egzopolisaharida ispitan je tijekom stresnih uvjeta liofilizacije soja *L. fermentum* D12. Prekonočno uzgojene bakterijske stanice isprane su dva puta i suspendirane u fosfatnom puferu (pH=7,4) uz dodatak tri različite koncentracije EPS-a (0,2; 0,5 i 1 mg/mL), pri čemu je kao kontrola korišten uzorak bez dodatka EPS-a. Bakterijske stanice su liofilizirane u Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka). Broj bakterijskih stanica prije i nakon liofilizacije određen je indirektnom metodom, priređivanjem odgovarajućih razrjeđenja u fiziološkoj otopini i nacjepljivanjem na MRS agar uz inkubaciju pri 37°C.

3.2.4. Detekcija proteolitičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline

3.2.4.1. Određivanje acidifikacijskog kapaciteta

Određena je pH vrijednost supernatanta prekonočnih kultura bakterija mliječne kiseline rodova *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Lactococcus* uzgojenih u MRS i M17 tekućim podlogama i obranom mlijeku. Stupanj kiselosti određen je iz 1 mL uzorka supernatanta razrijeđenog s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak titriran je s 0,1 M NaOH (Carlo ERBA, Italija) uz fenolftalein kao indikator do pojave ružičaste boje. Stupanj kiselosti, odnosno postotak (%) mliječne kiseline određen je prema navedenim formulama:

$$\begin{aligned} \text{°SH} &= a \cdot 20 \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot 2 \\ \% \text{ mliječne kiseline} &= \text{°SH} \cdot 0,0225 \end{aligned}$$

a = volumen (mL) 0,1 M NaOH

$f_{\text{NaOH}} = 1$

(°SH ~ 0,0225 g mliječna kiseline (%))

°SH → stupanj kiselosti

3.2.4.2. Određivanje Fmc⁺ fenotipa

Sposobnost BMK da koaguliraju mlijeko određena je prema Hebert i sur. (2001). Prekonoćna kultura odabranih sojeva BMK je centrifugirana pri 8000 x g tijekom 10 min pri 4°C, nakon čega su stanice isprane dva puta sa sterilnim 50 mM natrij fosfatnim puferom (pH 7,0). Suspenzija stanica je nacijepljena u 10 % (m/V) obranog mlijeka i inkubirana pri 37°C tijekom 16 sati. Ovisno o brzini koagulacije mlijeka, rezultati su interpretirani kao: nema koagulacije, slaba koagulacija, umjerena koagulacija, dobra koagulacija i izvrsna koagulacija.

3.2.4.3. Određivanje proteolitičke aktivnosti

Proteolitička aktivnost prekonoćnih kultura bakterija mliječne kiseline uzgojenih u MRS ili M17 tekućoj podlozi i obranom mlijeku, određena je kvalitativnom metodom difuzije u podlogu prema Raveschot i sur. (2020a) s modifikacijama. Sterilna kruta podloga s obranim mlijekom (10 %) (Sigma-Aldrich, Njemačka) uz dodatak 2 % (m/V) agra (Merck, Njemačka) ohlađena je u vodenoj kupelji (Inkolab, Hrvatska) temperiranoj na 50°C i izlivena u Petrijevu zdjelicu. Nakon skrtnjavanja podloge, izbušene su „rupe“ u agaru bušačem promjera 7 mm, u koje je zatim ukapano 50 µL uzoraka suspenzije stanica i supernatanta bakterijske kulture. Petrijeve zdjelice su inkubirane pri 30°C, a promjeri zona, nastalih uslijed hidrolize kazeina, koji upućuju na proteolitičku aktivnost pojedinog soja bakterije mliječne kiseline određeni su nakon 48 sati.

Proteolitička aktivnosti odabranih sojeva BMK određena je i Ansonovom metodom prema Beganović i sur. (2013). Filtrat supernatanta prekonoćnih kultura svakog soja (1 mL) suspendiran je s 5 mL otopine kazeina, nakon čega je uslijedila inkubacija od 10 min pri 37°C. Reakcija je prekinuta dodatkom 5 mL trikloroetene kiseline (Thermo Fischer Scientific, SAD), pri čemu su istaloženi nehidrolizirani proteini. Nakon ponovne inkubacije (30 minuta, 37°C) i filtracije, u 2 mL filtrata dodano je 5 mL 0,4 M otopine Na₂CO₃ (Kemika, Hrvatska) i 1 mL Folin-Ciocalteu Fenol reagensa (Merck, Njemačka). Uzorak je ponovno inkubiran tijekom 30 min pri 37°C i filtriran, te je izmjerena apsorbanacija pri 670 nm na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006 (Rim, Italija). Slijepa proba je sadržavala predinkubiranu otopinu kazeina kojoj je na početku eksperimenta dodana trikloroetena kiselina, nakon čega je uslijedilo dodavanje supernatanta i svi prethodno opisani postupci. Svi uzorci su pripremljeni u tri paralele, pri čemu je nakon oduzimanja slijepe probe izračunata srednja vrijednost.

Na temelju jednadžbe pravca, očitavanjem apsorbancije (A_{670}) izračunata je množina (μmol) oslobođenog L-tirozina (Merck, Njemačka) (slika 9), uslijed hidrolize kazeina djelovanjem proteaza u uzorcima supernatanta sojeva. Izračunata je i internacionalna jedinica enzimske aktivnosti (I.J.) po mL supernatanta prema jednadžbi:

$$\frac{\text{I.J.}}{\text{ml}} = \frac{n \cdot V_{\text{uk}}}{V_{\text{enz}} \cdot t \cdot V}$$

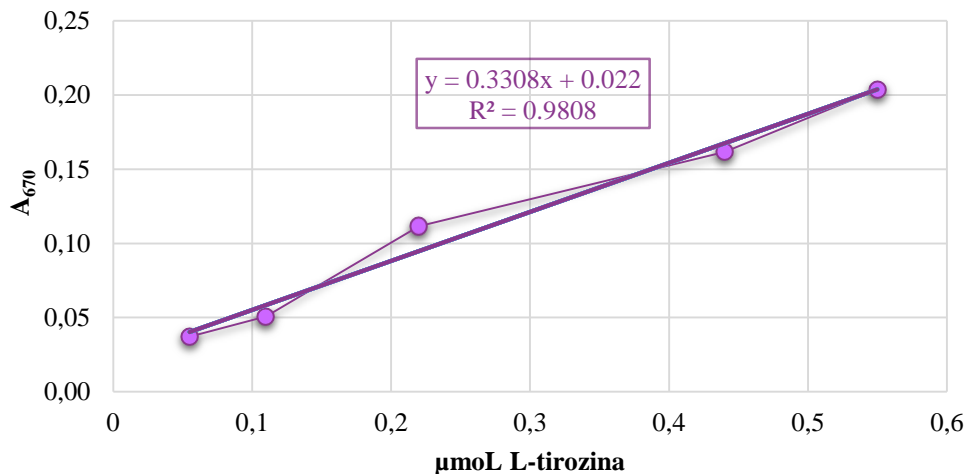
n (oslobođenog Tyr) = μmol

V_{uk} = ukupni volumen uzorka u mL

V_{enz} = volumen supernatanta koji sadrži enzim

t = trajanje enzimske reakcije u minutama

V = volumen uzorka pri kolorimetrijskom određivanju



Slika 9. Standardna krivulja za određivanje proteolitičke aktivnosti Ansonovom metodom

3.2.4.4. Analiza produkata razgradnje kazeina Tricin-SDS-PAGE

Kazeionolitička aktivnost odabranih bakterijskih sojeva je ispitana prema El-Ghaish i sur. (2010) s modifikacijama. Prekonočne kulture su centrifugirane pri 4200 o/min tijekom 10 min, a zatim isprane fosfatnim puferom ($\text{pH} = 7,4$). Dobivena biomasa suspendirana je u 2 %-tnoj otopini obranog mlijeka (Sigma-Aldrich, Njemačka) te inkubirana 48 sati pri 37°C , nakon čega je praćena razgradnja kazeina pomoću Tricin-SDS-PAGE metode. Kao kontrola je korištena neinokulirana otopina obranog mlijeka (2 %). Gel za Tricin-SDS-PAGE pripremljen je prema Haider i sur. (2012).

3.2.4.5. Identifikacija enzima proteolitičkog sustava pomoću MALDI-TOF/TOF

Prekonoćna kultura soja *E. faecium* ZGZA7-10 uzgojena je propagacijom u 400 mL tekuće MRS podloge pri 37°C, nakon čega je provedeno centrifugiranje tijekom 10 min pri 4200 o/min i temperaturi od 4°C. Ekstrakcija proteina provedena je postupcima opisanim u ReadyPrep Total Protein Extraction Kit-u (Bio-Rad, SAD) prema uputama proizvođača. Ekstrakti proteina razdvojeni su SDS-PAGE elektroforezom. Digestija u gelu provedena je prema Shevchenko i sur. (2006). Osušeni uzorci peptida su otopljeni u 0,1 % vodene otopine trifluoroctene kiseline (TFA, Sigma-Aldrich, SAD). Razdvajanje peptida provedeno je tekućinskom kromatografijom (*engl.* liquid chromatography, LC) na Dionex Ultimate 3000 RSLC nano System uređaju uz UV/VIS detektor (Thermo Fischer Scientific, SAD) spregnutim s Proteineer fcII sakupljačem frakcija (Bruker, Njemačka). Separacija je provedena na koloni Acclaim PepMap 100 C18, 3 µm, 100 Å, 75 µm i.d. x 15 cm (Thermo Fisher Scientific, SAD) pri 40°C. Mobilna faza A se sastojala od 0,1 % vodene otopine TFA (v/v), a mobilna faza B od TFA u acetonitrilu (ACN, v/v). Valna duljina na detektoru je podešena na 214 nm. Protok sakupljača frakcije je podešen na 100 µL/h (1,4 mg CHCA matrice otopljene u 1 mL 50 % vodene otopine acetonitrila). Ukupno su sakupljene 192 frakcije. Razdvojene frakcije peptida su automatski uzorkovane na MALDI (*engl.* matrix-assisted laser desorption/ionization) pločicu (Proteineer fcII, Bruker, Njemačka). Analiza peptida provedena je pomoću spektrometra masa Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF (*engl.* time of flight) (Bruker, Njemačka). Analiza MS i MS/MS spektara primjenjena je za pretragu baze podataka pomoću ProteinScape, verzija 3.0 (Bruker, Njemačka) ProteinProspector MS-Tag pretraživačem preko SwissProt i NCBI baze podataka.

3.2.4.6. Detekcija gena za proteinaze primjenom PCR metode

Provedena je PCR reakcija s izoliranom DNA soja *E. faecium* ZGZA7-10. Reakcijska smjesa sastojala se od EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix-a (2x Premix) (Takara, Japan), vode (Takara, Japan), uzorka DNA i specifičnih početnica (5'-GCTTGAATTCGTTGTCGCTGCGGTTGT-3') i (5'-GCATGAATTCAATGCACGATAAATGAG-3') za detekciju intragenske regije odgovorne za odgovorne za ekspresiju proteinaza prema Strahinić i sur. (2009). Kao negativna kontrola za provjeru da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije ovih dviju početnica

korišten je uzorak pripremljen bez dodatka DNA. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD), a reakcija je provedena u uvjetima prikazanim u tablici 3. Nakon završene reakcije uzorci su stavljeni na agarozni gel (1 %), a elektroforeza je provedena pri 100 V. Gel je nakon završetka elektroforeze bojan u otopini etidijevog bromida (Boehringer Mannheim GmbH, Njemačka) koncentracije 0,5 $\mu\text{g/mL}$, nakon čega je stavljen na UV transiluminator (DNR Bio-Imaging Systems, Izrael) gdje je snimljena slika gela pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 3. Uvjeti provođenja PCR reakcije s početnicama za detekciju gena koji kodiraju za enzime uključene u proteolitičku aktivnost

Uvjeti PCR reakcije	Temperatura	Trajanje
Početa denaturacija	94°C	4 min
<u>30 ciklusa:</u>		
Denaturacija	94°C	1 min
Sparivanje početnica	56°C	1 min
Produljivanje lanca DNA	72°C	1,5 min
Završno produljivanje lanca DNA	72°C	7 minuta

3.2.4.7. Određivanje fermentacijskih profila šećera pomoću API 50 CHL testa

Sojevi *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12 i *L. plantarum* D13 uzgojeni su anaerobno, a soj *E. faecium* ZGZA7-10 aerobno na odgovarajućem agaru u obliku kolonija. Pomoću mikrobiološke ušice s agra je sterilno dodana biomasa u ampulu koja sadrži API 50 CHL medij. Gustoća inokuluma je izmjerena u denzitometru (BioMérieux, Francuska) i podešena na 2 McF (1 McFarland je $30 \cdot 10^7$ stanica/mL). Tako pripremljena suspenzija dodana je u svaku ampulu, od kojih svaka na dnu sadrži jedan od 49 različitih ugljikohidrata. U ampule je nakon toga dodano mineralno ulje (BioMérieux, Francuska) kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Tako priređen API strip, stavljen je u termostat na inkubaciju pri optimalnoj temperaturi rasta mikroorganizma. Rezultati su očitani nakon 24 h, odnosno 48 h nakon inkubacije, te su unešeni u program APIWEB[®]. Ukoliko dodana bakterija fermentira određeni ugljikohidrat kao produkt njenog metabolizma nastaju kiseline (mliječna i octena kiselina), odnosno dolazi do zakiseljavanja podloge, pri čemu dolazi do promjene boje medija koji sadrži bromkrezol purpurni indikator, u žutu boju (+), a ukoliko ne fermentira ostat će plavo-ljubičaste boje (-). Ukoliko neka ampula sadrži željezo doći će do promjene boje u crnu (+).

Biokemijski profil se očita, a bakterijske kulture identificiraju pomoću programskog paketa s bazom podataka V 5.0, prema uputama proizvođača.

3.2.4.8. Parametri fermentacije tijekom rasta u mlijeku

Nakon prekonocnog uzgoja sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, bakterijske stanice isprane su dva puta s fiziološkom otopinom, a uzgoj je proveden u 50 mL samo obranog mlijeka (2 %) i u 50 mL obranog mlijeka (2 %) uz dodatak različitih koncentracija NaCl-a (2,0, 4,0 i 6,5 % (w/v)) za svaki pojedini soj. Inkubacija je provedena aerobno tijekom 48 h pri 37°C. Tijekom uzgoja odabranih bakterijskih izolata u obranom mlijeku i u obranom mlijeku pri različitim koncentracijama soli (NaCl-a), praćeni su parametri proizvodnje mliječne kiseline (opisano u poglavlju 3.2.4.1.), promjene pH vrijednosti te broj živih stanica u uzorcima indirektnom metodom, neposredno nakon inokulacije te nakon 6, 24 i 48 sati uzgoja.

Broj živih bakterijskih stanica u uzorcima određen je indirektnom metodom tj. nacjepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica u obliku kapi (10 µL) na Petrijeve zdjelice s odgovarajućom MRS hranjivom podlogom. Ploče s nacjepljenim *Lactobacillus* vrstama inkubirane su anaerobno, dok su ploče s nacjepljenim sojem *E. faecium* ZGZA7-10 inkubirane aerobno tijekom 24 sata pri 37°C. Nakon inkubacije određen je broj živih bakterijskih stanica i izražen kao razlika logaritamskih vrijednosti CFU/mL_{obranog mlijeka} od početnog broja nacjepljenih stanica u 0. satu.

3.2.4.9. Kvantifikacija laktoze, laktata, acetata i diacetila

Kvantifikacija laktoze, laktata, acetata i diacetila u uzorcima bakterijskih kultura nakon uzgoja u obranom mlijeku provedena je tekućinskom kromatografijom (HPLC-UV/VIS-DAD) i plinskom kromatografijom diacetila (GC-FID). Usporedbom s kalibracijskim krivuljama koje su pripravljene upotrebom odgovarajućih standarada; D-laktoza monohidrat (Sigma-Aldrich, SAD), anhidridni natrijev acetat (Sigma-Aldrich, SAD), natrijev-D,L-laktat (Sigma-Aldrich, SAD) i diacetil (Sigma-Aldrich, SAD), određene su koncentracije laktoze, mliječne i octene kiseline i diacetila prisutne u uzorcima. Koncentracija octene kiseline izračunata je množenjem rezultata sadržaja acetata s faktorom $F = \text{omjer } Mr(\text{octena kis.})/Mr(\text{natrijeva acetata})$. Koncentracija mliječne kiseline izračunata je množenjem rezultata sadržaja laktata s faktorom $F = \text{omjer } Mr(\text{mliječna kis.})/Mr$

(natrijeva laktata). Granica kvantifikacije HPLC/UV/VIS (DAD) metode iznosi 0,00625 mg/mL acetata i 0,00625 mg/mL lakata, a GC-FID metode za određivanje koncentracije diacetila 100 µg/mL (100 ppm). Granica kvantifikacije metode za određivanje diacetila GC-FID metodom je 100 ppm. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dvaju nezavisnih mjerenja. Analize su provedene u Biocentru d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

3.2.5. Sekvencioniranje cijelog genoma

Genomi soja producenta bakteriocina *L. plantarum* D13, soja producenta egzopolisaharida *L. fermentum* D12 i proteolitičkog soja *E. faecium* ZGZA7-10 sekvencionirani su u IGA Technology, Udine, Italija, nakon izolacije DNA primjenom Maxwell[®] DNA Cell kit-a u Maxwell[®] 16 Research System uređaju (Promega, USA) prema uputama proizvođača. Sekvencioniranje je provedeno na Illumina's MiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA) uređaju pristupom uparenog kraja (*engl.* „paired-end approach“) kako je opisano u Banić i sur. (2018). Genomske sekvence su pohranjene u NCBI bazi podataka, a pregled projekta (BioProject PRJNA388578) i brojeva pod kojim su objavljeni (*engl.* accession numbers) prikazani su u tablici 13. Za obradu podataka korištena je verzija CASAVA 1.8.2. Anotacija, distribucija i kategorizacija sekvencioniranih gena provedena je primjenom RAST (*engl.* rapid annotations using subsystems technology) servera, koji provodi identifikaciju kodirajućih proteina, rRNA i tRNA gena, dodjeljuje funkcije genima, i predviđa koji podsustavi su prisutni u genomu (Aziz i sur., 2008). Za konstrukciju genomskog atlasa, potpuno sekvencionirani genomi su analizirani primjenom PATRIC aplikacije (<https://www.patricbrc.org/>) (Wattam i sur., 2014). Filogenetska udaljenost sekvencioniranih genoma sojeva producenata funkcionalnih biomolekula bakteriocina - plantaricina (*L. plantarum* SF9C, *L. plantarum* M92C, *L. plantarum* D13 i *L. plantarum* SF15C), egzopolisaharida (*L. fermentum* D12), površinskih S-proteina (*L. helveticus* M92, *L. brevis* ZG1-K7, *L. brevis* D6, *L. brevis* SF9B i *L. brevis* SF15B) i proteolitičkog soja *E. faecium* ZGZA7-10 određena je konstrukcijom filogenetskog stabla primjenom REALPHY servera, verzija 1.12 (<https://realphy.unibas.ch/realphy/>). Određena je i filogenetska udaljenost soja producenta egzopolisaharida, *L. fermentum* D12, sa svim sojevima dostupnima u NCBI bazi podataka.

3.2.6. *In vitro* ispitivanja adhezijskih svojstava na Caco-2 staničnoj liniji

Ispitivanje adhezijskih svojstava odabranih sojeva BMK (*L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10) na Caco-2 staničnoj liniji, provedeno je prema Leboš Pavunc i sur. (2019) s modifikacijama. Monosloj Caco-2 stanične linije naciepljen je na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica (Greiner Bio-One, Austrija) uz dodatak DMEM/F12 medija (Corning Scientific GmbH, Njemačka) obogaćenog s L-glutaminom (Merck, Njemačka) i 10 %-tnim FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, by Life Technologies, SAD), nakon čega su stanice isprane dva puta s DMEM medijem. Prije naciepljivanja, jezgre Caco-2 stanica su obojane s Incucyte Nuclight Rapid crvenom bojom (PHI AB, SAD). Prekonoćna kultura odabranih sojeva BMK je centrifugirana pri 5000 x g tijekom 5 min, nakon čega su stanice isprane dva puta sa sterilnim fosfatnim puferom (Gibco, by Life Technologies, SAD), a koncentracija im je podešena na $2 \cdot 10^8$ CFU/mL. Bakterijske stanice su suspendirane u 5 mM Viafluor 488 boji (Biotium, SAD), inkubirane tijekom 15 min pri 37°C, nakon čega su suspendirane u DMEM mediju i dodane na formirani monosloj Caco-2 stanične linije s podešenim multiplicitetom infekcije (*engl.* multiplicity of infection, MOI) od 50 bakterija po stanici, nazvanim MOI 50, i inkubirane tijekom 1, 4 i 12 sati pri 37°C, uz lagano miješanje. Nakon inkubacije, neadhezirane bakterijske stanice su isprane tri puta s fosfatnim puferom i fiksirane dodatkom 4 %-tnog paraformaldehida (Gibco, by Life Technologies, SAD) i fosfatnog pufera. Nakon fiksiranja i ispiranja s fosfatnim puferom, mikroskopske fluorescentne slike Caco-2 stanica i adheziranih bakterijskih stanica su detektirane primjenom EVOS FLc Cell Imager uređaja (ThermoFisher Scientific, USA) pri povećanju od 20x. Analize su provedene u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji SuZ.

3.2.7. Kolonizacijski potencijal autohtonih BMK *in vivo*

3.2.7.1. Priprema suspenzije bakterijskih stanica i kaniliranje štakora

750 μ L svake od odabranih prekonoćnih kultura sojeva *E. faecium* ZGZA7-10, *L. fermentum* D12, *L. brevis* D6 i *L. plantarum* D13 združeno je u dizajnirani konzorcij BMK. Nakon centrifugiranja, talog stanica je suspendiran u 0,5 mL fiziološke otopine, a indirektnom metodom je određen broj živih mikroorganizama naciepljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica u sterilnoj destiliranoj vodi na MRS agar u obliku kapi (10 μ L) u dvije paralele. Nakon 48 h

anaerobne inkubacije pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po mililitru uzorka. Eksperiment intervencije na modelu štakora se provodio na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Održavanje i briga o svim eksperimentalnim životinjama je provedena prema članku 21. Zakona o zaštiti životinja (Narodne novine, broj NN135/06 i NN37/13), članka 41. i 96. Zakona o općem upravnom postupku (Narodne novine, broj 47/09) Republike Hrvatske, te u skladu s direktivom Europske Unije (EU) 2010/63/EU o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (OJEU, 2010). Istraživanja su odobrena od strane Etičkog povjerenstva, br. odobrenja HR-POK-012. Štakori (n=12) su 5 dana uzastopno kanilirani s 0,5 mL pripremljene probiotičke suspenzije u kojoj je broj živih mikroorganizama iznosio $1,243 \cdot 10^{10}$ CFU/mL, izravno u želudac, te su prikupljeni uzorci fecesa s čiste stelje prije postupka kaniliranja, 3. i 5. dan kaniliranja, unutar 2 h nakon premještanja štakora u čisti kavez i 7. dan nakon prestanka kaniliranja.

3.2.7.2. Profiliranje mikrobiote fecesa štakora

100 mg fecesa štakora suspendirano je u 1 mL fiziološke otopine te su uklonjeni netopljivi ostaci fecesa i stelje. Talog stanica dobiven centrifugiranjem 10 min pri 13000 o/min, suspendiran je u 400 µL otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Nakon 2 h inkubacije, uzorci su uronjeni u led kako bi se spriječilo njihovo zagrijavanje tijekom sonikacije provedene na uređaju Sonopuls mini20 (Bandelin, Njemačka) u 3 ciklusa s trajanjem od 30 s i s 15 s pauze između ciklusa. Potom je izolirana DNA iz ukupnog volumena pripremljenog uzorka u Maxwell[®] 16 Research System instrumentu (Promega, SAD) primjenom odgovarajućeg Maxwell[®] DNA Tissue kita. Koncentracija DNA je izmjerena uređajem Biospec Nano (Shimadzu, Japan) pri valnoj duljini 0,7 nm. Raspon vrijednosti dobivenih koncentracija su 123,86 ng/µL - 261,40 ng/µL. Uzorci izolirane DNA su poslani na Illumina MiSeq sekvenciranje (Molecular Research, SAD), a ostatak je pohranjen na -20°C do daljnjih analiza. Dobiveni podaci u fasta formatu korišteni su za daljnju bioinformatičku analizu pomoću QIIME 2[™] (*engl.* quantitative insights into microbial ecology) platforme u suradnji s Kabinetom za bioinformatiku PBF-a, SuZ.

3.2.8. Mikroinkapsulacija BMK u različitim matriksima

3.2.8.1. Mikroinkapsulacija bakterijskih stanica u κ -karagenanu

Prekonoćne kulture sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 uzgojene su propagacijom u 300 mL odgovarajuće tekuće podloge. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min (4°C), a zatim ispirane dva puta s 10 mL fiziološke otopine. Talog stanica nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom suspendiran je u istom volumenu 2 %-tne (v/w) otopine κ -karagenana (Sigma, SAD). Smjesa bakterijskih stanica i κ -karagenana postepeno je dodana u 1 %-tnu otopinu kalcijeva klorida uz miješanje na tresilici (New Brunswick Scientific, SAD). Talog je ispran dva puta s fiziološkom otopinom, a broj stanica je određen indirektnom metodom, te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica.

3.2.8.2. Mikroinkapsulacija bakterijskih stanica u kazeinu djelovanjem transglutaminaze

Prekonoćne kulture sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 uzgojene su propagacijom u 300 mL odgovarajućeg tekuće podloge. Nakon prekonoćnog uzgoja bakterijske stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min (4°C), a zatim ispirane dva puta s 10 mL fiziološke otopine. Nakon određivanja početnog broja stanica indirektnom metodom, talog stanica suspendiran je u 15 %-tnoj otopini kazeina (Sigma, SAD), u koju je dodan enzim transglutaminaza (10 U transglutaminaze/g kazeina). Smjesi bakterijskih stanica i kazeina dodano je u 150 mL temperiranog biljnog ulja, te je provedeno miješanje na tresilici (New Brunswick Scientific, SAD) pri 900 g/min tijekom 2 sata uz zagrijanje pri 40°C. Nastala suspenzija stanica odvojena je od uljne faze centrifugiranjem pri 500g/min tijekom 1 minute. Supernatant je odbačen, a nastale mikrokapsule su suspendirane u 2x volumenu Ringerove otopine (Merck, Njemačka), nakon čega je uljna faza uklonjena centrifugiranjem pri 500g/min tijekom 1 minute. Mikrokapsule su razbijene u Bag-mixeru (Interscience, Francuska), a broj mikroinkapsuliranih stanica određen je indirektnom metodom, te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica.

3.2.8.3. Mikroinkapsulacija bakterijskih stanica u alginatu

Prekonoćne kulture sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 uzgojene su propagacijom u 300 mL tekuće MRS podloge. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min (4°C), a zatim isprane dva puta s 10 mL fiziološke otopine. Talog stanica nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom suspendiran je u istom volumenu 2 %-tne (v/w) otopine natrijeva alginata (Fluka, Švicarka). Smjesa bakterijskih stanica i alginata postepeno je dodana u 1 %-tnu otopinu kalcijeva klorida uz miješanje na magnetnoj mješalici (IKA-Werke GmbH & Co, Njemačka), prilikom čega dolazi do formiranja mikrokapsula. Kuglice su ostavljene 1 sat na tresilici (New Brunswick Scientific, SAD) da očvrstnu, nakon čega je uslijedilo ispiranje dva puta s fiziološkom otopinom i određivanje broja mikroinkapsuliranih stanica oslobađanjem iz mikrokapsula pomoću 2 %-tnog (v/w) Na-citrata (T.T.T., Hrvatska) (prilagođeno prema Li i sur., 2009), te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu mikroinkapsuliranih stanica. Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (*engl.* encapsulation yield, EY), odnosno broj živih stanica prije i poslije mikroinkapsulacije izračunat je prema navedenoj formuli, gdje je N broj živih mikroinkapsuliranih stanica, a N₀ broj slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks (alginat, κ-karagenan ili kazein) (Vaziri i sur., 2018):

$$EY = \frac{N}{N_0} \times 100$$

3.2.8.4. Mikroinkapsulacija u alginatu uz dodatak prebiotika

U svrhu što duljeg preživljavanja mikroinkapsuliranog i liofiliziranog probiotičkog soja producenta egzopolisaharida *L. fermentum* D12, mikroinkapsulacija stanica u 2 %-tnom alginatu za koji je dokazana najbolja učinkovitost provedena je na isti način opisano u poglavlju 3.2.8.3. uz dodatak različitih vrsta prebiotika; inulin i fruktooligosaharid (FOS) (Magdis d.o.o., Hrvatska), manitol (Difco, SAD) i laktuloza (Calbiochem, SAD) u konačnoj koncentraciji od 5 % (w/v). Kao kontrola je korišten mikroinkapsulirani soj *L. fermentum* D12 u koji nije dodan niti jedan od navedenih prebiotika.

3.2.9. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica u alginatu

3.2.9.1. Liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica u alginatu s lioprotektorima

Provedena je liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica u alginatu uz dodatak lioprotektora; obrano mlijeko (Fluka, Njemačka) (10 % w/v), inulin (Difco, SAD) (10 % w/v), saharoza (Kemika, Hrvatska) (10 % w/v), laktoza (Kemika, Hrvatska) (10 % w/v) i sorbitol (Kemika, Hrvatska) (10 % w/v). Bakterijske stanice mikroinkapsulirane u alginatu liofilizirane uz dodatak fiziološke otopine korištene su kao kontrolni uzorak. Uzorci su zamrznuti pri -80°C , nakon čega je provedena liofilizacija priređenih mikrokapsula s dodatkom različitih lioprotektora u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka). Oslobođanje stanica iz liofiliziranih mikrokapsula, provedeno je pomoću 2 %-tnog (v/w) Na-citrata (T.T.T., Hrvatska) (prilagođeno prema Li i sur., 2009). Broj stanica određen je indirektnom metodom.

3.2.9.2. Preživljavanje mikroinkapsuliranih i liofiliziranih stanica BMK u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) (Sigma, SAD) u 0,5 % otopini natrijevog klorida (Kemika, Hrvatska), kojoj je pH vrijednost podešena na 2,0 s koncentriranom klorovodičnom kiselinom (Sigma-Aldrich, SAD). Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) (Fluka, Švicarska) i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) (Difco, SAD) u 0,5 % otopini natrijeva klorida, kojoj je pH vrijednost podešena na 8,0 s natrijevom lužinom (Kemika, Hrvatska) (Kos, 2001). Stanice odabranih bakterijskih kultura, *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, mikroinkapsulirane u alginatu (2 % (w/v)) i liofilizirane uz dodatak obranog mlijeka (10 % (w/v)) kao lioprotektora za koji je dokazan najbolji protektivni učinak i nemikroinkapsulirane stanice liofilizirane bez dodatka lioprotektora, odnosno uz dodatak fiziološke otopine (kontrola), izložene su djelovanju želučanog soka tijekom 2 sata, a zatim su centrifugirane pri 3500 o/min i suspendirane u simuliranom soku tankoga crijeva tijekom iduća 4 sata (Kos, 2001). Oslobođanje stanica iz liofiliziranih mikrokapsula, nakon djelovanja želučanog soka te želučanog soka i tankog crijeva, provedeno je pomoću 2 %-tnog (v/w) Na-citrata (T.T.T., Hrvatska) (prilagođeno prema Li i sur., 2009). Broj stanica određen je indirektnom metodom.

3.2.9.3. Liofilizacija stanica *L. fermentum* D12 mikroinkapsuliranih u alginatu s prebiotičkim supstratima

Provedena je liofilizacija stanica soja *L. fermentum* D12 mikroinkapsuliranog u alginatu uz dodatak različitih prebiotika, FOS+inulin, manitol, laktuloza i uz dodatak obranog mlijeka (10 % w/v) (Fluka, Njemačka) kao lioprotektora. Kao kontrole su korišteni mikroinkapsulirani uzorak u koji nije dodan niti jedan prebiotik, liofiliziran uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora i mikroinkapsulirani uzorak u koji nije dodan niti jedan prebiotik, liofiliziran bez dodatka lioprotektora, odnosno u koji je dodana fiziološka otopina. Uzorci su zamrznuti pri -80°C preko noći, nakon čega je proveden proces liofilizacije u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka). Ispitivanje broja živih mikroinkapsuliranih stanica provedeno je tjedan dana nakon postupka mikroinkapsulacije te nakon 1, 2, 3, 6 i 12 mjeseci. Liofilizirane mikroinkapsulirane stanice su tretirane s 2 % (v/w) Na-citratom (T.T.T., Hrvatska) (prilagođeno prema Li i sur., 2009). Broj stanica je određen indirektnom metodom, priređivanjem odgovarajućih razrjeđenja u fiziološkoj otopini i naciepljivanjem na MRS agar uz inkubaciju pri 37°C. Preživljavanje liofiliziranih stanica soja *L. fermentum* D12 mikroinkapsuliranih u alginatu s prebiotičkim supstratima i u obranom mlijeku tijekom prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a, ispitano je kako je opisano u poglavlju 3.2.9.2.

3.2.9.4. Detekcija prisutnosti soja *L. fermentum* D12 u mikrokapsulama RAPD-PCR metodom

U svrhu utvrđivanja prisutnosti soja *L. fermentum* D12 u mikrokapsulama, nakon razgradnje alginatnih mikrokapsula pomoću 2 %-tnog (v/w) Na-citrata (T.T.T., Hrvatska) (prilagođeno prema Li i sur., 2009) provedena je izolacija DNA iz kolonija poraslih na MRS pločama pomoću Genomic Wizard kita (Promega, SAD) i RAPD-PCR reakcija s početnicom M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') kako je opisano u poglavlju 3.2.10.4. Kao kontrola je korištena ukupna genomska DNA soja *L. fermentum* D12.

3.2.9.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfološka karakterizacija liofiliziranih mikrokapsula soja *L. fermentum* D12, pripremljenih kako je opisano u poglavlju 3.2.3.5., provedena je primjenom skenirajuće elektronske mikroskopije

(SEM VEGA3 TESCAN, Češka) s ubrzanim naponom od 10kV, u Znanstvenom centru izvrsnosti za napredne materijale i senzore, na Institutu za Fiziku, Zagreb.

3.2.10. Kontrolirana fermentacija odabranim konzorcijem BMK

U svrhu proizvodnje sušenog svježeg sira i sirutke zaostale nakon proizvodnje, s poboljšanim nutritivnim svojstvima i dodanom funkcionalnom vrijednošću odabrane su sljedeće starter kulture: *L. brevis* D6, *L. plantarum* D13, *L. fermentum* D12 i *E. faecium* ZGZA7-10. *L. brevis* D6 je u prijašnjim istraživanjima okarakteriziran kao soj koji eksprimira S-proteine (Uroić i sur., 2016). U suradnji s Probiotik d.o.o., proizvedena su 2 različita uzorka sušenog svježeg kravljeg sira u tri paralele, od kojih je kontrolni sir proizveden primjenom komercijalne starter kulture DELVO[®]CHEESE CT-203 DSF, proizvođača DSM Food Specialties B.V., koja sadrži *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc* spp. Nakon optimizacije uvjeta potrebnih za proizvodnju sira odgovarajuće kvalitete, određeni volumeni prekonocnih kultura odabranih izolata BMK su centrifugirani 10 min pri 4200 o/min, a talog bakterijskih stanica je ispran dva puta sa sterilnom fiziološkom otopinom. Izmjerena je pH vrijednost mlijeka prije i nakon inokulacije i tijekom fermentacije. Nakon dodatka odgovarajućih autohtonih starter kultura određen je broj stanica u inokulumu indirektnom metodom (tablica 4). Prije dodatka starter kultura, mlijeko je dogrijavano pri 40°C uz dodatak 0,3 mL/L CaCl₂ i 0,03 g/L sirila Bioren[®] u prahu, nakon čega je provedeno zrenje tijekom 18 sati do postizanja izoelektrične točke kazeina kazeina pri pH vrijednosti 4,6. Dobiveni gruš je obrađen rezanjem na kocke dimenzija 2 · 2 cm². Kalupljenje i cijedenje je provedeno nakon mirovanja od jednog sata pri sobnoj temperaturi tijekom 2 sata.

Tablica 4. Početan broj bakterijskih stanica (CFU/mL) inokuliranih u mlijeko u svrhu dobivanja sušenog svježeg sira

Bakterijski soj	CFU/mL (±SD)
<i>Levilactobacillus brevis</i> D6	1,87 · 10 ⁶ (±0,862)
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> D13	1,44 · 10 ⁶ (±0,678)
<i>Enterococcus faecium</i> ZGZA7-10	5,22 · 10 ⁶ (±1,651)
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> D12	2,65 · 10 ⁶ (±0,617)

3.2.10.1. Analiza parametara kvalitete fermentiranih proizvoda

3.2.10.1.1. Određivanje prinosa i suhe tvari sušenog svježeg sira i sirutke

Nakon proizvodnje svježih sireva određene su njihove mase, prinosi te volumeni sirutki zaostalih nakon proizvodnje. U cilju dobivanja sušenog svježeg sira, dobiveni svježi sirevi su sušeni tijekom 48 sati pri 40°C uz okretanje sireva nakon 24 sata. Volumen izdvojene sirutke je određen nakon proizvodnje svježeg sira. Također, nakon dobivanja konačnih proizvoda, sušenih svježih sireva, izvagana im je masa te određen prinos. Prinosi svježeg sira i sušenog svježeg sira određen je vaganjem mase proizvedenog sira, a izračunat je obzirom na količinu upotrijebljene sirovine, odnosno svježeg mlijeka „Veronika“, prema navedenoj formuli (Leboš Pavunc i sur., 2012):

$$\text{Prinos sira (\%)} = \frac{\text{masa proizvedenog sira}}{\text{volumen upotrijebljene sirovine}} \cdot 100$$

Suha tvar je određena u uzorcima sireva u tri paralele direktnom metodom prema Božanić i sur. (2010). Dno aluminijske posudice je prekriveno kvarcnim pijeskom promjera 0,1-0,5 mm (Gram mol, Hrvatska) i sušeno u sušioniku (Instrumentaria, Hrvatska) pri 102±2°C tijekom 3-4 sata. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom je dodano 2-3 g uzorka sira nakon čega su uzorci sušeni pri temperaturi od 102 ± 2°C tijekom 2 sata. Nakon 2 sata sušenja, posudica s poklopcem i uzorkom je ohlađena u eksikatoru, najmanje 30 minuta i nakon toga izvagana. Postupak je proveden do dobivanja konstantne mase, pri čemu je za izračunavanje postotka suhe tvari u siru korištena najmanja zabilježena vrijednost. Svi uzorci su pripremljeni u tri paralele, uz izračunate srednje vrijednosti i standardne devijacije (±SD).

Iz razlike u masi je izračunat postotak suhe tvari:

$$\% \text{ vode u siru} = a/c \cdot 100$$

a = razlika u masi aluminijske posudice s uzorkom prije i nakon sušenja (g)

c = masa odvaganutog uzorka (g)

3.2.10.1.2. Mikrobiološka analiza fermentiranih proizvoda

Mikrobiološka čistoća nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sušenih svježih sireva te liofilizirane (proces liofilizacije objašnjen u poglavlju 3.2.9.1.) i neliofilizirane sirutke nakon 5 i 10 dana pohranjenih pri 4°C određena je indirektnom metodom. Iz sira je mikrobiološka ispravnost određena na način da je 1 gram sira sterilno uzet iz unutrašnjosti sira i suspendiran u 9 mL sterilne destilirane vode te smrvljen u bag mixer-u (Interscience, Francuska) do dobivanja homogene suspenzije, a iz sirutke na način da je 1 mL sirutke sterilno suspendirano (liofilizirani uzorci sirutke su prethodno otopljeni u 1 mL sterilne destilne vode) u 9 mL sterilne destilirane vode. Nakon toga je provedeno naciepljivanje decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica u sterilnoj destiliranoj vodi na odgovarajući agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. U svrhu detekcije bakterija roda *Listeria* i *Salmonella*, bakterijske suspenzije su naciepljene na ChromoBio® *Listeria* agar (Biolab, Mađarska) i XLD agar (Biolife, Italija). Nakon 48 h aerobne inkubacije pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije, te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu uzorka.

3.2.10.1.3. Analiza kemijskih parametara u fermentiranim proizvodima

Količina masti i laktoze određena je iz 50 grama uzoraka sušenih svježih sireva i 50 mL sirutke u Centru za kontrolu namirnica (CKN, Zagreb, Hrvatska). Količina masti određena je metodom po Soxhletu, a količina laktoze gravimetrijskom metodom (Gamero-Barraza i sur., 2018). pH vrijednost proizvedenih sušenih svježih sireva i sirutki nakon proizvodnje određena je pomoću pH elektrode (Metrohm, Švicarska) u siru i sirutki.

3.2.10.1.4. Analiza senzorskih svojstava fermentiranih proizvoda

Senzorska svojstva proizvedenih sušenih svježih sireva ocjenjena su prema Kirin (2006). Utvrđena su organoleptička svojstva sira mjerenjem, vaganjem i opisom vanjskog izgleda, konzistencije, prereza, mirisa i okusa. Grupa ocjenjivača se sastojala od 5 članova, a rezultati ocjene senzorskih svojstava sušenih svježih sireva su navedeni kao srednja vrijednost svih ocjenjivača. Vanjski izgled sušenog svježeg sira određen je njegovim dimenzijama, tj. promjerom i visinom, masom sira te

oblikom i bojom kore, koja je posljedica sušenja. Određena je srednja vrijednost dimenzija sireva iz tri paralele uz izračunate standardne devijacije (\pm SD).

Kod provođenja senzorske analize kvalitete proizvoda na bazi sirutke praćeni su okus, boja, talog i izgled nakon proizvodnje napitka. Ocjenjivanje je provodilo 5 članova koji su pojedino svojstvo sirutke ocijenili ocjenama od 1 do 5, a rezultati ocjene senzorskih svojstava sirutki navedeni su kao srednja vrijednost svih ocjenjivača uz izračunate standardne devijacije (\pm SD). Senzorsko ocjenjivanje proizvedenih napitaka s i bez dodatka aroma kopmonenata maline i vanilije u svrhu poboljšanja senzorskih svojstava proizvedenih sirutki provedeno je prema Božanić i sur. (2010). Za hedonističku senzorsku analizu prihvatljivosti fermentiranog proizvoda (s i bez dodatka aroma komponenata) grupa ocjenjivača se također sastojala od 5 članova.

3.2.10.2. Određivanje broja živih stanica mješovite starter kulture primjenom mikrobioloških metoda

Broj živih stanica BMK nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sireva pri 4°C određen je nakon 5 i 10 dana, na način da je 1 gram sira sterilno uzet iz unutrašnjosti sira i suspendiran u 9 mL sterilne destilirane vode te smrvljen u bag mixer-u (Interscience, Francuska) do dobivanja homogene suspenzije. Nakon toga, broja stanica određen je indirektnom metodom. Broja stanica BMK 5 i 10 dana nakon skladištenja izražene su kao razlika logaritamskih vrijednosti (Δ log CFU/g sira) od logaritamske vrijednosti broja vijabilnih bakterijskih stanica nakon proizvodnje sira (0. dan).

3.2.10.3. Usporedba preživljavanja probiotičkih sojeva tijekom čuvanja tekuće sirutke liofiliziranog probiotičkog proizvoda na bazi sirutke

U svrhu povećanja aktivnosti i broja živih stanica upotrebljenih starter kultura tijekom primjene sirutke kao funkcionalnog napitka i nutraceutičkog probiotičkog proizvoda, provedena je liofilizacija sirutke, nakon čega se pratio broj živih stanica BMK tijekom skladištenja, odnosno tijekom 5 i 10 dana čuvanja pri 4°C. Za usporedbu se koristio neliofilizirani tekući uzorak sirutke čuvan pri 4°C. Uzorci sirutke (1 mL) su zamrznuti pri -80°C preko noći, nakon čega je proveden proces liofilizacije u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka). Broj živih mikroorganizama nakon proizvodnje i tijekom skladištenja

liofilizirane i neliofilizirane sirutke nakon 5 i 10 dana pohranjenih pri 4°C određen je indirektnom metodom, na način da je 1 mL sirutke suspendirano u 9 mL sterilne destilirane vode (liofilizirani uzorci sirutke su prethodno otopljeni u 1 mL sterilne destilne vode). Pad broja stanica bakterija mliječne kiseline 5 i 10 dana nakon skladištenja izražene su kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log$ CFU/mL sirutke) od logaritamske vrijednosti broja vijabilnih bakterijskih stanica nakon proizvodnje sirutke (0. dan).

3.2.10.4. Karakterizacija ukupne DNA iz sira pomoću RAPD-PCR i DGGE-PCR metoda

Uzorci sireva (100 mg) za izolaciju mješovite DNA uzeti su sterilno iz unutrašnjosti te su suspendirani u 1 mL fiziološke otopine, dok je za izolaciju mješovite DNA iz uzoraka sirutke korišteno 15 mL homogenizirane sirutke. Nakon centrifugiranja 10 min pri 13000 o/min, talog je suspendiran je u 400 μ L otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Nakon inkubacije u trajanju 1,5 sata, DNA je izolirana iz ukupnog volumena pripremljenog uzorka u Maxwell[®] 16 Research System instrumentu (Promega, SAD) primjenom odgovarajućeg Maxwell[®] DNA Tissue kita za izolaciju mješovite DNA iz sira i Maxwell[®] DNA Cell kita za izolaciju DNA iz sirutke (modificirano prema Leenhouts i sur., 1990). Uzorci izolirane DNA su poslani na Illumina MiSeq sekvenciranje. Dobiveni podaci u fasta formatu korišteni su za bioinformatičku analizu pomoću QIIME 2[™] (*engl.* quantitative insights into microbial ecology) platforme u suradnji s Kabinetom za bioinformatiku PBF-a, SuZ.

DNA izolirana iz sojeva korištenih u proizvodnji autohtonih sušenih svježih sireva i mješovita DNA izolirana iz proizvedenih sireva i pripadajućih sirutki poslužila je kao kalup za RAPD-PCR reakciju koja je provedena u DNA-termobloku, Mastercyclerpersonal, “Eppendorf”. Korištena je M13 početnica (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') prema Martín-Platero i sur. (2008). Smjesa za PCR reakciju se sastojala od EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix-a (2x Premix) (Takara, Japan), vode (Takara, Japan), uzoraka DNA i M13 početnice. Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica korišten je uzorak bez DNA. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD), a reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u tablici 5, nakon čega su dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1 %-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 150 V tijekom 1 sata. Gel je obojan u Diamond boji (Promega, SAD) i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na UV

transiluminator (DNR Bio-Imaging Systems, Izrael) pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije s M13 početnicom za RAPD-PCR

Uvjeti PCR reakcije	Temperatura	Trajanje
Početa denaturacija	94°C	1 min
<u>35 ciklusa:</u>		
Denaturacija	94°C	1 min
Sparivanje početnica	40°C	20 sekundi
Produljivanje lanca DNA	72°C	80 sekundi
Završno produljivanje lanca DNA	72°C	5 minuta

DGGE-PCR reakcija provedena je s univerzalnim bakterijskim početnicama HDA1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') i HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'). Reakcijska smjesa je sadržavala ekstrahiranu DNA, početnice, vodu (Takara, Japan) i EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix) (Takara, Japan) koji sadrži DNA polimerazu, odgovarajući pufer, dNTP i boju. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska smjesa istog sastava bez dodatka uzorka DNA. PCR reakcija je provedena pri uvjetima navedenim u tablici 6. Standard se sastojao od λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD). Dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1 %-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 200 V. Gel je obojan u Diamond boji (Promega, SAD) i vizualiziran na UV transiluminator (DNR Bio-Imaging Systems, Izrael) pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 6. Uvjeti PCR reakcije s univerzalnim HDA1 i HDA2 početnicama za DGGE-PCR

Uvjeti PCR reakcije	Temperatura	Trajanje
Početa denaturacija	95°C	3 min
<u>35 ciklusa:</u>		
Denaturacija	95°C	30 sekundi
Sparivanje početnica	58°C	30 sekundi
Produljivanje lanca DNA	72°C	40 sekundi
Završno produljivanje lanca DNA	72°C	5 minuta

DGGE-PCR elektroforeza provedena je u gradijentu denaturirajućeg agensa 30-70 %. Neposredno prije nanošenja gela u suspenziju je dodano 130 μ L APS-a (stock 0,1 g/mL) i 5,8 μ L TEMED-a (Bio-Rad, SAD). Za razlikovanje gradijenta koncentracije dodana je Dcode dye otopina (Bio-Rad,

SAD) u suspenziju gela višeg postotka. Kao uzorci korišteni su PCR produkti izolirane mješovite DNA iz svakog uzorka sira, a kao standard združeni sojevi *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10. DGGE-PCR elektroforeza je tijekom prvih 10 minuta provedena pri 30 V, a nakon toga tijekom 3 sata pri 80 V. Nakon elektroforeze gel je obojan u 0,5 µg/mL Diamond boji (Promega, SAD) i vizualiziran na UV transiluminator (DNR Bio-Imaging Systems, Izrael) pri valnoj duljini od 254 nm pomoću Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

3.2.10.5. Analiza bioaktivnih peptida

3.2.10.5.1. Identifikacija bioaktivnih peptida LC-MALDI-TOF/TOF metodom

Prekonočne kulture sojeva D6, D12, D13 i ZGZA7-10 uzgojene su u 50 mL svježeg mlijeka „Veronika“ u tri paralele i inkubirane aerobno pri 37°C tijekom 24 i 48 sati. Nakon uzgoja uzorci su zamrznuti na -80°C i koncentrirani liofilizacijom. Analiza bioaktivnih peptida određena je frakcioniranjem peptida prema Baptista i sur. (2018). Uzorci svakog sira (40 grama) i sirutke (40 mL) su homogenizirani dodatkom 80 mL destilirane vode tijekom 10 minuta. Homogenat je inkubiran pri 40°C tijekom 1 sata, nakon čega je provedeno centrifugiranje pri 3000 g tijekom 30 minuta pri 4°C. Supernatant je profiltriran kroz staklenu vunu i Filtrak filter papir No.388, zamrznut na -80°C i koncentriran liofilizacijom pri čemu je dobiven uzorak nalik vati. Liofilizirani uzorci otopljeni su u miliQ vodi (Sigma-Aldrich, Merck, SAD) do konačne koncentracije od 1 mg/mL i filtrirani kroz filter veličine pora 0,2 µm (Sigma-Aldrich, Merck, SAD). Razdvajanje peptida i MS akvizicija je provedena kako je opisano u poglavlju 3.2.4.5. Pretraživanje SwissProt baze podataka provedeno je primjenom ProteinScape verzije 3.0 (Bruker, Njemačka) sa sljedećim parametrima: nespecifično cijepanje, oksidacija na metioninu, histidinu i triptofanu, deaminacija asparagina i glutamina kao promjenjive modifikacije s masom tolerancije prekursora od 100 ppm-a. Identifikacija dobivenih proteinskih sekvenci pretražene su pomoću Milk Bioactive Peptide Database (MBPD) baze podataka (Søren Drud i sur., 2017). Analize su provedene u Biocentru d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

3.2.10.5.2. Relativna kvantifikacija bioaktivnih peptida LC-MRM-MS metodom

Nakon identifikacije bioaktivnih peptida, verzija 21.1.0.278 Skyline software-a (MacLean i sur., 2010) je korištena za optimizaciju MRM (*engl.* multiple reaction monitoring) metode. Razvoj metode i analiza uzoraka je provedena primjenom 6460 TripleQuad LC/MS sustava (Agilent Technologies, SAD) opremljenog s elektroionizacijskim raspršivanjem. Izvor iona i kromatografski parametri su postavljeni kako je opisano u Dekić Rozman i sur. (2021). Ukratko, instrument je namješten u pozitivnom modu ionizacije elektrosprejom (ESI+). Za kromatografsko razdvajanje korištena je kolona (Waters Corporation, SAD) za tekućinsku kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (*engl.* Ultra-Performance Liquid Chromatography, UPLC) UPLC BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7 μ m). Protok je namješten na 0,3 mL/min. Mobilna faza A se sastojala od 0,1 % vodene otopine mravlje kiseline (v/v), a mobilna faza B od 0,1% mravlje kiseline otopljene u acetonitrilu (v/v). Volumen injektiranja je bio 10 μ L. Parametri izvora iona su postavljeni na: kapilarni napon od 3,5 kV, temperatura plina 300°C, protok plina 7 L/min, raspršivač na 40 psi, temperatura plina u omotaču 300°C i protok plina u omotaču 9 L/min. Identifikacija pikova i analiza spektra provedene su pomoću MassHunterWorkstation software-a (Agilent Technologies, SAD). Za razvoj MRM metode korišteni su standardi peptida (Thermo Fischer Scientific, SAD). Analize su provedene u Biocentru d.o.o., Zagreb, Hrvatska.

3.2.11. Statistička analiza

Eksperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri nezavisna uzorka \pm standardna devijacija (SD). Statistički značajne razlike uzoraka određene su jednosmjernom analizom varijance (*engl.* one-way analysis of variance, one-way ANOVA), primjenom VassarStats računalnog programa (<http://vassarstats.net/>). Statistička razlika između uzoraka se smatrala značajnom ukoliko su p vrijednosti bile manje od 0,05.

4. REZULTATI

4.1. Odabir sojeva producenata funkcionalnih biomolekula

4.1.1. Plantaricini autohtonih BMK kao funkcionalne biomolekule

Za preliminarno ispitivanje potencijalne bakteriocinske aktivnosti provedena je analiza spektra antimikrobnog djelovanja. Antibakterijsko djelovanje ispitano je kod autohtonih sojeva BMK izoliranih iz različitih prirodnih staništa, kao jedan od važnijih selekcijskih kriterija za odabir probiotičkih i funkcionalnih starter kultura. Karakterizacijom sojeva na fenotipskoj i genotipskoj razini, sve bakterije su opisane kao Gram-pozitivne, nesporogene, katalaza negativne i fakultativno anaerobne. Morfološkom analizom pojedinačnih kolonija potvrđeno je da su stanice *Lactobacillus* sojeva štapićastog oblika, dok su *Enterococcus* sojevi kokoidnog oblika, bez kontaminacija. Sojevi su odabrani prema različitim prirodnim staništima iz kojih su izolirani i prema istraženim funkcionalnim probiotičkim svojstvima. Rezultati antibakterijskog djelovanja supernatanata prekonocnih kultura odabranih sojeva BMK prema test-mikroorganizmima *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC®19111™ dobiveni metodom difuzije s rupama u agaru, prikazani su u tablici 7. Promjeri zona inhibicije rasta test-mikroorganizma *S. aureus* 3048 su u rasponu od 11 do 16,5 mm, a za test-mikroorganizam *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u rasponu od 0 (nema inhibicije) do 20 mm.

Tablica 7. Antimikrobno djelovanje supernatanta kulture odabranih sojeva BMK prema *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC®19111™ određeno mjerenjem zona inhibicije rasta (mm) metodom difuzije s rupama u agaru

Sojevi BMK	Pomjeri zona inhibicije (mm)	
	<i>S. aureus</i> 3048	<i>L. monocytogenes</i> ATCC®19111™
<i>L. pentosus</i> D3	12,33 (±0,58)	11,33 (±1,53)
<i>L. fermentum</i> D12	11,33 (±0,58)	11,00 (±1,00)
<i>L. casei</i> M2	9,00 (±0,00)	9,33 (±0,58)
<i>L. casei</i> D10	11,33 (±0,58)	12,00 (±1,00)
<i>E. durans</i> D8	11,33 (±0,58)	10,67 (±0,58)
<i>E. faecium</i> L3	11,33 (±1,15)	13,33 (±0,58)
<i>E. faecium</i> A7	10,67 (±0,58)	10,67 (±0,58)
<i>E. faecium</i> ZGZA7-10	9,00 (±0,00)	9,67 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> D4	10,67 (±0,58)	11,67 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> D5	9,00 (±0,00)	9,33 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> D7	9,67 (±1,15)	10,33 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> D13	13,00 (±1,00)	12,33 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> M4	11,33 (±0,58)	12,33 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> M5	11,00 (±1,00)	12,67 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> MA2	10,33 (±0,58)	9,67 (±1,15)
<i>L. plantarum</i> MA3	0,00 (±0,00)	9,33 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> SF9C	12,00 (±1,00)	11,33 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> SF15C	12,67 (±0,58)	12,67 (±1,15)
<i>L. plantarum</i> ZG1C	11,33 (±0,58)	12,67 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> M92C	11,67 (±0,58)	13,33 (±0,58)
<i>L. plantarum</i> L4	10,33 (±1,53)	9,00 (±0,00)

Metoda s dvostrukim slojem agara razlikuje se od klasične metode difuzije u agar, u kojima se koristi supernatant kultura, po tome što se antibakterijsko djelovanje BMK ispituje izravno na hranjivoj podlozi na kojoj su porasle, te su u njoj prisutni svi ekstracelularno proizvedeni metaboliti s antimikrobnom aktivnošću. Dobiveni efektivni inhibicijski odnosi, metodom s dvostrukim slojem agara, za test-mikroorganizam *S. aureus* 3048 su u rasponu vrijednosti 0,95 (±0,07) do 2,65 (±0,07), a za test-mikroorganizam *L. monocytogenes* ATCC®19111™ od 0 (nema inhibicije) do 2,18 (±0,11) (tablica 8).

Tablica 8. Antagonističko djelovanje odabranih sojeva BMK prema rastu *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC®19111™, izraženi kao efektivni inhibicijski odnos (EIR), određen metodom s dvostrukim slojem agara

Sojevi BMK	<i>S. aureus</i> 3048	<i>L. monocytogenes</i> ATCC®19111™
<i>L. pentosus</i> D3	1,78 (±0,04)	0,86 (±0,05)
<i>L. fermentum</i> D12	1,89 (±0,10)	1,33 (±0,07)
<i>L. casei</i> M2	1,89 (±0,01)	0,84 (±0,06)
<i>L. casei</i> D10	1,95 (±0,06)	0,95 (±0,05)
<i>E. durans</i> D8	2,10 (±0,26)	0,86 (±0,15)
<i>E. faecium</i> L3	1,78 (±0,10)	0,53 (±0,06)
<i>E. faecium</i> A7	1,23 (±0,04)	0,00 (±0,00)
<i>E. faecium</i> ZGZA7-10	0,95 (±0,07)	0,60 (±0,14)
<i>L. plantarum</i> D4	1,60 (±0,14)	0,89 (±0,10)
<i>L. plantarum</i> D5	1,89 (±0,10)	1,57 (±0,12)
<i>L. plantarum</i> D7	1,75 (±0,05)	1,26 (±0,12)
<i>L. plantarum</i> D13	2,21 (±0,09)	1,78 (±0,10)
<i>L. plantarum</i> M4	2,12 (±0,19)	1,47 (±0,15)
<i>L. plantarum</i> M5	2,33 (±0,29)	1,55 (±0,14)
<i>L. plantarum</i> MA2	2,40 (±0,17)	0,83 (±0,11)
<i>L. plantarum</i> MA3	2,29 (±0,17)	0,82 (±0,16)
<i>L. plantarum</i> SF9C	2,65 (±0,07)	2,10 (±0,10)
<i>L. plantarum</i> SF15C	2,39 (±0,16)	1,99 (±0,11)
<i>L. plantarum</i> ZG1C	2,45 (±0,18)	1,83 (±0,11)
<i>L. plantarum</i> M92C	2,50 (±0,10)	2,18 (±0,11)
<i>L. plantarum</i> L4	1,86 (±0,15)	1,86 (±0,15)

Za daljnja istraživanja bakteriocinske aktivnosti odabrano je sedam sojeva vrste *L. plantarum* i tri soja roda *Enterococcus* s najučinkovitijim antagonističkim djelovanjem prema *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC®19111™. Lančanom reakcijom polimeraze provedeno je ispitivanje prisutnosti gena koji kodiraju za plantaricine kod *L. plantarum* vrsta odnosno enterocine roda *Enterococcus* (tablica 9). Niti u jednoj negativnoj kontroli ne dolazi do dimerizacije upotrebljenih početnica, stoga DNA vrpce dobivene sa specifičnim početnicama za detekciju gena za bakteriocine ukazuju na pozitivan rezultat PCR reakcije. Primjenom specifičnih početnica za detekciju gena koji kodiraju za plantaricine A, EF i peptid PlnJ, dobiveni su PCR produkti s izoliranom DNA sojeva *L. plantarum* L4, *L. plantarum* D13, *L. plantarum* M5, *L. plantarum* SF9C, *L. plantarum* SF15C, *L. plantarum* ZG1C i *L. plantarum* M92C. Primjenom specifičnih početnica entA i entB za detekciju gena koji kodiraju za enterocine, nakon provođenja PCR reakcije s

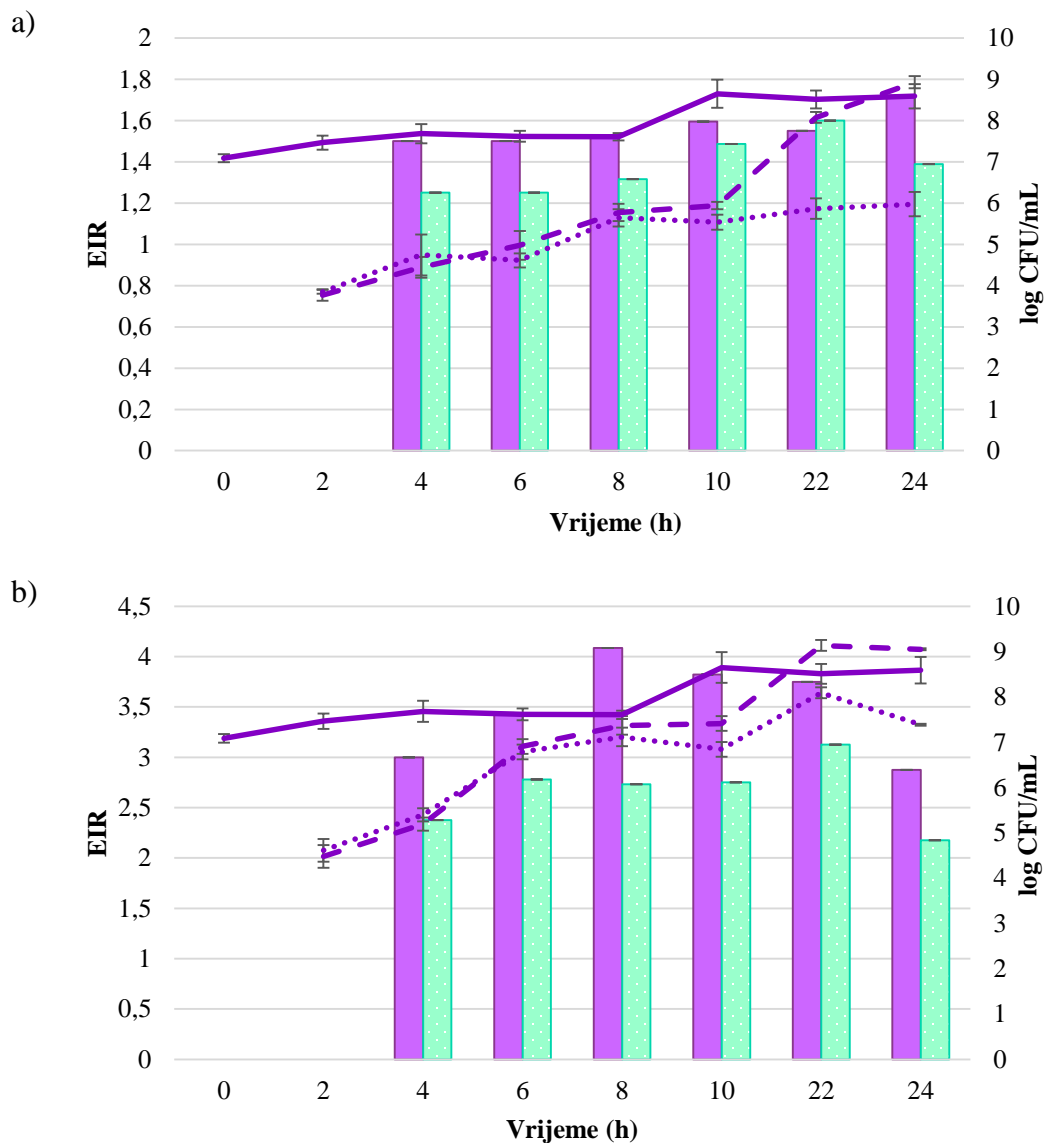
izoliranom DNA sojeva *E. durans* D8 i *E. faecium* L3 nije detektiran produkt PCR reakcije na gelu, dok je kod soja *E. faecium* ZGZA7-10 detektiran gen za enterocin B. Obzirom da je PCR reakcijom potvrđena prisutnost gena za plantaricine te da je jedan od ciljeva istraživanja primjena soja producenta bakteriocina u proizvodnji funkcionalnih fermentiranih proizvoda, daljnja istraživanja bakteriocinske aktivnosti su provedena sa sojem *L. plantarum* D13, koji je izoliran iz dimljenog svježeg sira.

Tablica 9. PCR detekcija gena koji kodiraju za bakteriocine plantaricin ili enterocin; + detektiran gen za bakteriocin; - nije detektiran gen za bakteriocin; / reakcija nije provedena

Soj	<i>plnA</i>	<i>plnEF</i>	<i>plnJ</i>	<i>plnNC8</i>	<i>plnS</i>	<i>plnW</i>	<i>entA</i>	<i>entB</i>
<i>E. durans</i> D8	/	/	/	/	/	/	-	-
<i>E. faecium</i> L3	/	/	/	/	/	/	-	-
<i>E. faecium</i> ZGZA7-10	/	/	/	/	/	/	-	+
<i>L. plantarum</i> L4	+	+	+	-	-	-	/	/
<i>L. plantarum</i> D13	+	+	+	-	-	-	/	/
<i>L. plantarum</i> M5	+	+	+	-	-	-	/	/
<i>L. plantarum</i> SF9C	+	+	+	-	-	-	/	/
<i>L. plantarum</i> SF15C	+	+	+	-	-	-	/	/
<i>L. plantarum</i> ZG1C	+	+	+	-	-	-	/	/
<i>L. plantarum</i> M92C	+	+	+	-	-	-	/	/
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-

Jedan od pristupa za karakterizaciju bakteriocina je poticanje sinteze provođenjem kultivacije u združenom uzgoju, odnosno kokultivacijom s osjetljivim mikroorganizmom. Kako bi se ispitala mogućnosti poticanja biosinteze plantaricina, proveden je združeni uzgoj *L. plantarum* D13 s *L. monocytogenes* ATCC®19111™, odnosno *S. aureus* 3048. *L. plantarum* D13 je iskazao antimikrobno djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™ jer je nakon združenog uzgoja broj živih bakterijskih stanica bio za 3 logaritamske jedinice niži nego u monokulturi (slika 10a). Nakon kokultivacije sa *S. aureus* 3048 broj bakterijskih stanica snižen je za 2 log jedinice u usporedbi s kontrolnim rastom (slika 10b). Združenim uzgojem s *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048, ustanovljeno je je bakteriostatsko djelovanje soja *L. plantarum* D13 prema oba test-mikroorganizma. Pri tome je *L. plantarum* D13 značajnije inhibirao rast *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u usporedbi sa *S. aureus* 3048. Tijekom kokultivacije s navedenim test-mikroorganizmima provjerena je stimulacija bakteriocinske aktivnosti soja *L. plantarum* D13 ispitivanjem inhibicijskog učinka soja producenta bakteriocina metodom s

dvostrukim sojem agara. U oba slučaja stimulacija bakteriocinske aktivnosti je vidljiva tijekom eksponencijalne faze rasta u kokulturi u odnosu na bakteriocinsku aktivnost soja *L. plantarum* D13 uzgojenog u monokulturi, koja se zadržala i tijekom stacionarne faze rasta.



Slika 10. Inhibicija rasta (log CFU/mL) test-mikroorganizama a) *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i b) *S. aureus* 3048 tijekom kokultivacije s *L. plantarum* D13 (•••). Krivulje rasta soja D13 (—) i test-mikroorganizama (— —). Stupci predstavljaju efektivni inhibicijski odnos (EIR) određen nakon združene kultivacije *L. plantarum* D13 s *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048 (■) i tijekom rasta *L. plantarum* D13 u monokulturi (■) uz izračunate standardne devijacije (\pm SD)

Kako su bakteriocini prema definiciji ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi ili proteini koji inhibiraju prvenstveno rast srodnih Gram-pozitivnih bakterija (Šušković i sur., 2010), da bi se ustanovila proteinska priroda ekstracelularne antimikrobne komponente u supernatantu kulture soja *L. plantarum* D13, ispitan je utjecaj visoke temperature te proteinaze K, na antimikrobno djelovanje, metodom s rupama u agaru. Prema dobivenim rezultatima uočeno je smanjenje inhibicijskog djelovanja *L. plantarum* D13 prema test-mikroorganizmima nakon izlaganja supernatanta kulture soja D13 enzimatskoj aktivnosti proteinaze K ili tretmana s visokom temperaturom od 100°C (tablica 10). Nakon prekonoćnog uzgoja soja producenta bakteriocina, *L. plantarum* D13, u MRS tekućoj podlozi, pH vrijednost supernatanta kulture je iznosila 4, a koncentracija mliječne kiseline 19,8 g/L. Ispitivanjem inhibicijskog djelovanja mliječne kiseline u koncentraciji u kojoj je bila prisutna u ispitivanim supernatantima kultura producenata bakteriocina, dobivene su manje zone inhibicije nego sa supernatantima kultura, što ukazuje na dodatno inhibicijsko djelovanje *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048, postignuto bakteriocinskom aktivnošću ispitivanog soja *L. plantarum* D13.

Tablica 10. Zone inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048 (mm) određene nakon ispitivanja inhibicijskog djelovanja supernatanta kulture, proteinaze K i visoke temperature na supernatant kulture, te mliječne kiseline, metodom difuzije s rupama u agaru

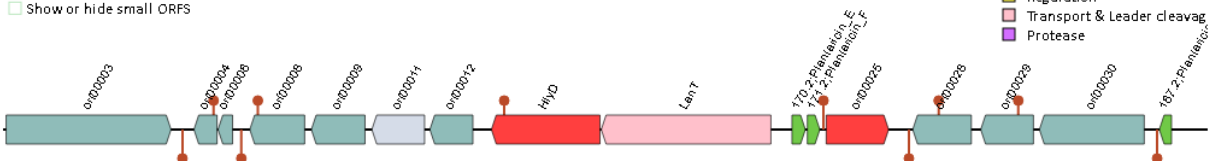
Promjer zone inhibicije (mm)	<i>L. plantarum</i> D13			
	supernatant	proteinaza K	100°C/30 min	mliječna kiselina (pH=4)*
<i>L. monocytogenes</i> ATCC®19111™	16	14	15	13
<i>S. aureus</i> 3048	16	15	15	12

*koncentracije mliječne kiseline i pH vrijednosti odgovaraju onima u supernatantima kultura producenata bakteriocina

U svrhu daljnje karakterizacije plantaricina, provedena je *in silico* identifikacija klastera uključenih u biosintezu plantaricina primjenom BAGEL 4.0 softwera. Detektirana su tri područja od interesa (*engl.* area of interest, AOI) koja se nalaze na 7., 11. i 12. kontigu (sljedu gena). Na slici 11 su shematski prikazani pronađeni genski klasteri odgovorni za biosintezu plantaricina soja *L. plantarum* D13. Popis gena povezanih sa sintezom i transportom plantaricina te gena odgovornih za imunitet soja producenta, pronađeni pomoću BAGEL 4.0 softwera, prikazani su u prilogu 1.

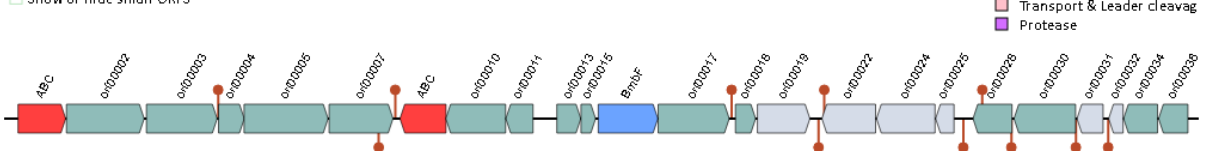
7. kontig

- Gene names
- Predicted promoters
- Predicted terminators
- Show or hide small ORFs



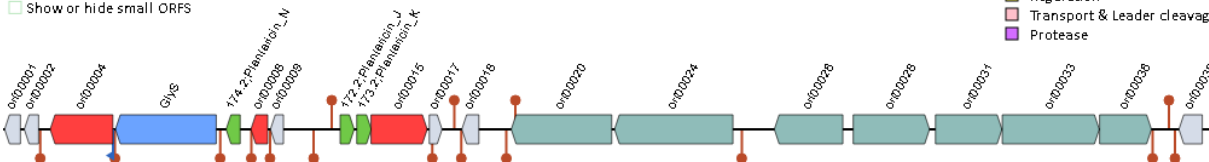
11. kontig

- Gene names
- Predicted promoters
- Predicted terminators
- Show or hide small ORFs



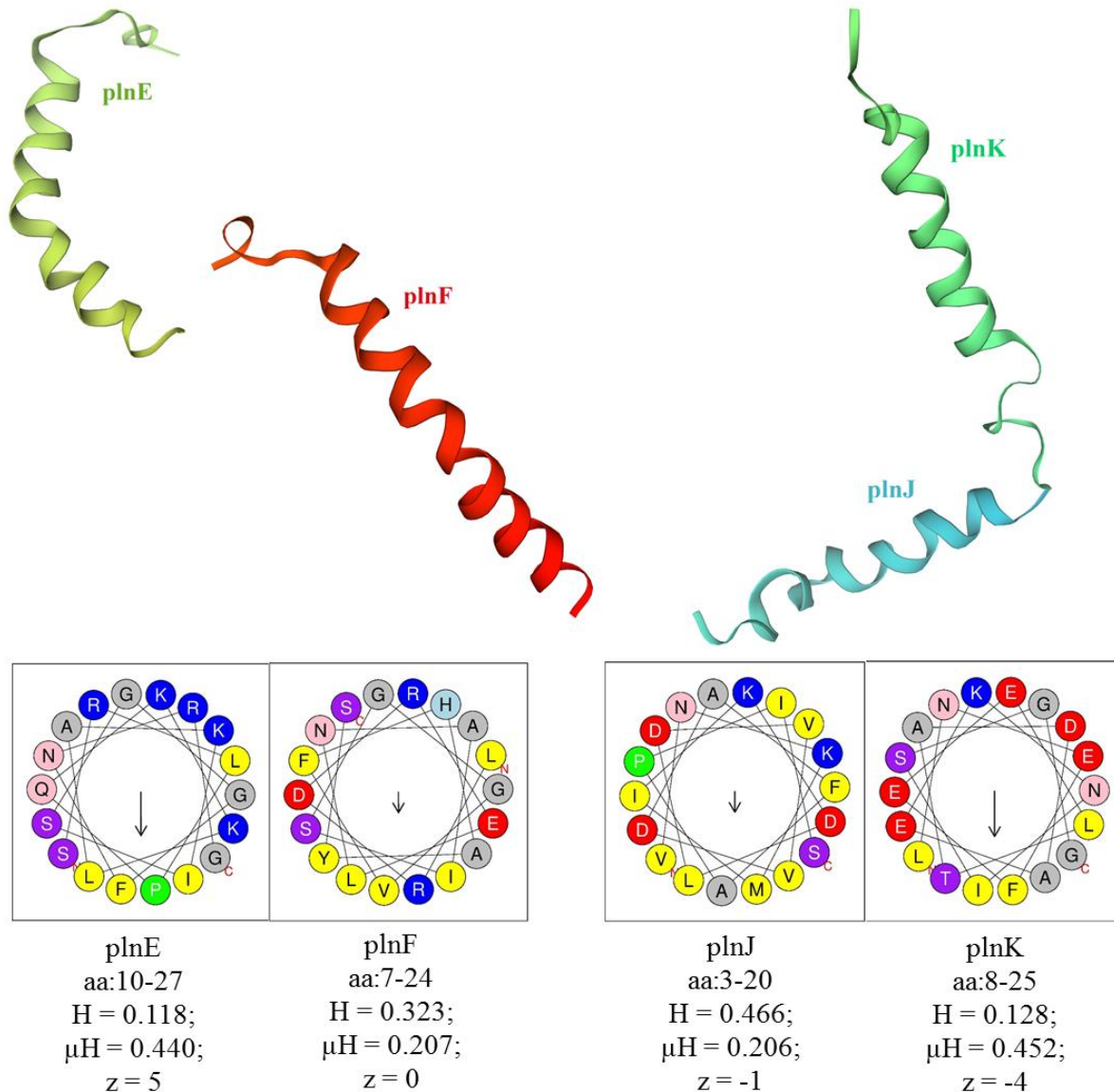
12. kontig

- Gene names
- Predicted promoters
- Predicted terminators
- Show or hide small ORFs



Slika 11. Shematski prikaz genomskih klastera za biosintezu plantaricina soja *L. plantarum* D13 koji se nalaze na 7., 11. i 12. kontigu, primjenom BAGEL 4.0 softvera

Pomoću BAGEL 4.0 softvera detektirani su strukturni geni koji kodiraju za plantaricine, a trodimenzionalna struktura plantaricina PlnJK i PlnEF predviđena je modeliranjem pomoću metode za prepoznavanje sličnosti primjenom SWISS-MODEL servera, dok su svojstva α -uzvojnica poput sastava aminokiselina (aa), hidrofobnosti (H), hidrofobnog momenta (μ H) i neto naboja (z) određena pomoću HeliQuest servera (slika 12). Prema *in silico* analizi radi se o peptidima koji sadrže do najviše 27 aminokiselina.



Slika 12. Trodimenzionalna struktura PlnJK i PlnEF soja *L. plantarum* D13, predviđena je modeliranjem pomoću metode prepoznavanja sličnosti primjenom SWISS-MODEL-a i prikaz svojstava α -uzvojnica analiziranih primjenom HeliQuest servera. aa –aminokiseline); žuta – hidrofobne aa; ljubičasta – serinske i treoninske aa; tamno plava – bazične aa; crvena – kisele aa; roza – aparaginske i glutaminske aa; siva – alaninske i glicinske aa; svijetlo plava – histidinske aa; zelena – prolinske aa; H – hidrofobnost; μ H – hidrofobni moment. Neto naboj (z) određen je pri pH = 7,4, pod pretpostavkom da je aminokiselina histidin neutralna i da su N-terminalna amino skupina i C-terminalna karboksilna skupina sekvence nisu nabijene

4.1.2. Egzopolisaharidi autohtonih sojeva BMK kao funkcionalne biomolekule

Neproteinske komponente probiotičkih bakterija poput polisaharida se također istražuju kao funkcionalne biomolekule. EPS-i BMK su primjer šećernih struktura koje su vezane na staničnu stjenku ili se izlučuju. Unutar kolekcije BMK naše istraživačke grupe koja obuhvaća bakterijske izolate ispitana je pojavnost tipičnog „ropy“ fenotipa, karakterističnog za biosintezu EPS. Između velikog broja autohtonih BMK, kod soja *L. fermentum* D12 učene su blistave bakterijske kolonije koje na dodir mikrobiološkom ušicom formiraju filamentozne niti tipične za sojeve producente EPS-a, nakon prekonoćnog uzgoja na MRS hranjivom agaru obogaćenom ugljikohidratom glukozom (slika 13).



Slika 13. Prikaz filamentoznih niti blistavih bakterijskih kolonija soja *L. fermentum* D12 uzgojenog na MRS hranjivom agaru uz dodatak šećera glukoze

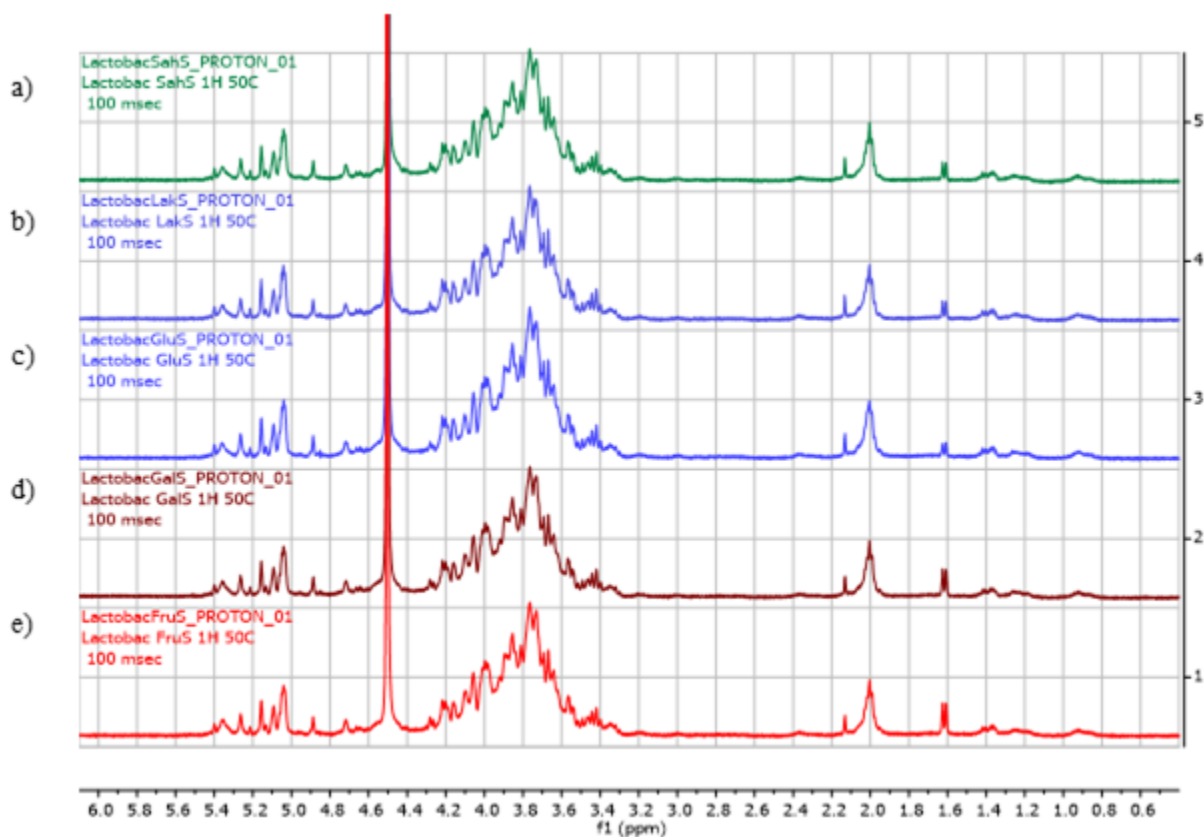
Biosinteza, odnosno prinos EPS-a može se optimirati nizom parametara pa tako i dodatkom određenog ugljikohidrata u suvišku u mediju za uzgoj. Kako bi se ispitao koji je optimalni izvor šećera i da li dodatak utječe na promjenu strukture EPS-a, soj *L. fermentum* D12 je uzgojen u MRS hranjivoj podlozi obogaćenij s 5 različitih vrsta šećera: glukoza, galaktoza, laktoza, fruktoza i saharoza. Sojevi producenti EPS-a mogu sintetizirati EPS-e vezane na površinu bakterijskih stanica (EPS-b) ili ih pak mogu otpuštati u mikrookoliš (EPS-r). Kako bi se ustanovilo da li je EPS soja *L.*

fermentum D12 vezan na staničnu ovojnici ili se pak otpušta u ekstracelularni medij provedena su dva različita postupka za izolaciju EPS-a s površine bakterijskih stanica odnosno izlučenih u medij. Nakon izolacije, određen je prinos (Y_{EPS} (mg/L)) i čistoća EPS-a primjenom UV/VIS spektrofotometrije. Kako je prinos određen u uzorku egzopolisaharida ekstrahiranih s površine stanica (EPS-b) *L. fermentum* D12 (0,6-2,2 mg) bio značajno manji ($p < 0,01$), te je imao visoki sadržaj proteina, ustanovljeno je sintetizirani EPS nije vezan za površinu bakterijske stanice, već da se izlučuje u okolišni medij stanice. Dodatak izvora ugljika u MRS agar utjecao je na promjenu prinosa EPS-r (Y_{EPS}), koji je u slučaju dodatka galaktoze bio najniže i iznosio 165,75 mg/L, a u slučaju dodatka glukoze postignut je najviši prinos od 200,25 mg/L (tablica 11).

Tablica 11. Prinos egzopolisaharida (Y_{EPS}) izoliranih iz supernatanta (EPS-r) nakon uzgoja *L. fermentum* D12 u MRS hranjivoj podlozi uz dodatak različitih izvora ugljika

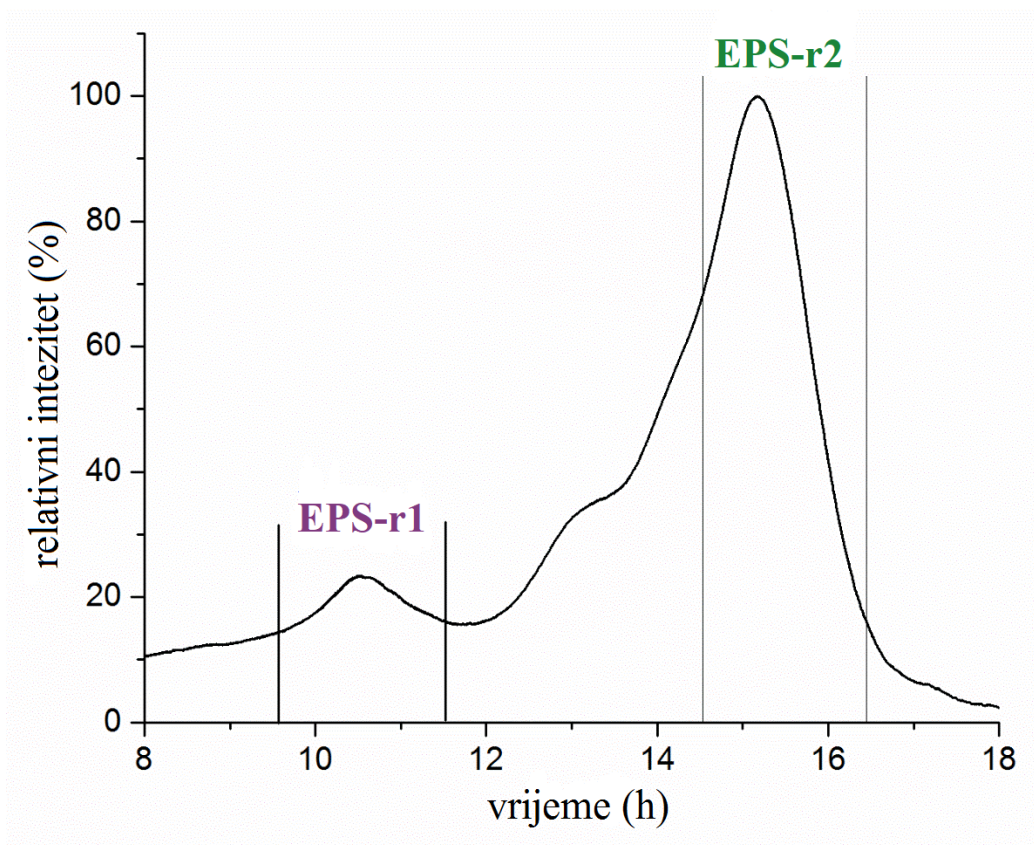
Uzorak	Y_{EPS} (mg/L)
EPS-r _{glukoza}	200,25
EPS-r _{fruktoza}	193,00
EPS-r _{laktoza}	181,75
EPS-r _{saharoza}	167,50
EPS-r _{galaktoza}	165,75

Da bi se ustanovile raznolikosti strukture EPS-r uvjetovane nakon rasta *L. fermentum* D12 u hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika provedena je ¹H-NMR analiza. ¹H-NMR spektar je pokazao da su EPS-i izolirani iz MRS hranjivih podloga s dodatkom različitih šećera identične strukture, što znači da izvor ugljika nije utjecao na strukture EPS-a (slika 14). Purificirani uzorci EPS-r su združeni u jedan uzorak, koji je zatim tretiran s trikloroocetnom kiselinom kako bi se uklonili preostali proteini i etanolom za uklanjanje preostalih lipida. Nakon dodatnog pročišćavanja, uzorak je centrifugiran, dijaliziran i filtriran, a pH vrijednost je podešena na 6,7.



Slika 14. ^1H -NMR spektri EPS-r *L. fermentum* D12 nakon kultivacije u MRS hranjivoj podlozi obogaćenoj s 2 % izvora ugljika: a) saharoza, b) laktoza, c) glukoza, d) galaktoza i e) fruktoza

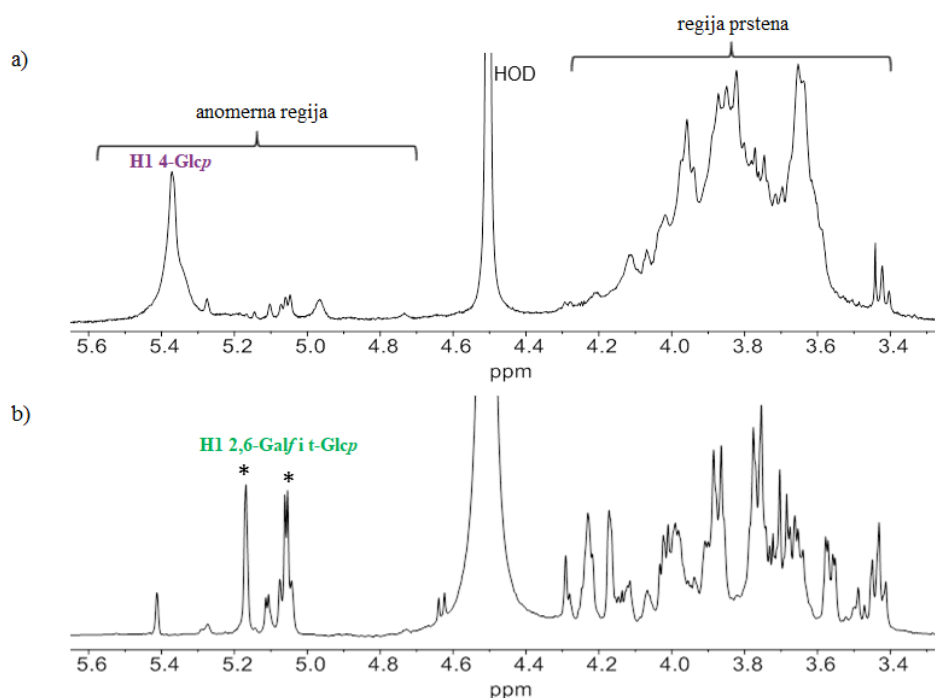
Uzorak EPS-r je analiziran kromatografijom isključenjem na osnovi veličine čestica (*engl.* size-exclusion chromatography, SEC). Elucijski profil uzoraka EPS-r uzoraka sadrži dva glavna pika, što upućuje na prisutnost dva EPS-a različite molekulske mase, od koji drugi pik nije potpuno simetričan zbog pripadajućeg „repa“ na početku eluiranja (slika 15). Uzorci su odvojeni i nazvani EPS-r1 i EPS-r2, dok je „rep“ drugog uzorka eliminiran jer je ^1H -NMR analiza pokazala da je istog sastava kao i sastav tekuće MRS podloge u kojoj je proveden uzgoj soja *L. fermentum* D12. Izračunom površina ispod oba pika određen je omjer uzoraka EPS-r1 i EPS-r2 koji iznosi 1:12.



Slika 15. Elucijski profil egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPS-r) nakon provedene kromatografije isključenjem na osnovi veličine

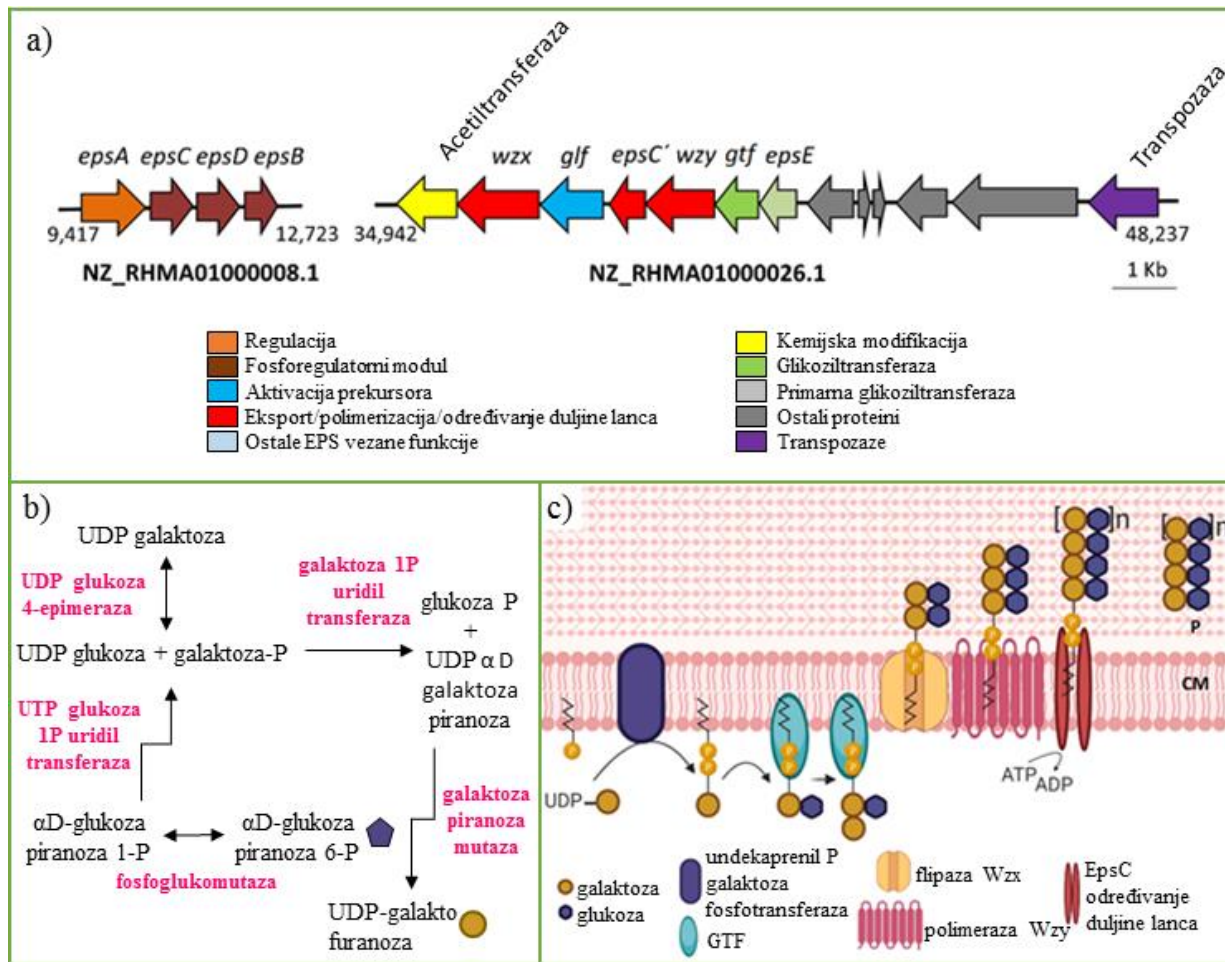
Uzorci EPS-r1 i EPS-r2 različitih molekularnih masa analizirani su $^1\text{H-NMR}$ spektroskopijom, koja je pokazala da se dva uzorka nalaze u spektru tipičnom za polisaharide i da se međusobno razlikuju po strukturi. $^1\text{H-NMR}$ analiza uzorka EPS-r1 pokazala je jednu intenzivnu rezonanciju oko 5,37 ppm u području anomerne regije, što ukazuje na to da je ovaj šećer homopolimer α -konfiguracije (slika 16a). Analizom tipa glikozidne veze primjenom GC-MS kromatografije dokazano je da se uzorak EPS-r1 sastoji od 4-vezane glukoze u konfiguraciji piranoze i male količine 4,6-vezane glukoze u konfiguraciji piranoze, što upućuje na prisutnost razgranatog glukana (integracija ispod pikova upućuje na 10 %-tno grananje) (rezultati nisu prikazani). Usporedba $^1\text{H-NMR}$ spektra s podacima iz literature (Zhang i sur., 2019; Pellizzoni i sur., 2016), ukazuje na to da je uzorak EPS-r1 u formi glikogena. U anomernoj regiji $^1\text{H-NMR}$ spektra uzorka EPS-r2, vidljive su dvije glavne rezonancije pri 5,18 i 5,07 ppm s identičnim integracijskim površinama i 5 manje intenzivnih pikova na 5,42, 5,12, 5,08, 5,05 i 4,64 ppm, što upućuje na prisutnost jednog polisaharida koji se sastoji od dva različita šećera, zajedno s jednim ili više polimera (slika 16b). Analiza sastava uzorka

EPS-r2 provođenjem plinske kromatografije je pokazala prisutnost tri vrste šećera, manoze, galaktoze i glukoze u relativnom molarnom omjeru 0,4:1,0:1,0. Ovi rezultati ukazuju na to da dvije glavne rezonancije u $^1\text{H-NMR}$ spektru uzorka EPS-r2 pripadaju galaktozi i glukozi, dok manozna zbog male količine prisutne u uzorku vjerojatno pripada mano-proteinima iz kvašćevog ekstrakta, koji je sastavni dio MRS podloge za uzgoj *L. fermentum* D12. Analiza tipa glikozidne veze primjenom GC-MS kromatografije uzorka EPS-r2 je pokazala da dvije rezonancije pripadaju terminalnoj glukozi u konfiguraciji piranoze i 2,6-vezanoj galaktozi u konfiguraciji furanoze u molarnom omjeru 1,0:0,5, što ukazuje na to da je uzorak EPS-r2 heteropolisaharid koji se sastoji od razgranatih disaharidnih ponavljajućih jedinica s 2,6-Galf na okosnici i t-Glcp na bočnom lancu (rezultati nisu prikazani). Količina 2,6-Galf izmjerene GC-MS analizom je manja u odnosu na onu izmjerenu $^1\text{H-NMR}$ spektrofotometrijom zbog manje stabilnosti furanozne konfiguracije u odnosu na piranoznu. U uzorcima EPS-r1 i EPS-r2 vidljiva je prisutnost rezonancija koje ne pripadaju uzorku, no zbog tendencije stvaranja međumolekulskih vodikovih veza, polisaharide je ponekad teško dobiti u čistom obliku.



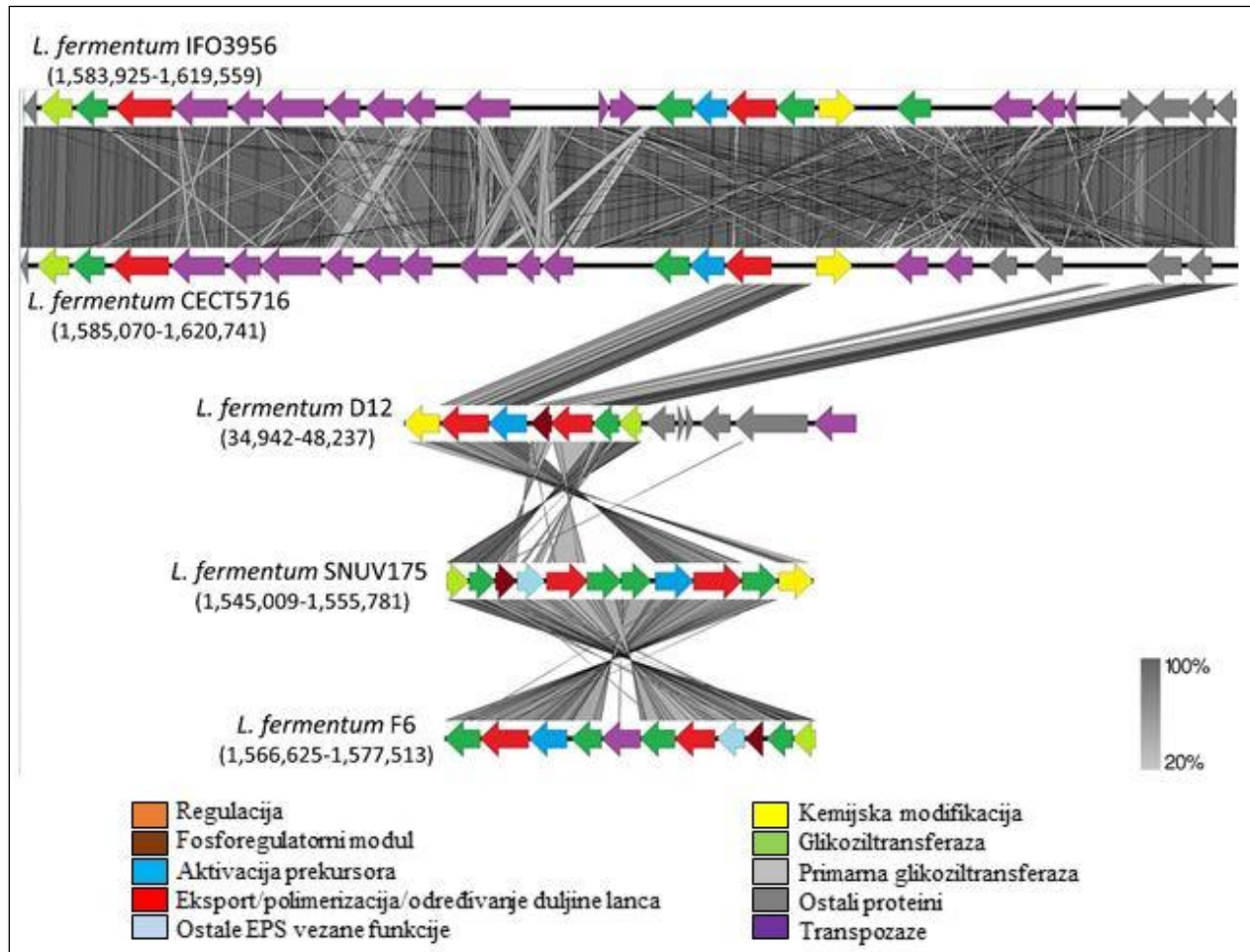
Slika 16. $^1\text{H-NMR}$ spektar uzoraka a) EPS-r1 i b) EPS-r2 u D_2O (500 MHz, 50°C). H1 4-Glcp = anomerni protoni 4-vezane glukopiranoze; *označavaju dvije najintenzivnije anomerne rezonancije koje pripadaju t-Glcp i 2,6-Galf

Za karakterizaciju biosinteze EPS-a soja D12 na genomskoj razini, provedena je *in silico* identifikacija gena biosinteze, funkcionalnom anotacijom aminokiselinskih sekvenci dobivenih pomoću RAST servera primjenom BLASTp baze podataka. Kreiran je *eps* genski klaster (slika 17a) koji sadrži 12 gena povezanih s aktivacijom prekursornih molekula i biosintezom EPS-a, a pregled svih pronađenih gena vezanih uz aktivaciju prekursornih molekula, sintezu i transport egzopolisaharida, prikazani su u prilogu 2. Osim enzima ključnih za glikolizaciju, koja je prva faza u biosintezi EPS-a, kao i u fermentaciji ugljikohidrata, aktivacija prekursornih molekula je sljedeći korak, pri čemu su obje grupe enzima pronađene nakon funkcionalne anotacije *L. fermentum* D12. Kako prema GC i GC-MS analizi *L. fermentum* D12 proizvodi EPS-e sastavljene od glukoze i galaktoze, u konfiguraciji piranoze i furanoze, potvrđeni su i geni za biosintezu ovih prekursora. Enzimi koji su uključeni u proces aktivacije šećera su: dTDP-glukoza 4,6-dehidrataza (*rfbB*), UTP-glukoza-1-fosfat uridililtransferaza (*galU*) i fosfoglukomutaza (*pgm*) za formiranje UDP-glukoze, UDP-4-epimeraza (*galE*) i galaktoza-1-fosfat uridililtransferaza (*galT*) za formiranje UDP-galaktoze i UDP-galaktopiranoza mutaza (*glf*) koja provodi konverziju UDP-galaktopiranoze u UDP-galaktofuranozu. Dodatno, identificiran je i *epsB* (GW747_RS03550), *epsC* (GW747_RS03540) i *epsD* (GW747_RS03545) geni na kontigu NZ_RHMA01000008.1, koji prema Dan i sur. (2009) sudjeluju u polimerizaciji i određivanju duljine lanca EPS-a, kao i *epsA* (GW747_RS03535) koji sintetizira transkripcijski regulator odgovoran za sintezu EPS. Geni koji kodiraju za polisaharidnu polimerazu Wzy (GW747_RS07675) i flipazu Wzx (GW747_RS07660), proteine odgovorne za polimerizaciju i transport EPS-a preko stanične membrane su pronađeni na kontigu NZ_RHMA01000026.1., zbog čega se može zaključiti da soj *L. fermentum* D12 izlučuje EPS-e putem Wzx/Wzy-ovisnog puta. Na kontigu je pronađen i gen *epsC'* (GW747_RS07670) čija uloga je povezana s tirozin kinazom i određivanjem duljine lanca. *In silico* analizom, unutar *eps*-D12 klastera pronađen je gen *epsE* (GW747_RS07685), koji odgovara undekaprenil galaktoza fosfotransferazi, GW747_RS07680 gen koji kodira za protein unutar kojeg se nalazi DUF4422 domena, a povezan je s ugradnjom galaktofuranoze u polisaharid te geni koji kodiraju za glikoziltransferazu (*gtf*) acetiltransferazu i transpozazu. Na slici 17b shematski su prikazani geni koji kodiraju za enzime uključene u aktivaciju prekursornih molekula, te je pretpostavljen model biosintetskog puta *eps* klastera soja *L. fermentum* D12 (slika 17c).

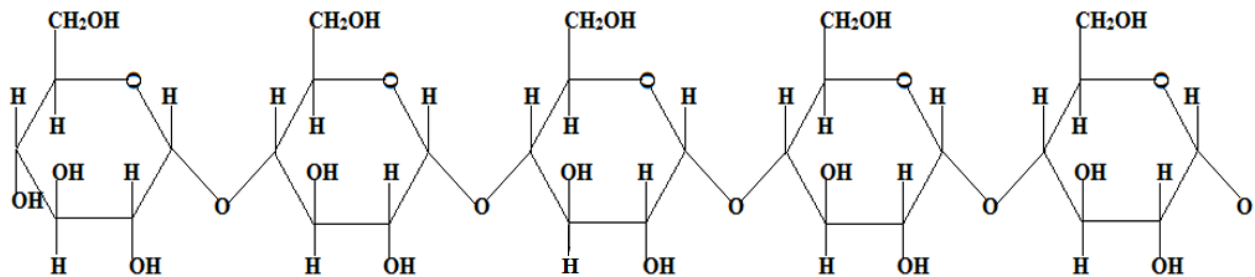


Slika 17. Shematski prikaz *eps* genskog klastera (kontig NZ_RHMA01000026.1) i gena uključenih u proizvodnju EPS-a (kontig NZ_RHMA01000008.1) soja *L. fermentum* D12. *epsA*: regulator transkripcije; *epsC*: tirozin-protein kinaza transmembranski modulator; *epsD*: tirozin-protein kinaza; *epsB*: mangan-ovisna protein-tirozin fosfataza; *wxz*: flipaza; *glf*: UDP-galaktopiranoza mutaza; *epsC'*: tirozin-protein kinaza transmembranski modulator/određivanje duljine lanca; *wzy*: polisaharidna polimeraza; *gff*: glikoziltransferaza; *epsE*: undekaprenil galaktoza fosfotransferaza; C: citoplazmina membrana; P: periplazma. a) orijentacija, funkcija i približna veličina gena prikazana su smjerom, različitim bojama i duljinama strelica, b) geni koji kodiraju za enzime uključene u aktivaciju prekursora: glukoze i galaktoze, c) pretpostavljeni model biosintetskog puta *eps* klastera soja *L. fermentum* D12

Usporedba organizacije gena unutar *eps* genskog klastera soja *L. fermentum* D12 s klasterima drugih *L. fermentum* sojeva slične organizacije (Deo i sur., 2019), CECT5716 (CP002033.1), IFO3956 (AP008937.1), SNUV175 (CP019030.1) i F6 (CP005958.1), prikazana je na slici 18. Pretpostavljena struktura uzorka EPS-r1 u formi glikogena, prikazana je na slici 19.

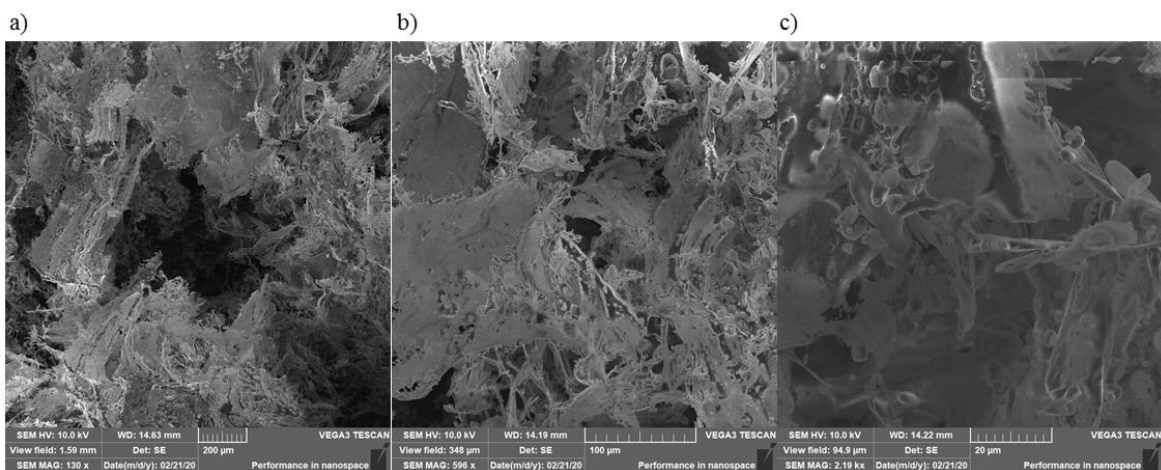


Slika 18. Usporedba *eps* genskih klastera soja *L. fermentum* D12 s drugim *L. fermentum* sojevima slične strukturne organizacije. Orijentacija, funkcija i približna veličina gena prikazana su smjerom, različitim bojama i duljinama strelica. Intezitet sive boje upućuje na povećanje postotka sličnosti sojeva na temelju provedene tBLASTx analize



Slika 19. Pretpostavljena struktura uzorka EPS-r1 u formi glikogena

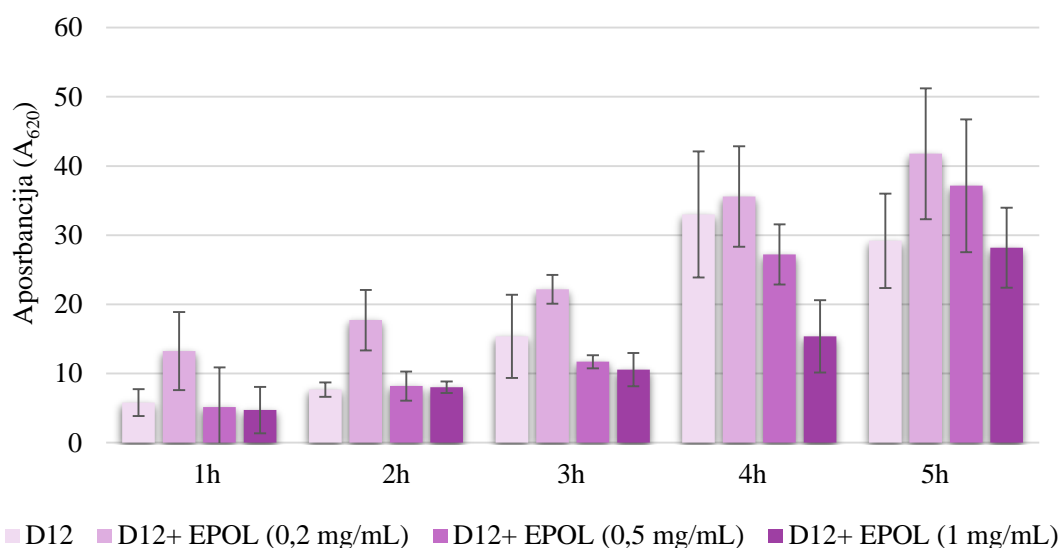
Morfološka svojstva EPS-a soja *L. fermentum* D12 analizirana su primjenom skenirajuće elektronske mikroskopije (*engl.* Scanning Electron Microscope, SEM). Mikrografija analiziranih EPS-a pri različitim povećanjima prikazana je na slici 20. Ova struktura polimera ima određeni postotak poroznosti što ukazuje na njegovu kompaktnost.



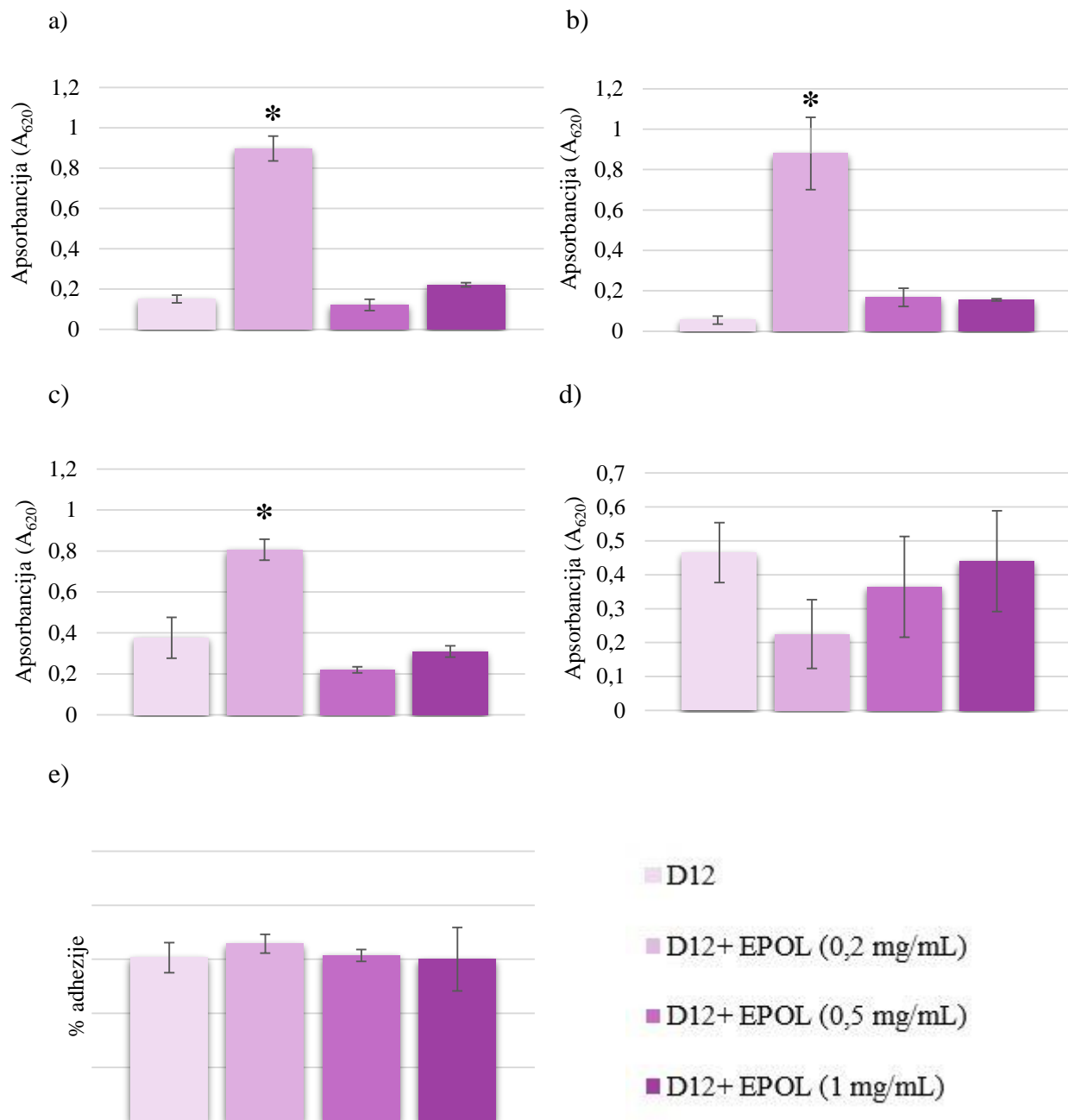
Slika 20. Mikrografija egzopolisaharida soja *L. fermentum* D12 snimljenog pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa pri povećanjima: a) 200, b) 100 i c) 20 μm

Kolonizacija humanog intestinalnog sustava je jedan od najvažnijih funkcionalnih svojstava probiotičkih sojeva, a prema Ruas-Madiedo i sur. (2011), ovisi o fizikalno-kemijskim i/ili strukturnim svojstvima, EPS-i mogu imati učinke na adheziju intestinalnog mukusa, tako da posreduju ili sprječavaju adheziju bakterijskih stanica prekrivanjem intestinalnog mukusa s molekulama EPS-a. Za definiranje utjecaja EPS-a na adhezijska svojstva soja *L. fermentum* D12, provedena su ispitivanja na proteine ekstracelularnog matriksa (ECM), humani fibronektin, laminin i kolagen, na glikoprotein mucin te na Caco-2 staničnu liniju. Ispitan je adhezijski kapacitet

D12 uz dodatak različitih koncentracija EPS-a. Jedna od korištenih koncentracija je upravo koncentracija jednaka prinosu proizvodnje EPS-a od 0,2 mg/mL, dok su ostale dvije korištene koncentracije 0,5 mg/mL i 1 mg/mL. Kontrola je uzorak bez dodatka EPS-a. Rezultati *in vitro* vezanja soja D12 na proteine ECM pokazali su značajnu sposobnost adhezije stanica ($p < 0,01$) na fibronektin, laminin i kolagen u prisutnosti 0,2 mg/mL EPS-a, dok je u prisutnosti većih koncentracija EPS-a i u kontroli, smanjena sposobnost vezanja soja D12 (slika 22a-c). Isti učinak je uočen i kod autoagregacije bakterijskih stanica tijekom 5 sati (slika 21). Učinak je bio suprotan prilikom eksperimenta adhezije na mucin. U prisutnosti 0,2 mg/mL EPS-a sposobnost vezanja je bila najmanja, dok je povećanjem koncentracija EPS-a uočeno povećanje adhezije, koje je i dalje bilo manje nego u uzorcima bez dodatka EPS-a (slika 22d). Utjecaj različitih koncentracija EPS-a na adheziju bakterijskih stanica na Caco-2 staničnu liniju nije uočen, a kapacitet vezanja je iznosio $65,75 \pm 3,44\%$ (slika 22e).



Slika 21. Utjecaj različitih koncentracija EPS-a (0 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL) na autoagregacijska svojstva soja *L. fermentum* D12



Slika 22. Utjecaj različitih koncentracija EPS-a (0 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL) na adheziju bakterijskih stanica *L. fermentum* D12 na a) fibronektin, b) laminin, c) kolagen, d) mucin, e) Caco-2 stanice. *Statistički značajno različito ($p < 0,01$) od drugih uzoraka

Prema nekim istraživanjima, dokazano je da EPS-i mogu imati zaštitnu ulogu tijekom stresnih uvjeta kao što je sušenje (Zannini i sur., 2016; Ryan i sur., 2015; Nguyen i sur., 2014), stoga je utjecaj različitih koncentracija EPS-a soja *L. fermentum* D12 ispitan tijekom procesa sušenja stanica u zamrznutom stanju - liofilizacije. Prema rezultatima, ustanovljeno je da povećanje koncentracije EPS-a ima povoljan učinak na preživljavanje *L. fermentum* D12 ($p < 0,05$), pri koncentracijama 0,5 i 1 mg/mL (tablica 12).

Tablica 12. Preživljavanje soja *L. fermentum* D12 tijekom liofilizacije. Uspoređene su logaritamske vrijednosti broja poraslih kolonija (CFU/mL) prije i nakon liofilizacije, a broj živih stanica nakon liofilizacije izražen je kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log$ CFU/mL)

c (EPS)	Prije liofilizacije (log CFU/mL)	Nakon liofilizacije (log CFU/mL)	$\Delta \log$ CFU/mL
0 mg/mL	9,77 ± 0,21 ^a	8,19 ± 0,19 ^a	1,57 ± 0,19 ^a
0,2 mg/mL	9,99 ± 0,29 ^a	8,79 ± 0,17 ^b	1,20 ± 0,17 ^{ab}
0,5 mg/mL	9,79 ± 0,14 ^a	8,68 ± 0,09 ^b	1,11 ± 0,09 ^b
1 mg/mL	9,62 ± 0,01 ^a	8,69 ± 0,09 ^b	0,92 ± 0,09 ^b

^{abc}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) unutar istog stupca

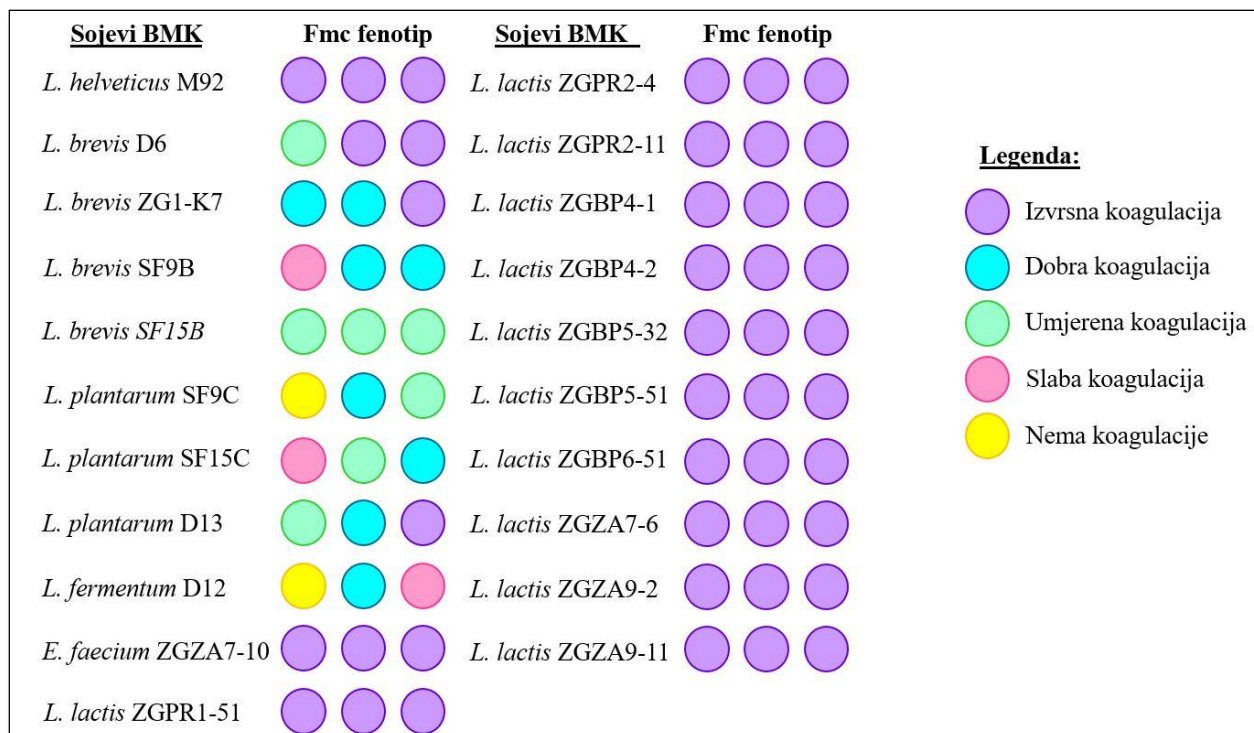
4.1.3. Proteolitička aktivnosti BMK za biosintezu peptida kao funkcionalnih biomolekula

Postavljen je i dodatni istraživački cilj za karakterizaciju proteolitičkog sustava BMK s potencijalom sinteze biopeptida iz kazeina. Enzimski sustav proteinaza BMK značajan je za odabir funkcionalnih starter kultura za proizvodnju sušenog svježeg sira s dodanom funkcionalnom vrijednošću. Odabrani su sojevi BMK koji pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Enterococcus*, izolirani prvenstveno iz fermentiranih proizvoda, koji razgrađuju kazein iz obranog mlijeka što upućuje na proteinaznu aktivnost koja se povezuje s akumulacijom biopeptida (Novak i sur., 2022b). Tijekom fermentacije, uspješan rast BMK očituje se pretvorbom laktoze u mliječnu kiselinu, uslijed koje se povećava kiselost, odnosno snižava pH vrijednost okolnog medija. Zakiseljavanjem mikrookoliša sprječava se rast patogenih bakterija, zbog čega je brzina zakiseljavanja mlijeka starter kulturama BMK od velike tehnološke važnosti. U cilju preliminarnog odabira BMK kao potencijalnih starter kultura za proizvodnju fermentiranih proizvoda dodane funkcionalne vrijednosti, određena je titracijska kiselost, postotak proizvedene mliječne kiseline i pH vrijednost supernatanata nakon uzgoja odabranih BMK u optimalnim medijima i obranom mlijeku. Nakon uzgoja u optimalnom mediju, svi *Lactobacillus* sojevi su u usporedbi s *L. lactis*

sojevima i sojem *E. faecium* ZGZA7-10, znatno snizili pH vrijednost podloge, dok je suprotan efekt uočen nakon uzgoja u obranom mlijeku. Vrijednosti titracijske kiselosti ($^{\circ}\text{SH}$) i postotka (%) proizvedene mliječne kiseline su kod svih sojeva bile znatno veće nakon uzgoja u optimalnom mediju (tablica 13). Prema Villegas i sur. (2015), proteolitička aktivnost BMK je u korelaciji s brzinom koagulacije mlijeka (*engl.* fast milk-coagulating, Fmc), stoga je ispitana sposobnost koagulacije mlijeka odabranih sojeva BMK tijekom 16 sati inkubacije u obranom mlijeku. Fmc⁺ fenotip prisutan je kod svih *Lactococcus* sojeva što je i očekivano jer posjeduju istraženi sustav proteaza, kao i sojevi *E. faecium* ZGZA7-10 i *L. helveticus* M92 (slika 23). Soj *L. helveticus* M92 detaljno je okarakteriziran kao probiotički soj koji eksprimira S-proteine na površini svojih stanica (Beganović i sur., 2011). Osim toga, analizom proteoma ovog soja, ustanovljene su enzimatske komponente sustava proteaza (Beganović i sur., 2013), uključujući PrtM proteazu, kao i proteine uključene u Opp transportni sustav i intarcelularne peptidaze PepE, PepN i PepQ. Kako je kod soja *L. helveticus* CNRZ32 pronađena homologija C-terminalnog kraja proteinazne PrtH domene s površinskim S-proteinima što upućuje na njihov sličan mehanizam vezanja (Genay i sur., 2009), moguća je povezanost površinskih S-proteina i učinkovite proteinazne aktivnosti soja M92.

Tablica 13. pH vrijednosti, titracijska kiselost (°SH) i postotak proizvedene mliječne kiseline u supernatantima kultura BMK nakon prekonocnog uzgoja u optimalnom mediju i obranom mlijeku

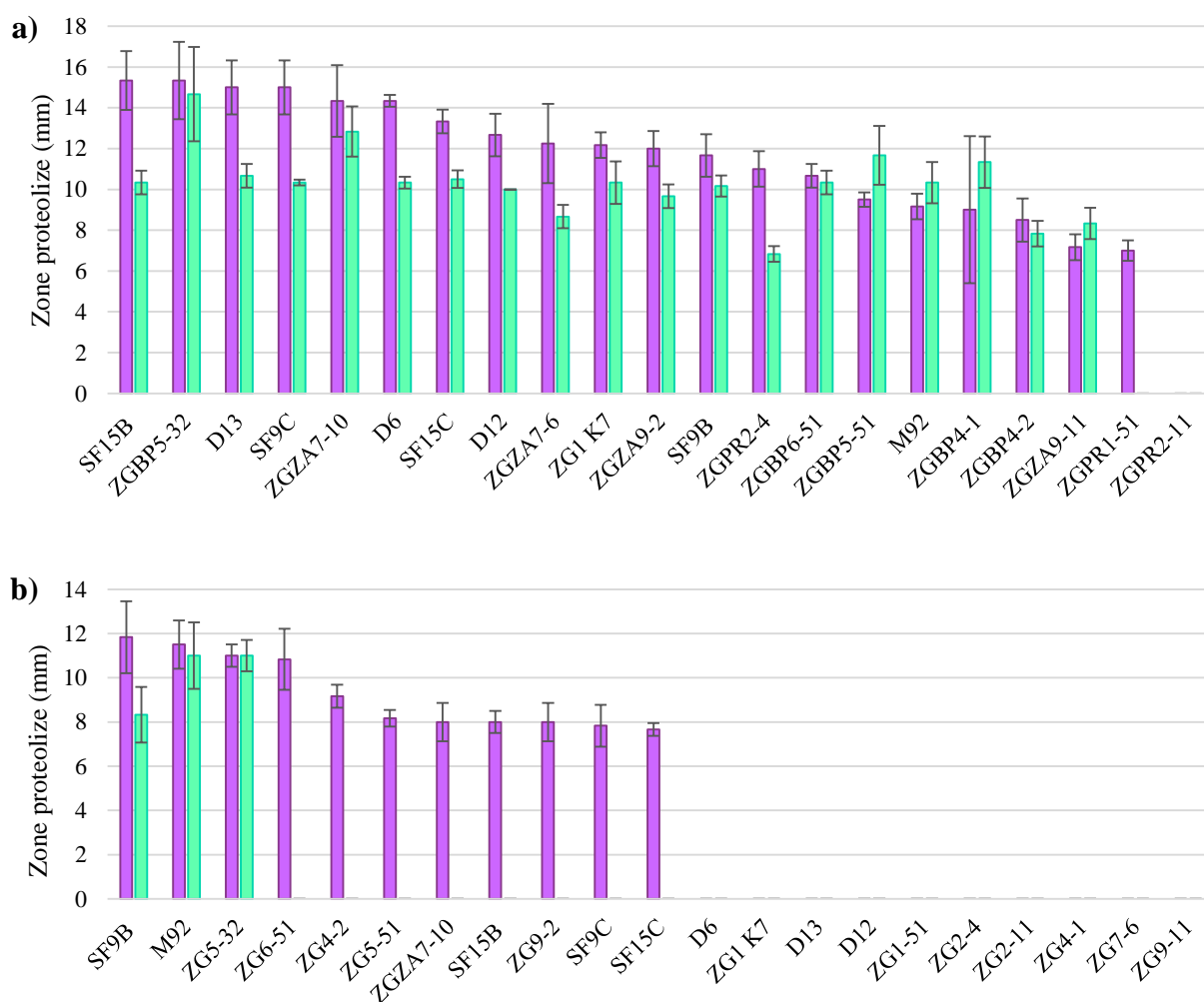
Soj BMK	pH vrijednost		Titracijska kiselost (°SH)		% mliječne kiseline	
	Optimalni medij	Obrano mlijeko	Optimalni medij	Obrano mlijeko	Optimalni medij	Obrano mlijeko
<i>L. helveticus</i> M92	4,77±0,46	4,30±0,51	46,67±22,03	28,00±17,44	1,05±0,50	0,63±0,39
<i>L. brevis</i> D6	3,85±0,03	5,06±0,18	81,33±6,11	16,00±4,00	1,83±0,14	0,36±0,09
<i>L. brevis</i> ZG1-K7	4,25±0,36	5,11±0,11	61,33±20,53	14,67±2,31	1,38±0,46	0,33±0,05
<i>L. brevis</i> SF9B	4,20±0,71	5,00±0,46	66,67±23,44	17,33±2,31	1,50±0,53	0,39±0,05
<i>L. brevis</i> SF15B	4,00±0,44	5,49±0,08	76,00±20,78	12,00±0,00	1,71±0,47	0,27±0,00
<i>L. plantarum</i> SF9C	3,78±0,08	5,67±0,15	88,00±13,86	12,00±0,00	1,98±0,31	0,27±0,00
<i>L. plantarum</i> SF15C	3,86±0,08	5,43±0,15	76,00±10,58	14,67±2,31	1,71±0,24	0,33±0,05
<i>L. plantarum</i> D13	3,75±0,05	5,19±0,28	77,33±20,13	12,67±1,15	1,74±0,45	0,29±0,03
<i>L. fermentum</i> D12	4,07±0,24	6,02±0,11	61,33±2,31	11,33±1,15	1,38±0,05	0,26±0,03
<i>E. faecium</i> ZGZA7-10	5,35±0,30	4,58±0,04	23,55±1,63	17,33±4,62	0,53±0,33	0,39±0,10
<i>L. lactis</i> ZGPR1-51	5,47±0,04	4,83±0,04	25,33±11,55	18,00±2,00	0,57±0,26	0,41±0,05
<i>L. lactis</i> ZGPR2-4	5,39±0,14	4,60±0,06	25,33±15,14	16,67±3,06	0,57±0,34	0,38±0,07
<i>L. lactis</i> ZGPR2-11	5,34±0,21	4,81±0,04	22,67±16,17	17,33±2,31	0,51±0,36	0,39±0,05
<i>L. lactis</i> ZGBP4-1	5,39±0,29	4,61±0,07	22,67±12,86	18,67±2,31	0,51±0,29	0,42±0,05
<i>L. lactis</i> ZGBP4-2	5,44±0,25	4,53±0,04	22,67±12,86	16,00±4,00	0,51±0,29	0,36±0,09
<i>L. lactis</i> ZGBP5-32	5,62±0,14	4,71±0,13	24,67±11,02	18,67±2,31	0,56±0,25	0,42±0,05
<i>L. lactis</i> ZGBP5-51	5,24±0,43	4,68±0,03	23,33±1,77	17,33±2,31	0,53±0,38	0,39±0,05
<i>L. lactis</i> ZGBP6-51	5,50±0,09	4,65±0,04	21,33±1,14	18,67±4,62	0,48±0,34	0,42±0,10
<i>L. lactis</i> ZGZA7-6	5,34±0,34	4,61±0,04	24,00±1,86	16,00±4,00	0,54±0,31	0,36±0,09
<i>L. lactis</i> ZGZA9-2	5,33±0,28	4,58±0,07	24,00±13,86	20,00±0,00	0,54±0,31	0,45±0,00
<i>L. lactis</i> ZGZA9-11	5,44±0,42	4,76±0,11	28,00±0,00	17,33±4,62	0,63±0,00	0,39±0,10



Slika 23. Kvalitativna detekcija koagulacije mlijeka i prisutnosti Fmc⁺ fenotipa nakon 16 sati uzgoja odabranih sojeva BMK u obranom mlijeku. Rezultati predstavljaju tri neovisna eksperimenta

BMK imaju složen i sofisticiran proteolitički sustav koji uključuje združenu aktivnost proteinaza, peptidaza i membranskih transportera, kojima hidroliziraju aminokiseline iz proteina prisutnih u mikrookolišu stanice (Pessione i Cirrincione, 2016). Najveći udio ukupnih proteina mlijeka čini kazein, te analizom supernatanta kulture, odnosno koncentrirane biomase stanica omogućena je dostupnost kazeina svim komponentama enzimskog sustava u usporedbi s eksperimentalnim pristupom u kojem bi se ispitala aktivnost samo purificirane proteinaze. Stoga je probir bakterijskih sojeva s potencijalnom proteolitičkom aktivnošću utemeljen na detekciji hidrolize proteina iz obranog mlijeka u prisutnosti koncentrirane biomase stanica, kako bi se detektirala aktivnost proteinaze vezane na staničnu stijenk, odnosno supernatanta bakterijskih kultura u slučaju da se radi o ekstracelularnoj proteinazi. Usporedbom hidrolazne aktivnosti sojeva uzgojenih u optimalnom mediju i uzgojem u obranom mlijeku, nije uočena indukcija proteinazne aktivnosti (slika 24). Najbolja sposobnost razgradnje kazeina određena je za koncentriranu biomasu stanica sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13, *E. faecium* ZGZA7-10, *L. plantarum*

SF9C, *L. plantarum* SF15C, *L. brevis* SF15B i *L. lactis* ZGBP5-32. Prema rezultatima, sojevi roda *Lactobacillus* i soj *Enterococcus*, nakon rasta u optimalnom mediju, fenotipski pokazuju izraženiju mogućnost hidrolize kazeina u usporedbi sa sojevima iz roda *Lactococcus*, osim u slučaju soja *L. lactis* ZGBP5-32 (slika 24a). Soj *L. lactis* ZGBP5-32 je pokazao značajnu proteolitičku aktivnost nakon prekonocnog uzgoja u obranom mlijeku pa se može pretpostaviti da kod ovog soja, koji je izvorno izoliran iz svježeg sira, postoji mogućnost induciranja komponenata proteolitičkog sustava i preusmjeravanja prema iskorištenju proteina kazeina odabirom odgovarajućeg medija, koji ne sadrži druge izvore aminokiselina.



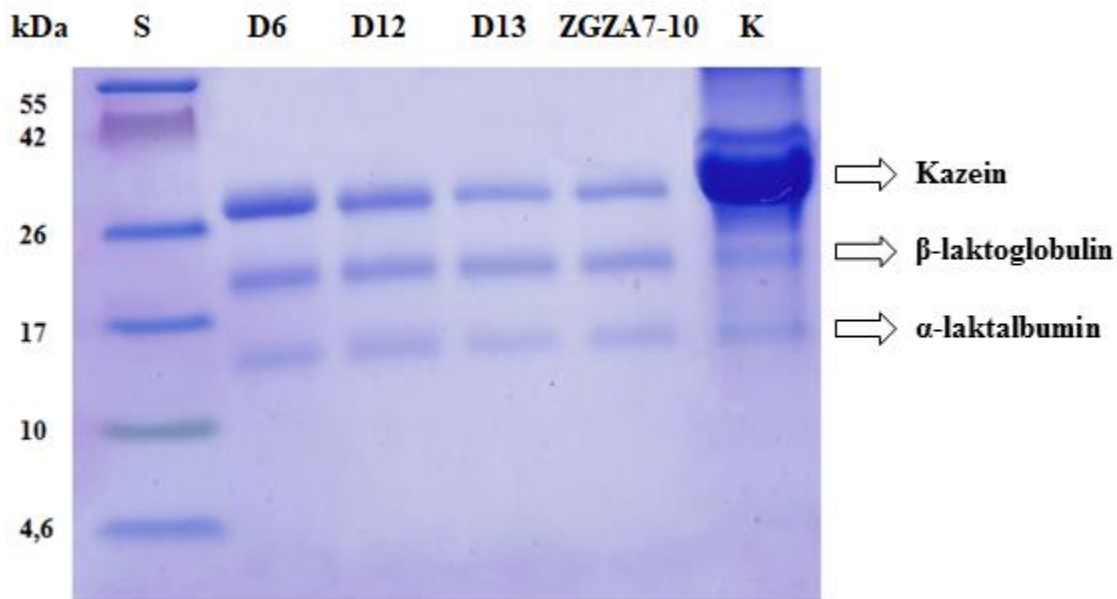
Slika 24. Kazeinolitička aktivnost ispitana je u uzorcima supernatanta prekonocne kulture (■) i koncentrirane biomase (■) sojeva poraslih u a) optimalnom mediju i b) obranom mlijeku

Za daljnja istraživanja proteolitičke aktivnosti, u svrhu primjene odabranih sojeva za proizvodnju sušenog svježeg sira s dodanom funkcionalnom vrijednošću, odabrana su tri soja koja eksprimiraju S-proteine na površini svojih stanica *L. helveticus* M92, *L. brevis* D6 i *L. brevis* ZG1-K7, jedan soj koji proizvodi bakteriocine *L. plantarum* D13, jedan soj producent EPS-a *L. fermentum* D12, tri *Lactococcus lactis* soja - ZGBP5-32, ZGZA7-6 i ZGZA9-2 te soj *E. faecium* ZGZA7-10. Kod odabranih sojeva provedeno je spektrofotometrijsko određivanje proteinazne aktivnosti Ansonovom metodom, pri čemu su najučinkovitiju kazeinolitičku aktivnost pokazali sojevi *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 (tablica 14).

Tablica 14. Proteolitička aktivnost odabranih sojeva BMK (U/mL_{supernatanta}) određeno pomoću Ansonove metode

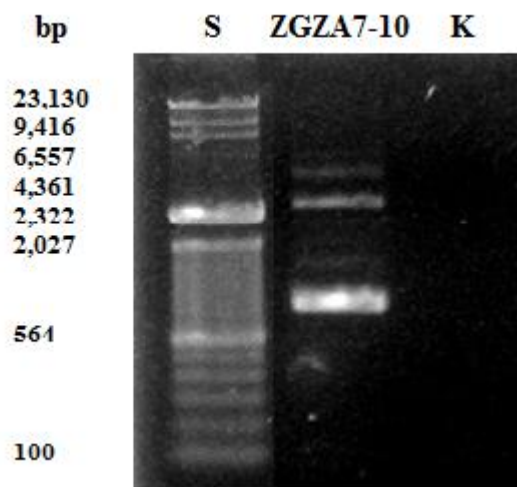
Soj:	nL-tirozina (µmol)	U/mL _{supernatanta}
<i>L. helveticus</i> M92	0,068 (±0,017)	0,743 (±0,185)
<i>L. brevis</i> D6	0,111 (±0,017)	1,219 (±0,183)
<i>L. brevis</i> ZG1-K7	0,022 (±0,008)	0,244 (±0,088)
<i>L. fermentum</i> D12	0,072 (±0,033)	0,792 (±0,363)
<i>L. plantarum</i> D13	0,094 (±0,029)	1,031 (±0,317)
<i>L. lactis</i> ZGBP5-32	-0,050 (±0,045)	-0,554 (±0,500)
<i>L. lactis</i> ZGZA7-6	0,007 (±0,006)	0,078 (±0,069)
<i>E. faecium</i> ZGZA7-10	0,320 (±0,018)	3,525 (±0,200)
<i>L. lactis</i> ZGZA9-2	-0,041 (±0,023)	-0,454 (±0,250)

Molekulska masa kazeina koji je dominantni protein u mlijeku je između 25 i 35 kDa. Za daljnju detekciju proteolitičke aktivnosti odabrana 4 izolata BMK, provedena je analiza razgradnje kazeina Tricin-SDS-PAGE (slika 25) iz supernatana kultura nakon uzgoja u 2 % obranom mlijeku. Iako su na poliakrilamidnom gelu vidljive proteinske vrpce koje odgovaraju molekulskoj masi kazeina koja iznosi otprilike 27 kDa, obivene vrpce su slabijeg inteziteta od kontrole, što upućuje na djelomičnu razgradnju kazeina iz mlijeka, a time na proteolitičku aktivnost ovih sojeva BMK.



Slika 25. Razgradnja kazeina u supernatantu kultura nakon uzgoja u 2 %-tnoj otopini obranog mlijeka pomoću odabranih sojeva BMK određena Tricin-SDS-PAGE elektroforezom; S - standard proteina; D6 - *L. brevis*; D12 - *L. fermentum*; D13 - *L. plantarum*; ZGZA7-10 - *E. faecium*; K - otopina obranog mlijeka

Za daljnju detekciju enzima uključenih u sustav proteolitičke aktivnosti odabran je soj *E. faecium* ZG7-10, primjenom SDS-PAGE u kombinaciji s MALDI-TOF/TOF spektrometrijom masa. Dobiveni su maseni spektri u pozitivnom modu ionizacije, s rasponom masa (m/z) 700-4000. Proteini odgovorni za proteolitičku aktivnost identificirani su ProteinProspector MS-Tag pretraživačem preko SwissProt i NCBI baze podataka. Primjenom SwissProt baze podataka identificirano je 7 proteaza, a NCBI bazom podataka 5 peptidaza i 3 proteina koju su dio transportnog sustava. Sekvence peptida koju je ProteinProspector MS-Tag pretraživač identificirao uz izračunate molekulske mase (MH^+), teorijske mase (MW), izoelektrične točke (pI) određenog peptida, te najbolji rezultati (*engl.* score) podudaranja dobivenih nukleotidnih sekvenci sa sekvencama pohranjenim u bazama podataka su prikazani u prilogu 3. U cilju detekcije gena odgovornih za proteolitičku aktivnost, provedena je PCR reakcija sa specifičnim početnicama za enzime koji sudjeluju u proteolitičkoj aktivnosti, soja *E. faecium* ZGZA7-10. Dobivena veličina PCR produkta je oko 685 bp, što ukazuje na prisutnost intragenske regije gena odgovornog za ekspresiju proteinaza (slika 26).



Slika 26. Elektroforeza PCR produkata u agaroznom gelu, umnoženih specifičnim PCR početnicama za ekspresiju proteinaza: S - standard, ZGZA7-10 - *E. faecium* ZGZA7-10, K - negativna kontrola

4.1.3.1. Analiza fermentacijske aktivnost odabranih sojeva BMK

U svrhu primjene odabranih sojeva BMK, *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, za proizvodnju sušenog svježeg sira s dodanom funkcionalnom vrijednošću, ispitana je mogućnost razgradnje glavnog šećera u mlijeku, laktoze i njegovih razgradnih produkata glukoze i galaktoze, kao i ostalih ugljikohidrata, primjenom API 50 CHL testa. Fermentacijski profili odabranih kultura pokazali su dobru sposobnost razgradnje laktoze, što je nužan preduvjet za primjenu starter kultura u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda - sušenog svježeg sira i sirutke. Fermentacijski profili razgradnje svih 49 različitih vrsta ugljikohidrata prikazan je u tablici 15.

Tablica 15. Fermentacijski profil ugljikohidrata bakterijskih sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10

Ugljikohidrat	D6	D12	D13	ZGZA7-10	Ugljikohidrat	D6	D12	D13	ZGZA7-10
Kontrola	-	-	-	-	Arbutin	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	+	Eskulin	+	+	+	+
Eritriol	-	-	-	-	Salicin	+	+	+	+
D-arabinoza	-	-	-	-	Celobioza	+	+	+	+
L-arabinoza	+	+	+	+	Maltoza	+	+	+	+
Riboza	+	+	+	+	Laktoza	+	+	+	+
D-ksiloza	+	+	-	-	Melibioza	+	+	+	+
L-ksiloza	-	-	-	-	Saharoza	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	Trehaloza	-	-	-	-
β -metil-ksilozid	-	-	-	-	Inulin	+	+	+	+
Galaktoza	+	+	+	+	Melezitoza	-	+	-	+
D-glukoza	+	+	+	+	D-rafinoza	-	+/-	-	-
D-fruktoza	+	+	+	+	Amidon	-	-	-	-
D-manoza	+	+	+	+	Glikogen	-	-	-	-
L-sorboza	-	-	-	-	Ksilitol	+	+	+/-	+
Ramnoza	+	+/-	-	-	β -gentobioza	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	D-turanoz	-	-	-	-
Inozitol	+/-	-	-	-	D-liksoza	-	-	-	+
Manitol	+	+	+	+	D-tagatoza	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	D-fukoza	-	-	-	-
α -metil-D-manozid	-	-	-	-	L-fukoza	-	-	-	-
α -metil-D-glukozid	+	-	-	-	D-arabitol	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	+	+	+	+	L-arabitol	+	+/-	+	+/-
Amigdalinalin	+	+	+	+	Glukonat	-	-	-	-
2-keto-glukonat	+	+	+	+	5-keto-glukonat	-	-	-	-

(-) negativna reakcija; (+) pozitivna reakcija, tijekom 48 sati; (\pm) prelazna reakcija

Tijekom proizvodnje sireva, dodatak natrijevog klorida ima višestruku ulogu jer djeluje kao konzervans, utječe na smanjenje količine vode u siru, doprinosi formiranju okusa, teksture i kvalitete sira i u konačnici doprinosi trajnosti gotovog proizvoda (Kalit, 2015; McSweeney, 2007). Kako bi se definirala koncentracija soli koju je potrebno dodati tijekom salamurenja svježeg sira, a da se pritom ne utječe na promjenu sastava mikrobne populacije, odnosno mikrobiološku aktivnost odabranih sojeva, ispitani su parametri fermentacije odabranih kultura tijekom rasta u mlijeku i tijekom rasta u mlijeku uz dodatak različitih koncentracija soli, 2,0, 4,0 i 6,5 % (w/v). Prema rezultatima, *L. plantarum* D13 značajno više zakiseljava podlogu u usporedbi s ostalim

sojevima, i proizvodi veće koncentracije mliječne kiseline. Svi sojevi BMK mogu rasti uz dodatak različitih koncentracija natrijeva klorida u hranjivoj podlozi. Pri tome je očekivano da je povećanjem koncentracije soli posljedično smanjena acidifikacija mlijeka uslijed smanjene sinteze mliječne kiseline (tablica 16).

Tablica 16. pH vrijednost, proizvedena mliječna kiselina (g/L) i broj živih stanica BMK izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti (Δ CFU/mL_{mlijeka}), tijekom uzgoja u obranom mlijeku s i bez dodatka različitih koncentracija NaCl-a

Vrijeme inkubacije	pH				Mliječna kiselina (g/L)				Δ log CFU/mL _{mlijeka}		
	0h	6h	24h	48h	0h	6h	24h	48h	6h	24h	48h
<i>L. plantarum</i> D6											
Obrano mlijeko	6,57± 0,12	6,35± 0,21	5,87± 0,57	4,48± 0,30	-	1,20± 1,04	3,00± 2,75	5,70± 3,41	0,10± 0,07	0,14± 0,22	0,61± 0,05
2 % NaCl	6,42± 0,20	6,28± 0,25	5,99± 0,34	5,16± 1,05	-	1,20± 1,04	1,65± 1,45	4,20± 2,89	0,02± 0,09	-0,10± 0,02	-0,61± 0,06
4 % NaCl	6,38± 0,24	6,27± 0,29	6,08± 0,27	5,38± 0,90	-	1,05± 0,94	1,35± 1,19	3,90± 2,60	0,02± 0,03	-0,37± 0,15	-0,75± 0,24
6 % NaCl	6,31± 0,24	6,22± 0,29	6,04± 0,20	5,60± 0,55	-	1,05± 0,94	1,35± 1,19	3,30± 2,08	-0,09± 0,10	-0,13± 0,06	-0,81± 0,18
<i>L. fermentum</i> D12											
Obrano mlijeko	6,62± 0,12	6,45± 0,08	5,23± 0,67	4,32± 0,31	-	0,75± 0,69	2,70± 0,90	4,95± 1,96	0,01± 0,12	0,20± 0,09	0,57± 0,19
2 % NaCl	6,44± 0,20	6,33± 0,19	5,65± 0,43	4,24± 0,39	-	1,20± 0,26	2,25± 0,45	4,50± 1,56	-0,13± 0,18	0,40± 0,30	0,43± 0,25
4 % NaCl	6,39± 0,21	6,29± 0,20	5,78± 0,28	4,77± 0,35	-	0,75± 0,69	1,50± 0,52	4,20± 2,08	-0,03± 0,19	0,26± 0,33	0,36± 0,19
6 % NaCl	6,31± 0,20	6,23± 0,20	6,02± 0,08	5,31± 0,12	-	1,35± 0,45	1,65± 0,69	2,70± 0,90	0,01± 0,14	-0,44± 0,32	-0,44± 0,18
<i>L. plantarum</i> D13											
Obrano mlijeko	6,58± 0,17	6,43± 0,20	5,43± 0,43	4,60± 0,67	-	1,20± 1,04	3,30± 1,37	6,30± 3,12	0,04± 0,02	0,39± 0,35	0,08± 0,30
2 % NaCl	6,37± 0,16	6,25± 0,22	6,01± 0,31	5,11± 0,68	-	1,20± 0,26	1,80± 0,90	4,20± 2,08	0,20± 0,06	0,28± 0,16	-0,13± 0,24
4 % NaCl	6,36± 0,25	6,21± 0,24	6,01± 0,21	5,12± 0,48	-	1,20± 0,26	1,65± 0,69	4,20± 2,08	0,31± 0,04	0,33± 0,09	-0,10± 0,25
6 % NaCl	6,31± 0,28	6,15± 0,21	6,01± 0,07	5,61± 0,22	-	1,05± 0,26	1,35± 0,45	3,00± 1,87	0,12± 0,12	-0,86± 0,23	-0,94± 0,04
<i>E. faecium</i> ZGZA7-10											
Obrano mlijeko	6,67± 0,08	6,21± 0,23	5,13± 0,34	4,63± 0,15	-	1,50± 0,52	3,15± 1,19	5,10± 2,08	0,27± 0,20	0,52± 0,05	0,72± 0,31
2 % NaCl	6,45± 0,13	6,14± 0,24	5,15± 0,30	4,73± 0,08	-	1,65± 0,26	3,30± 1,37	5,10± 2,26	0,29± 0,24	0,37± 0,27	0,41± 0,36
4 % NaCl	6,44± 0,22	6,21± 0,19	5,43± 0,36	5,03± 0,14	-	1,05± 0,94	3,00± 1,45	4,50± 1,56	0,20± 0,30	0,28± 0,30	0,47± 0,18
6 % NaCl	6,40± 0,22	6,22± 0,17	5,61± 0,22	5,40± 0,12	-	1,20± 1,04	2,40± 1,37	3,00± 1,37	-0,24± 0,15	0,16± 0,26	-0,15± 0,34

(-) nije detektirano

Koncentracija laktoze, laktata, acetata i diacetila u uzorcima bakterijskih kultura sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, nakon uzgoja u obranom mlijeku provedena je tekućinskom i plinskom kromatografijom (tablica 17). Soj *E. faecium* ZGZA7-10 sintetizira mliječnu kiselinu u većim koncentracijama, dok je najveću koncentraciju octene kiseline sintetizira *L. plantarum* D13. Koncentracije laktoze u supernatantima svih prekonocnih kultura BMK su u rasponu od $46,5 \pm 0,5$ do $51,0 \pm 1,0$ mg/mL, s najmanjom koncentracijom određenom kod soja ZGZA7-10. Proizvodnja diacetila nije uočena kod niti jednog soja.

Tablica 17. Rezultati analize koncentracije laktata, acetata, diacetila i laktoze nakon prekonocne inkubacije sojeva BMK u obranom mlijeku

Soj BMK	acetat (mg/mL)	laktat (mg/mL)	diacetil (mg/mL)	laktoza (mg/mL)
<i>L. plantarum</i> D13	$2,795 \pm 0,025^a$	$4,90 \pm 0,0^a$	-	$51,0 \pm 0,0^a$
<i>L. brevis</i> D6	$2,090 \pm 0,160^b$	$3,70 \pm 0,0^b$	-	$51,0 \pm 1,0^a$
<i>L. fermentum</i> D12	$2,310 \pm 0,010^c$	$5,85 \pm 0,05^c$	-	$47,5 \pm 0,5^b$
<i>E. faecium</i> ZGZA7-10	$1,420 \pm 0,040^d$	$7,15 \pm 0,05^d$	-	$46,5 \pm 0,5^b$

(-) nije detektirano

^{abc}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,01$) unutar istog stupca

4.1.4. Potpuno sekvencioniranje genoma autohtonih BMK

Unutar kolekcije BMK izoliranih iz različitih fermentacijskih mikrostaništa, koja je uspostavljena na temelju istraživanja probiotičkog koncepta Laboratorija, provedena je ciljana selekcija sojeva sa specifičnim svojstvima biosinteze bakteriocina i EPS-a te sojeva koji ekspimiraju proteaze koje sudjeluju u biosintezi bioaktivnih peptida u fermentiranim mliječnim proizvodima. U svrhu proizvodnje inovativnih funkcionalnih fermentiranih proizvoda pomoću funkcionalnih starter kultura odabrana su 4 bakterijska izolata sa specifičnim metabolizamskim svojstvima. Osim sinteze bakteriocina, EPS-a, odabrani su sojevi koji ekspimiraju površinske S-proteine i posjeduju specifičan sustav proteaza.

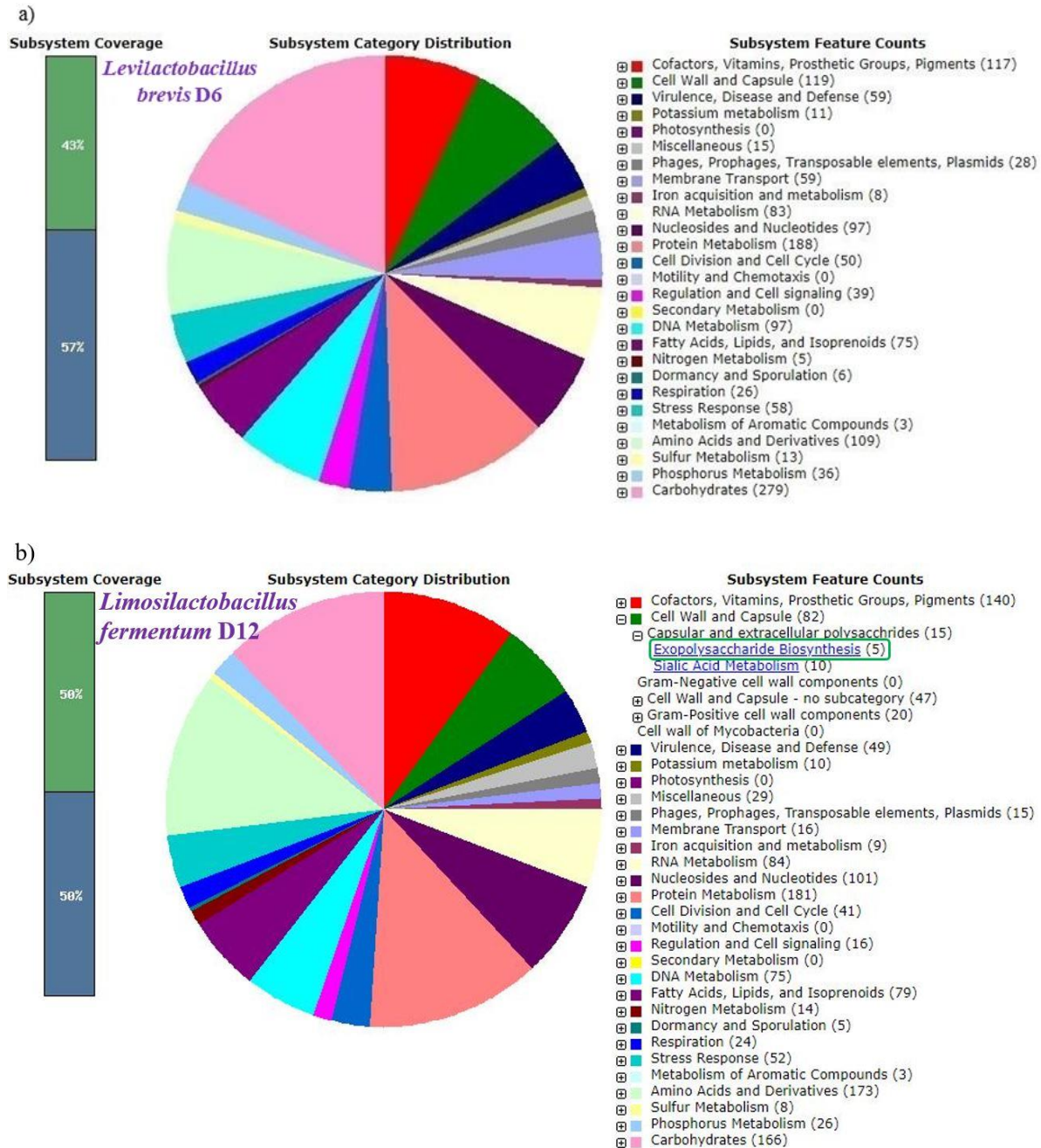
Obzirom da su pojedini sojevi bakterija iz roda *Enterococcus* rezistentni na antibiotike te mogu uzrokovati infekcije (Ogier i Serrot, 2008), ispitana je sigurnost primjene soja *E. faecium* ZGZA7-10 kao starter kulture prema EFSA (2012), potvrđeno je da soj nema hemolitičku aktivnost, te je dokazana njegova osjetljivost na antibiotike (Novak i sur., 2022a). Fenotipskom i morfološkom

analizom pojedinačne kolonije soja ZGZA7-10 ustanovljeno je da su stanice kokoidnog oblika, veličine $1,0 \cdot 1,5-2,0 \mu\text{m}$, nepokretne i da ne formiraju spore, dok je bojanjem po Gramu ustanovljeno da stanice pripadaju Gram-pozitivnim bakterijama.

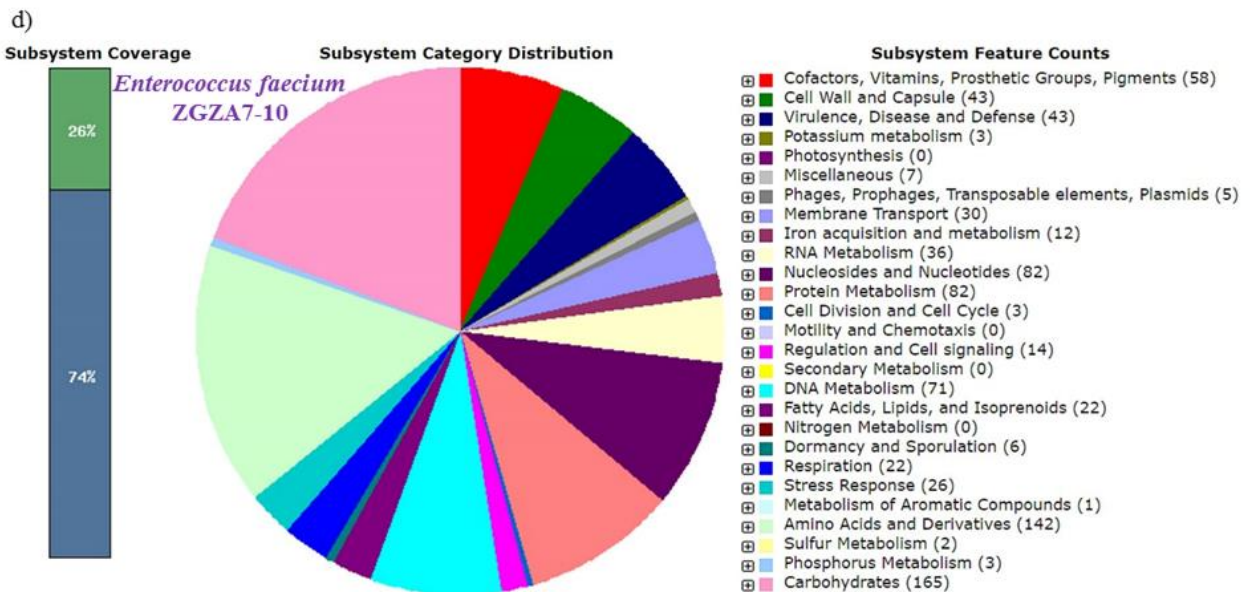
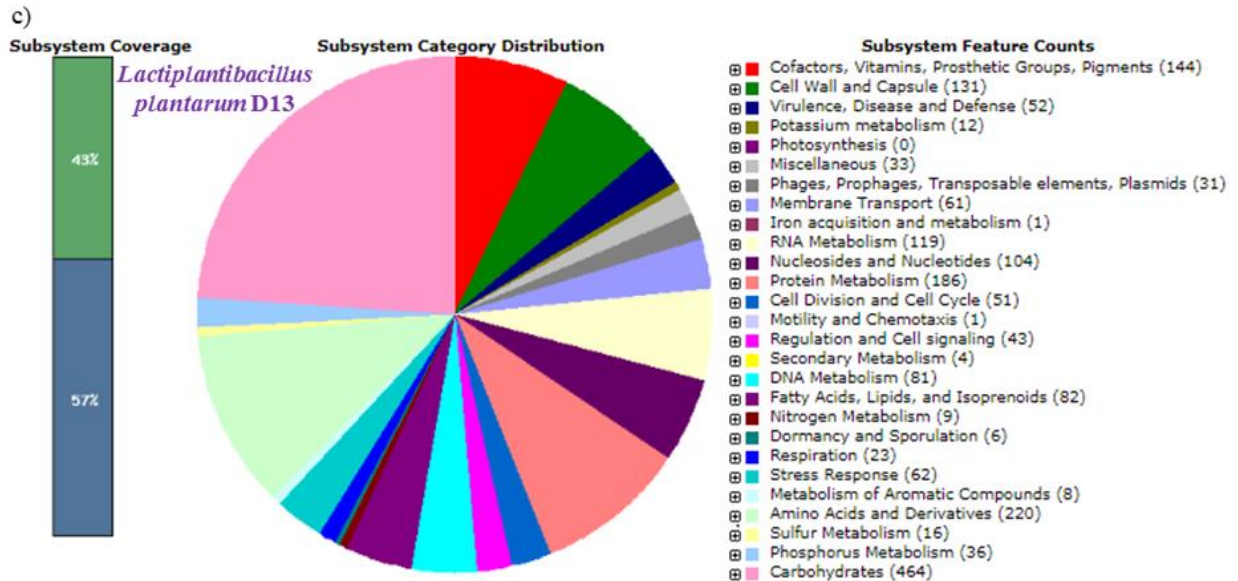
Identifikacija sojeva *L. plantarum* D13 i *L. fermentum* D12, izoliranih iz dimljenog svježeg sira, i soja *E. faecium* ZGZA7-10 izoliranog iz svježeg sira, provedena je nakon sekvencioniranja cijeloga genoma (*engl.* whole genome sequencing). Provedena je funkcionalna anotacija te kategorizacija sekvencioniranih gena primjenom RAST servera (slika 27), a genomski atlas sekvencioniranih sojeva je konstruiran primjenom PATRIC baze podataka (slika 28). Kao soj koji eksplicira S-proteine na površini svojih stanica odabran je soj *L. brevis* D6 (Uroić i sur., 2016), čija je identifikacija prethodno utvrđena, a sekvenca je pohranjena u NCBI bazi podataka (Kant i sur., 2016). Usporedba sekvencioniranih genomskih sekvenci odabranih sojeva prikazana je u tablici 18. Duljina genomske sekvence soja *L. plantarum* D13 iznosi 3,34 milijuna parova baza i podijeljena je na 58 kontiga. Duljina genoma soja D13 slična je duljini soja *L. plantarum* SF9C od 3,26 milijuna pb (Butorac i sur., 2020). Prema duljini genoma, dalje slijede *L. brevis* D6 s 2,59 milijuna pb, *E. faecium* ZGZA7-10 a 2,57 milijuna pb i *L. fermentum* D12 s 2,02 milijuna pb, podijeljenih na 123, 158 i 29 kontiga. Broj kodirajućih sekvenci je 2554, 1927 i 3174 za sojeve *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12 i *L. plantarum* D13, što odgovara istraživanju usporedbe genoma kod *Lactobacillus* sojeva, čiji broj je u rasponu od 1700 do oko 3000 gena koji kodiraju za proteine (Van Pijkeren i O'Tolle, 2013). Broj kodirajućih sekvenci soja *E. faecium* ZGZA7-10 približno odgovara vrijednostima za soj *E. faecium* Aus0004 (2860) (Lam i sur., 2012). Broj RNA molekula je 72, 64, 70 i 25 za svaki pojedini soj, *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10. Udio GC parova baza soja *L. brevis* D6 je 45,6 %, soja *L. fermentum* D12 52,0 %, soja *L. plantarum* D13 44,4 % i soja *E. faecium* ZGZA7-10 37,9 % što je u skladu s literaturnim podacima za druge *Lactobacillus* i *Enterococcus* sojeve, *L. brevis* SF9B (45,9 %) (Banić i sur., 2018), *L. fermentum* IFO 3956 (52 %) (Morita i sur., 2008), *L. fermentum* DSM 20052 (52,5 %) (Brandt i sur., 2020), *L. plantarum* SF9C (44,4 %) (Butorac i sur., 2020) i *E. faecium* Aus0004 (38 %) (Lam i sur., 2012).

Tablica 18. Usporedba karakteristika genoma odabranih sojeva BMK

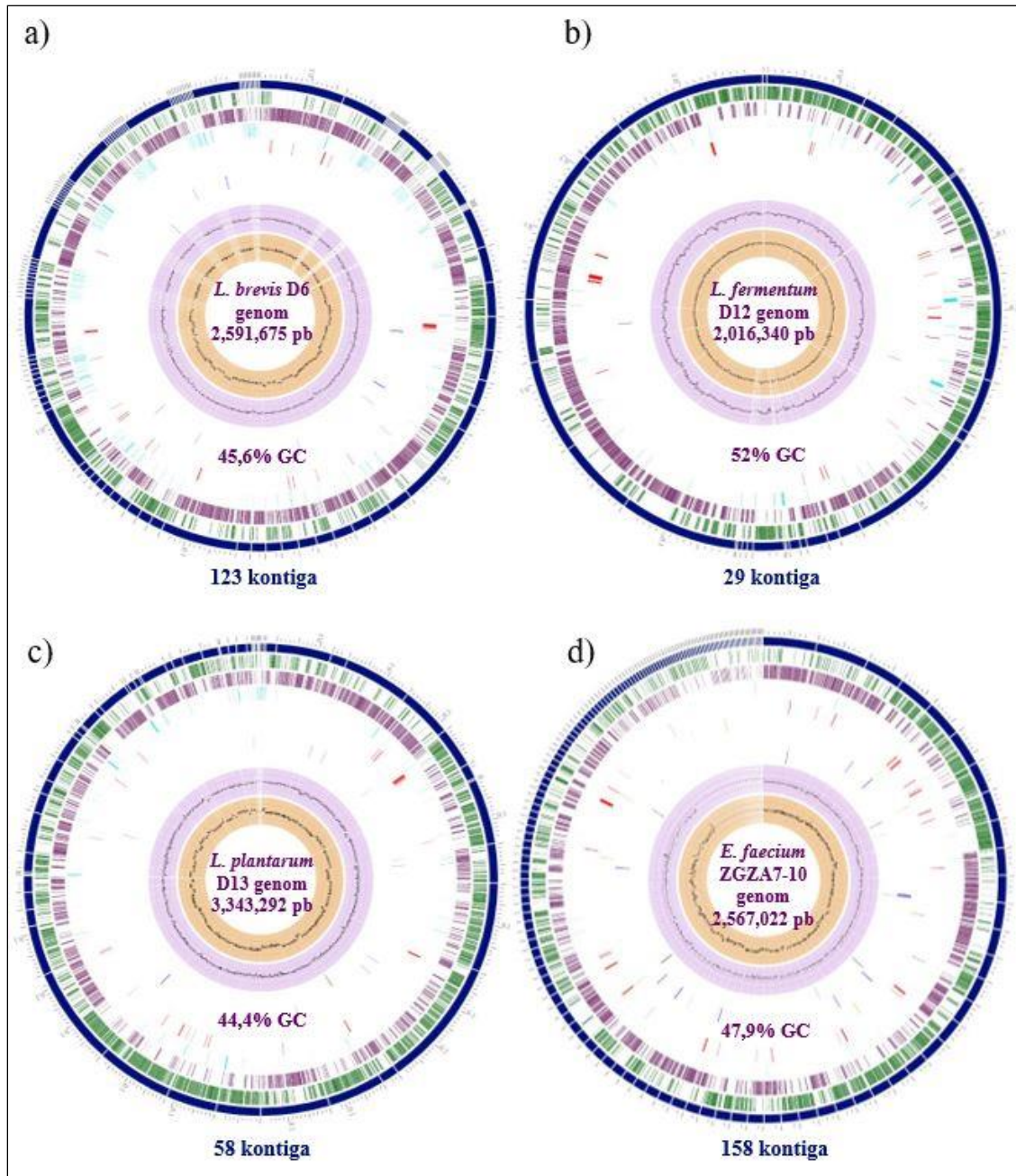
	<i>L. brevis</i> D6	<i>L. fermentum</i> D12	<i>L. plantarum</i> D13	<i>E. faecium</i> ZGZA7-10
Pristupni broj	LQNG00000000	RHMA00000000	NIGG00000000	JAJAGE00000000
Duljina genoma (pb)	2,591,675	2,016,340	3,343,292	2,567,022
%GC	45,6	52,0	44,4	37,9
N50	78576	62009	129563	33305
L50	12	11	9	24
Broj kontiga	123	29	58	158
Broj kodirajućih sekvenci	2554	1972	3174	2605
Broj RNA molekula	72	64	70	25



Slika 27. Funkcionalna kategorizacija gena sojeva a) *L. brevis* D6, b) *L. fermentum* D12, c) *L. plantarum* D13 i d) *E. faecium* ZGZA7-10 pomoću RAST servera. Zeleni dio stupca predstavlja postotak identificiranih proteina, a plavi dio postotak proteina koji nisu anotirani

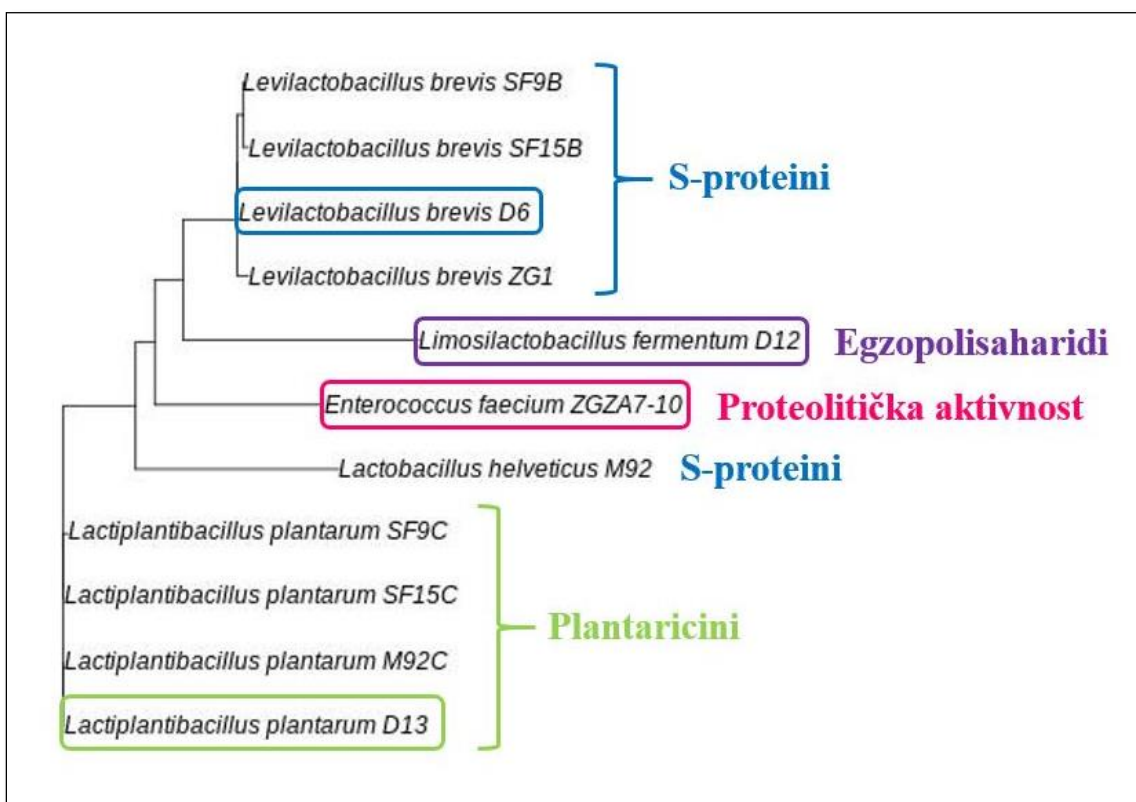


Nastavak slike 27. Funkcionalna kategorizacija gena sojeva a) *L. brevis* D6, b) *L. fermentum* D12, c) *L. plantarum* D13 i d) *E. faecium* ZGZA7-10 pomoću RAST servera. Zeleni dio stupca predstavlja postotak identificiranih proteina, a plavi dio postotak proteina koji nisu anotirani



Slika 28. Genomski atlas sojeva a) *L. brevis* D6, b) *L. fermentum* D12, c) *L. plantarum* D13 i d) *E. faecium* ZGZA7-10 priređen pomoću PATRIC baze podataka. Od vanjskog prema unutrašnjem krugu: duljina genoma (Mpb), raspored kontiga (sljedova), kodirajuće sekvence-FS (*engl.* forward strand), kodirajuće sekvence-RS (*engl.* reverse strand), nekodirajuće sekvence, kodirajuće sekvence homologne genima za antimikrobnu rezistenciju, kodirajuće sekvence homologne transporterima, kodirajuće sekvence homologne poznatim genima za ciljano djelovanje lijekova, udio GC parova baza i distribucija gvaninskih i citozinskih nukleotida u genomu

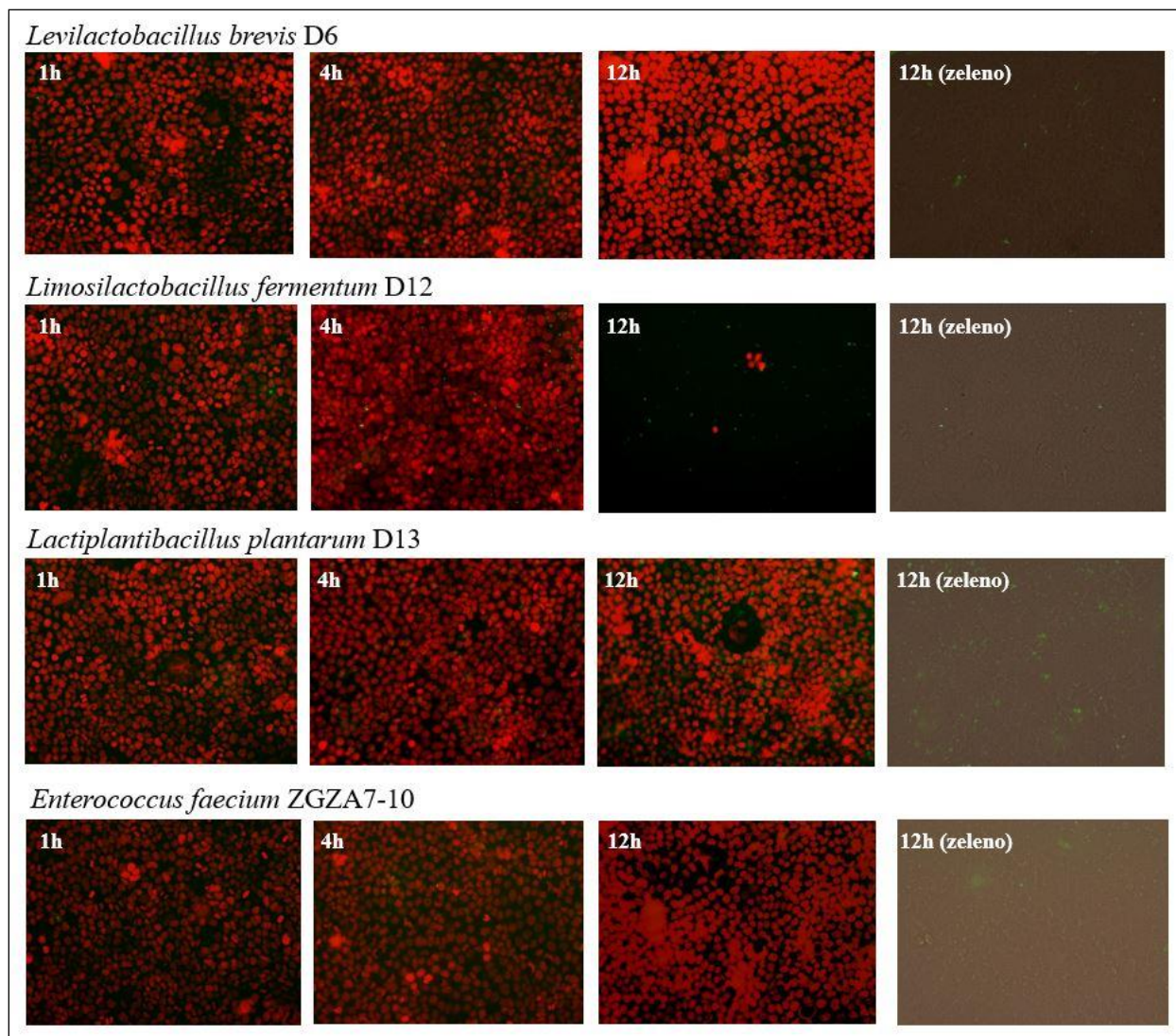
Filogenetska udaljenost sekvencioniranih genoma sojeva producenata biomolekula plantaricina *L. plantarum* SF9C, *L. plantarum* M92C, *L. plantarum* D13 i *L. plantarum* SF15C, egzopolisaharida *L. fermentum* D12, površinskih S-proteina *L. helveticus* M92, *L. brevis* ZG1-K7, *L. brevis* D6, *L. brevis* SF9B i *L. brevis* SF15B i proteolitičkog soja *E. faecium* ZGZA7-10, određena je konstrukcijom filogenetskog stabla pomoću REALPHY servera. *L. plantarum* sojevi, producenti plantaricina su grupirani zajedno, kao i *L. brevis* sojevi, dok su filogenetski udaljenije vrste *L. helveticus*, *L. fermentum* i *E. faecium* svrstane zasebno (slika 29). Određena je i filogenetska udaljenost *L. fermentum* D12, s *L. fermentum* sojevima čiji su genomi dostupni u NCBI bazi podataka (slika 30). Ustanovljena je sličnost soja D12 sa sojem KMB_613 (označen plavom bojom), izoliranim is slovačkog sira (Markusková i sur., 2018). Jedan od sojeva koji je pokazao visoku filogenetsku sličnost je soj *L. fermentum* IFO 3956 (označen žutom bojom), izoliran iz tradicionalnog egipatskog Ras sira, s dokazanom proteolitičkom aktivnosti (El-Ghaish i sur., 2010).



Slika 29. Dendrogram sekvencioniranih genoma sojeva producenata biomolekula plantaricina, egzopolisaharida i površinskih S-proteina, istraživanih u ovoj doktorskoj disertaciji, dobiveno primjenom REALPHY servera

4.1.5. *In vitro* i *in vivo* ispitivanje učinkovitosti biomolekula funkcionalnih starter kultura

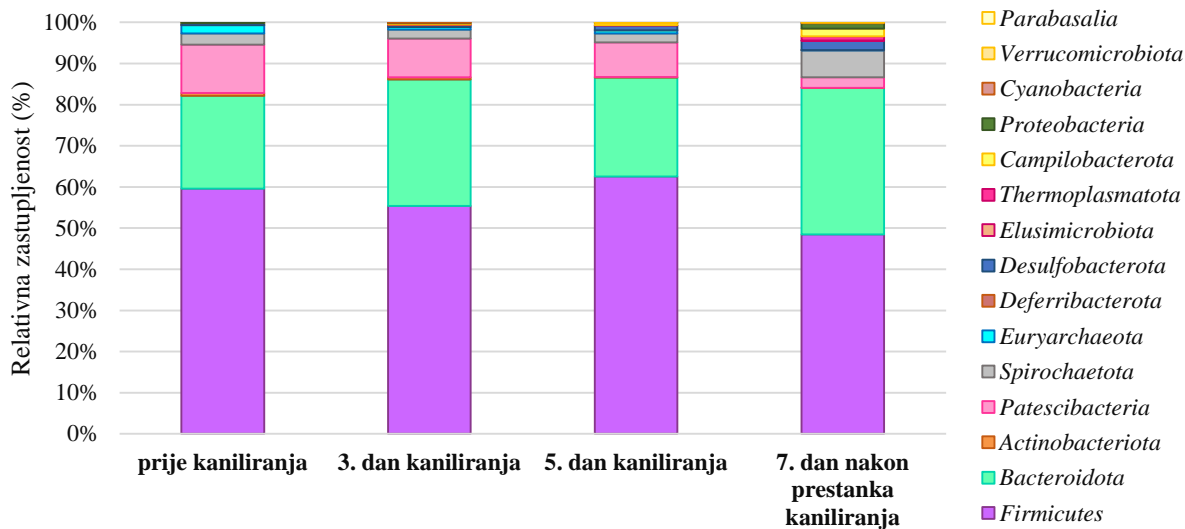
Potencijal probiotičkih bakterija da koloniziraju GIT domaćina i posljedično utječu na sastav intestinalne mikrobiote se smatra jednim od najvažnijih funkcionalnih svojstava njihovog djelovanja. U cilju ispitivanja kolonizacijskog potencijala *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, korištena su dva različita pristupa. Jedan od pristupa je ispitivanje adhezijskih svojstava pojedinačnih bakterijskih stanica na crijevne epitelne stanice *in vitro*, pri čemu je kao model korištena kontinuirana Caco-2 stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela. Adhezijski kapacitet pojedinačnih stanica potvrđen je fluorescentnom mikroskopijom za vizualizaciju adheziranih živih stanica, pri MOI = 50, nakon 1, 4 i 12 sati inkubacije, bojanjem različitim fluorescentnim bojama, pri čemu su bakterijske stanice obojane zelenom, a jezgra Caco-2 stanica crvenom fluorescentnom bojom. Najbolju sposobnost vezanja na monosloj Caco-2 stanične linije pokazali su sojevi *L. brevis* D6 i *L. fermentum* D12 (slika 31).



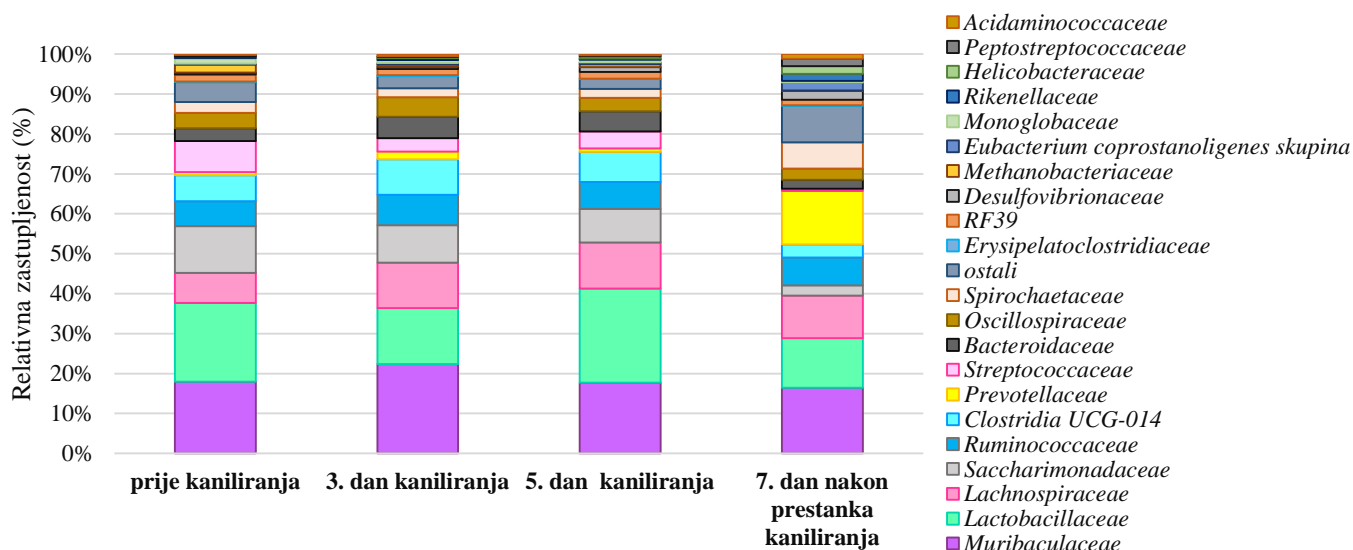
Slika 31. Adhezijska svojstva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 (zeleno) na monosloj Caco-2 stanica (crveno) pri MOI = 50, nakon 1, 4 i 12 sati inkubacije (prve tri slike prikazuju preklapanje monosloja Caco-2 stanica i adheziranih bakterijskih stanica, četvrta slika prikazuje samo adhezirane bakterijske stanice) analizirano fluorescentnim mikroskopom pri povećanju od 20x

U cilju ispitivanja utjecaja odabranih kultura s odgovarajućim funkcionalnim svojstvima proizvodnje površinskih S-proteina *L. brevis* D6, EPS-a *L. fermentum* D12, plantaricina *L. plantarum* D13 i enzimske aktivnosti proteaza *E. faecium* ZGZA7-10, na sastav intestinalne mikrobiote, korišten je pristup mikrobnog profiliranja nakon združene primjene konzorcija *in vivo*.

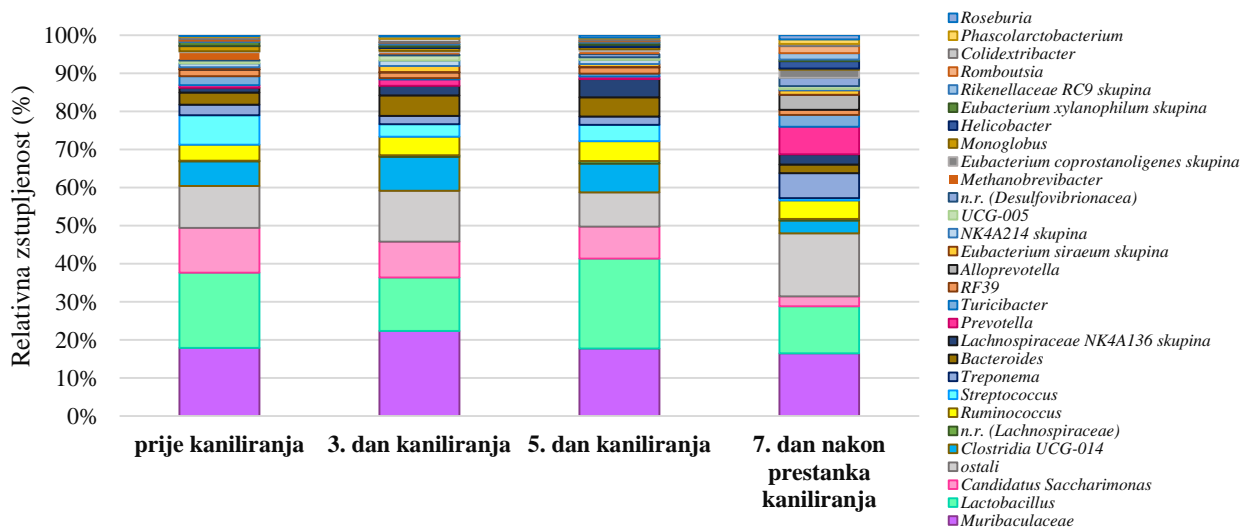
Proveden je postupak kaniliranja pokusnih životinja, a rezultati Illumina MiSeq sekvencioniranja DNA izoliranih iz fecesa štakora prije i nakon kaniliranja, pokazali su da se mikrobiomi fecesa štakora međusobno razlikuju. Prema rezultatima, najveći udio u mikrobiomu štakora kod svih uzoraka čine bakterije koje pripadaju koljenima *Firmicutes* i *Bacteroidota*, koji čine više od 80 % ukupne crijevne mikrobiote (slika 32), među kojima su najzastupljenije bakterije iz porodice *Lactobacillaceae* i *Muribaculaceae*. Nakon primjene probiotičke suspenzije, došlo je do povećanja bioraznolikosti fekalne mikrobiote. Na razini bakterijskih koljena, nakon probiotičkog tretmana došlo je do pojave *Thermoplasmatota*, *Cyanobacteria*, *Elusimicrobiota*, *Verrucomicrobiota* i *Parabasalia* u fecesu štakora (slika 33). Na razini porodice bakterijskih vrsta, najuočljivije je povećanje bakterija iz porodice *Prevotellaceae*, producenta kratkoločanih masnih kiselina, čija je zastupljenost povećana za 17 puta. Vidljivo je i povećanje porodica *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae*, koji su poznati producenti butirata te bakterija iz porodica *Peptostreptococcaceae* i *Rikenellaceae* i do potpunog izostanka bakterija iz porodice *Methanobacteriaceae* u fecesu sva tri štakora, u koju se ubrajaju bakterije *Methanobrevibacter smithii* (slika 34). Prema zastupljenosti bakterijskih rodova u mikrobiomu štakora, nakon kaniliranja odabranom mješovitom kulturom BMK, uočena je značajna promjena prisutnosti nekoliko rodova i privremeno povećanje bakterija roda *Lactobacillus* (slika 34). Najveće povećanje vidljivo je kod bakterija roda *Alloprevotella*, *Prevotella* i *Roseburia*, također producenta kratkoločanih masnih kiselina, čije zastupljenosti su povećane za 58, 10 i 8 puta. Združena primjena dizajniranog konzorcija BMK uzrokovala je smanjenje relativne zastupljenosti jednog od najčešćih patogena kod štakora, bakterije roda *Streptococcus*, i to za čak 13 puta, kao i smanjenje relativne zastupljenosti bakterija roda *Candidatus Saccharimonas*.



Slika 32. Relativna zastupljenost (%) bakterija na razini koljena u mikrobiomu fecesa štakora prije početka kaniliranja, treći i peti dan kaniliranja te sedmi dan nakon prestanka kaniliranja



Slika 33. Relativna zastupljenost (%) bakterija na razini porodice u mikrobiomu fecesa štakora prije početka kaniliranja, treći i peti dan kaniliranja te sedmi dan nakon prestanka kaniliranja



Slika 34. Relativna zastupljenost bakterija na razini roda u mikrobiomu fecesa štakora prije početka kaniliranja, treći i peti dan kaniliranja te sedmi dan nakon prestanka kaniliranja; n.r.-neidentificirani rod porodice u zagradi

4.2. Tehnološki aspekti primjene funkcionalnih starter kultura

S tehnološkog aspekta, potrebno je optimirati proizvodne uvjete s ciljem zadržavanja ili mogućeg povećanja metaboličke aktivnosti i broja živih stanica tijekom pripreve i primjene funkcionalnih starter kultura, odnosno skladištenja u formulaciji suhog aktivnog pripravka, primjenom postupaka mikroinkapsulacije i liofilizacije. Postupak mikronkapsulacije omogućuje zaštitu bakterijske stanice prilikom različitih nepovoljnih uvjeta, primjerice u GIT-u, kako bi stanice u što većem broju došle do kolona gdje mogu *in situ* sintetizirati svoje biomolekule. Svrha liofilizacije je omogućavanje pohrane odabranih funkcionalnih starter kultura kroz dulji vremenski period, njihov transport i kasniju primjenu.

Kako bi probiotičke bakterije iz formulacije u što većem broju dospjele do kolona gdje iskazuju svoju fiziološku ulogu, značajna je održivost tijekom obrade i skladištenja (Leboš Pavunc i sur., 2019; Succi i sur., 2017). Stoga je provedena mikroinkapsulacija bakterijskih stanica *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 u različitim polimernim nosačima. Usporedbom učinkovitosti mikroinkapsulacije, umrežavanje kazeina djelovanjem transglutaminaze se pokazao kao najmanje učinkovit nosač ($p < 0,05$) za sva 4 ispitivana soja, dok su jednako djelotvorni bili alginat i κ -karagenan (tablica 19). Mikroinkapsulacija probiotičkih bakterija u alginatu se sve više koristi zbog učinkovite zaštite stanica s kontroliranim otpuštanjem

u odgovarajućem mediju (Chávarri i sur., 2012), te optimalnim biokemijskim i muko-adhezivnim karakteristikama za *in situ* kolonizaciju odabranih probiotičkih sojeva (Banić i sur., 2018). Zbog dokazanih karakteristika, najbolje učinkovitosti i jednostavnosti provođenja metode, za daljnje eksperimente ispitivanja tehnoloških aspekata primjene odabranih funkcionalnih starter kultura odabran je ionski hidrogel alginat.

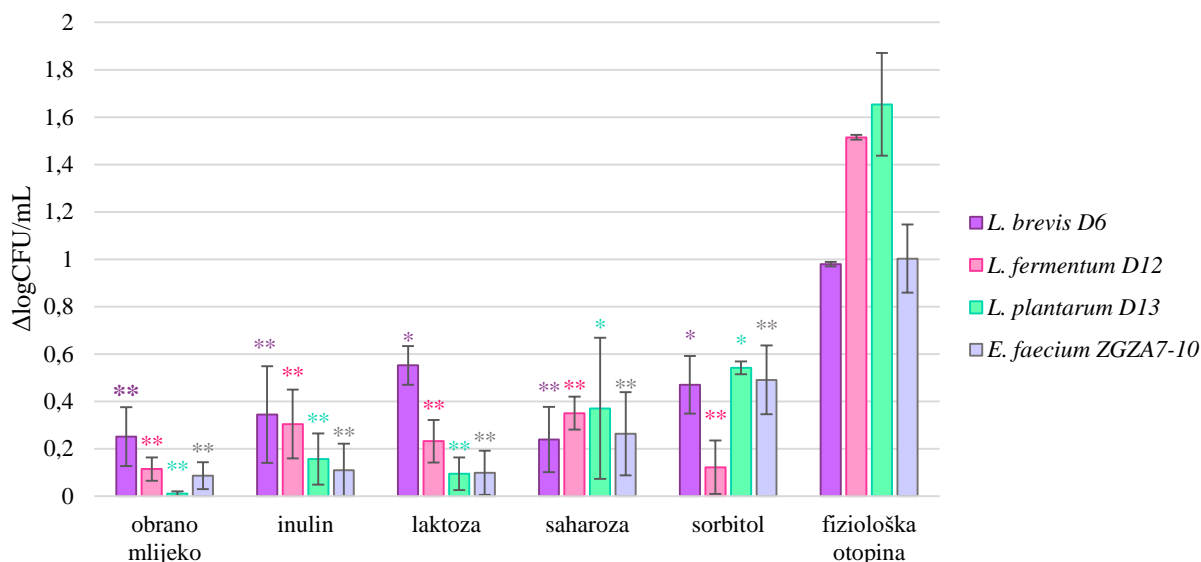
Tablica 19. Usporedba učinkovitosti mikroinkapsulacije stanica (*engl.* encapsulation yield, EY) izražene kao postotak (%) za *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 u alginatu, κ -karagenanu i kazeinu djelovanjem transglutaminaze

Matriks	Bakterijski soj			
	<i>L. brevis</i> D6	<i>L. fermentum</i> D12	<i>L. plantarum</i> D13	<i>E. faecium</i> ZGZA7-10
EY _{alginat} (%)	98,83±3,31 ^{az}	97,38±2,32 ^{az}	97,89±1,75 ^{az}	98,32±1,48 ^{az}
EY _{κ-karagenan} (%)	97,47±1,56 ^{abz}	98,87±0,88 ^{az}	96,91±0,45 ^{az}	90,35±6,89 ^{az}
EY _{kazein} (%)	92,43±0,24 ^{bz}	91,16±0,88 ^{bz}	97,52±1,85 ^{ay}	97,82±1,28 ^{ay}

^{ab}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) unutar istog stupca

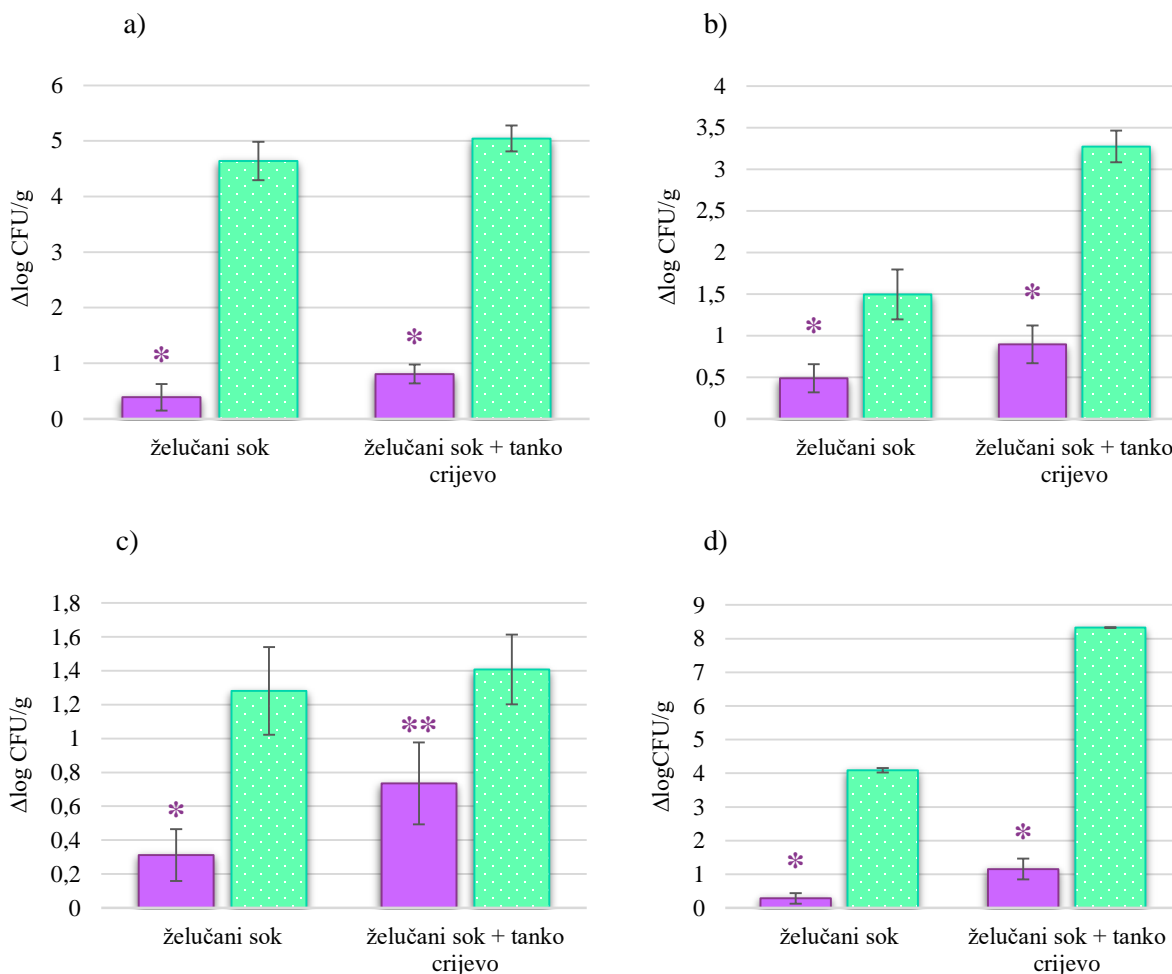
^{yz}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,01$) unutar istog reda

Prema Leboš Pavunc i sur. (2011) na preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom stresnih uvjeta liofilizacije može se utjecati dodatkom različitih zaštitnih komponenata, lioprotektora. Sojevi su mikroinkapsulirani u alginatu, a zatim liofilizirani uz dodatak različitih lioprotektora kako bi se ispitalo njihov zaštitni učinak. Kao kontrola, korišten je mikroinkapsulirani uzorak bez dodatka lioprotektora priređen u fiziološkoj otopini. Smanjenje broja aktivnih bakterijskih stanica izražene su razlikom logaritma koncentracije živih stanica prije i nakon procesa liofilizacije, pri čemu je kao početna vrijednost uzeta koncentracija stanica nakon procesa mikroinkapsulacije u alginatu. Usporedbom uzoraka liofiliziranih uz dodatak lioprotektora sorbitola, saharoze, laktoze, inulina i obranog mlijeka s uzorcima priređenima uz dodatak fiziološke otopine, dokazan je zaštitni učinak svih upotrebljenih lioprotektora ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$). U uzorcima liofiliziranim s obranim mlijekom postignuta je najmanja smrtnost stanica, što ga čini najboljim izborom u odabiru lioprotektora (slika 35).



Slika 35. Usporedba preživljavanja mikroinkapsuliranih sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 u alginatu, nakon procesa liofilizacije uz dodatak lioprotektora sorbitola, saharoze, laktoze, inulina i obranog mlijeka. * označavaju statistički značajnu razliku uzoraka liofiliziranih uz dodatak različitih lioprotektora od kontrola * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Za odabir BMK kao probiotičkih sojeva značajno je definirati preživljavanje stresnih uvjeta koji prevladavaju u GIT-u, kao što su niska pH vrijednost želuca i žučne soli u tankom crijevu. Kako bi se ispitao zaštitni utjecaj mikroinkapsulacije tijekom ekstremnih uvjeta GIT-a, ispitano je preživljavanje sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 mikroinkapsuliranih u alginatu i liofiliziranih uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora u simuliranim uvjetima želučanog soka i tankog crijeva. Kao početna vrijednost određen je broj stanica nakon procesa liofilizacije, a rezultati su prikazani kao smrtnost stanica odabranih sojeva BMK nakon prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a (slika 36). Ustanovljen je zaštitni učinak mikroinkapsulacije u alginatu na preživljavanje bakterijskih stanica tijekom prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a, obzirom da je broj živih stanica nakon prolaska kroz simulirane uvjete želučanog soka i tankog crijeva statistički značajno veći (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) kod stanica mikroinkapsuliranih u alginatu i liofiliziranih uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora, u odnosu na nemikroinkapsulirane uzorke istih sojeva liofilizirane uz dodatak fiziološke otopine, odnosno bez dodataka lioprotektora.



Slika 36. Usporedba smrtnosti stanica a) *L. brevis* D6, b) *L. fermentum* D12, c) *L. plantarum* D13 i d) *E. faecium* ZGZA7-10, mikroinkapsuliranih u alginatu i liofiliziranih uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora (■) i nemikroinkapsuliranih stanica u fiziološka otopina (■), nakon izlaganja simuliranim uvjetima želučanog soka i simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (želučani sok i tanko crijevo). * označavaju statistički značajnu razliku od nemikroinkapsuliranih uzoraka: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Kako je usporedbom učinkovitosti mikroinkapsulacije u različitim polimernim nosačima dokazana najbolja učinkovitost mikroinkapsulacije za ionski hidrogel alginat, ovaj polimerni matriks korišten je u mikroinkapsulaciji soja *L. fermentum* D12 uz dodatak tri različite vrste prebiotika inulin+FOS, manitol, laktuloza, s ciljem postizanja boljeg preživljavanja stanica tijekom skladištenja i dostave što većeg broja živih stanica do ciljnog mjesta djelovanja, debelog crijeva. Kao kontrola je korišten soj D12 koji je mikroinkapsuliran bez dodatka prebiotika. Soj *L. fermentum* D12 odabran je za

provođenje ispitivanja utjecaja prebiotika tijekom mikroinkapsulacije jer se radi o producentu EPS-a čija biosinteza je stimulirana prisutnošću izvora ugljika. Dodatak prebiotika nije utjecalo na postupak mikroinkapsulacije, obzirom da nije vidljiva statistički značajna razlika ($p < 0,05$) među uzorcima u usporedbi s kontrolom (tablica 20).

Tablica 20. Usporedba učinkovitosti mikroinkapsulacije stanica (EY) izražene kao postotak (%) soja *L. fermentum* D12 u alginatu uz dodatak prebiotika inulin+FOS, manitol, laktuloza i kontrole

Matriks	Bakterijski soj
	<i>L. fermentum</i> D12
EY _{inulin+FOS} (%)	97,32±2,09 ^a
EY _{manitol} (%)	99,72±0,18 ^a
EY _{laktuloza} (%)	99,16±0,71 ^a
EY _{kontrola} (%)	99,38±1,20 ^a

^{abc}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) unutar istog stupca

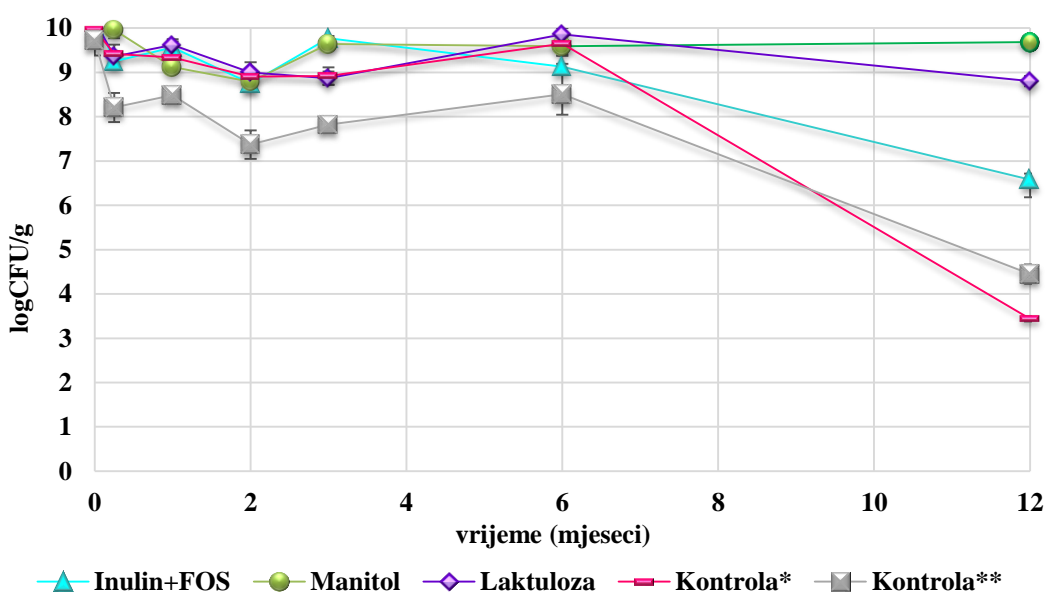
Nakon mikroinkapsulacije *L. fermentum* D12 u alginatu dodatkom različitih prebiotika provedena je liofilizacija mikrokapsula u obranom mlijeku. Zaštitni učinak obranog mlijeka tijekom stresnih uvjeta liofilizacije je potvrđen, obzirom da je smrtnost stanica soja *L. fermentum* D12 kod uzorka kojem nije dodan lioprotektor statistički značajno veća ($p < 0,01$) usporedbom s uzorcima kojima je dodano obrano mlijeko (tablica 21).

Tablica 21. Uporedba preživljavanja mikroinkapsuliranog probiotičkog soja *L. fermentum* D12 u alginatu, uz dodatak prebiotika inulin+FOS, manitol, laktuloza, nakon liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora. Kontrola¹ - mikroinkapsulirani soj D12 bez dodatka prebiotika, liofiliziran u obranom mlijeku, kontrola² - mikroinkapsulirani soj D12 bez dodatka prebiotika, liofiliziran u fiziološkoj otopini. Rezultati su prikazani kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log$ CFU/g) prije i nakon procesa liofilizacije

Matriks	$\Delta \log$ CFU/g
EY _{inulin+FOS} (%)	0,176±0,227 ^a
EY _{manitol} (%)	0,412±0,114 ^a
EY _{laktuloza} (%)	0,257±0,323 ^a
EY _{kontrola} ¹ (%)	0,153±0,041 ^a
EY _{kontrola} ² (%)	1,515±0,021 ^b

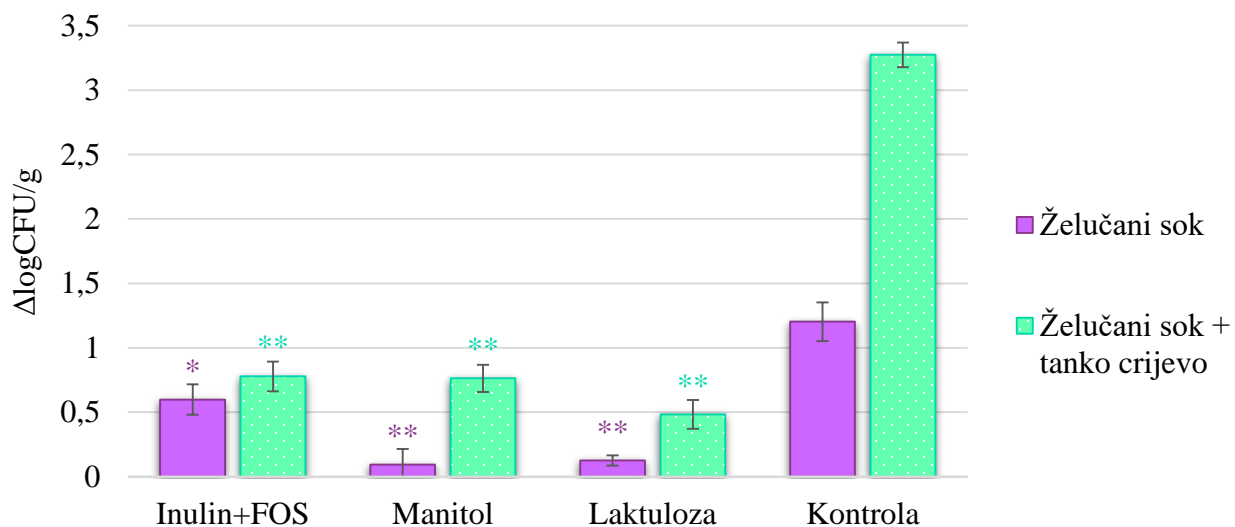
^{ab}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,01$) unutar istog stupca

Broj živih stanica u mikroinkapsuliranim liofiliziranim pripravcima uz dodatak obranog mlijeka, ispitan je tijekom godinu dana čuvanja pri +4°C. Preživljavanje soja *L. fermentum* D12 tijekom prvih 6 mjeseci je bilo vrlo visoko, bez obzira na korišteni prebiotik. Ovisno o vrsti dodanog prebiotika, značajnije smanjene broja uočeno je nakon godinu dana čuvanja. Uzorci u koje nije dodan niti jedan prebiotik pokazali su najlošije preživljavanje sa smanjenjem broja živih stanica od čak $6,539 \pm 0,056$ i $5,269 \pm 0,217$ log CFU/g u slučaju kontrole* i kontrole**. Najbolje preživljavanje soja D12 je dokazano uz dodatak prebiotika manitola i laktuloze, sa smrtnošću stanica od samo $0,365 \pm 0,032$ i $0,402 \pm 0,047$ log CFU/g, tijekom jedne godine čuvanja. Smrtnost stanica bakterijskog soja D12 tijekom jedne godine čuvanja, bila je značajno veća ($p < 0,01$) primjenom inulina u kombinaciji s FOS, budući da je broj živih stanica smanjen s $10,259 \pm 0,227$ na $6,577 \pm 0,396$ log CFU/g (slika 37).



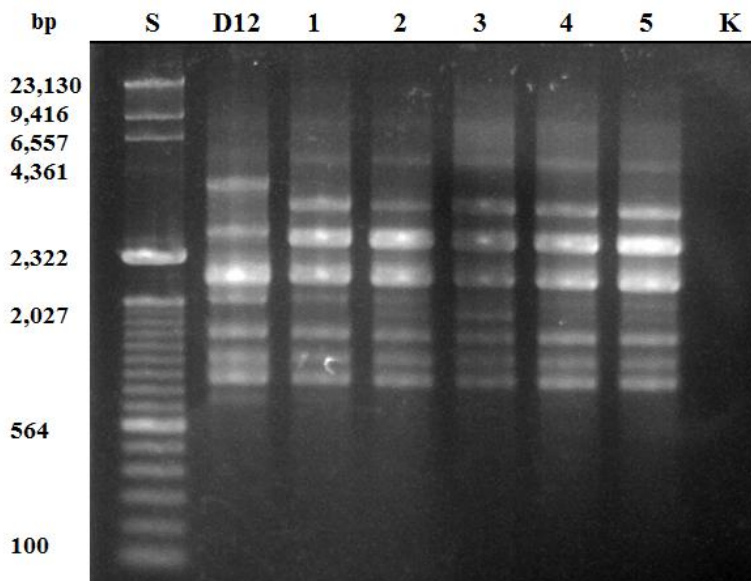
Slika 37. Broj živih bakterijskih stanica (log CFU po gramu mikroinkapsuliranih stanica) u mikroinkapsuliranim liofiliziranim pripravcima *L. fermentum* D12 neposredno nakon proizvodnje (0), te nakon 1, 2, 3, 6 i 12 mjeseci čuvanja. Kontrola* - mikroinkapsulirani soj liofiliziran u obranom mlijeku kao lioprotektoru i kontrola** - mikroinkapsulirani soj liofiliziran u fiziološkoj otopini

Provedeno je i ispitivanje utjecaja stresnih uvjeta GIT-a na liofilizirane mikrokapsule soja D12 uz dodatak različitih prebiotika. Dokazano je statistički značajno ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$) bolje preživljavanje uzoraka mikroinkapsuliranih uz dodatak različitih prebiotika i liofiliziranih uz dodatak obranog mlijeka, nakon prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a (slika 38).



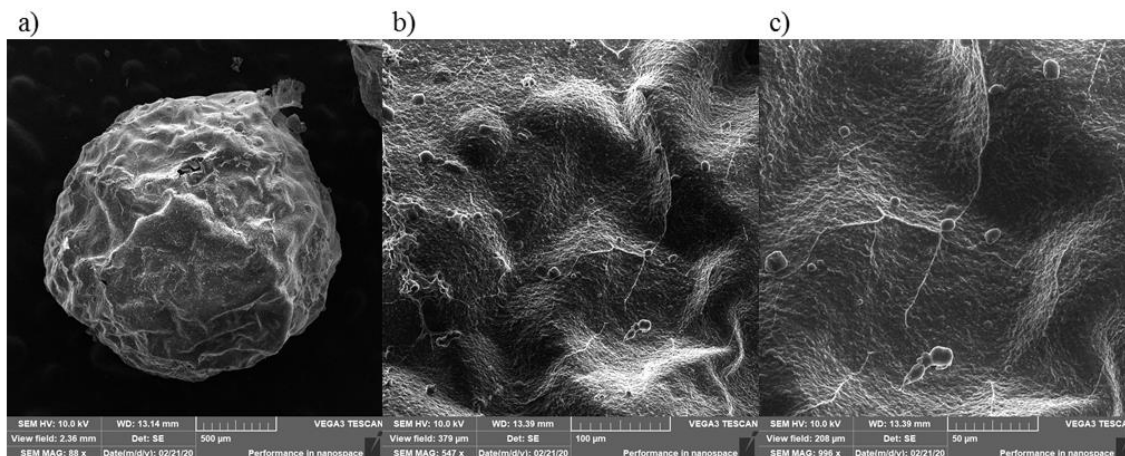
Slika 38. Usporedba smrtnosti mikroinkapsuliranih stanica *L. fermentum* D12 u alginatu uz dodatak prebiotika inulin+FOS, manitol, laktuloza, nakon izlaganja simuliranim uvjetima želučanog soka i simuliranim uvjetima cijelog GIT-a (želučani sok i tanko crijevo). Kontrola - nemikroinkapsulirani soj D12 liofiliziran, uz dodatak fiziološke otopine. * označavaju statistički značajnu razliku od kontrole: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$

Prisutnost soja *L. fermentum* D12 u liofiliziranim mikrokapsulama ispitana je nakon razgradnje alginatnih mikrokapsula pomoću 2 %-tnog (v/w) natrijeva citrata i izolacije DNA iz kolonija poraslih na MRS pločama, nakon čega je provedena RAPD-PCR reakcija (slika 39). Dobiveni profili DNA vrpci su u usporedbi s profilom genomske sekvence soja *L. fermentum* D12 vrlo slični, što dokazuje prisutnost ovih soja u svim liofiliziranim mikrokapsulama.



Slika 39. Elektroforeza produkata dobivenih RAPD-PCR metodom s M13 početnicom: **S** – standard, **1** – *L. fermentum* D12, **2** – pripravak mikroinkapsuliran u alginatu i liofiliziran u fiziološkoj otopini, **3** - pripravak mikroinkapsuliran u alginatu i liofiliziran u obranom mlijeku, **4** - pripravak mikroinkapsuliran u alginatu (inulin+FOS) i liofiliziran u obranom mlijeku, **5** - pripravak mikroinkapsuliran u alginatu (laktuloza) i liofiliziran u obranom mlijeku, **6** - pripravak mikroinkapsuliran u alginatu (manitol) i liofiliziran u obranom mlijeku, **K** - kontrola

Kako morfologija dobivene mikrokapsule utječe na transport odgovarajućeg supstrata do ciljnog mjesta (Sundararaghavan i Burdick, 2017), provedena je morfološka karakterizacije liofiliziranih mikrokapsula soja *L. fermentum* D12 primjenom skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Optička mikrografija potvrdila je da su mikrokaspule sferičnog oblika, pogodnog za dopremu odgovarajućeg supstrata, kao što je EPS (slika 40).



Slika 40. Mikrografija liofiliziranih alginatnih mikroapsula koje sadrže soj *L. fermentum* D12 snimljene pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa pri povećanjima: a) 500, b) 100 i c) 50 μm

4.3. Proizvodnja funkcionalnih fermentiranih proizvoda definiranim konzorcijem

Nakon selekcije i karakterizacije autohtonih sojeva BMK koji iskazuju specifična probiotička svojstva, ispitana je mogućnost sinteze biomolekula te zadovoljavanje tehnoloških kriterija za proizvodnju funkcionalnih fermentiranih proizvoda sušenog svježeg sira i sirutke. Prije dodatka mješovitih starter kultura, izmjerena je pH vrijednost svježeg mlijeka koja je iznosila 6,73 ($\pm 0,05$). Fermentacija je zaustavljena pri pH vrijednosti 4,6 što odgovara izoelektričnoj točki kazeina jer daljnje povećanje acidifikacije može imati negativan utjecaj na organoleptička svojstva proizvedenog svježeg sira. Tijekom proizvodnje sira, kako bi se izbjegla pojava neželjene sekundarne mikroflore, potrebna je potpuna fermentacija laktoze (Parente i Cogan, 2004), zbog čega je mjereno vrijeme trajanja fermentacije. Trajanje fermentacije sira proizvedenog s odabranim autohtonim BMK odvijala se tijekom 19 sati, a kontrolnog sira 18 sati, što je u skladu s primjenom mikrobnih kultura u proizvodnji sireva (Perko, 2015). Nakon proizvodnje, pH vrijednosti za sir proizveden primjenom odabranih BMK, te sirutke zaostale nakon proizvodnje iznosile su 4,18 ($\pm 0,04$) i 4,66 ($\pm 0,61$), dok su za kontrolni sir i sirutku vrijednosti bile 4,44 ($\pm 0,05$) i 4,46 ($\pm 0,11$). Vrijednosti su u kiselom pH području, što je i očekivano s obzirom da su glavni produkti metabolizma dodanih starter kultura mliječna i octena kiselina. Određeni su i prinosi proizvedenih sirutki i sireva nakon proizvodnje (svježi sir) i nakon sušenja (sušeni svježi sir). Prinos svježeg sira

proizvedenog primjenom odabranog konzorcija BMK iznosio je 35,58 ($\pm 8,10$) %, a volumen izdvojene sirutke 1191,67 ($\pm 154,46$) mL, dok su kod kontrolnog sira te vrijednosti iznosile 39,37 ($\pm 0,76$) % i 1132,67 ($\pm 23,69$) mL. Prinosi sušenih svježih sireva nisu se statistički značajno razlikovali ($p < 0,01$). Udio suhe tvari u siru proizvedenom primjenom odabranih starter kultura je iznosio 60,17 % ($\pm 2,42$), a u kontrolnom siru 70,41 % ($\pm 1,49$), što prema *Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva* (NN 20/2009) i prema Samaržija (2021) svrstava ove sireve u ekstratvrde sireve (tablica 22a). Što se tiče udjela mliječne masti, sir proizveden odabranim starter kulturama se može svrstati u polumasne (19,06 \pm 0,16 %), dok se kontrolni sir može svrstati u masne sireve (26,57 \pm 0,24 %) (Samaržija, 2015). Primjenom BMK kao starter kultura u proizvodnji i zrenju sira, njihovi enzimi sudjeluju u razgradnji proteina, masti, laktoze i citrata što izravno utječe na konačan okus, miris, aromu i teksturu zrelog sira (Kalit, 2015). Ispitivanjem prisutnosti laktoze u uzorcima sireva ispitana je metabolizamska sposobnost korištenih sojeva BMK, pri čemu je dokazana statistički značajno ($p < 0,01$) slabija sposobnost metaboliziranja laktoze kod sojeva korištenih u kontrolnom siru, usporedbom s korištenim autohtonim sojevima BMK (tablica 22). Prema udjelu masti i laktoze sve analizirane sirutke možemo svrstati u izvorno kisele sirutke (tablica 22b). Također i prema izmjenjenim pH vrijednostima sve sirutke svrstavamo u kisele sirutke obzirom da im je pH vrijednost manja od 5,0 (Tratnik i Božanić, 2012).

Mikrobiološka ispravnost, odnosno ispitivanje prisutnosti bakterija roda *Listeria* i *Salmonella*, nakon proizvodnje sira i izdvojenih sirutki, određeno je naciepljivanjem na selektivne podloge. Na ChromoBio® *Listeria* agar selektivnoj podlozi porast listerije se očituje kao porast sitnih maslinastozelenih kolonija, dok se na XLD agru porast bakterija roda *Salmonella* primjećuju kao sitne bijele kolonije. Rezultati analize su pokazali da nije došlo do porasta navedenih bakterija na selektivnim podlogama.

Tablica 22. Fizikalno-kemijska svojstva a) sušenih svježih sireva i b) izdvojenih sirutki, proizvedenih primjenom konzorcija BMK i komercijalne starter kulture (kontrola)

a)

Parametar	Sir proizveden konzorcijem BMK	Kontrolni sir
pH vrijednost	4,18±0,04 ^a	4,44±0,05 ^a
Prinos (%)	12,52±1,28 ^a	11,98±0,72 ^a
Suha tvar (%)	60,17±2,42 ^a	70,41±1,49 ^b
Mast (% w/w)	19,06±0,16 ^a	26,57±0,24 ^b
Laktoza (% w/w)	4,24±0,21 ^a	5,82±0,25 ^b
<i>Listeria ili Salmonella</i> (CFU/g)*	n.d.	n.d.

b)

Parametar	Sirutka proizveden konzorcijem BMK	Kontrolna sirutka
pH vrijednost	4,66±0,61 ^a	4,46±0,11 ^a
Sinereza (mL)	1191,67±154,46 ^a	1132,67±23,69 ^a
Mast (% w/w)	0,07±0,01 ^a	0,15±0,01 ^b
Laktoza (% w/w)	2,74±0,15 ^a	3,13±0,15 ^a
<i>Listeria ili Salmonella</i> (CFU/mL)*	n.d.	n.d.

*n.d. - nije detektirano

^{ab}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,01$) unutar istog reda

Konzistencija sušenog svježeg sira određena je njegovim dimenzijama, tj. promjerom i visinom, masom sira te oblikom i bojom kore, koja je posljedica sušenja. Vanjski oblik, boja i kora sireva pokazuju na određenu neujednačenost. Oba sira su bila nepravilnog oblika, hrapave kore i neujednačene boje, dok im je konzistencija bila reziva, djelomično lomljiva i zrnata. Rezultati senzorskog ispitivanja ukazali su na to da je sir proizveden primjenom odabranih funkcionalnih starter kultura bio ujednačene kvalitete i da je imao lijepo povezano bijelo tijesto, manji broj nepravilnih okašaca ujednačene veličine, ugodan mliječno kiseli miris i blago mliječno kiselkast, umjereno slan okus. Nasuprot tome, kontrolni sir se pokazao da ima slabiji mliječno kiseli miris i nepoželjan kiselkast okus (tablica 23a). Prema rezultatima senzorskog ispitivanja svojstava sirutka izdvojena nakon proizvodnje sušenog svježeg sira primjenom autohtonih funkcionalnih starter kultura je imala značajno ($p < 0,05$) bolje rezultate od sirutke koja je izdvojena nakon proizvodnje kontrolnog sušenog svježeg sira primjenom komercijalne starter kulture. Okus proizvedene sirutke primjenom odabranog konzorcija BMK je jasno izražen, karakterističan za sirutku, bez stranih okusa, vrlo dobro izražene arome i okusa, vrlo dobro izražene svježine i slatkoće. Miris joj je bio

ugodan, bez ikakvih stranih mirisa i karakterističan za napitke na bazi sirutke, dok je boja karakteristična za sirutku. Sirutka je bez taloga, a izgled je tipičan za sirutku, bez nepoželjnih karakteristika. Kontrolna sirutka je imala lošije karakteristike okusa, taloga i izgleda. Okus je bio preizražen, imao je tragove kiselosti, gorčine i užeglosti te tragove stranih okusa. Postojala je prisutnost taloga u manjim količinama pri čemu je sam izgled sirutke imao izražene nepoželjne karakteristike (tablica 23b). U svrhu poboljšanja senzorskih svojstava sirutki, dodane su aroma komponente maline i vanilije nakon čega je provedena hedonistička senzorska analiza prihvatljivosti fermentiranog proizvoda. Sirutke izdvojene iz sira proizvedenih uz dodatak funkcionalnih starter kultura, dodatak aroma značajno ($p < 0,05$) je poboljšao okus konačnog proizvoda, u usporedbi s kontrolnom sirutkom (tablica 24).

Tablica 23. Senzorička ocjena a) sušenog svježeg sira i b) izdvojene sirutke proizvedenih primjenom kozorcija BMK i komercijalne starter kulture (kontrola)

a)

Uzorak	Starter kultura	Vanjski izgled	Miris	Konzistencija	Prerez	Okus
Suhi svježi sir	Konzorcij BMK	3,60±0,55 ^a	5,00±0,00 ^a	3,80±0,45 ^a	4,20±0,45 ^a	5,00±0,00 ^a
	Kontrola	3,20±0,45 ^a	3,40±0,55 ^b	3,20±0,45 ^a	4,00±0,71 ^a	3,20 ± 0,84 ^b

b)

Uzorak	Starter kultura	Izgled	Miris	Boja	Talog	Okus
Sirutka	Konzorcij BMK	4,40±0,89 ^a	4,80±0,45 ^a	4,80 ± 0,45 ^a	4,60 ± 0,89 ^a	4,80±0,45 ^a
	Kontrola	3,80±0,84 ^a	4,00±0,71 ^a	4,00 ± 0,71 ^a	3,00 ± 0,71 ^b	3,40 ± 0,89 ^b

^{ab}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) unutar istog stupca

Tablica 24. Hedonistička senzorska analiza prihvatljivosti fermentiranog proizvoda na bazi sirutke sa i bez dodatka aroma komponenata (malina i vanilija)

Starter kultura	Sirutka	Sirutka (aroma maline)	Sirutka (aroma vanilije)
Konzorcij BMK	8,00±0,71 ^{az}	7,60±1,14 ^{az}	8,33±0,58 ^{az}
Kontrola	6,20±0,84 ^{ay}	5,60±1,14 ^{ay}	5,00±0,71 ^{ay}

^aIsto slovo označava da nema statistički značajne razlike ($p < 0,01$) unutar istog reda

^{yz}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) unutar istog stupca

Ispitan je i broj BMK u dobivenim sirevima tijekom 10.-dnevnog skladištenja pri 4°C (tablica 25). Broj BMK u siru proizvedenom primjenom dizajniranog konzorcija BMK nije se značajno promijenio tijekom skladištenja (5. i 10. dan) u odnosu na broj bakterija nakon proizvodnje (0. dan). Broj živih stanica BMK je u oba uzorka sira iznosio više od 10⁶ CFU/g što je minimalan broj kako bi probiotičke bakterije osigurale funkcionalne učinke. Dodatno, dokazana je mikrobiološka ispravnost sušenih svježih sireva tijekom skladištenja, analizom kontaminacije bakterija roda *Listeria* i *Salmonella*.

Tablica 25. Broj BMK i ispitivanje mikrobiološke ispravnosti nakon 5 i 10 dana skladištenja sušenih svježih sireva, izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta\log$ CFU/g_{sira}) u odnosu na broj bakterija nakon proizvodnje (0. dan)

Starter kultura	Mikroorganizam	Sušeni svježi sir	
		5. dan	10. dan
Konzorcij BMK	BMK	0,11±0,21 ^{az}	0,20±0,38 ^{az}
	<i>Listeria</i>	n.d.	n.d.
	<i>Salmonella</i>	n.d.	n.d.
Kontrola	BMK	0,10±0,13 ^{az}	0,35±1,02 ^{az}
	<i>Listeria</i>	n.d.	n.d.
	<i>Salmonella</i>	n.d.	n.d.

n.d.-nije detektirano

^aIsto slovo označava da nema statistički značajne razlike ($p < 0,01$) unutar istog reda

^zIsto slovo označava da nema statistički značajne razlike ($p < 0,01$) unutar istog stupca

U svrhu postizanja što većeg broja i biološke aktivnosti probiotičkih sojeva u suhom aktivnom pripravku provedena je liofilizacija izdvojenih sirutki, nakon čega je određen broj stanica BMK tijekom skladištenja (5 i 10 dana) pri 4°C, pri čemu se može pretpostaviti da proteini sirutke imaju ulogu lioprotektora (tablica 26). Za usporedbu se koristio neliofilizirani tekući uzorak sirutke čuvan pri istim uvjetima. Pad broja stanica BMK kod liofilizirane sirutke dobivene primjenom odabranog konzorcija BMK tijekom skladištenja (10 dana) se značajno razlikovao ($p < 0,05$) u odnosu na tekuću sirutku, što ukazuje na učinkovitost provedene liofilizacije, pri čemu su usporeni metabolički procesi stanice, a sirutkini proteini su uspješno zaštitili stanice BMK od stresnih uvjeta liofilizacije, zbog čega je očuvan veći broj stanica u suhom aktivnom pripravku. Dodatno, usporedbom pada broja stanica nakon 10.-og dana skladištenja uočen je značajan pad broja BMK u kontrolnoj sirutki u odnosu na sirutku dobivenu dizajniranim konzorcijem BMK, što ukazuje na bolju vijabilnost odabranih funkcionalnih starter kultura. Mikrobiološka ispravnost sirutki ispitana

je testiranjem prisutnosti rodova *Listeria* i *Salmonella* tijekom skladištenja, pri čemu nije došlo do porasta navedenih bakterija na selektivnim podlogama, što je u skladu s Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/2008).

Tablica 26. Pad broja stanica BMK i ispitivanje mikrobiološke ispravnosti nakon 5 i 10 dana skladištenja izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ($\Delta \log \text{CFU/mL}_{\text{sirutke}}$) u liofiliziranoj i tekućoj sirutki u odnosu na broj bakterija nakon proizvodnje (0. dan)

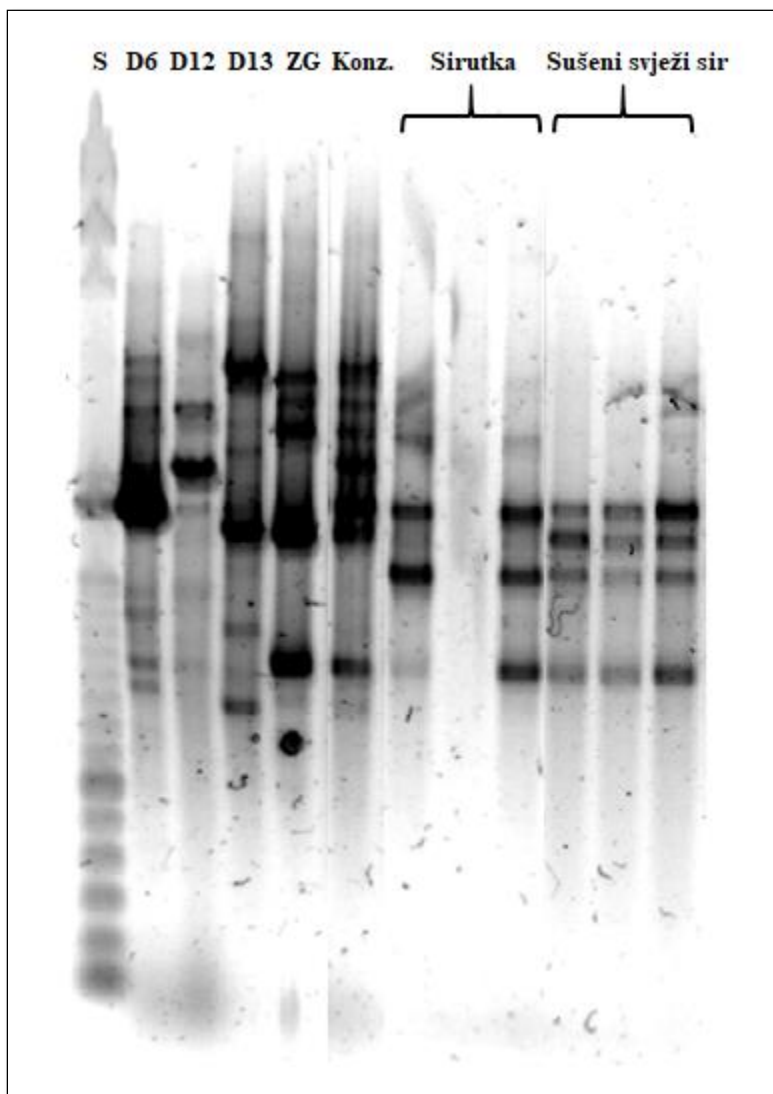
Starter kultura	Mikroorganizam	Liofilizirana sirutka		Tekuća sirutka	
		5. dan	10. dan	5. dan	10. dan
Konzorcij BMK	BMK	0,04±0,30 ^{az}	0,07±0,48 ^{az}	0,36±0,54 ^{abz}	0,59±0,55 ^{bz}
	<i>Listeria</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>Salmonella</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kontrola	BMK	0,18±0,93 ^{az}	0,76±0,58 ^{az}	0,80±0,32 ^{az}	1,76±0,52 ^{ay}
	<i>Listeria</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	<i>Salmonella</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.-nije detektirano

^{ab}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) unutar istog reda

^{yz}Različito slovo označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) unutar istog stupca

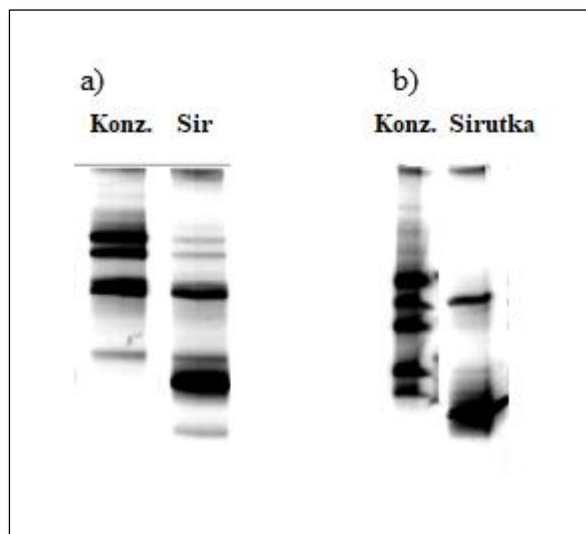
Za potvrdu prisutnosti primjenjenih funkcionalnih starter kultura *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, u proizvedenom sušenom svježem siru i sirutki, provedene su genetičke RAPD-PCR i DGGE-PCR metode te Illumina MiSeq sekvenciranje. Usporedbom rezultata dobivenih RAPD-PCR metodom dobiven je različit profil vrpce svakog soja korištene BMK. Za usporedbu s profilom mješovite DNA izolirane iz sira i sirutke proizvedenog primjenom odabranog konzorcija BMK, primjenjeni su pomiješani uzorci DNA sojeva korišteni u proizvodnji sira. Kod analiziranog sira i sirutke vidljiv je sličan profil vrpce kao i kod konzorcija BMK korištenog u proizvodnji sira. Nedostatak pojedinih DNA vrpce posljedica je prisutnosti mješovite DNA pri čemu se dobije polujedinstveni profil DNA vrpce. Također, u proizvedenim sirutkama udio funkcionalnih starter kultura korištenih u proizvodnji sira je manji, što se vidi i iz izmjerenih koncentracija DNA nakon izolacije mješovite DNA, u usporedbi s koncentracijama DNA izoliranih iz sireva (slika 41).



Slika 41. Elektroforeza produkata dobivenih RAPD-PCR metodom s M13 početnicom: **S** – standard, **D6** – *L. brevis* D6, **D13** – *L. plantarum* D13, **D12** – *L. fermentum* D12, **ZG** - *E. faecium* ZGZA7-10, **Konz.** - konzorcij BMK sojeva D6, D13, D12 i ZGZA7-10, **Sirutka** - DNA izolirana iz sirutke izdvojene nakon proizvodnje sira, **Sir** – DNA izolirana iz sušenog svježeg sira

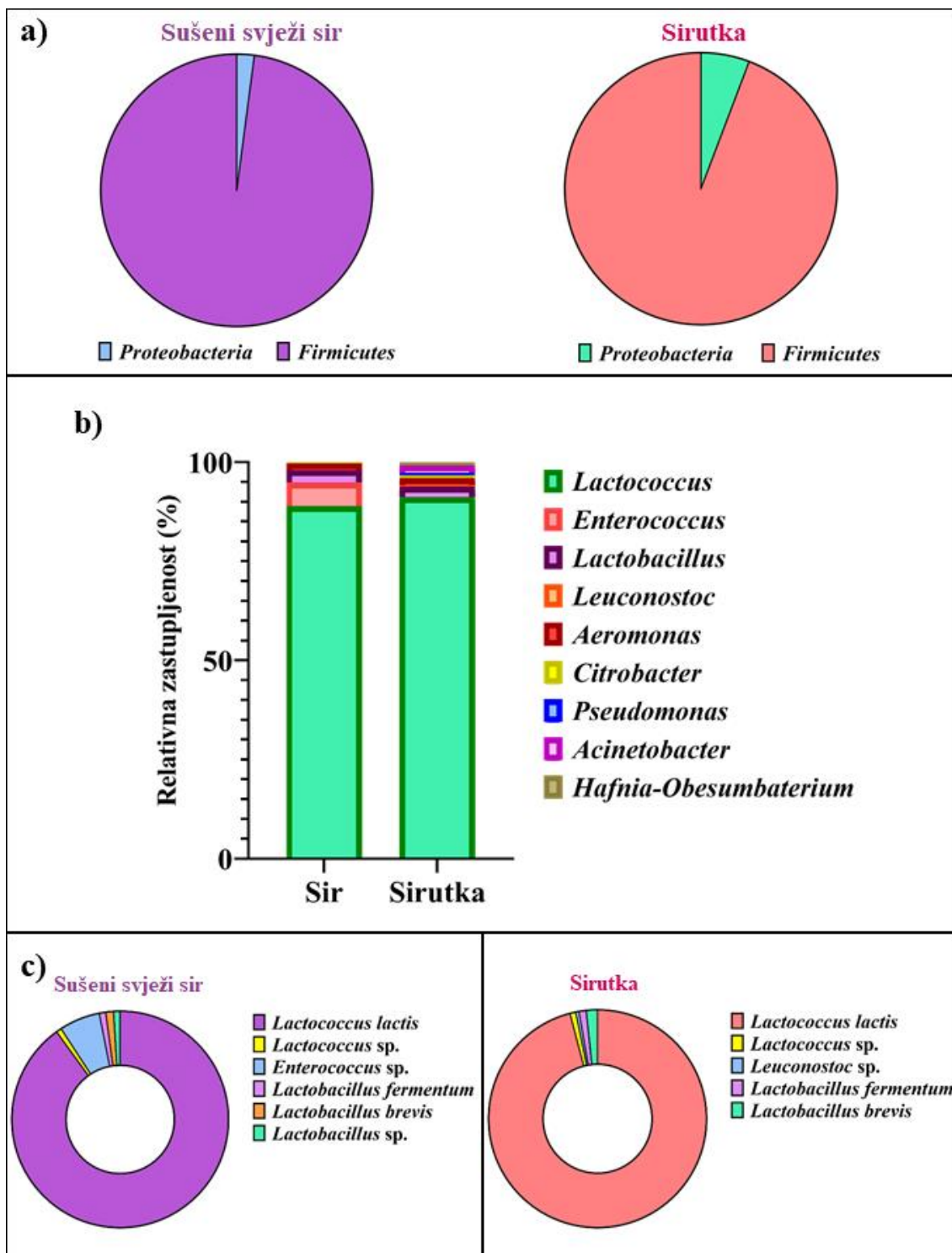
Detekcija dodanih funkcionalnih bakterijskih vrsta provedena je i DGGE-PCR elektroforezom (slika 42). Usporedbom vrpce mješovite DNA izolirane iz sira i sirutke s odgovarajućim združenim sojevima vidljiv je sličan profil prisutnih vrsta. Kod uzorka mješovite DNA izolirane iz sira i sirutke vidljive su dodatne DNA vrpce koje ne odgovaraju migraciji DNA prisutne kod uzoraka združenih sojeva. DGGE-PCR profili upućuju i na prisutnost drugih bakterijskih vrsta autohtone

mikrobiote prilikom fermentacije sireva, što je u skladu s rezultatima dobivenim Illumina MiSeq sekvenconiranjem.



Slika 42. DNA fragmenti sojeva bakterija mliječne kiseline nakon provedene DGGE-PCR elektroforeze na 30-70 % gelu: a) **Sir** – DNA izolirana iz sušenog svježeg sira, b) **Sirutka** – DNA izolirana iz sirutke izdvojene nakon proizvodnje sira, **Konz.** - konzorcij BMK sojeva *L. brevis* D6, *L. plantarum* D13, *L. fermentum* D12 i *E. faecium* ZGZA7-10

Rezultati dobiveni primjenom DGGE-PCR metode su u skladu s analizom mikrobioma pomoću Illumina MiSeq sekvenconiranja mješovite DNA izolirane iz sireva i sirutki i analizirane primjenom bioinformatičkog alata QIIME 2™. U oba uzorka, siru i sirutki, identificirane su bakterije koljena *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Koljeno *Firmicutes* u uzorku sira zastupljeno je 97,92 %, a koljeno *Proteobacteria* 2,08 %, dok je u uzorku sirutke koljeno *Firmicutes* zastupljeno je 94,24 %, a koljeno *Proteobacteria* 5,77 % (slika 43a). Iz koljena *Firmicutes* pronađene su bakterijske vrste koje odgovaraju konzorciju BMK dodanom u proizvodnju sira i sirutke (slika 43c). U uzorku sira dodatno su detektirane bakterijske vrste roda *Lactococcus* (88,92 %), a u sirutki bakterijske vrste rodova *Lactococcus* (90,50 %) i *Leuconostoc* (0,46 %) koje su autohtono prisutne. Iz koljena *Proteobacteria* u siru i sirutki su detektirane bakterijske vrste razreda *Gammaproteobacteria* u istom postotku kao i pripadajuće koljeno. Bakterijske vrste koje pripadaju razredu *Gammaproteobacteria* su dominantne tijekom rane faze zrenja sira (Budak i sur., 2016), a detektirane su i tijekom proizvodnje drugih fermentiranih proizvoda (Parente i sur., 2020).



Sika 43. Relativna zastupljenost a) bakterijskih koljena, b) bakterijskih rodova i c) bakterija miječne kiseline na razini vrste u ukupnoj mikrobnj populaciji sušenog svježeg sira i sirutke dobivenih nakon fermentacije s konzorcijem BMK optimiranog sastava na temelju rezultata sekvencioniranja ukupne DNA primjenom QIIME 2™ platforme

Kako je primjena konzorcija BMK tijekom fermentacije pokazala pozitivan utjecaj na teksturu, fizikalno-kemijska i senzorska svojstva sušenog svježeg sira i sirutke, istraženo je može li njihova implementacija pridonijeti oslobađanju biopeptida za postizanje dodatnih funkcionalnih svojstava proizvedenih fermentiranih proizvoda. LC-MALDI-TOF/TOF masenom spektrometrijom u proizvedenim sušenim svježim sirevima i izdvojenim sirutkama, identificirano je 16 ciljanih peptida nastalih razgradnjom α -S2-CN i β -CN (tablica 27b). Proteolitički potencijal svakog odabranog soja BMK potvrđen je detekcijom peptida nastalih razgradnjom kazeina nakon uzgoja u svježem mlijeku (tablica 27a). U sušenom svježem siru proizvedenom primjenom odabranog konzorcija BMK detektirano je 15 biopeptida, od kojih je 11 peptida detektirano nakon fermentacije mlijeka primjenom pojedinačnih sojeva BMK, a 10 peptida u odgovarajućoj izdvojenoj sirutki. Pretraživanjem MBPDB baze podataka detektirani su peptidi s potencijalnim imunomodulatornim, antitrombotskim, antimikrobnim, ACE-inhibitorskim (smanjenje krvnog tlaka), antioksidativnim ili protuupalnim djelovanjem (tablica 28). Peptid HQP HQPLPPTVMFPPQ (β -CN) detektiran je samo kod soja D12, nakon uzgoja u svježem mlijeku, kao i u uzorku sira i sirutke proizvedenih primjenom odabranog konzorcija BMK, dok su peptidi VYPFPGIPN (β -CN) i FVAPFPEVFG (α -S2-CN) detektirani isključivo kod sojeva D6 i D13, kao i u uzorku sira proizvedenog primjenom odabranih sojeva BMK. U uzorku sušenog svježeg sira proizvedenog primjenom odabranog konzorcija BMK, 10 peptida nastalih razgradnjom kazeina su bili značajno zastupljeniji nego u kontrolnom siru, a 2 peptida nisu pronađena u kontrolnom siru. Nasuprot tome, u kontrolnom siru su značajno ($p < 0,01$) zastupljenija bila tri peptida, od kojih jedan nije pronađen u siru proizvedenom primjenom odabranog konzorcija BMK.

Tablica 27. Peptidi identificirani primjenom ciljane LC-MRM-MS analize u uzorcima (a) svježeg mlijeka inokuliranog s pojedinačnim sojevima BMK, (b) sušenog svježeg sira dobivenog primjenom konzorcija BMK i u kontrolnom siru proizvedenom uz dodatak DELVO®CHEESE CT-203 DSF starter kulture, njihovim izdvojenim sirutkama i mlijeku prije inokulacije starter kulturama

a)

Sekvenca peptida/ Izvor proteina	<i>L. plantarum</i> D13		<i>L. brevis</i> D6		<i>L. fermentum</i> D12		<i>E. faecium</i> ZGZA7-10	
	(24h)	(48h)	(24h)	(48h)	(24h)	(48h)	(24h)	(48h)
WMHQPHQPLPPT/ Beta-kezein	248,75± 114,43	131,14± 102,02	239,13± 98,18	168,66± 99,33	138,90± 26,54	195,07± 55,73	3,09± 2,37	n.d.
SWMHQPHQPLPPT/ Beta-kazein	45,83± 17,58	23,53± 23,18	24,64± 8,35	16,50± 11,51	8,36± 3,29	55,74± 19,51	n.d.	n.d.
SQSKVLPVPQKAVPYP Q/Beta-kazein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
YQEPVLGPVR/ Beta-kazein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RDMPIQAF/Beta-kazein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HQPHQPLPPTVMFPPQ/ Beta-kazein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,53± 3,01	n.d.	n.d.
TKVIPYVRYL/ Alfa-S2- kazein	4,19± 1,48	1,17± 0,86	2,39± 2,23	2,67± 0,62	n.d.	n.d.	6,40± 1,62	4,01± 3,38
VLGPVRGPF/Beta- kazein	36,96± 21,31	89,09± 123,62	39,27± 14,51	26,89± 17,50	89,95± 32,41	396,76± 109,19	1,08± 0,77	n.d.
WIQPKTKVIPYVRYL/ Alfa-S2- kazein	8,36± 2,16	5,92± 3,46	10,13± 3,77	6,95± 4,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
APSFSDIPNPIGSENSE/ Alfa-S1-kazein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LVYFPFGPIHNSLPQN/ Beta- kazein	15,02± 3,00	15,60± 3,33	14,13± 2,43	8,28± 8,27	10,14± 2,74	11,17± 0,85	n.d.	n.d.
LVYFPFGPIHNSLPQ/Be ta- kazein	3,59± 2,24	2,59± 2,02	3,32± 3,76	3,54± 0,30	6,38± 7,09	10,58± 3,18	n.d.	n.d.
VYFPFGPIPN/Beta- kazein	n.d.	n.d.	1,27± 0,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
QEPVLGPVRGPFPIIV/B eta- kazein	9,70± 1,41	4,61± 3,60	5,65± 2,93	3,32± 2,15	2,11± 1,94	5,62± 0,54	2,64± 0,67	1,65± 1,39
YQEPVLGPVRGPFPIIV /Beta- kazein	95,53± 17,96	74,71± 32,21	49,54± 14,87	26,41± 20,03	52,71± 31,15	65,61± 8,68	28,48± 7,49	17,98± 14,83
FVAPFPEVFG/Alfa-S1- kazein	n.d.	1,03 ± 0,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LYQEPVLGPVRGPFPII V/Beta- kazein	27,31± 13,59	7,24± 4,11	20,43± 17,83	12,88± 10,89	11,61± 9,29	12,41± 2,45	3,62± 3,06	3,34± 0,40
LLYQEPVLGPVRGPFPI IV/Beta- kazein	3,22±1,82	n.d.	3,20±4,15	n.d.	1,05±0,73	1,07±0,13	1,13±1,59	n.d.

n.d. – nije detektirano

b)

Sekvenca peptida/ Izvor proteina	RT	Kontrolni sir	Kontrolna sirutka	Sir proizveden konzorcijem BMK	Sirutka proizvedena konzorcijem BMK	Kontrola- mlijeko
WMHQPHQPLPPT/ Beta-kazein	8,953	1,67±0,72	n.d.	13,08±0,89	1,14±0,11	n.d.
SWMHQPHQPLPPT/ Beta-kazein	9,446	20,41±2,79	46,92±3,82	132,39±18,65	22,10±8,07	n.d.
SQSKVLPVPQKAVPYPQ/ Beta-kazein	10,069	56,48±28,21	46,01±7,46	90,90±3,32	35,34±7,67	n.d.
YQEPVLGPVR/ Beta-kazein	10,210	2,84±0,95	n.d.	7,69±0,29	n.d.	n.d.
RDMPIQAF/ Beta-kazein	11,373	51,08±12,79	25,32±0,31	108,89±5,37	7,70±0,21	n.d.
HQPHQPLPPTVMFPPQ/ Beta-kazein	11,582	n.d.	n.d.	9,55±1,80	4,25±0,75	n.d.
TKVIPYVRYL/ Alfa-S2- kazein	11,723	49,02±12,40	69,00±11,30	35,52±6,36	12,59±5,62	40,70±6,50
VLGPVRGPF/ Beta-kazein	12,083	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
WIQPKTKVIPYVRYL/ Alfa-S2- kazein	12,172	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
APSFSDIPNPIGSENSE/ Alfa-S1-kazein	12,506	6,54±0,40	n.d.	20,89±0,21	n.d.	n.d.
LVYFPFGPIHNSLPQN/ Beta-kazein	12,917	n.d.	n.d.	1,74±2,42	n.d.	n.d.
LVYFPFGPIHNSLPQ/ Beta-kazein	13,279	2,77±0,38	5,94±0,78	1,49±2,08	1,24±0,36	n.d.
VYFPFGPIP/ Beta-kazein	13,373	1,69±0,67	1,85±0,53	7,66±0,33	n.d.	n.d.
QEPVLGPVRGPFPIIV/ Beta-kazein	15,696	19,27±1,83	125,57±19,77	25,93±2,05	77,66±24,10	n.d.
YQEPVLGPVRGPFPIIV/ Beta-kazein	15,949	1432,50±228,82	361,51±33,00	682,92±57,39	97,39±30,35	11,25±6,08
FVAPFPEVFG/ Alfa-S1-kazein	16,093	37,60±3,70	n.d.	35,79±0,70	n.d.	n.d.
LYQEPVLGPVRGPFPIIV/ Beta-kazein	16,250	47,63±10,13	6,54±1,20	20,24±0,44	2,64±0,32	5,82±2,54
LLYQEPVLGPVRGPFPIIV/ Beta-kazein	16,743	9,05±3,15	8,37±1,31	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - nije detektirano

Tablica 28. Identifikacija peptida s potencijalnim bioaktivnim djelovanjem, izoliranih nakon uzgoja pojedinačnih sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 u svježem mlijeku i iz sušenih svježih sireva dobivenih primjenom konzorcija BMK i DELVO®CHEESE CT-203 DSF starter kulture i njihove izdvojene sirutke

Sekvenca peptida/Izvor proteina	Bioaktivno djelovanje (referenca)
WMHQPHQPLPPT/Beta-kazein	protuupalno i ACE-inhibitorno (Adam i sur., 2020)
SWMHQPHQPLPPT/Beta-kazein	antioksidativno (Tonolo i sur., 2020)
SQSKVLPVPQKAVPYPQ/Beta-kazein	antioksidativno (Tonolo i sur., 2020)
YQEPVLGPVR/Beta-kazein	imunomodulatorno (Kayser i sur., 1996), ACE-inhibitorno (Lu i sur., 2016), antitrombotsko (Liu i sur., 2019), antioksidativno i protuupalno (Sowmya i sur., 2019)
RDMPIQAF/Beta-kazein	ACE-inhibitorno (Yamamoto i sur., 1994)
HQPHQPLPPTVMFPPQ/Beta-kazein	protuupalno i ACE-inhibitorno (Adam i sur., 2020)
TKVIPYVRYL/Alfa-S2-kazein	antimikrobno (Alvarez-Ordóñez i sur., 2013)
VLGPVRGPFV/Beta-kazein	ACE-inhibitorno (Miguel i sur., 2006)
WIQPKTKVIPYVRYL/Alfa-S2-kazein	antimikrobno (Alvarez-Ordóñez i sur., 2013)
APSFSDIPNPIGSENSE/Alfa-S1-kazein	antioksidativno (Tonolo i sur., 2020)
LVYPPFGPIHNSLPQN/Beta-kazein	n.d.
LVYPPFGPIHNSLPQ/Beta-kazein	n.d.
VYPPFGPIP/Beta-kazein	antioksidativno, ACE-inhibitorno (Eisele i sur., 2013) antioksidativno (Tonolo i sur., 2020)
QEPVLGPVRGPFPIIV/Beta-kazein	ACE-inhibitorno (Lu i sur., 2016)
YQEPVLGPVRGPFPIIV/Beta-kazein	imunomodulatorno (Sandré i sur., 2001), antitrombotsko (Rojas-Ronquillo i sur., 2012) antimikrobno (Birkemo i sur., 2009), ACE-inhibitorno (Yamamoto i sur., 1994)
FVAPFPEVFG/Alfa-S1-kazein	ACE-inhibitorno (Robert i sur., 2004)
LYQEPVLGPVRGPFPIIV/Beta-kazein	imunomodulatorno (Coste i sur., 1992)
LLYQEPVLGPVRGPFPIIV/Beta-kazein	ACE-inhibitorno (Yamamoto i sur., 1994)

n.d. - nije detektirano

5. RASPRAVA

5.1. Karakterizacija sojeva producenata i njihovih biomolekula

BMK prirodno su prisutne u različitim mikrookolišima, te su u stalnoj interakciji s drugim predstavnicima autohtone mikrobne populacije, putem kompeticije za lokalizaciju i hranjive tvari. U takvom okolišu sinteza antimikrobnih metabolita je značajna za stjecanje kompetitivne prednosti u mikrobnim ekosustavima. Svojstvo BMK da inhibiraju rast drugih mikroorganizama proizlazi prvenstveno iz inhibicijskog djelovanja primarnih metabolita mliječne i octene kiseline koji uzrokuju snižavanje pH vrijednosti mikrookoliša, ali sintetiziraju i vodikov peroksid, etanol, diacetil, acetaldehid i bakteriocine s antimikrobnom djelovanjem (Šušković i sur., 2010). Između autohtonih BMK na temelju ispitivanja antimikrobnog djelovanja poraslih bakterijskih kultura BMK i supernatanta kultura BMK provedena je *in vitro* selekcija sojeva BMK koji iskazuju značajniji inhibicijski učinak prema Gram-pozitivnim bakterijama *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048. Odabrano je 10 sojeva BMK, od kojih 7 pripada vrsti *Lactiplantibacillus plantarum*, a tri rodu *Enterococcus*. Nakon detekcije *pln* amplikona PCR metodom, za daljnju karakterizaciju bakteriocinske aktivnosti u svrhu proizvodnje funkcionalnih fermentiranih proizvoda, odabran je soj *L. plantarum* D13, izoliran iz dimljenog svježeg sira. U cilju poticanja antimikrobne aktivnosti i sinteze eventualno prisutnog plantaricina koji je među najčešće okarakteriziranim bakteriocinima BMK (Zacharof i Lovitt, 2012), proveden je združeni uzgoj soja *L. plantarum* D13 s osjetljivim sojevima *L. monocytogenes* ATCC®19111™ i *S. aureus* 3048, pri čemu je dokazano bakteriostatsko djelovanje prema oba test-mikroorganizma. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC®19111™ postignuta je nakon desetog sata kokultivacije, odnosno na kraju eksponencijalne faze rasta. Bakteriostatsko djelovanje bakteriocina je zadržano nakon 24 sata, a broj stanica *L. monocytogenes* ATCC®19111™ bio je za 3 logaritamske jedinice niži nego u kontroli, rast *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u BHI tekućoj hranjivoj podlozi. Provjerom antimikrobnog djelovanja *L. plantarum* D13 dvostrukim slojem agara tijekom kokultivacije, vidljivo je poticanje bakteriocinske aktivnosti prema *L. monocytogenes* ATCC®19111™ u prvih 10 h kokultivacije, tijekom eksponencijalne faze rasta soja producenta bakteriocina, dok se ista aktivnost zadržala i do kraja stacionarne faze. Rezultati su u skladu s istraživanjima González i sur. (1994), gdje se plantaricin soja *Lactiplantibacillus plantarum* LL441 proizvede u eksponencijalnoj fazi rasta, pri čemu je maksimalna vrijednost inhibicije rasta postignuta na početku stacionarne faze, te je ostala nepromjenjena do kraja stacionarne faze rasta soja producenta.

Na kraju kokultivacije, pH vrijednost podloge je iznosila 5,95. Pri koncentracijama mliječne kiseline u uzorcima nakon 24 h kokultivacije nije ustanovljena inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC®19111™ ispitana metodom difuzije s rupama u agaru (rezultati nisu prikazani). Kako *L. monocytogenes* ATCC®19111™ nije osjetljiva na kisele uvjete (Smith i sur., 2013), pa tako ni na djelovanje mliječne kiseline koja je uzrokovala snižavanje pH vrijednosti hranjive podloge, može se pretpostaviti da inhibicijsko djelovanje *L. plantarum* D13 proizlazi iz bakteriocinske aktivnosti. Prilikom kokultivacije sa *S. aureus* 3048, D13 ima slabije inhibitorno djelovanje na kraju eksponencijalne faze rasta u usporedbi s *L. monocytogenes* ATCC®19111™. Inhibicija rasta je iznosila oko 2 log jedinice u odnosu na rast *S. aureus* 3048 u monokulturi. Pretpostavljeno je da je indukcija bakteriocinske aktivnosti *L. plantarum* D13 bila tijekom eksponencijalne faze rasta u kokulturi koja se zadržala i tijekom stacionarne faze rasta. Nakon 24 h kokultivacije pH vrijednost podloge je iznosila 6,5. Pri koncentracijama mliječne kiseline u uzorcima nakon 24 h kokultivacije nije ustanovljena inhibicija rasta *S. aureus* 3048 ispitana metodom difuzije s rupama u agaru (rezultati nisu prikazani), stoga inhibicijsko djelovanje *L. plantarum* D13 tijekom kokultivacije, ukazuje na moguću bakteriocinsku aktivnost. Ovi rezultati su u skladu s Maldonado-Barragán i sur. (2013) koji su predložili da je indukcija biosinteze bakteriocina kokultivacijom sa specifičnim bakterijskim vrstama, zajedničko obilježje *L. plantarum* sojeva.

Antibakterijska aktivnost soja *L. plantarum* D13 može biti posljedica snižavanja pH vrijednosti mikrookoliša uslijed proizvodnje mliječne i octene kiseline ili različitih drugih antimikrobnih metabolita poput bakteriocina. Bakteriocini BMK su prema definiciji ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi ili proteini koji djeluju antimikrobno prema srodnim Gram-pozitivnim bakterijama (Šušković i sur., 2010). Prisutnost potencijalnih plantaricina u uzorku supernatanta kulture *L. plantarum* D13 dokazana je nakon tretmana s proteinazom K i kuhanjem, pri čemu su zone inhibicije niže u usporedbi s kontrolom. Za detaljniju karakterizaciju plantaricina na genomskoj razini, provedena je bioinformatička analiza genoma *L. plantarum* D13 s ciljem kreiranja genskih klastera odgovornih za njihovu biosintezu. Geni koji kodiraju za biosintezu bakteriocina su većinom organizirani u operonske klastere koji se sastoje od minimalno četiri gena; strukturni gen koji kodira za prebakteriocin, gen za imunitet koji kodira za imunosni protein čija uloga je zaštita soja producenta od proizvedenog bakteriocina, gen koji kodira za ABC transporter za sekreciju bakteriocina iz stanice, i gen koji kodira za pomoćni protein, ključan u procesu transporta iz stanice, a mogu se nalaziti na kromosomu, plazmidima ili transpozonomima (Drider i

sur., 2006). BAGEL 4.0, omogućuje *in silico* identifikaciju genskih klastera u prokariotskoj DNA uključenih u biosintezu bakteriocina. Primjenom BAGEL 4.0, detektirana su tri područja od interesa koja se nalaze na kontizima 7., 11. i 12., soja D13, a koji odgovaraju genskim klasterima plantaricina. BAGEL 4.0 analizom genomskih sekvenci osim već detektiranih gena koji kodiraju za plantaricine A, EF i peptid PlnJ plantaricina PlnJK, koji su potvrđeni PCR metodom, detektirano je još 5 dodatnih gena plnY, plnS, plnO, plnN i plnK, koji sudjeluju u biosintezi ovih antimikrobnih peptida. Dodatno, detektirana su 3 gena uključena u biosintezu plantaricina, 5 gena koji su uključeni u transport plantaricina iz stanice te 4 gena koji su odgovorni za otpornost soja producenta bakteriocina na vlastiti proizvedeni plantaricin, a koji su prisutni i u genomima drugih sekvencioniranih *L. plantarum* sojeva (prilog 1). Biosinteza plantaricina EF i JK i plantaricina N detektirana je kod soja *L. plantarum* C11 (Anderssen i sur., 1998), kao i signalnog peptida plantaricin A (Sand i sur., 2013) te plnO gena koji kodira za glikoziltransferazu (Diep i sur., 2009b), dok je plantaricin S pronađen kod soja *L. plantarum* LPCO10 (Jimenez-Diaz i sur., 1995), a plantaricin Y kod soja *L. plantarum* 510 s dokazanim antimikrobnim djelovanjem prema *L. monocytogenes* (Chen i sur., 2014). Pomoću metode prepoznavanja sličnosti primjenom SWISS-MODEL servera predviđena je trodimenzionalna struktura peptida plantaricina soja *L. plantarum* D13, koja pokazuju homologiju strukture sa strukturama PlnJK soja *L. plantarum* C11 (Rogne i sur., 2009) i PlnEF soja *L. plantarum* C11 (Fimland i sur., 2008), a čije su 3-D strukture su određene NMR metodom.

Osim plantaricina koji su antimikrobni peptidi malih molekulskih masa, cilj je i detekcija još jedne skupine metabolita koje sintetiziraju pojedine BMK. Radi se o egzopolisaharidima koji imaju makromolekularnu strukturu. EPS-i su površinski ugljikohidratni polimeri prisutni u bakterijama koji mogu činiti zaštitni sloj, ali i sudjeluju u interakciji s okolišem (Bengoa i sur., 2018; Dertli i sur., 2015). Sinteza pojedinih EPS-a kod BMK očituje se formiranjem tipičnog „ropy“ fenotipa, kojeg karakterizira pojava rastezljivih filamentoznih niti nakon uzgoja na MRS agar podlozi obogaćenoj ugljikohidratima (Castro-Bravo i sur., 2018). „Ropy“ fenotip je ustanovljen kod soja *L. fermentum* D12 izoliranog iz dimljenog svježeg sira, te se dalje istraživao kao potencijalni producent EPS-a. Prema Degeest i sur. (2001) ukupni prinos EPS-a kojeg proizvode BMK ovisi o fizikalno-kemijskim faktorima kao što su sastav medija, osobito izvori ugljika, dušika i kationa, soju producentu i uvjetima rasta kao što su temperatura, pH vrijednost, dostupnost kisika te vremenu kultivacije. Uvjeti uzgoja, kao što je obogaćivanje podloge za rast različitim izvorima

šećera, može utjecati na količinu, strukturu i biološku funkciju proizvedenog EPS-a sojeva BMK (Ryan i sur., 2015). Kako bi se ustanovio potencijalan utjecaj različitih izvora ugljika dodanih u hranjivu podlogu na molekulsku masu i strukturu proizvedenog EPS-a, provedena je izolacija EPS-a soja *L. fermentum* D12 nakon uzgoja uz dodatak pet različitih izvora šećera, glukoza, fruktoza, galaktoza, saharoza i laktoza. Pri istim uvjetima provedena je izolacija EPS-a vezanih na površini bakterijskih stanica (EPS-b) soja *L. fermentum* D12 i onih izlučenih u medij (EPS-r). Računanjem prinosa izoliranih EPS-a ($Y_{\text{EPS}}(\text{mg/L})$) i određivanjem čistoće UV/VIS spektrofotometrijom, ustanovljeno je da soj *L. fermentum* D12 sintetizira EPS-e koji nisu vezani na površinu bakterijskih stanica već ih izlučuje u izvanstanični prostor (EPS-r) tijekom uzgoja u MRS hranjivoj podlozi uz dodatak različitih izvora ugljika. Uzorci EPS-a vezanih na površini bakterijskih stanica (EPS-b) su izostavljeni iz daljnjih istraživanja. $^1\text{H-NMR}$ analizom u ovom istraživanju utvrđeno je da vrsta dodanog šećera u hranjivu podlogu ne utječe na kemijsku strukturu EPS-r soja *L. fermentum* D12, stoga su svi uzorci združeni u jedinstveni uzorak. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima van den Berg i sur. (1995) koji je dokazao da dodatak različitih izvora ugljika kao što su fruktoza, laktoza i galaktoza ne utječu na strukturu proizvedenog EPS-a soja *Lactobacillus sake* 0-1. Najveći prinos EPS-r soja *L. fermentum* D12 ostvaren je primjenom glukoze kao dodatnog izvora ugljika, što je u skladu s rezultatima Cerning i sur. (1994). Prema dosadašnjim istraživanjima, prinos EPS-a kojeg proizvode BMK prirodnim putem je u rasponu od 50-400 mg/L, za razliku od ostalih bakterija, čiji prinos može biti i do 25 g/L kao kod ksantana (Cirrincione i sur., 2018), što čini soj *L. fermentum* D12 aktivnim producentom EPS-a, u usporedbi s drugim sojevima producentima EPS-a roda *Lactobacillus* (Balzaretta i sur., 2017; Gerwig i sur., 2013). $^1\text{H-NMR}$, GC i GC-MS analizama ustanovljeno je soj *L. fermentum* D12 proizvodi dva različita polisaharida: glikogen i razgranati heteropolisaharid koji sadrži t-Glup i 2,6-vezanu Galf. Struktura glikogena dokazana je i kod bakterija koje ne pripadaju BMK, kao što su *Burkholderia cenocepacia* BTS2 (Pellizzoni i sur., 2016) i *Petrogona mobilis* SJ95 (Zhang i sur., 2019). Do sada, opisano je samo nekoliko *L. fermentum* sojeva koji proizvode EPS-e, od kojih troje proizvode ponavljajuće strukturne jedinice EPS-a (Ale i sur., 2020). Anotacijom aminokiselinskih sekvenci dobivenih pomoću RAST servera primjenom BLASTp baze podataka ustanovljeno je da soj *L. fermentum* D12 sadrži *eps* genski klaster odgovoran za sintezu EPS-a (Butorac i sur., 2021). Prema Deo i sur. (2019) pretpostavljeni *eps* klaster sadrži gene za biosintezu, transport i regulaciju EPS-a, koji uključuju primarnu glikoziltransferazu (*epsE*), još jednu glikoziltransferazu (*gtf*), flipazu (*wzx*), polimerazu (*wzy*) i

tirozin kinazu (*epsC*). Unutar klastera nedostaje *epsB* gen koji kodira za modulator tirozin kinaze, a koji bi mogao biti kompenziran s genom na fosforegulatornom modulu na kontigu NZ_RHMA01000008.1. Za soj *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1, koji sadrži nekoliko *eps* klastera, dokazano je da se nedostatak gena za sintezu EPS-a, može nadoknaditi genima koji su unutar drugih klastera (Remus i sur., 2012). Nedostatak primarnih gena za sintezu EPS-a, kao što su *wzy*, *epsB* i *epsC* (ili oba), *wzx* i *epsE* identificirano je i kod drugih BMK roda *Lactobacillus* (Deo i sur., 2019). Geni koji sudjeluju u proizvodnji EPS-a ili aktivaciji prekursora nalaze se i na drugim mjestima unutar genoma, kao što je acetiltransferaza (GW747_RS07655) koja se nalazi na početku klastera soja *L. fermentum* D12, čija funkcija je kemijska modifikacija EPS-a, ili kao *epsA* i *epsD* geni koji se nalaze na kontigu NZ_RHMA01000008.1. Gen koji kodira za transpozazu (GW747_RS07715) okružuje *eps*-D12 klaster, a nalazi se i kod drugih laktobacila (Deo i sur., 2019). Unutar klastera pronađeni su geni koji kodiraju za biosintezu i aktivaciju galaktofuranoze, kao i za aktivaciju glukoze, što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima analize sastava izoliranih EPS-a soja *L. fermentum* D12. Jedan od tih gena je UDP-galaktopiranoza mutaza (*glf*) (GW747_RS07665) koja je učestalo identificirana kod BMK (Deo i sur., 2019). Organizaciju gena *eps* klastera roda *Lactobacillus* klasificirali su Deo i sur. (2019) u 8 skupina, analizom hijerarhijskog grupiranja obzirom na prisutnost ili odsutnost gena. Neke od tih skupina su nazvane „generičkim“ što ukazuje na prisutnost *epsABCDE* gena na 5' kraju, kao što je to slučaj kod soja *L. fermentum* YL-11 (Wei i sur., 2019), dok su drugi *eps* klastera, kojima nedostaju pojedini od *epsABCDE* gena ili se nalaze na drugom mjestu u *eps* klasteru, klasificirani kao „negerički“. Analizom poravnanja sekvenci, organizacija gena *eps* klastera soja *L. fermentum* D12 se može svrstati „negeričkom“ klasteru koji pripada skupini 8. Dodatno, analizom genoma ustanovljeno je da soj *L. fermentum* D12 sadrži 7 gena koji kodiraju za fosfotransferazni sustav (PTS) za unos različitih vrsta šećera u stanicu, D-manoza, celobioza, D-saharoza, D-glukoza, D-galaktoza, D-laktoza, D-riboza, D-ksiloza, D-fruktoza, D-maltoza i D-melibioza što je u skladu s fermentacijskim profilom dobivenim API 50 CHL testom (rezultati nisu prikazani).

Kako proizvodnja EPS-a kod probiotičkih sojeva ima važnu ulogu u adheziji i kolonizaciji GIT-a, gdje vrsta, struktura i koncentracija EPS-a mogu imati utjecaj na sposobnost adhezije (Alp i Kulešić, 2019; Lebeer i sur., 2008), ispitana je uloga EPS-a kao funkcionalnih biomolekula, a to je sposobnost kolonizacije GIT-a domaćina. Uspješna kolonizacija mukozne površine direktna je posljedica učinkovite bakterijske adhezije na komponente crijeva, prvenstveno proteine

ekstracelularnog matriksa (Styriak i sur., 2003) i glikoprotein mucin, a svojstvo autoagregacije se smatra predispozicijom za adheziju na epitelnu površinu, a kasnije i za kolonizaciju BMK u GIT-u domaćina (Rajoka i sur., 2017). Zbog strukturnih i funkcionalnih svojstava Caco-2 stanica, porijeklom iz humanog intestinalnog epitela, koja se najčešće koriste kao *in vitro* modeli za ispitivanje adhezijskih svojstava BMK (Moussavi i Adams, 2009), ovaj tip stanica je odabran za ispitivanje utjecaja različitih koncentracija EPS-a na adhezijska svojstva soja producenta. Kako bi se preliminarno procjenilo da li EPS posreduje u adheziji, ispitan je i kapacitet vezanja D12 na purificirane proteine ECM te glikoprotein mucin, koje su osnovne strukturne komponente mukusa. Ispitivanjem utjecaja različitih koncentracija EPS-a na autoagregacijska i adhezijska svojstva soja *L. fermentum* D12, dokazana je najbolja mogućnost vezanja na proteine ECM-a, fibronektin, laminin, kolagen, pri koncentraciji koja odgovara stvarnom prinosu proizvodnje EPS-a, 0,2 mg/mL. Sličan učinak je postignut i tijekom ispitivanja autoagregacije, što ukazuje na funkcionalna svojstva proizvedenog EPS-a. Kod vezanja na glikoprotein mucin uočeno je da je dodatkom različitih koncentracija EPS-a smanjena mogućnost vezanja, dok kod adhezije na Caco-2 stanice nema učinka. Rezultati upućuju na to da različita fizikalno-kemijska, odnosno strukturna svojstva proizvedenih EPS-a, kao i njihova koncentracija, specifično utječu na sposobnost adhezije, pri čemu su značajna i površinska svojstva stanice probiotičkog soja producenta. EPS-i sojeva roda *Lactobacillus* osim adhezijskih svojstava mogu imati i ulogu za bakterijske stanice zbog zaštitnog djelovanja teških metala, sušenja ili nekih drugih stresnih okolišnih čimbenika (Limoli i sur., 2015). Ispitivanjem zaštitne uloge različitih koncentracija EPS-a tijekom liofilizacije, dokazano je da povećanje koncentracije EPS-a ima zaštitnu ulogu tijekom sušenja. Rezultati su u skladu s Nguyen i sur. (2014), gdje je povećanje koncentracije EPS-a imalo zaštitni učinak na preživljavanje soja *Bifidobacterium bifidum* THT 0101 tijekom liofilizacije.

Na temelju antimikrobnog i bakteriocinskog djelovanja, proizvodnje EPS-a i ekspresije S-proteina (Butorac i sur., 2021; Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016; Beganović i sur., 2013), odabrano je 9 *Lactobacillus* sojeva BMK s ciljem odabira funkcionalnih starter kultura za kontroliranu fermentaciju sušenog svježeg sira ujednačene kvalitete uz zadržavanje svojstava teksture i okusa tradicionalnog sira. Odabran je jedan *Enterococcus faecium* soj i još 11 sojeva vrste *Lactococcus lactis* zbog najbolje proučenog proteolitičkog sustava razgradnje kazeina djelovanjem proteinaza. Proteinaze imaju bitnu ulogu u proizvodnji sira, obzirom da sudjeluju u razgradnji proteina i razvoju okusa tijekom zrenja sira (Kok i sur., 2011). Osim što su odgovorne

za rast stanica i formiranje arome, proteinaze BMK imaju i sposobnost razgradnje alergeni proteina mlijeka (Kieliszek i sur., 2021). Tijekom proizvodnje sira, jedan od najbitnih čimbenika je sposobnost koagulacije, koja se odvija istovremeno sa zakiseljavanjem mlijeka (Villegas i sur., 2015). Kod svih ispitanih sojeva dokazana je sposobnost koagulacije mlijeka, iako su vrijednosti titracijske kiselosti bile znatno veće nakon uzgoja u optimalnom mediju.

Potencijalna proteolitička aktivnost odabranih sojeva BMK ispitana je procjenom razgradnje proteina iz obranog mlijeka temeljem pojave bistrih zona, primjenom supernatanta kulture, odnosno koncentrirane biomase stanica uzgojenih u optimalnom mediju i u obranom mlijeku. Indukcija proteinazne aktivnosti nakon uzgoja u obranom mlijeku nije uočena niti kod jednog soja. Izraženija kazeinolitička aktivnost je uočena pojavom zona oko bakterijskih kultura nakon uzgoja u optimalnom mediju kod većine sojeva. Sojevi roda *Lactobacillus* i *Enterococcus* iskazali su izraženiju mogućnost hidrolize kazeina u usporedbi sa sojevima roda *Lactococcus*. Odabrana su 4 soja, *L. brevis* D6, *L. plantarum* D13, *L. fermentum* D12 i *E. faecium* ZGZA7-10 za daljnu karakterizaciju proteolitičke aktivnosti pomoću Ansonove metode, za daljnja ispitivanja u svrhu proizvodnje autohtonog sušenog svježeg sira s dodanom funkcionalnom vrijednošću. Većinu proteina u mlijeku čine kazein molekulske mase između 25 i 35 kDa i sirutkini β -laktoglobulin i α -laktalbumin, molekulske mase 18 kDa i 14 kDa (Hurley, 2010). Stoga je za detekciju proteolitičke aktivnosti odabranih izolata BMK, odnosno razgradnje peptida uslijed djelovanja proteaza, provedena Tricin-SDS-PAGE metoda. Dokazana je kazeinolitička aktivnost kod sva četiri soja. Za daljnju fenotipsku i genotipsku karakterizaciju enzima uključenih u proteolitičku aktivnost, odabran je soj *E. faecium* ZGZA7-10. Enzimi proteolitičkog sustava soja ZGZA7-10 identificirani su ProteinProspector MS-Tag pretraživačem preko SwissProt i NCBI baze podataka, nakon provođenja SDS-PAGE u kombinaciji s MALDI-TOF/TOF spektrometrijom masa. Identificirani su enzimi proteolitičkog sustava od kojih pojedini imaju katalitičku ulogu razgradnje proteina do oligopeptida, zatim peptidaze unutar stanice odgovorne za razgradnju oligopeptida do kraćih peptida i aminokiselina. Identificirani su i sustavi ABC transportera koji služe za prijenos raznovrsnih molekula, pa tako i peptida unutar stanice. Na genomskoj razini dokazana je prisutnost intrageneske regije odgovorne za ekspresiju proteinaza.

Homofermentativne BMK gotovo potpuno razgrađuju laktozu u mlijeku u mliječnu kiselinu preko piruvata, kako bi proizvele dovoljnu količinu energije. Međutim, piruvat se može alternativno prevoditi u mnoge druge metabolite, kao što su acetat, etanol, diacetil i acetaldehid. Na taj način,

BMK proizvode hlapljive komponente koje pridonose tipičnom okusu fermentiranih proizvoda. Bakterije iz roda *Lactobacillus* među kojima su i *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum* i *Levilactobacillus brevis*, su dio autohtono prisutnih BMK u fermentiranim mliječnim proizvodima i odgovorne su za specifična senzorska svojstva sira, pa njihova primjena kao starter kultura može pridonjeti okusu i aromi sira, ovisno o soju koji se koristi (Pedersen i sur, 2016). Mogućnost razgradnje laktoze, koji je nužan preduvjet za primjenu starter kultura u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda - sušenog svježeg sira i sirutke, određena je analizom fermentacijskog profila *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 sojeva primjenom API 50 CHL metode. Zbog dokazanih korisnih učinaka NaCl-a u proizvodnji sireva (Kalit, 2015; McSweeney, 2007), kod odabrana 4 soja, *L. brevis* D6, *L. plantarum* D13, *L. fermentum* D12 i *E. faecium* ZGZA7-10, provedeno je ispitivanje parametara fermentacije tijekom rasta u mlijeku uz dodatak različitih koncentracija soli, 2,0, 4,0 i 6,5 % (w/v). Odabrane su tri različite koncentracije soli kako bi se optimirao dodatak soli tijekom industrijske proizvodnje sušenog svježeg sira, a da ne utječe na mikrobiološku aktivnost odabranih sojeva. Tijekom fermentacije određen je broj BMK, pH vrijednost i koncentracija proizvedene mliječne kiseline. Najučinkovitiji rast uz dodatak različitih koncentracija soli imao je soj *E. faecium* ZGZA7-10 što upućuje na adaptaciju bakterijskih stanica, odnosno osmotolerantnosti, a zatim sojevi *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *L. brevis* D6. Prema rezultatima rast bakterija je inhibiran povećanjem koncentracije soli u mlijeku, što posljedično utječe i na smanjenje količine proizvedene mliječne kiseline i sposobnost grušanja. Određivanjem koncentracija fermentacijskih metabolita primjenom HPLC-UV/DAD kromatografije nakon prekonoćnog uzgoja u obranom mlijeku, s obzirom na detektiranu prisutnost mliječne i octene kiseline iz laktoze, svi sojevi BMK okarakterizirani su kao heterofermentativni mikroorganizmi. Analiza proizvodnje diacetila nije detektirana kod 4 soja. Raspon koncentracije diacetila ovisno o vrsti sira iznosi od 0,02-13,68 ppm, a povećane koncentracije povezane su s neugodnim okusom sireva (Clark i Winter, 2015).

Prilikom izbora probiotičkih sojeva potrebno je definirati sposobnost vezanja na mukoznu površinu GIT-a domaćina. Adhezija na intestinalnu mukozu štiti probiotičke stanice od ispiranja, pri čemu omogućava privremenu kolonizaciju, imunološku modulaciju i kompetitivnu ekskluziju patogena te predstavlja fizičku barijeru prema dubljim slojevima intestinalnog epitela (Lahtinen i Ouwehand, 2009). Zbog strukturnih i funkcionalnih karakteristika Caco-2 stanične linije, koja potječe od ljudskog crijevnog epitela, ove stanice se najčešće koriste kao *in vitro* modeli za ispitivanje

adhezijskih svojstava BMK (Lea, 2015). Nakon odabira sojeva BMK s odgovarajućim funkcionalnim svojstvima, za proizvodnju sušenog svježeg sira: *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, ispitan je njihov kolonizacijski potencijal primjenom fluorescentne mikroskopije na Caco-2 staničnoj liniji, pri čemu su sojevi *L. brevis* D6 i *L. fermentum* D12 pokazali su najbolju sposobnost vezanja. Dodatno, ispitano je preživljavanje odabranog konzorcija BMK *in vivo* na modelu eksperimentalnih štakora čiji sastav intestinalne mikrobiote pokazuje visoku sličnost s intestinalnom mikrobiotom čovjeka, kako bi se ustanovio mogući kolonizacijski potencijal, ali i mogući učinak na sastav intestinalne mikrobiote (Lecomte i sur., 2015). Sastav intestinalne mikrobiote zdrave osobe je u homeostazi s domaćinom i ima važnu ulogu u probavi hrane, regulaciji metabolizma, iskorištavanju energije iz hranjivih tvari te zaštiti sluznice crijeva. Osim toga, utječe i na imunosti sustav te apsorpciju nutrijenata, vitamina, lijekova i toksičnih spojeva (Goldsmith i Sartor, 2014; Li i sur., 2008). Dostignuća u tehnologijama sekvencioniranja metagenoma omogućilo je kompleksne analize mikrobioma čiji rezultati upućuju na povezanost poremećaja u sastavu intestinalne mikrobiote s pojavom različitih bolesti (Lv i sur., 2021; Hajjar i sur., 2021; Lecomte i sur., 2015; Goldsmith i Sartor, 2014). Prema rezultatima, najveću relativnu zastupljenost u intestinalnom mikrobiomu štakora čine bakterije koje pripadaju koljenima *Firmicutes* i *Bacteroidota*. Nakon kaniliranja štakora suspenzijom sojeva *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, povećana je relativna zastupljenost bakterija porodice *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* i *Ruminococcaceae*. Ove bakterije su producenati kratkolančanih masnih kiselina i uobičajeni su predstavnici bakterijske populacije intestinalne mikrobiote zdrave osobe (Jandhyala i sur., 2015). U intestinalnoj mikrobioti osoba oboljelih od Parkinsonove bolesti (Scheperjans i sur., 2015), smanjen je udio bakterija iz navedenih porodica u usporedbi s mikrobiotom zdrave osobe. Smatra se da nedostatak *Prevotellaceae* u intestinalnom mikrobiomu uzrokuje inhibiciju sinteze mucina što rezultira povećanom permeabilnosti crijeva (Brown i sur., 2011; Forsyth i sur., 2011). Bakterije iz porodice *Rikenellaceae*, čiji je udio u intestinalnoj mikrobioti ispitivanih štakora također povećan nakon administracije, su tipični u sastavu intestinalne mikrobiote zdravih ljudi. Povećanje relativne zastupljenosti bakterija iz porodice *Peptostreptococcaceae*, koji su značajno zastupljeniji kod zdravih životinja nego kod onih koje boluju od poremećaja ravnoteže intestinalne mikrobiote (Leng i sur., 2016). Nakon tretmana, nisu detektirane bakterije iz porodice *Methanobacteriaceae* u mikrobiomu štakora. Ovoj porodici pripadaju bakterije *Methanobrevibacter smithii*, koje se

povezuju s povećanim rizikom od razvoja pretilosti (Mbakwa i sur., 2015). Na razini bakterijskih rodova, nakon kaniliranja štakora odabranom konzorcijem BMK, snižena je relativna zastupljenost *Saccharibacteria* u koje se ubraja *Candidatus Saccharimonas*, Gram-negativna bakterija koja uzrokuje upalne bolesti sluznice crijeva (McMullen i sur., 2015), kao i smanjenje zastupljenosti patogene bakterije roda *Streptococcus*. Također, prema rezultatima povećana je zastupljenost bakterija roda *Alloprevotella* i *Prevotella*, producenata kratkolančanih masnih kiselina, kao i zastupljenost bakterija roda *Roseburia*, koji su producenti butirata. Nedostatak butirata uzrokuje povećanu permeabilnost crijeva, a određena koncentracija ove kratkolančane masne kiseline u crijevima ima zaštitni učinak prilikom razvoja tumora (Hajjar i sur., 2021). Potencijal probiotičkih sojeva da utječu na bioraznolikost crijevne mikrobiote ustanovili su Lv i sur. (2021) profiliranjem mikrobioma fecesa imunokomprimitiranih štakora združenom primjenom bakterija roda *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Bacillus*. Rezultati istraživanja ukazali su na povećanje relativne zastupljenosti bakterijskih koljena *Proteobacteria*, *Fusobacteriota* i *Actinobacteriota*, te izostanak *Spirochaetota* i *Cyanobacteria*.

5.2. Tehnološki aspekti primjene BMK sa svojstvom sinteze specifičnih biomolekula

S ciljem zadržavanja funkcionalnosti odabranih starter kultura tijekom biotehnoške proizvodnje, transporta, skladištenja te konačne primjene u fermentiranom mliječnom proizvodu, istražuju se različiti tehnološki aspekti kako bi se postigao što veći broj metabolički aktivnih bakterijskih stanica. Jedan od ciljeva ovog istraživanja je ispitati učinak mikroinkapsulacije bakterijskih stanica optimiranjem odabira različitih nosača, parametara liofilizacije uz dodatak različitih lioprotektora, te primjena prebiotičkih supstrata kako bi se u konačnoj probiotičkoj formulaciji, odnosno u pripravku funkcionalne starter kulture zadržao visok broj metabolički aktivnih bakterijskih stanica tijekom biotehnoške proizvodnje, transporta, čuvanja i primjene *in situ*. Mikroinkapsulacija se često primjenjuje jer zaštićuje bakterijske stanice u nepovoljnim uvjetima mikrokoliša. Svrha mikroinkapsulacije je poboljšanje preživljavanja bakterija tijekom primjene do ciljnog mjesta djelovanja u intestinalnom traktu. Mikrokapsule s bakterijskim stanicama nisu topljive u vodi, kako bi u prehrambenom proizvodu struktura bila očuvana i tijekom dopreme do gastrointestinalnog trakta (Chávarri i sur., 2012). Za mikroinkapsulaciju probiotičkih bakterija primjenjuju se različiti nosači poput ionskih hidrogelova alginata i hitozana, hidrogelova poput gelan gume, ksantana, karagenana i želatine, mliječni proteini kazein ili sirutkini proteini. Primjena alginata doprinosi

stabilnosti strukture formirane mikrokapsule pri niskim pH vrijednostima, koje bubre u slabo bazičnim otopinama, stoga su pogodne za zaštitu bakterija tijekom prolaska kroz GIT, gdje se izlažu vrlo niskim pH vrijednostima želučanog soka, a istovremeno omogućuju polagano otpuštanje u bazičnim pH vrijednostima u crijevima (Chávarri i sur., 2012). Alginat se učestalo primjenjuje u postupcima mikroinkapsulacije zbog prednosti kao što su netoksičnost, jednostavnost provođenja metode, ekonomičnosti, te je prihvaćen kao dodatak prehrani (Chávarri i sur., 2012; Islan i sur., 2012). Bakterijske stanice su mikroinkapsulirane u različitim polimernim nosačima, u alginatu, κ -karagenanu i u kazeinu s enzimom transglutaminazom. Tehnologija mikroinkapsulacije uspješno je provedena u sva tri ispitana polimerna matriksa. Određena je učinkovitost mikroinkapsulacije u vrijednosti višoj od 91 %, pri čemu se alginat pokazao kao najoptimalniji nosač kod ispitanih *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 sojeva. Rezultati su u skladu s istraživanjima Dehkordi i sur. (2020), te je određena učinkovitost mikroinkapsulacije probiotičke bakterije *Lactobacillus acidophilus*, primjenom alginata i denaturiranih sirutkinih proteina u rasponu vrijednosti od 81,42 do 97,51 %, ovisno o koncentracijama upotrebljenih polimernih matriksa. U svrhu poboljšanja preživljavanja BMK tijekom dehidracije i kasnijeg skladištenja, izbor odgovarajuće metode sušenja je značajan. Liofilizacija probiotičkih stanica često se koristi za dehidraciju, osobito za proizvodnju velikih količina suhih aktivnih pripravaka koncentriranih mikrobioloških kultura. Kako liofilizacija obuhvaća sušenje proizvoda u zamrznutom obliku, tijekom procesa smanjuje se količina vode u stanicama s ciljem usporavanja metaboličkih procesa, a ujedno je i cilj očuvanje stanične strukture metaboličke aktivnosti stanice. Pri tome je značajno definirati otpornost fosfolipida stanične membrane pri prelasku iz tekuće u gel fazu, a dodatak šećera može utjecati na snižavanje temperature pri kojoj se taj prelazak odvija jer se vežu na površinu fosfolipida umjesto vode i na taj način čuvaju strukturu stanične membrane. Bakterijske kulture su prilikom zamrzavanja i sušenja u vakuumu izložene stresnim uvjetima koji mogu uzrokovati oštećenja stanice ili čak gubitak funkcije bakterijske stanice jer uklanjanje vezane vode uzrokuje oštećenje strukture proteina, stanične stjenke i citoplazmine membrane (Fonseca i sur., 2015). Da bi se zadržala metabolička aktivnost bakterijskih stanica tijekom liofilizacije primjenjuju se lioprotektori. Lioprotektori su komponente koje sprječavaju oštećenja stanica tijekom zamrzavanja, sušenja i skladištenja. Dodaju se u medij prije početka liofilizacije u svrhu zaštite stanica, te kako bi se povećao postotak preživljavanja tijekom dehidratacije. Kao lioprotektori, koriste se obrano mlijeko

u prahu, proteini sirutke, mono-(glukoza, ksiloza), di-(saharoza, laktoza i trehaloza) i polisaharidi (inulin, škrob, dekstran), alkoholi (glicerol i sorbitol), različite aminokiseline i njihovi derivati (Siaterlis i sur., 2009). Prilikom liofilizacije funkcionalnih starter kultura ili probiotičkih sojeva BMK u svrhu postizanja što većeg broja živih stanica u suhom aktivnom pripravku, često se kao lioprotektor primjenjuje obrano mlijeko. U usporedbi s drugim lioprotektorima, prednosti primjene obranog mlijeka su: sprječavanje oštećenja bakterijske stanice stabilizacijom komponente citoplazmine membrane, stvaranjem porozne strukture liofiliziranog pripravka bakterijskih stanica, olakšana rehidracija (Basholli-Salih i sur., 2014). U svrhu postizanja što većeg broja aktivnih stanica tijekom pohrane i kasnije primjene, provedena je liofilizacija mikroinkapsuliranih stanica BMK u alginatu uz dodatak lioprotektora sorbitola, saharoze, laktoze, inulina i obranog mlijeka. Smrtnost odabranih sojeva tijekom liofilizacije bila je znatno niža u odnosu na kontrolu, stoga se može pretpostaviti da odabrani lioprotektori imaju zaštitni učinak na bakterijske stanice tijekom stresnih uvjeta liofilizacije. Prema rezultatima obrano mlijeko se pokazalo kao najprikladniji lioprotektor, obzirom da je broj aktivnih stanica bio veći u usporedbi s primjenom ostalih lioprotektora što ga čini najboljim izborom u zaštiti stanica *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 tijekom stresnih uvjeta liofilizacije. Nadalje, da bi probiotičke bakterije došle do kolona moraju preživjeti u visokom broju prolazak kroz nepovoljne uvjete usne šupljine i tankog crijeva što je veliki izazov. Također, bitno je i preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom procesiranja i skladištenja funkcionalne hrane koja ih sadrži, kako bi se osigurala željena količina bioaktivnih stanica u konačnom proizvodu (Anal i Singh, 2007). Za funkcionalnost probiotičkih bakterija preporučeno je da minimalna učinkovita dnevna količina koju je potrebno konzumirati iznosi 10^6 - 10^9 živih mikrobnih stranica (Watson i Preedy, 2015). Prema rezultatima mikroinkapsulacije u alginatu i liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora doprinosi zaštiti prilikom prolaska bakterijskih stanica *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10 kroz simulirane uvjete GIT-a. Rezultati su u skladu s Dehkordi i sur. (2020) koji su dokazali zaštitni učinak mikroinkapsulacije primjenom alginata i denaturiranih sirutkinih proteina, tijekom izlaganja stresnim uvjetima GIT-a bakterije *Lactobacillus acidophilus*.

EPS-i bakterija su prisutni dulji vremenski period od drugih sastojaka hrane u GIT-u čovjeka i pretpostavlja se da zbog prebiotičkog svojstva mogu utjecati na kolonizaciju trakta probiotičkim sojevima iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* slično drugim prebioticima,

fruktooligosaharidima, galaktooligosaharidima i inulinu koji su izvor ugljika za crijevne bakterije (de Roos, 2000). Bakterijskom fermentacijom ovih rezistentnih ugljikohidrata nastaju kratkolančane masne kiseline (*engl.* short chain fatty acids, SCFA) i mliječna kiselina koje reduciraju broj patogenih bakterija u crijevima, moduliraju imunološki sustav, osiguravaju izvor energije za stanični epitel debelog crijeva, te moduliraju metabolizam kolesterola i lipida kao i sastav mikrobiote (Topping i Clifton, 2001). EPS-i mogu biti fermentabilni supstrati s prebiotičkim potencijalom povećanja udjela intestinalnih bifidobakterija u intestinalnom mikrobiomu (Hongpattarakere i sur., 2012). Zbog funkcionalnih učinaka prebiotika na zdravlje domaćina i u svrhu povećanja broja živih stanica soja producenta EPS-a *L. fermentum* D12, provedena je mikroinkapsulacija u alginatu za koji je dokazana najbolja učinkovitost, uz dodatak tri različite vrste prebiotika, inulin + FOS, manitol i laktuloza. Dodatak različitih vrsta prebiotika ne utječe na učinkovitost mikroinkapsulacije, a procesom liofilizacije dobivenih mikrokapsula još jednom je dokazan protektivni učinak obranog mlijeka. Uloga prebiotičkih supstrata, inulina + FOS, manitola i laktuloze, dokazana je tijekom godinu dana čuvanja, gdje su procesom liofilizacije usporeni svi metabolički procesi unutar stanice, dok im je izvor ugljika osiguran dodatkom prebiotika. Rezultati su u skladu sa Sathyabama i sur. (2014) koji su dokazali da dodatak prebiotika u alginatni polimer tijekom postupka mikroinkapsulacije ima povoljan učinak na preživljavanje probiotičkih bakterija, posebno tijekom čuvanja pri niskim temperaturama. Među analiziranim prebioticima, manitol se pokazao kao najučinkovitiji prebiotički supstrat za soj *L. fermentum* D12. Slično su dokazali Succi i sur. (2017) jer je određen veći postotak preživljavanja *Lactobacillus* sojeva uz dodatak prebiotika manitola tijekom kultivacije. Protektivni učinak mikroinkapsulacije u alginatu dokazan je i tijekom izlaganja liofiliziranih mikrokapsula stanica *L. fermentum* D12 uz dodatak tri različite vrste prebiotika, kroz simulirane uvjete GIT-a. Protektivni učinak može se pripisati postupku mikroinkapsulacije stanica, zbog stabilnosti alginata pri niskim pH vrijednostima, zbog čega štiti stanice od kiselih uvjeta u želučanom soku i sposobnosti bubrenja u slabo bazičnim otopinama, pri čemu je omogućeno polagano otpuštanje probiotičkih bakterija i dodanih prebiotika u bazičnim uvjetima koji prevladavaju u tankom crijevu. Nakon otpuštanja odabranih probiotičkih bakterija u tankom crijevu, one dospijevaju u kolon. Sinbiotički učinak postignut je dodatkom prebiotika čime se postiže proliferacija, odnosno selektivno poticanje rasta poželjnih komensalnih bakterija. Također, prebiotici služe i kao supstrat ili hrana intestinalnoj mikrobioti za koje se smatra da pozitivno utječu na zdravlje domaćina. Liao i sur. (2019) su također

dokazali učinkovitost mikroinkapsulacije u alginatu za uspješnu dopremu stanica soja *L. fermentum* L7, izoliranog iz majčinog mlijeka, do GIT-a. Dodatno, RAPD-PCR reakcijom dokazana je prisutnost probiotičkog soja *L. fermentum* D12 u svim mikrokapsulama, a SEM analizom morfologija mikrokapsule koje su pogodne za dopremu supstrata kao što je EPS do kolona.

5.3. Primjena BMK kao funkcionalnih starter kultura za fermentaciju inovativnih proizvoda

BMK se već dugi niz godina primjenjuju kao starter kulture s ciljem poboljšanja organoleptičkih, nutricionističkih i tehnoloških karakteristika proizvoda. Kao glavni produkt fermentacije ugljikohidrata nastaju mliječna i/ili octena kiselina, ali mogu proizvesti i etanol, bakteriocine, različite aroma komponente i EPS. Uslijed promjene pH vrijednosti, mijenjaju se izvorne karakteristike hrane, što rezultira poboljšanjem organoleptičkih karakteristika konačnog proizvoda (Šušković i sur., 2010; De Vuyst i sur., 2007) i sprječavanjem rasta patogenih mikroorganizama i uzročnika kvarenja hrane. Starter kulture su pripravci koji sadrže žive mikroorganizme, a primjenjuju se za dobivanje različitih fermentiranih namirnica s krajnjim ciljem oplemenjivanja tih namirnica različitim proizvodima metabolizma upotrijebljenih starter kultura. Funkcionalne starter kulture se mogu definirati kao kulture koje posjeduju barem jedno funkcionalno svojstvo s krajnjim ciljem poboljšanja kvalitete konačnog proizvoda koji će imati pozitivan učinak na zdravlje i fiziologiju potrošača (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Najvažnije svojstvo primjene BMK kao starter kultura je zakiseljavanje mlijeka pri čemu zahvaljujući svom proteolitičkom sustavu metaboliziraju proteine mlijeka te na taj način formiraju okus i teksturu samog proizvoda (Griffiths i Tellez, 2013; Kongo, 2013). Blagi kiseli okus i ugodna svježina jedne su od najvažnijih karakteristika fermentiranih mliječnih proizvoda kao što su jogurt i sir. Sirevi se općenito mogu podijeliti prema vrsti mlijeka iz kojeg se proizvode na kravlje, ovčje, kozje i bivolje mlijeko, načinu koagulacije (proizvedeni fermentacijom pomoću BMK ili dodatkom kiseline), konzistenciji (ekstratvrđi, tvrđi, polutvrđi, polumeki te meki, odnosno svježi sirevi), količini masti u suhoj tvari sira (ekstramasni, punomasni, masni, polumasni i posni), zrenju (bez zrenja, sirevi koji zriju uz pomoć bakterija ili pomoć plijesni) i prema načinu proizvodnje (Samaržija, 2021). Za rast i aktivnost u mlijeku, grušu ili tijestu sira, BMK koriste laktozu koju unose u stanicu pomoću specifičnih transportnih sustava nakon čega se hidroliziraju u monosaharide, koje se tada metaboliziraju pomoću brojnih enzima različitim putevima, uz

proizvodnju metabolita (Tratnik i Božanić, 2012). Združena primjena odabranih starter kultura koji sintetiziraju biomolekule poput površinskih S-proteina, EPS, bakteriocina i bioaktivnih peptida *in situ* može doprinjeti razvoju novih fermentiranih proizvoda s poboljšanim nutritivnim svojstvima i dodanom funkcionalnom vrijednošću proizvoda, a bez primjene prehrambenih konzervansa ili aditiva. Ovakav pristup predstavlja prirodnu alternativu, atraktivnu suvremenim potrošačima, uz postizanje ekonomskog učinka bitnog za prehrambenu industriju. Stoga, dizajniran je konzorcij BMK koji sadrži tri *Lactobacillus* i jednog *Enterococcus* soja, a koji su primjenjeni kao mješovita funkcionalna starter kultura za provedbu kontrolirane fermentacije u proizvodnji sušenog svježeg sira i sirutke primjenom svježeg kravljeg mlijeka. Sva četiri soja, *L. brevis* D6, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13 i *E. faecium* ZGZA7-10, iskazuju specifične funkcionalne karakteristike poput sinteze biomolekule površinskih S-proteina, EPS, plantaricina i proteolitičke aktivnosti. Fermentirani sušeni svježi sirevi i sirutka proizvedeni su u kontroliranim uvjetima s definiranim sastavom i brojem probiotičkih bakterija u inokulumu za proizvodnju sušenog svježeg sira. Nakon proizvodnje i tijekom skladištenja proizvedenih sušenih svježih sireva potvrđena je mikrobiološka čistoća i određeni su fizikalno-kemijski parametri (pH vrijednost, volumen izdvojene sirutke i prinos sira) koji ukazuju na sigurnost i kvalitetu gotovog proizvoda, potvrđuju odabrane parametre tehnologije proizvodnje, pri čemu se kao odabrane kontrolne točke mogu definirati: temperatura tijekom fermentacije (24 °C), pH vrijednost sira (izoelektrična točka kazeina pri pH vrijednosti 4,6 kao parametar završetka fermentacije) i početni broj od 10^6 CFU/mL starter kulture u mlijeku za proizvodnju sira. Suhi svježi sir proizveden primjenom odabranog konzorcija BMK nije se značajno razlikovao od kontrolnog sira proizvedenog primjenom komercijalne DELVO®CHEESE CT-203 DSF starter kulture u pH vrijednosti, prinosu i sinerezi. Kiselost oba sira u ovom istraživanju je bila nižih vrijednosti od onih koje su objavili Bekele i sur. (2018) za svježi sir (4,54-5,20), dok je prinos svježeg sira dobiven fermentacijom odabranih starter kultura ($35,58 \pm 8,10$ %) u skladu s prinosom svježeg sira proizvedenog primjenom odabranih autohtonih sojeva *Limosilactobacillus fermentum* A8 i *Enterococcus faecium* A7 (Leboš Pavunc i sur., 2012). Prema *Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva* (NN 20/2009) i udjelu suhe tvari, proizvedeni sušeni svježi sirevi se mogu svrstati u ekstra tvrde sireve. Sir proizveden primjenom dizajniranog konzorcija BMK se prema udjelu mliječne masti može svrstati u polumasne, dok se kontrolni sir može svrstati u masne sireve (Samaržija, 2021). Senzorskim ispitivanjem ustanovljena su bolja organoleptična svojstva sira proizvedenog primjenom odabranih funkcionalnih BMK. Dobivene

razlike, posebice u okusu i mirisu mogu se pripisati specifičnim svojstvima primjenjenih starter kultura. Kremasta tekstura sira proizvedenog primjenom odabranog konzorcija BMK mogla bi biti povezana sa sintezom EPS-a soja *L. fermentum in situ* (Butorac i sur., 2021). Prema Surberu i sur. (2021) BMK koje proizvode EPS-e sa specifičnim „ropy“ fenotipom mogu doprinijeti poboljšanju teksture kremastih sireva. Primjena selekcioniranih autohtonih starter kultura, *E. faecium* A7 i *L. fermentum* A8, također je imala povoljan učinak na senzorska svojstva svježeg sira u usporedbi sa svježim sirom proizvedenog primjenom komercijalne starter kulture (Leboš Pavunc i sur., 2012). Ukupan broj živih stanica BMK u slučaju sira proizvedenog dizajniranim konzorcijem starter kultura i u slučaju kontrolnog sira proizvedenog dodatkom komercijalne starter kulture DELVO®CHEESE CT-203 DSF je bio veći od 10^6 CFU/g. Navedeni rezultati odgovaraju istraživanjima koja su pokazala da je potrebno konzumirati 10^8 živih probiotičkih stanica kako bi se postigao povoljan učinak na zdravlje domaćina, što znači da u dnevnom unosu od 45 grama sira treba biti 6×10^6 takvih bakterija, uz njihovo preživljavanje od 30 % (Lovayová i sur., 2015). Mikrobiološka kvaliteta mlijeka i mliječnih proizvoda je vrlo važna jer zbog svojeg prirodnog sastava i svojstava osiguravaju idealne uvjete za rast i razmnožavanje različitih vrsta mikroorganizama. Prisutnost patogene bakterije *L. monocytogenes* u mlijeku i mliječnim proizvodima predstavlja zdravstveni problem jer se kao uzročnik listerioze javlja puno rjeđe u odnosu na druge bolesti prenosive putem hrane, poput salmoneloze i kampilobakterioze, no uzrokuje visoku stopu smrtnosti do 40 %. U industrijskoj proizvodnji mljekarskih proizvoda *L. monocytogenes* predstavlja značajan problem zbog uspješnog rasta u širokom rasponu pH vrijednosti (4,3-9,6) i temperature (-1,5-45°C) te izrazite otpornosti prema visokim koncentracijama NaCl-a do 12 % (Bubonja i sur., 2007). Kontaminacija pasteriziranog mlijeka i mliječnih proizvoda rodovima *Listeria* i *Salmonella* često je prisutna zbog loših higijenskih uvjeta proizvodnje. Ispitivanjem mikrobiološke čistoće nakon proizvodnje i tijekom skladištenja nije došlo do porasta bakterija roda *Listeria* i *Salmonella*, što je u skladu s *Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu* (NN 74/2008), prema kojem bakterija *L. monocytogenes* ne smije biti prisutna u broju većem od 100 CFU/g tijekom deklariranog roka trajanja proizvoda. Također, bakterija *L. monocytogenes* ne smije biti prisutna u 25 g proizvoda koji se stavlja na tržište. Isto vrijedi i za bakteriju roda *Salmonella*, koja ne smije biti prisutna u 10 (25) g proizvoda koji se stavlja na tržište.

Sirutka nastaje kao sporedni proizvod u tehnološkom procesu proizvodnje sira ili kazeina (Tratnik i Božanić, 2012), pri čemu predstavlja jedan od nedovoljno iskorištenih nusproizvoda prehrambene industrije. Sirutka kao otpadni proizvod u inustriji proizvodnje sira predstavlja ekološki problem, što je potpuno u neskladu jer je nutritivno bogata sirovina. Jedno od rješenja je proizvodnja fermentiranih funkcionalnih napitaka na bazi sirutke, koja je u ovom radu proizvedena u laboratorijskom mjerilu, te je dodatno proizvedena sirutka u praškastom obliku, procesom liofilizacije, a može biti primijenjena kao dodatak prehrani, prvenstveno fermentiranim mliječnim proizvodima. Ovisno o načinu koagulacije kazeina nastaje kisela ili slatka sirutka, pri čemu sastav i svojstva izdvojene sirutke ovise o tehnologiji proizvodnje osnovnog proizvoda, ali i o kvaliteti upotrebljenog mlijeka. Analiza sirutke pokazala je da se radi o kiseloj sirutki s niskim udjelima masti i laktoze (Tratnik i Božanić, 2012).

Hrana ili komponente hrane s medicinskim ili zdravstvenim učinkom nazivaju se nutraceuticima, dok se funkcionalna hrana definira kao funkcionalna ukoliko sadrži sastojke koji pozitivno djeluju na jednu ili više ciljanih funkcija u tijelu. U posljednjih nekoliko godina u području funkcionalne hrane pojavili su se novi pojmovi nazvani postbiotici, koji podrazumijevaju produkte ili metaboličke nusprodukte bakterija, kao što su enzimi, peptidi, teihoninske kiseline, polisaharidi, površinski proteini i organske kiseline s mnogobrojnim povoljnim učincima na zdravlje domaćina (Aguilar-Toalá i sur., 2018). Stoga, u cilju proizvodnje funkcionalnog napitka i nutraceutičkog probiotičkog proizvoda, uspješno je proveden proces liofilizacije, pri čemu je postignut veći broj i biološka aktivnost BMK kao producenata postbiotika plantaricina i EPS-a u suhom aktivnom pripravku na bazi sirutke. Prema rezultatima, očuvan je visok broj bakterijskih stanica nakon proizvodnje i tijekom skladištenja koncentrirane sirutke priređene liofilizacijom tekuće sirutke. Prema tome, inovativni proizvodi mogu se proizvesti kao funkcionalni napitak (tekuća sirutka) i nutraceutički probiotički proizvod, odnosno kao sastojak funkcionalnog dodatka prehrani (liofilizirana sirutka). Ispitivanjem mikrobiološke čistoće nakon proizvodnje i tijekom skladištenja liofilizirane i neliofilizirane sirutke nije došlo do povećanja bakterija roda *Listeria* i *Salmonella*, što je u skladu s *Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu* (NN 74/2008). Razvijen je inovativni napitak na bazi sirutke koji sadrži više od 10^6 probiotičkih bakterijskih stanica po mL, čime se može kategorizirati kao funkcionalni probiotički napitak. Prema provedenoj senzorskoj analizi, inovativni napitak na bazi sirutke dobiven primjenom dizajniranog konzorcija BMK, može se proizvesti kao tekući napitak s dodatkom vanilije ili maline.

Identifikacija mješovite funkcionalne starter kulture definiranog sastava kao i autohtono prisutne mikrobiote, u proizvedenom sušenom svježem siru i sirutki, provedena je primjenom klasičnih mikrobioloških metoda, RAPD-PCR i DGGE-PCR te metagenomičkim sekvencioniranjem nove generacije.

Određene BMK sintetiziraju biopeptide što pridonosi funkcionalnoj vrijednosti finalnog fermentiranog proizvoda (Yusuf i Gürkan, 2021). Sinteza biopeptida primjenom BMK predstavlja atraktivan pristup mliječnoj industriji obzirom da bioproces pridonosi kvaliteti konačnog proizvoda osobito zbog ekonomičnosti bioprocasa koji ne zahtjeva implementaciju dodatnih tehnoloških postupaka (Raveschot i sur., 2020b). Zbog prepoznate važnosti proteolitičkog sustava te zbog pozitivnog učinka odabranog konzorcija BMK na proizvedene fermentirane proizvode, proteomičkim pristupom provedena je detekcija peptida s potencijalnim bioaktivnim djelovanjem u sušenim svježim sirevima i izdvojenim sirutkama. Hidroliza α -CN i β -CN u uzorcima svježeg mlijeka „Veronika“ nakon prekonoćnog uzgoja pojedinačnih sojeva BMK, kao i u uzorcima sušenog svježeg sira i sirutke proizvedenih primjenom odabranog konzorcija BMK i DELVO®CHEESE CT-203 DSF starter kulture (kontrola) detektirana je primjenom kvantitativne LC-MRM-MS analize ciljanih peptida. U uzorku sušenog svježeg sira dobivenog primjenom odabranih starter kultura, identificirano je 15 peptida nastalih razgradnjom kazeina, od kojih je deset značajno zastupljeno, a dva peptida (HQP HQPLPPTVMFPPQ i LVYFPFGPIHNSLPQN) nisu detektirana u kontrolnom siru. ACE-inhibitorna aktivnost YQEPVLGPPVRGPFPIIV peptida prisutnog u najvećoj mjeri kod uzorka sira dobivenog odabranim konzorcijem BMK dokazana je kod nekoliko vrsta sireva proizvedenih u različitim regijama (Ong i sur., 2007). Peptid WMHQPHQPLPPT dobiven razgradnjom β kazeina, značajno je zastupljeniji u uzorku sira dobivenog fermentacijom odabranih sojeva BMK nego u kontrolnom siru. Prema Adams i sur. (2020) isti peptid je identificiran kao dio veće bioaktivne frakcije prikupljene iz supernatanta fermentiranog mlijeka s protuupalnim i ACE-inhibitorskim djelovanjem. Peptid HQPHQPLPPTVMFPPQ s potencijalnim protuupalnim i ACE-inhibitorskim djelovanjem (Adam i sur., 2020) detektiran je kod soja *L. fermentum* D12 nakon uzgoja u svježem mlijeku, kao i u uzorku sira i sirutke dobivenih primjenom odabranog konzorcija BMK. Potencijalna ACE-inhibitorna i antioksidativna aktivnost peptida VYFPFGPIP (Eisele i sur., 2013; Tonolo i sur., 2020) detektirana je kod soja *L. brevis* D6, dok je kod soja *L. plantarum* D13 pronađen FVAPFPEVFG peptid s potencijalnim ACE-inhibitorskim učinkom (Robert i sur., 2004). Ista dva peptida

detektirana su kod uzorka sira dobivenog primjenom odabrane starter kulture. Ovi rezultati upućuju na to da su peptidi s potencijalnim bioaktivnim djelovanjem pronađeni kod uzorka sira, posljedica kazeinolitičke aktivnosti sojeva D6, D12 i D13. Dodatno, u uzorcima sira i sirutke dobivenih primjenom odabranog konzorcija BMK nisu pronađena tri peptida, LLYQEPVLGPVRGPFPIIV, VLGpVRGPFp i WIQPkTKVIPYVRYL, s potencijalnim ACE-inhibitorskim (Miguel i sur., 2006; Yamamoto i sur., 1994) i antimikrobnim djelovanjem (Alvarez-Ordóñez i sur., 2013), a koji odgovaraju peptidima proizvedenim kod svih sojeva BMK uzgojenih u monokulturi. Obzirom na prethodno okarakterizirana probiotička svojstva odabranih sojeva BMK, njihov utjecaj na bioraznolikost mikrobiote štakora, kao i sinteza biopeptida, njihova primjena u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda dodatno je poboljšala funkcionalnu vrijednost finalnih proizvoda.

6. ZAKLJUČCI

1. Definirana specifična funkcionalna svojstva, kroz inhibicijsko djelovanje plantaricina, protektivne uloge i posredovanja u kolonizacijskom potencijalu EPS-a te enzimskog djelovanja proteolitičkog sustava za sintezu biopeptida, temelj su za primjenu opisanih BMK kao bakterija s probiotičkih aktivnostima
2. Temeljem rezultata adhezije *in vitro* i analizom intestinalne mikrobiote *in vivo* nakon primjene odabranog konzorcija četiri soja BMK dokazan je kolonizacijski potencijal
3. Postignut je tehnološki značaj primjene odabranih BMK u smislu očuvanja visokog broja metabolički aktivnih bakterijskih stanica tijekom pripreme i primjene kao funkcionalnih starter kultura, odnosno skladištenja u formulaciji suhog aktivnog pripravka, primjenom postupaka mikroinkapsulacije i liofilizacije
4. Dizajniran konzorcij BMK doprinosi provođenju kontrolirane fermentacije s funkcionalnog i tehnološkog aspekta bioprocesa
5. Primjenom konzorcija BMK postignuta je proizvodnja sušenog svježeg sira sa zadržanim autohtonim svojstvima tradicionalno proizvedenog sira povećane koncentracije biopeptida uz potencijal funkcionalnog proizvoda dodane vrijednosti, kao i proizvodnja inovativnog napitka od nusproizvoda sirutke, pri čemu je postignut ekološki učinak uslijed iskorištavanja sirutke koja predstavlja otpadni proizvod u proizvodnji sira, te je time ostvaren doprinos održivosti bioprocesa
6. Plantaricin D13, te EPS D12, imaju potencijal probiotičkih molekula nove generacije, te uz biokatalitički potencijal sustava proteaza obećavajući su postbiotici koji djeluju kao okidačke molekule za specifične funkcionalnosti sojeva producenata

7. LITERATURA

Abraham, B., Quigley, E.M.M. (2020) Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: when to use them? *Frontline Gastroenterol.* **11**, 62-69.

Adams, C., Sawh, F., Green-Johnson, J.M., Jones Taggart, H., Strap, J.L. (2020) Characterization of casein-derived peptide bioactivity: Differential effects on angiotensin-converting enzyme inhibition and cytokine and nitric oxide production. *J. Dairy Sci.* **103**(7), 5805-5815.

Aguilar-Toalá, J.E., Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A. (2018) Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci. Tech.* **75**, 105-114.

Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D., Karr, A. (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* **5**, 340-345.

Ale, E.C., Rojas, M.F., Reinheimer, J.A., Binetti, A.G. (2020) *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties? *Food Microbiol.* **90**, 103465.

Alp, D., Kuleaşan, H. (2019) Adhesion mechanisms of lactic acid bacteria: conventional and novel approaches for testing. *World J. Microb. Biot.* **35**, 156.

Alvarez-Cisneros, Y.M., Sáinz Espuñes, T.R., Wachter, C., Fernandez, F.J E., Ponce-Alquicira, E. (2011) Enterocins: Bacteriocins with applications in the food industry. U: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. (Méndez-Vilas, A., ured), Formatex Research Center, Badajoz, str. 1330-1341.

Alvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Clifford, T., Deasy, T., Considine, K., Hill, C. (2013) Structure-Activity Relationship of Synthetic Variants of the Milk-Derived Antimicrobial Peptide α 2-Casein f(183-207). *Appl. Environ. Microbiol.* **79** (17), 5179-5185.

Alvarez-Siero, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P. (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100** (7), 2939-2951.

Anal, A.K., Singh, H. (2007) Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci. Tech.* **18**, 240–251.

Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J. (1998) Antagonistic Activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two New Two-Peptide Bacteriocins, Plantaricins EF and JK, and the Induction Factor Plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (6), 2269–2272.

Antikainen, J., Anton, L., Sillanpää, J., Korhonen, T. K. (2002) Domains in S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and self-assembly. *Mol. Microbiol.* **46**, 381–394.

Aragon, F., Carino, S., Perdigón, G., Moreno-LeBlanc, A. (2014) The administration of milk fermented by the probiotic *Lactobacillus casei* CRL 431 exerts an immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model. *Immunobiology*, **219**, 457–464.

Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, **9** (75), 1-15.

Badel, S., Bernardi, T., Michaud P. (2011) New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **29**, 54–66.

Bali, V., Panesar, P.S., Bera, M.B., Kennedy, J.F. (2016) Bacteriocins: Recent Trends and Potential Application. *Crit. Rev. Food Sci.* **56**, 817-834.

Balzaretti, S., Taverniti, V., Guglielmetti, S., Fiore, W., Minuzzo, M., Ngo, H.N., Ngere, J.B., Sadiq, S., Humphreys, P.N., Laws, A.P. (2017) A Novel Rhamnose-Rich Hetero-exopolysaccharide Isolated from *Lactobacillus paracasei* DG Activates THP-1 Human Monocytic Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **83** (3), 2702-2716.

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

Baptista, D.P., Galli, B.D., Cavalheiro, F.G., Negrão, F., Eberlin, M.N., Gigante, M.L. (2018) *Lactobacillus helveticus* LH-B02 favours the release of bioactive peptide during Prato cheese ripening. *Int. Dairy J.* **87**, 75-83.

Basholli-Salihi, M., Mueller, M., Salar-Behzadi, S., Unger, F. M., Viernstein, H. (2014) Effect of lyoprotectants on b-glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. *LWT -Food Sci. Technol.* **57**, 276-282.

Becker, A. (2015) Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Front. Microbiol.* **6**, 687.

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

Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Džidara, P., Šušković, J. (2013) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*, **20**, 58-64.

Bekele, B., Bech Hansen, E., Eshetu Guya, M., Ipsen, R., Hailu, Y. (2018) Effect of starter cultures on properties of soft white cheese made from camel (*Camelus dromedarius*) milk. *J. Dairy Sci.* **102**, 1108–1115.

Belguesmia, Y., Naghmouchi, K., Chihib, N.-E., Drider, D. (2011) Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. U: *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, (Drider, D., Rebuffat, S., ured.), Springer, New York, str. 171–195.

Bengoa, A., Goretti Llamas, M., Irapordaa, C., Dueñas, M.T., Abraham, A.G., Garrote, G.L. (2018) Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food Microbiol.* **69**, 212–218.

Ben Omar, N., Abriouel, H., Keleke, S., Sánchez Valenzuela, A., Martínez-Cañamero, M., Lucas López, R., Ortega, E., Gálvez, A. (2008) Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons. *Int. J. Food Microbiol.* **127**, 18–25.

Biermann, C. J., McGinnis, G. D. (1989) Analysis of Carbohydrates by GLC and MS, CRC Press, Inc. Florida.

Birkemo, G.A., O’Sullivan, O., Ross, R.P., Hill, C. (2009) Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 233–240.

Boels, I.C., Rvan, K., Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Wmde, V. (2001) Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. *Internat. Dairy J.* **11** (9), 723-732.

Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada, Zagreb.

Brandt, K., Nethery, M.A., O’Flaherty, S., Barrangou, R. (2020) Genomic characterization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20052. *BMC Genomics*, **21**, 328.

Brown, C.T., Davis-Richardson, A.G., Giongo, A., Gano, K.A., Crabb, D.B., Mukherjee, N., Casella, G., Drew, J.C., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H., Veijola, R.K., Simell, T.T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C., Schatz, D.A., Atkinson, M.A., Triplett, E.W. (2011) Gut Microbiome Metagenomics Analysis Suggests a Functional Model for the Development of Autoimmunity for Type 1 Diabetes. *PLoS One*, **6**, e25792.

Bubonja M., Vučković D., Rubeša-Mihaljević R., Abram M. (2007) Činitelji bakterije i domaćina u patogenezi listerioze. *Medicina*, **43**, 15-20.

Budak, S. O., Figge, M. J., Houbraken, J., de Vries, R.P. (2016) The diversity and evolution of microbiota in traditional Turkish Divle Cave cheese during ripening. *Int. Dairy J.* **58**, 50-53.

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

Butorac, K., Novak, J., Bellich, B., Teran, L. C. Banić, M. Leboš Pavunc, A., Zjalić, S., Cescutti, P., Šušković, J., Kos, B. (2021) Lyophilized alginate-based microspheres containing *Lactobacillus fermentum* D12, an exopolysaccharides producer, contribute to the strain's functionality *in vitro*. *Microb. Cell Fact.* **20**, 17.

Castro-Bravo, N., Wells, J.M., Margolles, A., Ruas-Madiedo. P. (2018) Interactions of Surface Exopolysaccharides From *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Within the Intestinal Environment. *Front. Microbiol.* **9**, 2426.

Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 113-130.

Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. (1994) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3914–9.

Chanos, P, Mygind, T. (2016) Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biot.* **100**, 4297–4308.

Chávarri, M., Marañón, I., Villarán, M.C. (2012) Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. U: Probiotics (Rigobelo, E.C., ured.), InTech, str. 501-540.

Chen, Y.S., Wang, Y.C., Chow, Y.S., Yanagida, F., Liao, C.C., Chiu, C.M. (2014) Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. *Arch. Microbiol.* **196**, 193–199.

Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M.T. (2017) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotech.* **49**, 23-28.

Chung, W.S.F., Walker, A.W., Louis, P., Parkhill, J., Vermeiren, J., Bosscher, D., Duncan, S.H., Flint, H.J. (2016) Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol.* **14**, 1–13.

Clark, S., Winter, C.K. (2015) Diacetyl in Foods: A Review of Safety and Sensory Characteristics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **14**, 635–643.

Costa, N.E., Hannon, J.A., Guinee, T.P., Auty, M.A., McSweeney, P.L., Beresford, T.P. (2010) Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **93**, 3469–86.

Coste, M., Rochet, V., Léonil, J., Mollé, D., Bouhallab, S., Tomé, D. (1992) Identification of C-terminal peptides of bovine β -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Imunol. Lett.* **33**, 41-46.

Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 95-105.

Crittenden, R., Playne, M.J. (2009) Prebiotics. U: Handbook of Probiotics and Prebiotics, (Lee, Y.K., Salminen, S., ured.), John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, USA, str. 535–561.

Cuthbertson, L., Mainprize, I.L., Naismith, J.H., Whitfield, C. (2009) Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide co-polymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **73**, 155-177.

Dan, T., Fukuda, K., Sugai-Bannai, M., Takakuwa, N., Motoshima, H., Urashima, T. (2009) Characterization and Expression Analysis of the Exopolysaccharide Gene Cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2656-64.

Degeest, B., Vaningelgem, F., De Vuyst, L. (2001) Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**, 747–757.

Dehkordi, S.S., Alemzadeh, I., Vaziri, A.S., Vossoughi, A. (2020) Optimization of Alginate-Whey Protein Isolate Microcapsules for Survivability and Release Behavior of Probiotic Bacteria. *Appl. Biochem. Biotech.* **190**, 182–196.

Dekić Rozman, S., Butorac, A., Bertoša, R., Hrenović, J., Markeš, M. (2021) Loss of thermotolerance in antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Environ. Health Res.* **31**, 1–13.

Deo, D., Davray, D., Kulkarni, R.A. (2019) Diverse repertoire of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus* revealed by comparative analysis in 106 sequenced genomes. *Microorganisms*, **7**, 444.

de Roos, N.M., Katan, M.B. (2000) Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 405–411.

De Vuyst, L., Leroy (2007) Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, And Food Applications. *J. Mol. Microb. Biotech.* **13**, 194-199.

Dertli, E., Mayer, M.J., Narbad, A. (2015) Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *BMC Microbiol.* **15**, 8.

Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Nes, I.F. (1996) Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* **178**, 4472–4483.

Diep, D.B., Nes, I.F. (2002) Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets*, **3**, 107-122.

Diep, D.B., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H., Nes, I.F. (2009a) Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **10**, 62–73.

Diep, D.B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., Nes, I.F. (2009b) An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, **30**, 1562–1574.

Dimopoulou, M., Bardeau, T., Ramonet, P.Y., Miot-Certier, C., Claisse, O. Doco, T., Petrel, M., Lucas, P., Dols-Lafargue, M. (2016) Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: from genomic and phenotypic analysis to technological valorization. *Food Microbiol.* **53**, 10–17.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., Prévost, H. (2006) The continuing story for class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **70**, 564-582.

Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B., Fischer, L. (2013) Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using *Bacillus lentus* alkaline peptidase. *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 483–490.

European Food Safety Authority (EFSA) (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J.* **226**, 1–12.

European Food Safety Authority (EFSA) (2012) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* **10**, 2740.

Ekblad, B., Kyriakou, P.K., Oppegard, C., Nissen-Meyer, J., Kaznessis, Y.N., Kristiansen, P.E. (2016) Structure-Function Analysis of the Two-Peptide Bacteriocin Plantaricin EF. *Biochemistry*, **55**, 5106–5116.

Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., Balasubramanian, T. (2014) Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **4**, 305-311.

El-Ghaish, S., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertlé, T., Chobert, J.-M. (2010) Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *Eur. Food Res. Technol.* **230**, 635–643.

El-Ghaish, S., Dalgalarondo, M., Choiset, Y.M., Ivanova, I., Haertlé, T., Chobert, J.M. (2010) Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chem.* **120**, 758–764.

FAO/WHO (2002) *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario: Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, str. 1-11.

Fernandez-Espla, M.D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. (2000) *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4772–4778.

Fields, K., Falla, T.J., Rodan, K., Bush, L. (2009) Bioactive peptides: signaling the future. *J. Cosmet. Dermatol.* **8**, 8–13.

Fimland, N., Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., Kristiansen, P.E. (2008) Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 1711-1719.

Fonseca, F., Cenard, S., Passot, S. (2015) Cryopreservation and freeze-drying protocols. U: Freeze-drying of lactic acid bacteria (Wolkers W., Oldenhof H., ured.), Springer, New York, str. 477-488.

Fontana, A., Falasconi, I., Molinari, P., Treu, L., Basile, A., Vezzi, A., Campanaro, S., Morelli, L. (2019) Genomic Comparison of *Lactobacillus helveticus* Strains Highlights Probiotic Potential. *Front Microbiol.* **10**, 1380.

Forsyth, C.B., Shannon K.M., Kordower, J.H., Voigt, R.M., Shaikh, M. (2011) Increased Intestinal Permeability Correlates with Sigmoid Mucosa alpha-Synuclein Staining and Endotoxin Exposure Markers in Early Parkinson's Disease. *PLoS One*, **6**, e28032.

Foulquié Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Vuyst, L. (2003) Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 214-229.

Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M., Arendt, E. (2012) Comparison of the impact of dextran and reuteran on the quality of wheat sourdough bread. *J. Cereal Sci.* **56**, 531–537.

Gamero-Barraza, J.I., Reyes-Jáquez, D., Medrano-Roldán, H., Morales-Castro, J., Martínez-P, M.A., Delgado. E., Cooke, P., Rosas-Flores, W. (2018) Effect of extrusion processing on cottonseed protein and corn flour interactions through molecular dynamics simulation. Proceedings of 8th Food Science, Biotechnology & Safety Congress.

Genay, M., Sadat, L., Gagnaire, V., Lortal, S. (2009) prtH2, Not prtH, Is the Ubiquitous Cell Wall Proteinase Gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3238–3249.

Gerwig, G.J., Dobruchowska, J.M., Shi, T., Urashima, T., Fukuda, K., Kamerling, J.P. (2013) Structure determination of the exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *Carbohydr Res.* **378**, 84–90.

Giraffa, G. (2012) Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Engl. Life Sci.* **12**, 391–398.

Goldsmith, J.R., Sartor, R.B. (2014) The role of diet on intestinal microbiota metabolism: Downstream impacts on host immune function and health, and therapeutic implications. *J. Gastroenterol.* **49**, 785-798.

González, B., Arca, P., Mayo, B., Suárez, J.E. (1994) Detection, Purification, and Partial Characterization of Plantaricin C, a Bacteriocin Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of Dairy Origin. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2158-2163.

Griffiths, M.W., Tellez, A.M. (2013) “*Lactobacillus helveticus*: The Proteolytic System”, *Front. Microbiol.* **4**, 1-9.

Haider, S.R., Helen, J.R., Sharp, B.L. (2012) Tricine-SDS-PAGE, U: Protein Electrophoresis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, (Kurien, B.T., Scofield, R.H., ured.), Springer Science+Business Media, Berlin, str. 81-91.

Kant, R., Uroić, K., Hynonen, U., Kos, B., Šušković, J., Palva, A. (2016) Genome Sequence of *Lactobacillus brevis* Strain D6, Isolated from Smoked Fresh Cheese. *Genome A*, **4**, e00264-16.

Hajjar, R., Richard, C.S., Santos, M.M. (2021) The role of butyrate in surgical and oncological outcomes in colorectal cancer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **320**, 601-608.

Harris, P.J., Henry, R.J., Blakeney, A.B., Stone, B.A. (1984) An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **127**, 59–73.

Hegarty, J.W., Guinane, C.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. (2016) Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait? Version 1. *F1000Res.* **5**, 2587.

Hebert, E.M., De Giori, G.S., Raya, R.R. (2001) Isolation and characterization of a slowly milk-coagulating variant of *Lactobacillus helveticus* deficient in purine biosynthesis. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 1846-1850.

Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., Nes, I.F. (2001) Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*, **147**, 643–651.

Holzappel, W.H., Wood, B.J. (2014) Introduction to the LAB. U: Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy, (Holzappel, W.H., ured.), Wiley, West Sussex, UK, str. 1–12.

Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., Rastall, R.A. (2012) *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohyd. Polym.* **87**, 846– 852.

Hurley, W.L. (2010) Milk Composition & Synthesis. Lactation Biology website <<http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/>>. Pristupljeno 29. ožujka 2018.

Ismail, B., Nampoothiri, K.M. (2010) Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Arch. Microbiol.* **192**, 1049-1057.

Islam, S.T., Lam, J.S. (2014) Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Can. J. Microbiol.* **60**, 697-716.

Islan, G.A., De Verti, I.P., Marchetti, S.G., Castro, G.R. (2012) Studies of ciprofloxacin encapsulation on alginate/pectin matrixes and its relationship with biodisponibility. *Appl. Biochem. Biotech.* **167**, 1408–1420.

Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **21** (29), 8787–8803.

Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P. (1995) Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microb.* **61**, 4459–4463.

Jones, M.L., Martoni, C.J., Parent, M., Prakash, S. (2012) Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* **107**, 1505–1513.

Kalit, S. (2015) Opće Sirarstvo. Sirarstvo u teoriji i praksi. U: Sirarstvo u teoriji i praksi, (Matijević, B., ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska, str. 29 - 45.

Karimi, R., Mortazavian, A. M., Gomes Da Cruz, A. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Sci. Technol.* **91**, 283–308.

Kayser, H., Meisel, H. (1996) Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* **383**, 18-20.

Kelleher, P., Murphy, J., Mahony, J., Van Sinderen, D. (2015) Next-generation sequencing as an approach to dairy starter selection. *Dairy Sci. Technol.* **95**, 545–568.

Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., Kot, A.M. (2021) Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, **26**, 1858.

Kim, Y., Oh, S., Kim, S. H. (2009) Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 324-329.

Kirin, S. (2006) Bjelovarski autohtoni «sušeni sir». *Mljekarstvo*, **56** (4), 343-356.

Kitts, D.D., Weiler, K. (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharm. Design*, **9**, 1309–1323.

Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39–85.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fiers, M.W.E.J., Stiekema, W., Lankhorst, R.M.K., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N.N., Kerkhoven, R., de Vries, M., Ursing, B., de Vos, W. M., Siezen, R.J. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **100** (4), 1990–1995.

Kleerebezem, M. (2004) Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides*, **25**, 1405–14.

Kok, J., Kunji, E., Steele, J. L., Broadbent, J. R. (2011) Protein breakdown by lactic acid bacteria. U: Thirty years of research on lactic acid bacteria, (Ledebøer, A., ured.), 24 MEDIA Science Communication Agency, Rotterdam, str. 133-150.

Kongo, J.M. (2013) Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments, IntechOpen, London.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Kos, B., Šusković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981–987.

Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Francesco, C. (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 699-707.

Kos, B., Beganović, J., Jurašić, L., Švađumović, M., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Šušković, J. (2011) Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. *Mljekarstvo*, **61**, 273-282.

Kristiansen, P.E. Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J. (2005) Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. *J. Biol. Chem.* **280** (24), 22945-22950.

Lam, M. M. C., Seemann, T., Bulach, D.M., Gladman, S. L., Chen, H., Haring, V., Moore, R. J., Ballard, S., Grayson, M. L. Johnson, P. D. R., Howden, B. P., Stinear, T. P. (2012) Comparative Analysis of the First Complete *Enterococcus faecium* Genome. *J. Bacteriol.* **194**, 2334-2341.

Lahtinen, S., Ouwehand, A., (2009) Mechanisms of probiotics. U: Handbook of Probiotics and Prebiotics, 2. izd., (Lee, Y. K., Salminen, S., ured.), Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, str. 377-440.

Laws, A., Gu, Y., Marshall, V. (2001) Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol Adv.* **19**, 597-625.

Lea, T. (2015) Caco-2 cell line. U: The impact of food bioactives on health: *in vitro* and *ex vivo* models, 1. izd. [online], (Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., ured.), Springer, Cham, Švicarska <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/>. Pristupljeno 2. travnja 2021.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, J. (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 728-764.

Lebeer, S., Bron, P.A., Marco, M.L., Van Pijkeren, J.P., O'Connell Motherway, M., Hill, C., Pot, B., Roos, S., Klaenhammer, T. (2018) Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Curr. Opin. Biotechnol.* **49**, 217-223.

Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos, B., Buneta, A., Beluhan S., Šušković J. (2011) Influence of microencapsulation and transglutaminase on viability of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92 and consistency of set yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* **64**, 254-261.

Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos B., Uroić K., Blažić M., Šušković J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production, *Food Technol. Biotechnol.* **50**, 141-151.

Leboš Pavunc, A., Penava, L., Ranilović, J., Novak, J., Banić, M., Butorac, K., Petrović, E., Mihaljević-Herman, V., Bendelja, K., Savić Mlakar, A., Durgo, K., Kos, B., Šušković, J. (2019) Influence of Dehydrated Wheat/Rice Cereal Matrices on probiotic activity of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12[®]. *Food Technol. Biotech.* **57**, 147-158.

Lecomte, V., Kaakoush, N.O., Maloney, C.A., Raipuria, M., Huinao, K.D., Mitchell, H.M., Morris, M.J. (2015) Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters. *PLoS One*, **10**, e0126931.

Leenhouts, K., Kok, J., Venema, G. (1990) Stability of Integrated Plasmids in the Chromosome of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2726-2735.

Leng, Y., Yi, M., Fan, J., Bai, Y., Ge, Q., Yao, G. (2016) Effects of acute intra-abdominal hypertension on multiple intestinal barrier functions in rats. *Sci. Rep.* **6**, 22814.

Li, M., Wang, B., Zhang, M., Rantalainen, M., Wang, S., Zhou, H., Zhang, Y., Shen, J., Pang, X., Zhang, M., Wei, H., Chen, Y., Lu, H., Zuo, J., Su, M., Qiu, Y., Jia, W., Xiao, C., Smith, L.M., Yang, S., Holmes, E., Tang, H., Zhao, G., Nicholson, J. K., Li, L., Zhao, L. (2008) Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2117-2122.

Li, X.Y., Chen, X.G., Cha, D.S., Park, H.J., Liu, C.S. (2009) Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. *J. Microencapsul.* **26**, 315-324.

Liao, N., Luo, B., Gao, J., Li, X., Zhao, Z., Zhang, Y., Ni, Y., Tian, F. (2019) Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnol. Lett.* **41**(2), 263-272.

Limoli, D.H., Jones, C.J., Wozniak, D.J. (2015) Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol. Spectr.* **3**.

Linares, D.M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Ross, R.P., Stanton, C. (2017) Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Front. Microbiol.* **8**, 846.

Liu, H., Tu, M., Cheng, S., Chen, H., Wang, Z., Du, M. (2019) An anticoagulant peptide from beta-casein: identification, structure and molecular mechanism. *Food Funct.* **7**, 1-26.

Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R.J. (2010) The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: A genomic comparison. *BMC Genomics*, **11**, 36.

London, L.E.E., Price, N.P., Ryan, P., Wang, L., Auty, M.A., G.F. Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P. (2014) Characterization of a bovine isolate *Lactobacillus mucosae* DPC 6426 which produces an exopolysaccharide composed predominantly of mannose residues. *J. Appl. Microbiol.* **117**, 509–17.

Lovayová, V., Dudriková, E., Rimárová, K., Siegfried, L. (2015) Quantity of selected probiotic cultures in semi-hard cheese with low-cooking curd during the maturation process. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 4697–4702.

Lu, Y., Govindasamy-Lucey, S., Lucey, J. A. (2016) Angiotensin-I-converting enzymeinhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *J. Dairy Sci.* **99**, 1-12.

Lv, L., Mu, D., Du, Y., Yan, R., Jiang, H. (2021) Mechanism of the Immunomodulatory Effect of the Combination of Live *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, and *Bacillus* on Immunocompromised Rats. *Front. Immunol.* **12**, 694344.

Lynch, K.M., Zannini, E., Coffey, A., Arendt, E.K. (2018) Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **9**, 155–176.

Maccfarlane, G.T., Steed, H., Maccfarlane, S. (2008) Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 305–344.

MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B.; Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C., MacCoss, M.J. (2010) Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*, **26**, 966–968.

Maldonado, A., Jimenez-Diaz, R., Ruiz-Barba, J.L. (2004) Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific grampositive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J. Bacteriol.*, **186**, 1556–1564.

Maldonado, A., Ruiz-Barba J.L., Jiménez-Díaz, R. (2003) Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 383-389.

Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Padrós, H., Ruiz-Barba, J.L. (2013) Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. *Food Microbiol.* **33**, 40-47.

Markusková, B., Lichvariková, A., Szemes, T., Korenová, J., Kuchta, T., Drahovská, H. (2018) Genome analysis of lactic acid bacterial strains selected as potential starters for traditional Slovakian bryndza cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, 1-7.

Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martín-Sánchez, I., Martínez-Bueno, M. (2008) Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. *App. Environ. Microbiol.* **74**, 5662-5673.

Mbakwa, C.A., Penders, J. , Savelkoul, P.H., Thijs, C., Dagnelie, P.C., Mommers, M., Arts, I.C. (2015) Gut colonization with *methanobrevibacter smithii* is associated with childhood weight development. *Obesity*, **23**, 2508-2516.

McMullen, L., Leach, S.T., Lemberg, D.A., Day, A.S. (2015) Current roles of specific bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *AIMS Microbiology*, **1**, 82-91.

McSweeney, P.L.H. (2007) *Cheese Problems Solved*, Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge.

Mende, S., Rohm, H., Jaros, D. (2016) Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *Int. Dairy J.* **52**, 57-71.

Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., Aleixandre, M. A. (2006) Effect of ACE-Inhibitory Peptides Obtained from *Enterococcus faecalis* Fermented Milk in Hypertensive Rats. *J. Dairy Sci.* **89**, 3352–3359.

Mills, S., Ross, R.P., Hill, C. (2017) Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 129–153.

Mohanty, D., Jena, R., Choudhury, P.K., Pattnaik, R., Mohapatra, S., Saini, M.R. (2016) Milk derived antimicrobial bioactive peptides: a review. *Int. J. Food Prop.* **19**, 837–846.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., Remaud-Siméon, M. (2001) Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**, 675–85.

Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D.J., McKay, L.L.,

Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T., Hattori, M. (2008) Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res.* **15**, 151-161.

Moussavi, M., Adams, M.C. (2009) An *in vitro* study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations. *Curr. Microbiol.* **60**, 327-335.

Mozzi, F., Savoy de Giori, G., Font de Valdez, G. (2003) UDP-galactose 4-epimerase: a key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus casei* CRL 87 in controlled pH batch cultures. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 175-183.

Narodne novine (2008) *Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu*. Zagreb: Narodne novine d.d., **74**.

Narodne novine (2009) *Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva*. Zagreb: Narodne novine d.d., **20**.

Navarro, L., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Díez, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2008) Comparative study of the *pln* locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin-producing *L. plantarum* J51 strain. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 390-394.

Nissen-Meyer, J., Larsen, A.G., Sletten, K., Daeschel, M., Nes, I.F. (1993) Purification and characterization of plantaricin A, a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1973-8.

Nguyen, H.T., Razafindralambo, H., Blecker, C., N'Yapo, C., Thonart, P., Delvigne, F. (2014) Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying. *Biochem. Eng. J.* **88**, 85-94.

Nourikyan, J., Kjos, M., Mercy, C., Cluzel, C., Morlot, C., Noirot-Gros, M.-F., Guiral, S., Lavergne, J.-P., Veening, J.-W., Grangeasse, C. (2015) Autophosphorylation of the bacterial

tyrosine-kinase cpsD connects capsule synthesis with the cell cycle in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet.* **11**, e1005518.

Novak, J., Leboš Pavunc, A., **Butorac, K.**, Banić, M., Čuljak, N., Rak, H., Blažević, M., Iveljić, A.-M., Šušković, J., Kos, B. (2022a) Kazeinolitičke proteinaze *Lactobacillus* i *Lactococcus* sojeva izoliranih iz fermentiranih mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo*, **72**, 11-21.

Novak, J., Butorac, K., Leboš Pavunc, A., Banić, M., Butorac, A., Lepur, A., Oršolić, N., Tonković, K., Bendelja, K., Čuljak, N., Lovrić, M., Šušković, J., Kos, B. (2022b) A Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules*, **27**, 160.

Ogier, J.C., Serrot, P. (2008) Safety assesment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 291 – 301.

OJEU (2010) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union.* **276**, 33–79.

Olvera-García, M., Sanchez-Flores, A., Quirasco Baruch, M. (2018) Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 2251–2267.

Ong, L., Henriksson, A., Shah, N.P. (2007) Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp. *Le Lait*, **87**, 149–165.

Oppegård, C, Kjos, M., Veening, J.-W., Nissen-Meyer, J., Kristensen, T. (2016) A putative amino acid transporter determines sensitivity to the two- peptide bacteriocin plantaricin JK. *MicrobiologyOpen*, **5**, 700–708.

Parente, E., Cogan, T.M. (2004) Starter cultures: general aspects. U: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3. izd., (Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., Guinee, T. P., ured.), Elsevier, London, str. 123–148.

Parente, E., Ricciardi, A., Zotta, T. (2020) The microbiota of dairy milk: A review. *Int. Dairy J.* **107**, 104714.

Pedersen, T.B., Vogensen, F.K., Ardö, Y. (2016) Effect of heterofermentative lactic acid bacteria of DL-starters in initial ripening of semi-hard cheese. *Int. Dairy J.* **57**, 72-79.

Pellizzoni, E., Ravalico, F., Scaini, D., Delneri, A., Rizzo, R., Cescutti, P. (2016) Biofilms produced by *Burkholderia cenocepacia*: influence of media and solid supports on composition of matrix exopolysaccharides. *Microbiology*, **162**, 283-294.

Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Fact.* **13**, 1-13.

Perko, B. (2015) Najnovija dosti gnuća u proizvodnji sira. U: Sirarstvo u teoriji i praksi, (Matijević, B., ured.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, Hrvatska, str. 133 - 148.

Pessione, E., Cirrincione, S. (2016) Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Front. Microbiol.* **7**, 876.

Picon, A., Garde, S., Ávila, M., Nuñez, M. (2010) Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *Int. Dairy J.* **20**, 156–162.

Poole, J., Day, C.J., von Itzstein, M., Paton, J.C., and Jennings, M.P. (2018) Glycointeractions in bacterial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 440–452.

Rajoka, M.S., Mehwish, H.M., Siddiq, M., Haobin, Z., Zhu, J., Yan, L., Shao, D., Xu, X., Shi, J. (2017) Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. *LWT-Food Sci. Technol.* **84**, 271–280.

Raveschot, C., Cudennec, B., Deracinois, B., Frémont, M., Vaeremans, M., Dugersuren, J., Demberel, S., Drider, D., Dhulster, P., Coutte, F., Flahaut, C. (2020a) Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from Mongolian traditional dairy products: A multiparametric analysis, *Food Chem.* **304**.

Raveschot, C., Deracinois, B., Bertrand, E., Flahaut, C., Frémont, M., Drider, D., Dhulster, P., Cudennec, B., Coutte, F. (2020b) Integrated Continuous Bioprocess Development for ACE-Inhibitory Peptide Production by *Lactobacillus helveticus* Strains in Membrane Bioreactor. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 585815.

Rehm, B.H. (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 578–592.

Remus, D.M., van Kranenburg, R., van Swam, I.I., Taverne, N., Bongers, R. S., Wels, M., Wells, J. M., Bron, P.A., Kleerebezem, M. (2012) Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. *Microb. Cell Fact.* **11**, 149.

Ricci-Cabello, I., Olalla Herrera, M., Artacho, R. (2012) Possible role of milk derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutr. Rev.* **70**, 241–255.

Robert, M.C., Razaname, A., Mutter, M., Juillerat, M.A. (2004) Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J. Agric. Food. Chem.* **52**, 6923-31.

Rogne, P., Haugen, C., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., Kristiansen, P.E. (2009) Three-dimensional structure of the two-peptide bacteriocin plantaricin JK. *Peptides*, **30**, 1613-1621.

Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A. (2011) Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* **69**, 2011–2015.

Ruas-Madiedo, P., Salazar, N., de los Reyes-Gavilán, C.G. (2009) Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. U: Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends, (Ullrich, E., ured.), Caister Academic Press, UK, str. 279.

Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., García-Garibaya, M. (2012) Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy J.* **26** (2), 147-154.

Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Jiménez-Díaz, R., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2008) Characterization of a new organization of the plantaricin locus in the inducible bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* J23 of grape must origin. *Arch. Microbiol.* **189**, 491–499.

Ryan, P., Ross, R., Fitzgerald, G., Caplice, N., Stanton, C. (2015) Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Funct.* **6**, 679–693.

Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Ruas-Madiedo, P. (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 1440–1453.

Samaržija, D. (2021) Mljekarska mikrobiologija. U: Specifičnost mljekarske mikrobiologije i osnove proizvodnje i prerade mlijeka (Volarić, V., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 2-36.

Sánchez, A., Vázquez, A. (2017) Biactive peptides: A review. *Food Qual. Safe.* **1**, 29-46.

Sand, S.L., Nissen-Meyer, J., Sand, O., Haug, T.M. (2013) Plantaricin A, a cationic peptide produced by *Lactobacillus plantarum*, permeabilizes eukaryotic cell membranes by a mechanism dependent on negative surface charge linked to glycosylated membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1828**, 249-59.

Sandré, C., Gleizes, A., Forestier, F., Gorges-Kergot, R., Chilmonczyk, S., Léonil, J., Moreau, M.-C., Labarre C. (2001) A Peptide Derived from Bovine β -Casein Modulates Functional Properties of Bone Marrow-Derived Macrophages from Germfree and Human Flora-Associated Mice. *J. Nutr.* **131**, 2936–2942.

Sathyabama, S., Ranjith kumar, M., Bruntha devi, P., Vijayabharathi, R., Brindha priyadharisin, V. (2014) Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT - Food Sci. Technol.* **57**, 419-425.

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P.A., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., Auvinen, P. (2015) Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov. Disord.* **30**, 350-358.

Schmid, J., Sieber, V., Rehm, B. (2015) Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* **6**, 496.

Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J.V., Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860.

Siaterlis, A., Deepika, G., Charalampopoulos, D. (2009) Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**, 295-301.

Siezen, R.J., Renckens, B., van Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., de Vos, W.M. (2005) Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8371-8382.

Smith, J.L., Liu, Y., Paoli, G.C. (2013) How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Can. J. Microbiol.* **59**, 141-152.

Søren Drud, N., Beverly, R.L., Qu, Y., Dallas, D.C. (2017) Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk proteinderived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chem.* **232**, 673–682.

Sowmya, K., Bhat, M.I., Bajaj, R.K., Kapila, S., Kapila, R. (2019) Buffalo Milk Casein Derived Decapeptide (YQEPVLGPVR) Having Bifunctional Anti-inflammatory and Antioxidative Features Under Cellular Milieu. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **25**, 623–633

Styriak, I., Nemcova, R., Chang, Y.H., Ljungh, A. (2003) Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 329-333.

Strahinić, I., Kojić, M. Tolinački, M., Fira, D., Topisirović, L. (2009) The presence of prtP proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3–1. *Appl. Microbiol.* **50**, 43-49.

Succi, M., Tremonte, P., Panella, G., Tipaldi, L., Cozzolino, A., Romaniello, R., Sorrentino, E., Copplola, R. (2017) Pre-cultivation with selected prebiotics enhances the survival and the stress response of *Lactobacillus rhamnosus* strains in simulated gastrointestinal transit. *Front. Microbiol.* **8**(1067), 1-11.

Sundararaghavan, H.G., Burdick, J.A. (2017) Cell encapsulation. U: Comprehensive biomaterials II. 2 izd. (Ducheyne, P., ured.) Elsevier, Amsterdam, str. 154–74.

Surber, G., Spiegel, T., Dang, B.P., Pombo, A.W. (2021) Cream cheese made with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis*: Impact of strain and curd homogenization pressure on texture and syneresis. *J. Food Eng.* **308**, 110664.

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

Šušković, J., Kos, B. (2019) Predavanja iz kolegija „Probiotici i starter kulture“, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Šušković, J., Kos B. (2007) Mikrobiološke metode i antibiotici. U: Metode u molekularnoj biologiji, (Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katušić Hećimović, S., Meštović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D., ured.), Institut Ruđer Bošković, Zagreb, str. 949-963.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial activity-The most important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 296-307.

Tagliazucchi, D., Martini, S., Solieri, L. (2019) Bioprospecting for Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Food. *Fermentation*, **5**, 96.

Tai, H.F., Foo, H.L., Rahim, R.A., Loh, T.C., Abdullah, M.P., Yoshinobu, K. (2015) Molecular characterisation of new organisation of *plnEF* and *plw* loci of bacteriocin genes harbour concomitantly in *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Microb. Cell Fact.* **14**, 89.

Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.C. (2003) Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56, *Res. Microbiol.* **154**, 705–712.

Terzić-Vidojević, A., Tonković, K., Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Strahinić, I., Kojić, M., Veljović, K., Golić, N., Kos, B., Čadež, N., Gregurek, L.J., Šušković, J., Raspor, P., Topisirović, L.J. (2015) Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT - Food Sci. Technol.* **63**, 298-306.

Toba, T., Kotani, T., Adachi, S. (1991) Capsular polysaccharide of slime-forming *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* LAPT 3001 isolated from Swedish fermented milk “langfil”. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 167-172.

Tonolo, F., Fiorese, F., Moretto, L., Folda, A., Scalcon, V., Grinzato, A., Ferro, S., Arrigoni, G., Bindoli, A., Feller, E., Bellamio, M., Marin, O., Rigobello, M.P. (2020) Identification of New Peptides from Fermented Milk Showing Antioxidant Properties: Mechanism of Action. *Antioxidants*, **9**, 117.

Topping, D.L., Clifton, P.M. (2001) Short chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* **81**, 1031-1064.

Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Uroić, K., Novak, J., Hynöonen, 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 Sci. Technol.* **69**, 623-632.

van den Berg, D., Robijn, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J., Ledebor, A. M., Verrips, C. T. (1995) Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2840-2844.

van Heel, A.J., de Jong, A., Song, C., Viel, J.H., Kok, J., Kuipers, O.P. (2018) BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Res.* **2**, **46**, 278-281.

van Hijum, S.A., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I.G. (2006) Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 157-76.

Van Pijkeren, J.P., O'Tolle, P.W. (2013) Comparative and Functional Genomics of the Genus *Lactobacillus*. U: *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, (Ljungh, Å. Wadström, T. ured.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, str. 59-82.

Vaziri, A.S., Alemzadeh, I., Vossoughi, M., Khorasani, A.C. (2018) Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. *Carbohydr. Polym.* **199**, 266–275.

Villegas, J.M., Brown, L., Savoy de Giori, G., Hebert, E.M. (2015) Characterization of the mature cell surface proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 4277-4286.

Waldherr, F.W., Vogel, R.F. (2009) Commercial exploitation of homo-exopolysaccharides in non-dairy food. U: *Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends*, (Ullrich, M., ured.), Caister Academic Press, UK, str. 313–329.

Wattam, A.R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T.L., Driscoll, T., Gabbard, J.L., Gillespie, J.J., Gough, R., Hix, D., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E.K., Olson, R., Overbeek, R., Pusch, G.D., Shukla, M., Schulman, J., Stevens, R.L., Sullivan, D.E., Vonstein, V., Warren, A., Will, R., Wilson, M.J., Yoo, H.S., Zhang, C., Zhang, Y., Sobral, B.W. (2014) PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res.* **42**, 581-591.

Watson, R.R., Preedy, V.R. (2015) *Probiotics, Prebiotics and Symbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*, Elsevier, Amsterdam.

Wei, Y., Li, F., Li, L., Huang, L., Li, Q. (2019) Genetic and biochemical characterization of an exopolysaccharide with in vitro antitumoral activity produced by *Lactobacillus fermentum* YL-11. *Front Microbiol.* **10**, 2898.

Welman, A.D., Maddox, I.S. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**, 269–274.

Werning, M.L., Nácher, M., López, P., de Palencia, P.F., Aznar, R., Notararigo, S. (2012) Biosynthesis, Purification and Biotechnological Use of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. INTECH, London.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., Cámara, M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**, 1119–1134.

Whitney, J.C., Howell, P.L. (2013) Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **21**, 63–72.

Worsztynowicz, P., Olejnik-Schmidt, A., Białas, W., Grajek, W. (2019) Identification and partial characterization of proteolytic activity of *Enterococcus faecalis* relevant to their application in the dairy industry. *Acta Bioch. Pol.* **66**, 61-69.

Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994) Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* **77** (4), 917-922.

Yother, J. (2011) Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 563–581.

Yusuf, B., Gürkan, U. (2021) Analysis of the kefir and koumiss microbiota with the focus on certain functional properties of selected lactic acid bacteria. *Mljekarstvo*, **71** (2), 112-123.

Zacharof, M.P., Lovitt, R.W. (2012) Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. A Review Article. *APCBEE Procedia*, **2**, 50-56.

Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100** (3), 1121-1135.

Zeidan, A.A., Kuzina Poulsen, V., Janzen, T., Buldo, P. Derkx, P.M.F., Øregaard, G., Neves, A. R. (2017) Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 168–200.

Zhang, X., Leemhuis, H., van der Maarel, M.J.E.C. (2019) Characterization of the GH13 and GH57 glycogen branching enzymes from *Petrotoga mobilis* SJ95 and potential role in glycogen biosynthesis. *PLoS One*, **14**(7), e0219844.

Zhou, Y., Cui, Y., Qu, X. (2018) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydr. Polym.* **207**, 317-332.

8. PRILOZI

PRILOG 1. *In silico* identifikacija gena vezanih uz sintezu, strukturu, transport i imunost plantaricina soja *L. plantarum* D13, dobivenih anotacijom nukleotidnih sekvenci primjenom BAGEL 4.0 softwer-a

Kontig	Postotak identifikacije (%)	e-vrijednost	Funkcija
SINTEZA			
7	99,19	7e-180	regulator odziva PlnD
7	100	2e-162	regulator odziva PlnC, aktivator
7	27,13	5e-18	histidin kinaza povezana s proizvodnjom bakteriocina
STRUKTURNI GENI			
7	100	7e-37	plantaricin E
7	100	6e-35	ggmotiv; Lactococcin; bakteriocin IIC; 171,2; plantaricin_F
7	100	3e-29	antimikrobno djelovanje17; bakteriocin IIC; 167,2; plantaricin A
7	100	1e-66	PlnY
7	38,89	3e-09	PlnS
7	31,75	3e-04	PlnS
12	100	0,0	PlnO
12	100	3e-35	bakteriocin IIC; 174,2; plantaricin N
12	100	6e-37	172,2; plantaricin J
12	100	2e-37	ComC; bakteriocin IIC; 173,2; plantaricin K
TRANSPORT			
7	100	0,0	pomoćni faktor za ABC-transporter PlnH
7	100	0,0	ABC-transporter za bakteriocine, ATP- vezujući i permeazni protein PlnG
11	68,73	2e-125	potencijalan ABC transporter, ATP-vezujući protein spyM18 0273
11	41,15	8e-51	potencijalan ABC transporter, ATP- vezujući protein HI 1272
11	40,69	2e-63	ABC transporter, permeazni protein HI 1471
IMUNOST			
7	100	2e-179	P71468 LACPL PlnI (imunosni protein PlnI, proteaza vezana na membranu CAAX obitelj proteina)
12	29,86	5e-07	P71468 LACPL PlnI (imunosni protein PlnI, proteaza vezana na membranu CAAX obitelj proteina)
12	100	2e-40	P71462 LACPL imunosni protein PlnM
12	32,02	4e-20	pretpostavljeni imunosni protein za bakteriocin

PRILOG 2. *In silico* identifikacija gena vezanih uz aktivaciju prekursornih molekula, sintezu, polimerizaciju i transport egzopolisaharida (EPS-a) soja *L. fermentum* D12, dobivenih anotacijom aminokiselinskih sekvenci pomoću RAST servera primjenom BLASTp baze podataka

Gen	Lokus	Najbolji BLAST razultat i izvorni mikroorganizam	Duljina (aa)	% identifikacije	<i>e</i> - vrijednost	% pokrivenosti
AKTIVACIJA PREKURSORA						
galE	GW747 _RS003 65	UDP-glukoza 4- epimeraza, GalE [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>]	331	99,70	0,0	100
galT	GW747 _RS096 00	galaktoza-1-fosfat uridililtransferaza [<i>Lactobacillus fermentum</i>] (EC 2.7.7.10), AOR74297.1	485	99,59	0,0	100
galU	GW747 _RS005 90	UTP-glukoza-1- fosfat uridililtransferaza, GalU, [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>] (EC 2.7.7.9), WP_02134963 3.1	303	99,67	0,0	100
pgm/ pmm	GW747 _RS006 60	fosfoglukomutaza/ fosfomanomutaza, alfa/beta/alfa domena II [<i>Limosilactobacillus fermentum</i> ATCC 14931] (EC 5.4.2.8), EEI22570.1	577	99,65	0,0	100
glf	GW747 _RS076 65	UDP-galaktopiranoza mutaza [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>] WP_128492410.1	373	99,73	0,0	100
rfbB	GW747 _RS075 90	dTDP-glukoza 4,6- dehidrataza [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>] (EC 4.2.1.46), WP_130125615.1	310	99,68	0,0	100
SINTEZA EGZOPOLISAHARIDA						
epsA	GW747 _RS035 35	protein iz LCP obitelji [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>], WP_003685760.1	333	99,10	0,0	100

nastavak **PRILOGA 2.** *In silico* identifikacija gena vezanih uz aktivaciju prekursornih molekula, sintezu, polimerizaciju i transport egzopolisaharida (EPS-a) soja *L. fermentum* D12, dobivenih anotacijom aminokiselinskih sekvenci pomoću RAST servera primjenom BLASTp baze podataka

Gen	Lokus	Najbolji BLAST razultat i izvorni mikroorganizam	Duljina (aa)	% identifikacije	e-vrijednost	% pokrivenost
SINTEZA EGZOPOLISAHARIDA						
<i>epsC</i>	GW747 _RS035 40	protein za biosintezu egzopolisaharida [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>], WP_124890989.1	256	97,66	0,0	100
<i>epsD</i>	GW747 _RS035 45	biosinteza polisaharida, tirozin autokinaza [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>], WP_187703811.1	246	96,75	2e-173	100
<i>epsB</i>	GW747 _RS035 50	protein za biosintezu egzopolisaharida [<i>Lactobacillaceae</i>], WP_035437027.1	256	100	8e-152	100
-	GW747 _RS076 55	acetiltransferaza [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>], WP_023466034.1	352	99,72	0,0	100
<i>gtf</i>	GW747 _RS076 80	DUF4422 domena proteina [<i>Lactobacillaceae</i>], WP_048340342.1	253	99,60	0,0	100
<i>epsE</i>	GW747 _RS076 85	glikoziltransferaza [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>], WP_004563036.1	224	100	9e-158	100
POLIMERIZACIJA I TRANSPORT EGZOPOLISAHARIDA						
<i>wzy</i>	GW747 _RS076 75	polimeraza [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>], WP_111523425.1	407	99,75	0,0	100
<i>epsC'</i>	GW747 _RS076 70	protein za biosintezu lipopolisaharida (LPS) [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>], WP_023466033.1	205	99,51	4e-145	100
<i>wzx</i>	GW747 _RS076 60	flipaza [<i>Limosilactobacillus fermentum</i>], WP_004563040.1	472	99,79	0,0	100

PRILOG 3. Identifikacija proteina odgovornih za proteolitičku aktivnost soja *E. faecium* ZGZA7-10 u uzorku proteina nakon ekstrakcije, pročišćavanja i separacije primjenom LC-a te MALDI-TOF/TOF analize i MS-Tag pretraživačem preko a) SwissProt i b) NCBI baze podataka

a)

Sekvenca	MH+ (Da)	Protein MW (Da)/pI	Score	Protein
PROTEAZE				
(R)VELAKLSVDDFVR(I)	1490,8	52349/5,80	12,0	ATP-ovisna proteaza, podjedinica ATPaze HslU
(K)ILDADHYGLEKVK(E)	1500,8	90144/8,0	3,20	Lon proteaza
(K)AAVDYSIQYIPQR(S)	1523,8	77430/5,60	9,90	potencijalna ATP-ovisna Clp proteaza, ATP- vezujuća podjedinica
(R)SEKPQLRATTVLGVIR(N)	1768,0	19,727/6.80	5,30	ATP-ovisna proteaza, podjedinica HslV
(K)FKVLSQSEVDDLMTK(S)	1868,9	450,063/5.50	10,90	adenozin monofosfat-protein transferaza i cistein proteaza IbpA
(K)VPFAIADATTLTEAGYVGE DVENILLK(L)	2849,5	45,478/7.50	14,80	ATP-ovisna Clp proteaza, ATP-vezujuća podjedinica ClpX
R.DFNEALVHQVVVAYAR.Q	2030,0	86,000/6.55	84,25	ATP-ovisna Clp proteaza, ATP-vezujuća podjedinica ClpL

b)

Sekvenca	MH+ Calculated (Da)	Protein MW (Da)/pI	Score	Protein
PEPTIDAZE				
(R)DNAGTVK(G)	704,4	175950/9,4	2,1	peptidaza
(R)LESANAK(S)	732,4	69508/8,6	18,6	peptidaza
(R)VSGPVIR(M)	727,4	79499/6,7	13,7	peptidaza C39
(K)VSPLYR(K)	736,4	50629/6,0	15,8	leucil aminopeptidaza
(K)VSPLYR(K)	736,4	31980/7,1	15,8	djelomična citosolna aminopeptidaza
TRANSPORTNI SUSTAV				
(K)ADVLYR(C)	736,4	40270/5,3	14,7	fosfoferin aminotransferaza
(R)GEVLYR(G)	736,4	65183/9,3	14,5	aminokiselinski dio ATP-vezujućeg transmembranskog ABC transporter proteina
(R)ASAATSAR(N)	734,4	46252/9,9	12,8	permeaza LivM sustava za transport aminokiselina razgranatog lanca visokog afiniteta

Životopis

Katarina Butorac mag. ing. biotechn., rođena je 27. rujna 1991. godine u Augsburgu, Savezna Republika Njemačka. 2010. godine upisuje Prehrambeno-biotehnološki fakultet (PBF) Sveučilišta u Zagrebu (SuZ), smjer Biotehnologija. Završni rad izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Marina Matošića, u Laboratoriju za tehnologiju voda, naslova: „Vrste ionskih izmjenjivača za primjenu u tehnologiji vode“. Tijekom studija odradila je stručnu praksu u PLIVI HRVATSKA d.o.o., Kontrola kvalitete, Mikrobiološki i biološki laboratorij. Godine 2016. diplomirala je na studiju Molekularne biotehnologije, a svoj diplomski rad naslova „Uloga S-proteina u probiotičkom djelovanju soja *Lactobacillus brevis* ZG1“ izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura. Od listopada, 2016. godine zaposlena je kao doktorand na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini“, u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura PBF-a, SuZ. 2017. godine nagrađena je srebrnom medaljom na 9. međunarodnom sajmu inovacija Agro Arca, a 2018. godine je dobila je FEMS-ovu stipendiju za tromjesečnu znanstvenu specijalizaciju na Department of Life Sciences, University of Trieste, pod nazivom “Isolation and characterisation of exopolysaccharides from selected autochthonous *Lactobacillus* strain”, pod vodstvom doc. dr. sc. Paole Cescutti. Potporu Biotehničke zaklade PBF-a, SuZ dobila je 2019. godine. Sudjelovala je u programima popularizacije znanosti i to na projektnoj nastavi za darovitu djecu PANDA. Pohađala je 1. stručni skup „od istraživanja do komercijalizacije“, u organizaciji BioCentra te simpozij „Peptide Chemistry day“ na SuZ-u. Usavršavala se na brojnim tečajevima i radionicama. Katarina Butorac koautor je 6 znanstvenih radova. Sudjelovala je na 20 domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Članica je Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog društva za biotehnologiju. Osim znanstvene aktivnosti sudjeluje u nastavi kao suradnik na nekoliko kolegija.

Znanstveni radovi iz skupine A1:

1. Banić, M., Uroić, K., Leboš Pavunc, A., Novak, J., **Zorić, K.**, Durgo, K., Petković, H., Jamnik, P., Kazazić, S., Radović, S., Scalabrini, S., Hynönen, U., Šuškovića, J., Kos, B. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT - Food Sci. Technol.* **93**, 257–267.
2. Leboš Pavunc, A., Penava, L., Ranilović, J., Novak, J., Banić, M., **Butorac, K.**, Petrović, E., Mihaljević-Herman, V., Bendelja, K., Savić Mlakar, A., Durgo, K., Kos, B., Šušković, J. (2019) Influence of Dehydrated Wheat/Rice Cereal Matrices on probiotic activity of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12[®]. *Food Technol. Biotech.* **57**, 147-158.
3. **Butorac, K.**, Banić, M., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Durgo, K., Oršolić, N., Kukulj, M., Radović, S., Scalabrin, S., Žučko, J., Starčević, A., Šušković, J., Kos, B. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microb. Cell Fact.* **19**, 106.
4. **Butorac, K.**, Novak, J., Bellich, B., Teran, L. C. Banić, M. Leboš Pavunc, A., Zjalić, S., Cescutti, P., Šušković, J., Kos, B. (2021) Lyophilized alginate-based microspheres containing *Lactobacillus fermentum* D12, an exopolysaccharides producer, contribute to the strain's functionality *in vitro*. *Microb. Cell Fact.* **20**, 1-17.
5. Novak, J., Leboš Pavunc, A., **Butorac, K.**, Banić, M., Čuljak, N., Rak, H., Blažević, M., Iveljić, A.-M., Šušković, J., Kos, B. (2022) Kazeinolitičke proteinaze *Lactobacillus* i *Lactococcus* sojeva izoliranih iz fermentiranih mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo*, **72**, 11-21.
6. Novak, J., **Butorac, K.**, Leboš Pavunc, A., Banić, M., Butorac, A., Lepur, A., Oršolić, N., Tonković, K., Bendelja, K., Čuljak, N., Lovrić, M., Šušković, J., Kos, B. (2022) A lactic acid bacteria consortium impacted the casein-derived biopeptides content of dried fresh cheese. *Molecules*, **27**, 160.