

# Adhezijska svojstva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka

---

Hrsan, Jana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:159:309711>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2023.

Jana Hrsan

**ADHEZIJSKA SVOJSTVA  
BAKTERIJA MLIJEČNE  
KISELINE IZOLIRANIH IZ  
MAJČINOGR MLIJEKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc i komentorstvom dr. sc. Kreše Bendelje, voditelja laboratorija i višeg znanstvenog suradnika, Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Nine Čuljak, mag. ing. biotechn. i dr. sc. Željka Cvetić, višeg stručnog suradnika, Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu.

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta *Hrvatske zaklade za znanost* „*Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika*“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

*Želim zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc i komentoru dr. sc. Kreši Bendelji na mentorstvu, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.*

*Također zahvaljujem Nini Čuljak mag. ing. biotechn. i dr. sc. Željku Cvetić na velikoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala i mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

## ADHEZIJSKA SVOJSTVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ MAJČINOG MLIJEKA

Jana Hrsan, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0113144225

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je odrediti mogu li se sojevi *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1, izolirani iz majčinog mlijeka, potencijalno koristiti kao probiotici. Ispitana je uloga S-proteina i egzopolisaharida bakterijskih sojeva u adheziji i kompetitivnoj ekskluziji bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, primjenom Caco-2 stanične linije. Adhezijska sposobnost istih sojeva također je potvrđena ispitivanjem vezanja sojeva na lektinu sličan protein ZG16. Ispitivanjem imunomodulacijskog učinka izoliranih S-proteina i egzopolisaharida te sojeva producenata, korištenjem Caco-2 stanične linije tretirane s lipopolisaharidima porijeklom iz bakterije *Escherichia coli* i hTNF- $\alpha$ , pokazano je njihovo inhibitorno djelovanje na proizvodnju proupalnih citokina IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ .

**Ključne riječi:** probiotici, bakterije mliječne kiseline, adhezija, S-proteini, egzopolisaharidi

**Rad sadrži:** 49 stranica, 11 slika, 1 tablica, 64 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

**Komentor:** dr. sc. Krešo Bendelja, v. znan. sur., Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu

**Pomoć pri izradi:** Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.; dr. sc. Željko Cvetić, v. struč. sur., Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
3. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo
4. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (zamjena)

**Datum obrane:** 7. srpanja, 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for Antibiotics, Enzyme, Probiotic And Starter Cultures Technology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Molecular Biotechnology

### ADHESION PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM HUMAN BREAST MILK

*Jana Hrsan, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0113144225*

**Abstract:** The aim of this work was to determine whether strains of *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 and *Limosilactobacillus fermentum* MC1, isolated from breast milk, could be used as potential probiotics. The role of S-proteins and exopolysaccharides of bacterial strains on intestinal epithelial Caco-2 cell line adhesion and competitive exclusion of the bacterium *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 was tested. The adhesion ability of the same strains was also confirmed by examining the binding of the strains to the lectin-like protein ZG16. The immunomodulatory effect of strain specific isolated S-proteins or exopolysaccharides and live bacteria using Caco-2 cells treated with lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and human TNF- $\alpha$  was assessed. Inhibition of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production was demonstrated.

**Keywords:** *probiotics, lactic acid bacteria, adhesion, S-proteins, exopolysaccharides*

**Thesis contains:** 49 pages, 11 figures, 1 table, 64 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor

**Co-mentor:** Krešo Bendelja, PhD, Senior research associate, Center for research and knowledge transfer in biotechnology, University of Zagreb

**Technical support and assistance:** Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.; Željko Cvetić, PhD, Senior associate, Center for research and knowledge transfer in biotechnology, University of Zagreb

#### Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full professor
2. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor
3. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor
4. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** July 7<sup>th</sup>, 2023



# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE .....	2
2.1.1. Metabolizam bakterija mliječne kiseline.....	3
2.1.2. Adhezijski mehanizmi bakterija mliječne kiseline .....	4
2.2. PROBIOTICI.....	6
2.2.1. Mehanizmi djelovanja probiotika .....	7
2.3. EGZOPOLISAHARIDI .....	10
2.3.1. Funkcija egzopolisaharida .....	11
2.4. S-PROTEINI .....	13
2.4.1. Funkcija S-proteina .....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	17
3.1.2. Stanične linije .....	17
3.1.3. Hranjive podloge.....	18
3.1.4. Kemikalije .....	18
3.1.5. Aparatura i pribor.....	20
3.2. METODE RADA .....	21
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija .....	21
3.2.2. Kompetitivna ekskluzija potencijalno patogene bakterije <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium FP1 sojevima BMK .....	22
3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....	23
3.2.4. Određivanje sposobnosti adhezije sojeva bakterija mliječne kiseline na protein ZG16 .....	23
3.2.5. Izolacija S-proteina <i>L. brevis</i> sojeva .....	24
3.2.6. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) S-proteina .....	24
3.2.7. Izolacija egzopolisaharida vezanih na stanice soja <i>L. fermentum</i> MC1.....	26
3.2.8. Određivanje imunomodulacijskog djelovanja S-proteina i egzopolisaharida na Caco-2 staničnoj kulturi nakon tretmana s LPS-om i hTNF- $\alpha$ , određivanjem ekspresije proupalnih citokina CBA metodom protočnim citometrom .....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	28

4.1. ADHEZIJA SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	28
4.2. ULOGA S-PROTEINA I EGZOPOLISAHARIDA SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U MODULACIJI IMUNOLOŠKOG SUSTAVA .....	30
4.2.1. Izolacija S-proteina i egzopolisaharida <i>Lactobacillus</i> sojeva.....	30
4.2.2. Imunomodulacijski učinak sojeva bakterija mliječne kiseline te izoliranih S-proteina i egzopolisaharida.....	32
4.3. ULOGA S-PROTEINA I EGZOPOLISAHARIDA SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U ADHEZIJI I KOMPETITIVNOJ EKSKLUZIJI PATOGENA .....	37
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA.....	41

# 1. UVOD

Brojna istraživanja provedena u posljednja dva desetljeća, pokazuju važnost crijevne mikrobiote. Disbioza crijevne mikrobne zajednice prethodi različitim crijevnim bolestima i metaboličkim poremećajima poput upalnih bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel disease, IBD*), dijabetesa i pretilosti. U tom smislu, uloga probiotika kao modulatora crijevne mikrobiote intenzivno se istražuje u svrhu prevencije i liječenja spomenutih stanja. Probiotici su živi mikroorganizmi koji kada se primjenjuju u odgovarajućim količinama, blagotvorno djeluju na zdravlje domaćina (Monteagudo-Mera i sur., 2019). Kako bi probiotici pozitivno djelovali na zdravlje čovjeka, moraju posjedovati određena svojstva (Gupta i sur., 2018; Williams, 2010). Upravo je sposobnost adhezije jedno od najvažnijih svojstava pri odabiru potencijalnih probiotičkih sojeva. Adhezija na crijevne epitelne stanice i/ili mukus kojeg su proizvele, preduvjet je za kolonizaciju gastrointestinalnog trakta, antagoniziranje enteropatogena i modulaciju imunološkog sustava domaćina (Dlamini i sur., 2019; Dimitrov i sur., 2014). Bakterije mliječne kiseline (BMK) predstavljaju jednu od najznačajnijih skupina probiotičkih mikroorganizama, budući da promiču zdravlje domaćina održavanjem ravnoteže crijevne mikrobiote (Li i sur., 2020; Colombo i sur., 2018; Gupta i sur., 2018). Adhezija BMK na crijevne epitelne stanice, posredovana je različitim strukturama, uključujući S-proteine i egzopolisaharide opisane u ovom radu (Alp i sur., 2019).

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati posjeduju li odabrani sojevi BMK (*Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1) koji su izolirani iz majčinog mlijeka probiotička svojstva. Jedan od kriterija koje potencijalni probiotik mora zadovoljiti je antagonističko djelovanje prema štetnim mikroorganizmima. Prema tome, provedeno je *in vitro* ispitivanje utjecaja S-proteina i egzopolisaharida koje izolirani sojevi BMK sintetiziraju, na njihovu adheziju, a samim time i kompetitivnu ekskluziju patogene bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, korištenjem Caco-2 stanične linije porijeklom iz kolorektalnog karcinoma. Osim toga, proučavana je specifična sposobnost adhezije odabranih sojeva ovisno o proteinu ZG16 kojeg proizvode mukozne stanice epitela kolona. Imunomodulacijski učinak živih BMK te izoliranih S-proteina i egzopolisaharida, ispitan je određivanjem ekspresije proupalnih citokina IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ , *cytometric bead* metodom protočnim citometrom, nakon izlaganja Caco-2 stanica lipopolisaharidima bakterije *Escherichia coli* i hTNF- $\alpha$  (engl. *human tumor necrosis factor- $\alpha$ , hTNF- $\alpha$* ).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine raznoliku skupinu bakterija koje pokazuju određene morfološke, metaboličke i fiziološke sličnosti (Khalid, 2011). Poznate su po upotrebi prilikom fermentacije hrane te su odgovorne za poboljšanje okusa i teksture fermentiranih prehrambenih proizvoda (Mokoena, 2017). Gram-pozitivni su, nesporulirajući i nepokretni mikroorganizmi, čija deoksiribonukleinska kiselina ima nizak gvanin + citozin sadržaj. Zahtijevaju anaerobne ili fakultativno aerobne uvjete rasta, a mogu biti u obliku koka ili štapića. Sposobnost prilagodbe na različite uvjete staništa, bakterijama mliječne kiseline omogućava nastanjivanje raznolikih područja koja su bogata nutrijentima. Prema tome, BMK obitavaju u namirnicama poput mliječnih proizvoda, mesa i povrća, ali su i uobičajeni stanovnici ljudskih sluznica kao što su usna šupljina, urogenitalni i gastrointestinalni trakt (GIT) (Bintsis, 2018; Khalid, 2011). BMK imaju složene prehrambene potrebe za aminokiselinama, peptidima, nukleotidnim bazama, vitaminima, mineralima, masnim kiselinama i ugljikohidratima, a optimalni pH rasta BMK kreće se između 5,5 i 5,8 (Mokoena, 2017). Ne mogu sintetizirati komponente respiratornog lanca, citokrom i porfirin, stoga ne mogu generirati adenozin trifosfat (ATP) gradijentom protona. Shodno tome, BMK isključivo dobivaju ATP fermentacijom, najčešće šećera. Osim što su poznate po proizvodnji mliječne kiseline kao krajnjeg produkta fermentacije ugljikohidrata, BMK su uključene u proizvodnju drugih produkata poput organskih kiselina, poliola, egzopolisaharida i antimikrobnih spojeva te se zbog toga široko primjenjuju u prehrambenoj industriji, primjerice kao starter kulture (Bintsis, 2018; Khalid, 2011). Klasifikacija BMK ponajviše se temelji na staničnoj morfologiji (koki, štapići ili tetrade), načinu fermentacije glukoze (homolaktična ili heterolaktična fermentacija), rasponu temperature rasta, konfiguraciji proizvedene mliječne kiseline (D-, L-oblik mliječne kiseline ili oba oblika), sposobnosti rasta pri visokim koncentracijama soli i otpornosti na kiseline i lužine (Khalid, 2011). BMK su svrstane u koljeno *Firmicutes*, razred *Bacilli* i red *Lactobacillales* te uključuju rodove *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*, od kojih je *Lactobacillus* najveći te je većina vrsta iz roda *Lactobacillus* izolirana upravo iz GIT-a ljudi i životinja. Molekularne tehnike klasifikacije i identifikacije BMK, poput 16S rDNA sekvenciranja, danas sve više zamjenjuju tradicionalne fenotipske metode, budući da pružaju točniju identifikaciju pojedinačnih sojeva (Mokoena, 2017). Pripadnici reda *Lactobacillales*

imaju relativno mali genom, a broj gena varira između 1600 i 3000 (Khalid, 2011). BMK su tijekom evolucije izgubile oko 1000 gena, uključujući gene koji kodiraju za kofaktore, hem citokrome i katalazu te gene koji su uključeni u sporulaciju. Međutim, BMK su duplikacijom gena i horizontalnim prijenosom gena stekle oko 86 novih gena pa tako i gene koji su odgovorni za otpornost na antibiotike. BMK imaju cirkularne i linearne plazmide koji su uključeni u fermentaciju ugljikohidrata, aktivnost proteinaza, proizvodnju bakteriocina, mehanizme obrane od faga i mehanizme otpornosti na antibiotike (König i Fröhlich, 2017).

### 2.1.1. Metabolizam bakterija mliječne kiseline

BMK su kemotrofni mikroorganizmi koji energiju pridobivaju oksidacijom kemijskih spojeva (Khalid, 2011). Tri osnovne metaboličke aktivnosti BMK su glikoliza, proteoliza i lipoliza (Bintsis, 2018), a fermentacija šećera predstavlja osnovni proces pridobivanja energije. BMK mogu asimilirati ugljikohidrate homolaktičnom ili heterolaktičnom fermentacijom koje rezultiraju različitim krajnjim produktima (Khalid, 2011). Obligatorne homofermentativne BMK prevode ugljikohidrate u mliječnu kiselinu kao jedini krajnji produkt. Prva faza homolaktične fermentacije podrazumijeva reakcije glikolize prilikom kojih se heksoze prevode u piruvat koji se zatim reducira u mliječnu kiselinu (glikolizom 1 mola glukoze dobiju se 2 mola mliječne kiseline i 2 mola ATP-a). Neke od obligatornih homofermentativnih BMK su *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* i *Lactobacillus helveticus*. U stresnim uvjetima, kao što su ograničena dostupnost glukoze ili prisutnost drugih ugljikohidrata, visoke pH vrijednosti ili niske temperature, neki homofermentativni mikroorganizmi mogu proizvesti mravlju kiselinu djelovanjem piruvat-format liaze (Khalid, 2011; Bintsis 2018). Heterolaktična fermentacija je proces prilikom kojeg se uz mliječnu kiselinu kao krajnji produkt formiraju i koprodukti; ugljikov dioksid, etanol i/ili octena kiselina. Pentozna fosfatnim putem glukoza se degradira do gliceraldehid-3-fosfata, acetil-fosfata i ugljikovog dioksida. Zatim se gliceraldehid-3-fosfat glikolizom prevodi do mliječne kiseline, a acetil-fosfat se konvertira u etanol i/ili octenu kiselinu. Odnos između nastale količine etanola i octene kiseline ovisi o sposobnosti mikroorganizma da reoksidira nikotinamid adenin dinukleotid koji nastaje u ranim fazama procesa te o energetskim potrebama samog mikroorganizma. Obligatorne heterofermentativne BMK samo ovim metaboličkim putem fermentiraju ugljikohidrate, a neke od njih su *Levilactobacillus brevis*, *Limosilactobacillus fermentum* i *Limosilactobacillus reuteri* (Bintsis, 2018).

Budući da BMK za rast trebaju aminokiseline, vitamine i nukleotidne baze koje ne mogu same sintetizirati, osim ugljikohidrata, metaboliziraju i proteine (Bintsis, 2018). Ovisno o vrsti i soju, BMK je za rast potrebno 6 do 14 različitih aminokiselina, na primjer, pripadnici roda *Lactococcus* za nesmetan rast trebaju glutaminsku kiselinu, glicin, leucin, izoleucin, histidin, metionin i valin. Obzirom da su aminokiseline u mlijeku sastavni dio proteina, a sama količina slobodnih aminokiselina je nedostatna za potrebe BMK, hidroliza proteina u mlijeku, najčešće kazeina, jedna je od centralnih metaboličkih aktivnosti BMK (Kieliszek i sur., 2021; Bintsis, 2018). Osim što proteoliza BMK rezultira proizvodnjom niza spojeva koji imaju blagotvoran učinak na ljude, upravo je taj proces odgovoran za razvoj karakterističnog okusa i teksture fermentiranih mliječnih proizvoda (Wang i sur., 2021; Bintsis, 2018). Proteoliza se kod BMK odvija u nekoliko koraka, uključujući degradaciju proteina, transport peptida, degradaciju peptida i katabolizam aminokiselina. Proces započinje djelovanjem membranski vezanim proteinazama koje cijepaju proteine do oligopeptida, zatim sljedi transport dipeptida, tripeptida i oligopeptida u stanice, nakon čega se peptidi u stanici cijepaju na aminokiseline djelovanjem različitih peptidaza poput endopeptidaza, aminopeptidaza, dipeptidaza, tripeptidaza i prolin specifičnih peptidaza (Wang i sur., 2021).

Lipoliza kod BMK podrazumjeva razgradnju mliječne masti do slobodnih masnih kiselina i glicerola. U odnosu na proteolizu, lipoliza manje pridonosi razvoju tipičnih organoleptičkih svojstava fermentirane hrane, međutim, pojedine slobodne masne kiseline odgovorne su za aromu određenih sireva. Osim toga, reagiraju s alkoholima ili slobodnim sulfhidrilnim skupinama, formirajući estere i tioestere te su prekursori brojnih okusnih komponenti kao što su laktoni (Bintsis, 2018).

### 2.1.2. Adhezijski mehanizmi bakterija mliječne kiseline

GIT odraslog čovjeka uobičajeno sadrži oko  $10^{14}$  bakterijskih stanica s više od 1000 različitih vrsta bakterija (DeGruttola i sur., 2016). Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u održavanju homeostaze, utječe na metaboličke procese, fiziološke funkcije, imunološki sustav, probavu hrane i štiti domaćina od patogena (Antal i sur., 2019). Kada je homeostaza crijevnih bakterija poremećena, dolazi do disbioze. Disbioza je definirana neravnotežom u sastavu bakterija, promjenama u metaboličkim aktivnostima bakterija ili promjenama u distribuciji bakterija unutar crijeva. Disbioza mikrobiote podrazumijeva gubitak ukupne bakterijske raznolikosti odnosno gubitak korisnih bakterija i prekomjerni rast potencijalno patogenih

bakterija (DeGruttola i sur., 2016). Disbioza mikrobiote GIT-a smatra se jednim od najčešćih čimbenika koji pridonose razvoju mnogih gastrointestinalnih bolesti (de Moreno de LeBlanc i LeBlanc, 2014). Patogeni mikroorganizmi se prije svega moraju pričvrstiti za površinu sluznice kako bi izazvali crijevne infekcije. Mikroorganizmi poput BMK s visokom adhezijskom sposobnošću, to jest s većim afinitetom za crijevnu sluznicu u odnosu na patogene, od velikog su značaja, obzirom da se učinkovitije vežu i tako isključuju patogene (Alp i sur., 2019). Smatra se da je bakterijska adhezija na intestinalne površine najprije potaknuta nespecifičnim fizičkim vezanjem kao što su hidrofobne interakcije, nakon čega slijedi adhezija posredovana specifičnim komponentama stanične stijenke (Monteagudo-Mera i sur., 2019). Crijevne epitelne stanice prekriva mukozni sloj koji se većinom sastoji od glikoziliranih proteina (mucina) i glikolipida. Osim što pruža zaštitu od enteropatogena i potencijalno štetnih antigena, mukozni sloj djeluje kao mjesto za pričvršćivanje bakterija koje koloniziraju crijeva (van Zyl i sur., 2020; Boekhorst i sur., 2006). BMK poput *L. reuteri* posjeduju površinske molekule kao što su mukus-vezujući proteini (engl. *Mucus-binding proteins*). Mukus-vezujući proteini sadrže Mub i/ili MucBP (engl. *MUCin-Binding Protein*) domene i posreduju u interakciji s mucinima. Iako su MucBP domene prisutne kod različitih bakterijskih vrsta, uključujući i patogene poput *Listeria monocytogenes*, one se gotovo isključivo nalaze u BMK izoliranim iz GIT-a čovjeka (Alp i sur., 2019; Monteagudo-Mera i sur., 2019). Osim toga, smatra se da lipoteihonska kiselina prisutna na staničnoj površini BMK djeluje kao posrednik adhezije na epitelne stanice čovjeka. Nadalje, egzopolisaharidi koje mikroorganizmi izlučuju van stanice, sudjeluju u nespecifičnoj adheziji na biotičke i abiotičke strukture. Adhezija posredovana egzopolisaharidima ovisi o njihovoj strukturi, vrsti i koncentraciji u GIT-u (Alp i sur., 2019). Naime, osim što pospješuju adheziju različitih probiotičkih sojeva na crijevnu sluznicu, egzopolisaharidi mogu „prekriti“ adhezivne faktore probiotika, ometajući njihovo prianjanje na epitelne crijevne stanice. Štoviše, egzopolisaharidi se mogu vezati na crijevni mukus i kompetitivno inhibirati adheziju samih probiotika, što može rezultirati vezanjem enteropatogena na crijeva posredstvom egzopolisaharida (Alp i sur., 2019; Xu i sur., 2019). Pretpostavlja se da flagele i pili BMK također pospješuju proces adhezije (Monteagudo-Mera i sur., 2019). Pojedine *Lactobacillus* vrste imaju SpaCBA pilus građen od tri vrste pilin podjedinica (SpaA, SpaC i SpaB). SpaCBA pilus prvi put je okarakteriziran kod bakterije *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. Afinitet za komponente crijevne površine poput mukusa, kolagena i epitelnih stanica, uglavnom se pripisuje SpaC podjedinici SpaCBA pilusa (Megta i sur., 2020; Alp i sur., 2019). Ostali površinski proteini poput fibronektin-vezujućih proteina (engl. *Fibronectin-binding proteins*, *FBPs*) i S-proteina (engl. *Surface layer proteins*) također

doprinosu bakterijskoj adheziji na crijevnu sluznicu, a samim time i procesu ekskluzije patogena (Monteagudo-Mera i sur., 2019).

## 2.2. PROBIOTICI

Većina BMK ima GRAS status (engl. *Generally Recognized as Safe*) te se danas one smatraju jednom od najznačajnijih skupina probiotičkih mikroorganizama (Colombo i sur., 2018; Gupta i sur., 2018). Osim BMK, naročito pripadnika rodova *Lactobacillus* i *Enterococcus*, bakterijske vrste iz roda *Bifidobacterium*, *Escherichia coli* Nissle 1917 i kvasac *Saccharomyces boulardii* najčešće su korišteni mikroorganizmi koji pokazuju probiotičko djelovanje i sastojci su brojnih dodataka prehrane i funkcionalne hrane (Plaza-Diaz i sur., 2019). Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji, probiotici su skupina živih mikroorganizama koji kada se konzumiraju u adekvatnoj količini, ostvaruju blagotvoran učinak na zdravlje domaćina. Probiotički sojevi BMK mogu se izolirati iz različitih izvora kao što su fermentirana hrana, životinje i ljudi (Gupta i sur., 2018). Međutim, većina probiotika dostupna na tržištu, izolirana je iz humane mikrobiote zbog njihove sigurnosti, sposobnosti preživljavanja u GIT-u i adhezijske sposobnosti (de Melo Pereira i sur., 2018; Gupta i sur., 2018).

Da bi se neki mikroorganizam smatrao probiotikom, mora zadovoljavati određene kriterije (Soccol i sur., 2010). Potencijalni probiotici moraju proći sigurnosnu procjenu što podrazumijeva taksonomsku identifikaciju, određivanje metaboličke aktivnosti te provjeru virulentnosti, toksičnosti, hemolitičke aktivnosti i rizika od prijenosa gena odgovornih za otpornost na antibiotike (de Melo Pereira i sur., 2018; Gupta i sur., 2018). Prije svega, probiotici moraju biti otporni na stresne uvjete GIT-a, to jest na djelovanje enzima prisutnih u usnoj šupljini i želucu, niske pH vrijednosti, žučne soli, želučane sokove i toplinski šok. Zatim treba procijeniti imaju li potencijalni probiotici sposobnost adhezije i koloniziranja epitelnih stanica GIT-a. Svojstvo mikrobne adhezije na epitelne stanice sisavaca obično se analizira na staničnim linijama kao što su stanična linija kolorektalnog karcinoma Caco-2 i stanična linija kolorektalnog adenokarcinoma HT-29. Nadalje, važno je da probiotici djeluju protiv potencijalnih patogena, proizvodnjom izvanstaničnih antimikrobnih komponenti (organske kiseline, vodikov peroksid, bakteriocini i peptidi male molekulske mase), kompetitivnom ekskluzijom, koagregacijom i stimuliranjem imunološkog sustava (de Melo Pereira i sur., 2018). Pri odabiru mogućih probiotika, nužno je utvrditi njihovu učinkovitost. Ovdje se



učinkovitost odnosi na fiziološku i genetičku stabilnost, sposobnost reprodukcije, dobra senzorska svojstva i održivost soja tijekom obrade proizvoda, skladištenja pa do kraja roka trajanja proizvoda (Gupta i sur., 2018). Kako bi se postigla zdravstvena dobrobit, probiotici moraju biti održivi i prisutni u visokim koncentracijama, obično od  $10^6$  do  $10^8$  CFU/g proizvoda. Prilikom odabira probiotika za ljudsku upotrebu, provode se ispitivanja *in vitro* i testovi na životinjskim modelima, nakon čega je potrebno provesti klinička ispitivanja kako bi se potvrdila njihova sigurnost i djelotvornost (de Melo Pereira i sur., 2018; Shewale i sur., 2014).

### 2.2.1. Mehanizmi djelovanja probiotika

Probiotici pokazuju značajan terapijski potencijal (Bermudez-Brito i sur., 2012). van Zyl i suradnici (2020) navode samo neke od blagotvornih učinaka probiotika koji uključuju stimulaciju imunološkog sustava domaćina, prevenciju dijareje uzrokovane primjenom antibiotika, liječenje upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory bowel disease, IBD*) i sindroma iritabilnog crijeva (engl. *Irritable bowel syndrome, IBD*), ublažavanje intolerancije na laktozu, snižavanje razine kolesterola i prevenciju gastrointestinalnih infekcija. Međutim, mehanizmi koji su odgovorni za pozitivno djelovanje probiotika na zdravlje domaćina još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni (Bermudez-Brito i sur., 2012). Pretpostavlja se da je određeni učinak probiotika rezultat kombinacije više različitih načina djelovanja te da je specifičan za svaki pojedini soj (van Zyl i sur., 2020; Bermudez-Brito i sur., 2012). Harzallah i Belhadj (2013) u svom radu predlažu tri temeljna mehanizma djelovanja probiotika: probiotici utječu na ljudsko zdravlje jačanjem crijevne barijere, stupanjem u interakcije s drugim prisutnim mikroorganizmima i djelovanjem na imunološki sustav domaćina. Neki od mehanizama djelovanja probiotika prikazani su na slici 1.

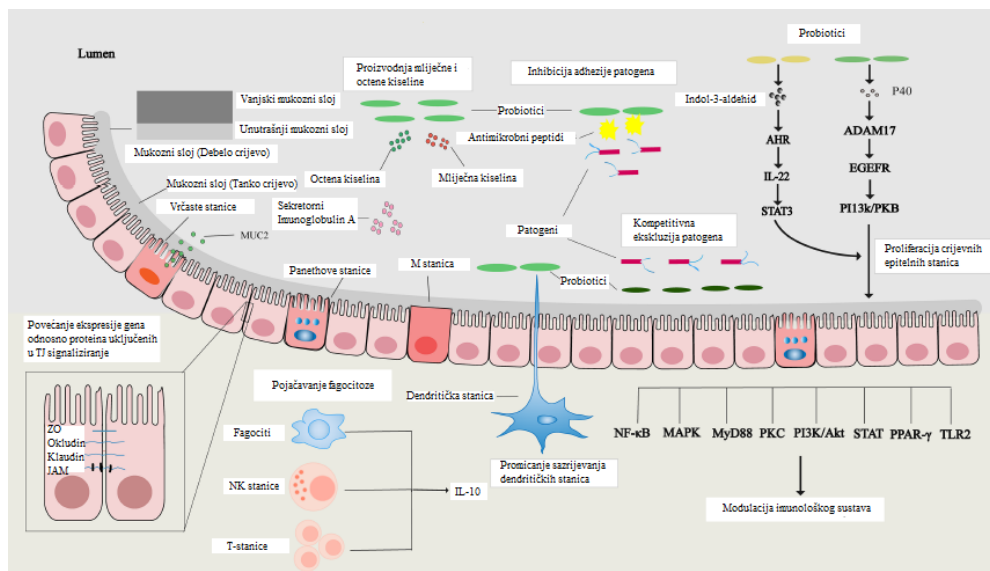
Crijevni epitel predstavlja selektivno propusnu barijeru, omogućava apsorpciju hranjivih tvari, sprječava gubitak vode i elektrolita, dok istovremeno ograničava ulazak potencijalno štetnih antigena i mikroorganizama (Suárez i sur., 2021; Vancamelbeke i Vermeire, 2017). Ukoliko se naruši homeostaza crijevne barijere, štetni čimbenici mogu dospjeti u submukozu i izazvati upalne reakcije koje često rezultiraju crijevnim poremećajima kao što je IBD (Bermudez-Brito i sur., 2012). Međustanični čvrsti spojevi (engl. *Tight junction, TJ*) dio su crijevne mehaničke barijere, a sastoje se od međustaničnih proteina poput *zonula occludens* (ZO) i cingulina te membranskih proteina; okcludina, klaudina i spojnih adhezijskih

molekula (engl. *Junction adhesion molecule, JAM*). Studije pokazuju da probiotici povećavaju ekspresiju gena koji kodiraju za spomenute proteine i uključeni su u TJ signaliziranje te tako održavaju integritet crijevne epitelne barijere (Gou i sur., 2022; Bermudez-Brito i sur., 2012). Primjerice, *Lactiplantibacillus plantarum* MB452 povećava ekspresiju gena koji kodiraju za proteine ZO-1, ZO-2, okcludin i cingulin i regulira ekspresiju gena koji su uključeni u razgradnju proteina čvrstog spoja što stabilizira čvrsti spoj i pospješuje funkciju crijevne barijere (Gou i sur., 2022). Osim toga, Gou i suradnici (2022) ističu da probiotici mogu ublažiti oštećenja crijeva i pomoći u obnovi crijevne barijere kroz regulaciju apoptoze i proliferacije crijevnih epitelnih stanica. Da bi enteropatogeni kolonizirali crijevni epitel i izazvali infekciju, najprije moraju prodrijeti kroz mukozni sloj (van Zyl i sur., 2020). Studije pokazuju da probiotici održavaju funkciju crijevne barijere, reguliranjem ekspresije mucina i formiranjem mukoznog sloja. Na primjer, *Lactobacillus acidophilus* A4 povećava ekspresiju MUC2 (glavni sekretorni mucin GIT-a) što inhibira vezanje *Escherichia coli* O157:H7 na HT-29 crijevne epitelne stanice (Gou i sur., 2022). Osim toga, probiotici potiču epitelne stanice na otpušanje antimikrobnih defenzina koji djeluju protiv bakterija, virusa i gljivica te stabiliziraju funkciju crijevne barijere (Bermudez-Brito i sur., 2012).

Kompetitivna ekskluzija podrazumijeva natjecanje različitih vrsta bakterija za dostupne hranjive tvari i receptorska mjesta intestinalnog trakta (Bermudez-Brito i sur., 2012; Collado i sur., 2010). Probiotički sojevi s visokom adhezijskom sposobnošću vežu se na ista receptorska mjesta u GIT-u kao brojni patogeni i na taj način sprječavaju njihovu adheziju (van Zyl i sur., 2020). Pokazano je da *L. rhamnosus* GG mehanizmom kompetitivne ekskluzije inhibira adheziju bakterije *Enterococcus faecium*. Pili bakterije *L. rhamnosus* GG posreduju u vezanju na crijevnu sluznicu što ometa adheziju *E. faecium* koja posjeduje slične pili strukture (Monteagudo-Mera i sur., 2019). Osim toga, probiotici mogu modificirati svoju okolinu kako bi je učinili manje pogodnom za rast patogena (Collado i sur., 2010). Antimikrobno djelovanje probiotika očituje se u njihovoj sposobnosti sinteze organskih kiselina i antibakterijskih peptida. Probiotičke BMK fermentiraju ugljikohidrate u GIT-u, što rezultira sintezom organskih kiselina poput mliječne i octene kiseline koje snižavaju pH i tako inhibiraju rast prisutnih patogena. BMK proizvode bakteriocine koji uzrokuju destrukciju ciljnih stanica formiranjem pora i/ili inhibicijom sinteze stanične stijenke. Na primjer, bakteriocini nisin, kojeg proizvodi *Lactococcus lactis*, plantaricin bakterije *Lactiplantibacillus plantarum* i lakticin B iz *L. acidophilus* djeluju protiv enteropatogena iz hrane uključujući rodove *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus* i druge (van Zyl i sur., 2020; Bermudez-Brito i sur., 2012). Pojedini

*Bifidobacterium* i *Lactobacillus* sojevi sintetiziraju konjugiranu linolnu kiselinu (CLA) koja potencijalno ima antikancerogenu aktivnost. Štoviše, vrste iz roda *Lactobacillus* sintetiziraju antifungalne tvari poput benzojeve kiseline, metilhidantoina, mevalonolaktona i kratkolančanih masnih kiselina. Osim toga, probiotici proizvode dekonjugirane žučne kiseline (engl. *de-conjugated bile acids*) koje pokazuju jači antimikrobni učinak u odnosu na žučne soli samog domaćina (Bermudez-Brito i sur., 2012).

Poznato je da probiotici imaju imunomodulacijski učinak (Bermudez-Brito i sur., 2012). Probiotičke bakterije mogu potaknuti protuupalnu reakciju urođene imunosti signalizirajući dendritičkim stanicama da luče protuupalne citokine kao što je interleukin 10 (IL-10). Osim toga, istraživanja pokazuju da pojedini probiotički sojevi smanjuju proizvodnju proupalnih citokina i na taj način sprječavaju upalu izazvanu patogenima. Nadalje, probiotici stimuliraju proizvodnju imunoglobulina A. Oslobođena antitijela u lumenu crijeva mogu inhibirati adheziju patogena na crijevne epitelne stanice blokiranjem njihovih adhezivnih receptora na staničnoj membrani. Određeni probiotički sojevi moduliraju imunološke mehanizme domaćina djelovanjem na fagocite kao što su makrofagi. Istraživanjem na miševima, pokazano je da je inhibicija enteropatogena *Pseudomonas aeruginosa* i *L. monocytogenes* sojem *Lactocaseibacillus casei* u korelaciji s povećanjem broja makrofaga (van Zyl i sur., 2020).



**Slika 1.** Mehhanizmi djelovanja probiotika (prema Gou i sur., 2022)

### 2.3. EGZOPOLISAHARIDI

Egzopolisaharidi (EPS) su ekstracelularni biološki polimeri koje mikroorganizmi, uključujući BMK, izlučuju kao odgovor na stres (Maajid i sur., 2022). Budući da BMK imaju GRAS status, egzopolisaharidi BMK, također se smatraju sigurnim za upotrebu pa se često primjenjuju u prehrambenoj industriji kao prirodni zgušnjivači, emulgatori i stabilizatori u svrhu poboljšanja fizikalno-kemijskih svojstava prehrambenih proizvoda. Nadalje, EPS pokazuju funkcionalna svojstva poput antioksidativnog, antikancerogenog, imunomodulacijskog, antibakterijskog, hipoglikemijskog i antihipertenzivnog djelovanja, snižavaju kolesterol u krvi i promiču kolonizaciju probiotika u crijevima domaćina (Xu i sur., 2019). Najistaknutiji rodovi BMK koji proizvode EPS su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Weisella* (Maajid i sur., 2022).

Obzirom na strukturu, EPS se dijele na homopolisaharide i heteropolisaharide. Homopolisaharidi se sastoje od D-glukoernih ili D-fruktoernih podjedinica. Homopolisaharidi koji su sastavljeni od D-glukoernih podjedinica povezanih  $\alpha$ - ili  $\beta$ -glikozidnim vezama, formiraju  $\alpha$ -glukane odnosno  $\beta$ -glukane. Homopolisaharidi sastavljeni od D-fruktoernih podjedinica povezanih  $\beta$ -glikozidnim vezama formiraju fruktane; levan i inulin. S druge strane, heteropolisaharidi se sastoje od dvije do osam različitih monosaharidnih podjedinica, a to su obično D-glukoza, D-galaktoza i L-ramnoza. Osim toga, N-acetil-glukozamin, N-acetil-galaktozamin, D-glukuronska kiselina, D-manoza i glicerol, sastavne su komponente heteropolisaharida (Maajid i sur., 2022).

Biosinteza homopolisaharida odvija se izvan bakterijske stanice uslijed djelovanja izvanstaničnih ili na stanicu vezanih glikansaharaza koje pripadaju klasi glikotransferaza. Navedeni enzimi kataliziraju hidrolizu saharoze uslijed čega se energija oslobođena iz glikozidnih veza koristi za vezanje monosaharidnih ostataka na rastući lanac glikana, što rezultira glukonom i fruktanom. Obzirom na njihov produkt, glikansaharaze se dijele na transglukozidaze i transfruktozidaze. Transglukozidaze uključuju dekstransaharazu, mutansaharazu i reuteransaharazu koje su kodirane *gtf* genima, a transfruktozidaze, levansaharazu i inulosaharazu, kodirane *fff* genima. Biosinteza heteropolisaharida je znatno složenija u odnosu na biosintezu homopolisaharida (Xu i sur., 2019). Iako mehanizam biosinteze heteropolisaharida još nije u potpunosti razjašnjen, Xu i sur. (2019) u svom radu navode mogući biosintetski put heteropolisaharida koji se odvija u četiri koraka: 1) Transport

i fosforilacija šećera fosfoenol piruvat fosfotransferaza sistemom ili transport šećera permeazom; 2) Formiranje šećernih nukleotida; 3) Formiranje i transport EPS-ponavljajućih jedinica; 4) Polimerizacija ponavljajućih jedinica i eksport dugačkog lanca heteropolisaharida.

### 2.3.1. Funkcija egzopolisaharida

EPS povećavaju šanse preživljavanja probiotičkih sojeva u GIT-u uslijed formiranja egzopolisaharidnog zaštitnog sloja koji povećava toleranciju probiotika na nepovoljne uvjete poput niskog pH, prisutnosti soli žučnih kiselina i različitih probavnih enzima. Osim toga, kao što je već spomenuto, posreduju u adheziji na epitelne crijevne stanice što olakšava kolonizaciju intestinalnog trakta. Nadalje, EPS pospješuju kolonizaciju crijeva imunološkom evazijom, to jest formiranjem zaštitnog štita (engl. *Protective shield*) ili induciranjem regulatornih T-stanica, što rezultira imunološkom tolerancijom na sojeve. Ujedno, probiotički sojevi koji proizvode EPS natječu se s patogenima za nutrijente i prostor te na taj način ograničavaju njihov rast (Xu i sur., 2019).

Prebiotici su neprobavljivi sastojci hrane ili tvari koje selektivno potiču rast i/ili aktivnost bakterija koje koloniziraju debelo crijevo i promiču zdravlje (Bindels i sur., 2015). Pojedini EPS koje proizvode BMK, mogu se koristiti kao prebiotici, budući da su visoko otporni na uvjete GIT-a i potiču rast probiotika u crijevima. Tako na primjer, homopolisaharid dekstran kojeg sintetizira *Weisella cibaria* RBA12, pokazuje visoku otpornost na hidrolizu umjetnim želučanim sokom,  $\alpha$ -amilazom i crijevnom tekućinom te pospješuje rast probiotičkih *Bifidobacteria* i *Lactobacillus species* (Xu i sur., 2019). Jurášková i suradnici (2022) u svom radu navode primjer istraživanja u kojem je pokazano da prisutnost EPS-a u GIT-u domaćina potiče rast laktobacila koji proizvode laktazu što umanjuje simptome intolerancije na laktozu.

Kao što je i prethodno spomenuto, EPS pokazuju antitumorsko i antioksidativno djelovanje. Istraživanja *in vitro* pokazuju da se antitumorska aktivnost EPS-a očituje u njihovoj sposobnosti inhibicije proliferacije tumorskih staničnih linija poput HT-29, Caco-2, stanične linije hepatoma (HepG-2), stanične linije raka gušterače (PANC-1), Ehrlichovih tumorskih stanica (EAC), stanica raka dojke (MCF-7) i stanica raka želuca (BGC-823) (Xu i sur., 2019). Nakupljanje slobodnih radikala dovodi do oksidativnog stresa u živim organizmima i oštećuje makromolekule poput deoksiribonukleinske i ribonukleinske kiseline, proteina i lipida što rezultira oštećenjima tkiva koja kasnije mogu doprinjeti razvoju ili progresiji raznih bolesti

poput neurodegenerativnih poremećaja, raka i pretilosti (Jurášková i sur., 2022). Antioksidativno djelovanje EPS-a, dokazano je *in vitro* na temelju njihove sposobnosti vezanja 2,2-difenil-1-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), hidroksil i superoksid radikala te sposobnosti inhibiranja peroksidacije lipida. Primjerice, pomoću eksperimentalnog modela kolitisa, pokazano je da *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 soj, koji daje visok prinos EPS-a, reducira oksidativni stres (Xu i sur., 2019).

Mnoga istraživanja *in vitro* pokazuju da EPS svojom antibakterijskom aktivnošću kontroliraju rast patogena i formiranje biofilmova te sprječavaju nastanak infekcija uzrokovanih patogenima (Xu i sur., 2019). Na primjer, pokazano je da heteropolisaharidi izolirani iz *Lactobacillus kefiranofaciens* učinkovito inhibiraju patogene poput *L. monocytogenes* i *Salmonella enteritidis*. Osim toga, smatra se da je antiviralna aktivnost EPS-a rezultat njihove imunomodulatorne sposobnosti, što je istraženo na miševima zaraženim virusom gripe. Rezultati istraživanja pokazuju da EPS koje sintetizira *L. bulgaricus* ublažavaju virusnu infekciju, poticanjem aktivnosti NK stanica (engl. *natural killer cells*) i proizvodnjom imunoglobulina G1 i A (Jurášková i sur., 2022).

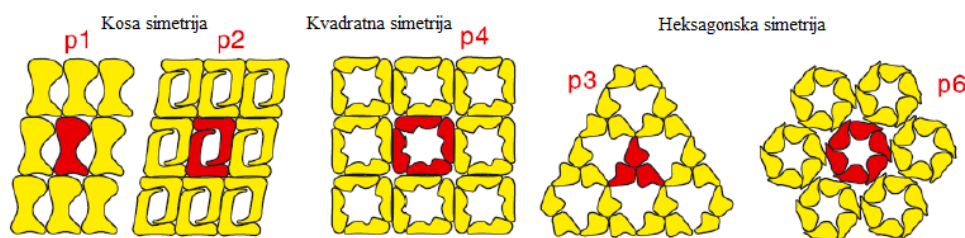
Prema dosadašnjim istraživanjima, veličina i naboj EPS-a, glavni su čimbenici koji određuju njihov utjecaj na imunitet. Iako postoje iznimke, EPS manje molekulske mase u pravilu pokazuju bolji imunološki učinak. Smatra se da je razlog bolja topljivost u vodi i lakše vezanje na stanične receptore. Osim toga, EPS s ukupnim negativnim nabojem pri fiziološkom pH rasponu pokazuju bolji imunostimulirajući učinak u odnosu na neutralne EPS-e. Imunomodulacijska aktivnost egzopolisaharida BMK proučava se uz pomoć modela koji se temelje na staničnim linijama sličnim makrofagima. RAW264.7, jedan je od najčešćih staničnih modela koji se koriste u tu svrhu. Makrofagi imaju važnu ulogu u obrani organizma od mikrobnih infekcija i tumora. EPS aktiviraju makrofage tako što potiču lučenje proupalnih (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL- $\beta$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , NO) i protuupalnih (IL-4, IL-10) medijatora te kemokina (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , CCL-20), povećavaju fagocitnu sposobnost, potiču morfološke preinake i proliferaciju. Limfociti slezene miša (NK stanice, T-stanice i B-stanice) također se koriste za *in vitro* imunološka istraživanja EPS-a. Studije pokazuju da EPS bakterije *L. plantarum* promiču proizvodnju dušikovog oksida, interleukina-12p70, kemokina RANTES (engl. *Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*) i ekspresiju MHC II i CD86 i na taj način aktiviraju dendritičke stanice koje predočuju antigene T-stanicama imunološkog sustava. Miševi koji su imunosuprimirani uslijed tretiranja ciklofosfamidom,

koriste se kao modeli za *in vivo* istraživanja učinaka EPS-a na imunitet (Xu i sur., 2019). Shin i sur. (2016) u svom radu, navode da se EPS bakterije *Pediococcus pentosaceus* KFT18 mogu koristiti kao imunostimulansi, budući da povećavaju imunološke indekse timusa i slezene te broj limfocita i neutrofila u modelu imunosuprimiranih miševa. Na miševima se proučava i blagotvorno djelovanje EPS-a na potpuno zdrave pojedince. Prema tome, EPS, osim što reguliraju aktivnost NK stanica, razinu citokina, dušikovog oksida i imunoglobulina A i G u serumu, reguliraju i proizvodnju citokina i imunoglobulina crijevne sluznice i razinu imunoglobulina A u fecesu (Xu i sur., 2019).

Povišen krvni tlak i kolesterol u krvi povećavaju rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Sve veći broj studija pokazuje da EPS mogu regulirati razinu kolesterola u serumu pojačavanjem lučenja žučnih kiselina (Jurášková i sur., 2022). Hipoglikemijsko djelovanje EPS-a očituje se u njihovoj sposobnosti inhibicije aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze. Nadalje, istraživanje na spontano hipertenzivnim štakorima pokazuje da kefiran, EPS kojeg proizvodi *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B, smanjuje krvni tlak inhibicijom aktivnosti angiotenzin I konvertirajućeg enzima (Xu i sur., 2019).

## 2.4. S-PROTEINI

S-sloj (engl. *S-layer/surface layer*) je pravilno uređen, parakristalni, visoko porozni, dvodimenzionalni sloj koji tijekom svih stadija rasta i stanične diobe u potpunosti prekriva staničnu površinu *Archaea* i mnogih bakterija (Gerbino i sur., 2015; Fagan i sur., 2014; Sleytr i sur., 2011). S-sloj je obično debljine od 5 do 20 nm, dok debljina S-sloja kod *Archaea* može doseći 70 nm (Pum i Sleytr, 2014). Sastoji od identičnih proteinskih ili glikoproteinskih podjedinica koje su poravnate po kosoj, kvadratnoj ili heksagonskoj simetriji što je vidljivo elektronskim mikroskopom i shematski prikazano na slici 2 (Gerbino i sur., 2015; Alp i sur., 2020).



**Slika 2.** Shematski prikaz različitih vrsta rešetki S-sloja (prema Mobili i sur., 2010)

Neke bakterije posjeduju dva ili više S-slojeva posloženih jedni na druge, a sastoje se od različitih vrsta podjedinica. Pore S-sloja zauzimaju od 30 do 70 % površine, identične su veličinom i morfologijom, a njihov promjer iznosi od 2 do 8 nm (Sleytr i sur., 2011). Proteini koji čine S-sloj nazivaju se S-proteinima, njihova molekulska masa kreće se između 25 do 200 kDa. Imaju visok sadržaj kiselih, hidrofobnih aminokiselina i lizina, a siromašni su aminokiselinama sa sumporom. Samim time, S-proteini imaju negativan ukupan naboj i nisku izolektričnu točku. Iznimka su S-proteini bakterija iz roda *Lactobacillus*, čija se izoelektrična točka kreće u rasponu od 9,4 do 10,4. Kod Gram-pozitivnih bakterija i nekih *Archaea*, S-sloj je nekovalentno vezan na komponente stanične stijenke poput peptidoglikana, polimera sekundarne stanične stijenke i pseudomureina, dok je kod Gram-negativnih bakterija, S-sloj pričvršćen za lipopolisaharide vanjske membrane stanice. S-proteini građeni su od dvije strukturne regije; regija odgovorna za vezanje na staničnu stijenku i regija odgovorna za samostalno organiziranje S-proteina u S-sloj (Pavkov-Keller i sur., 2011). Regija odgovorna za vezanje S-proteina na staničnu stijenku nalazi se na N- ili C-terminalnom kraju. Pojedine bakterije na N-terminalnom kraju posjeduju karakteristične SLH domene (engl. *S-layer homology*) koje se sastoje od oko 55 aminokiselina i uključene su u vezanje S-proteina na staničnu stijenku prepoznavanjem SCWP-a (engl. *Secondary Cell Wall Polymer*). S-proteini Gram-negativnih bakterija vežu se svojim N- ili C-terminalnim krajem za komponente vanjske membrane (Pavkov-Keller i sur., 2011; Sleytr i sur., 2011). S-proteini imaju široku primjenu zahvaljujući mogućnosti modifikacije njihovih prirodnih svojstava tehnikama genetičkog inženjerstva. Mogu se koristiti kao matriks za imobilizaciju funkcionalnih molekula i nanočestica, za proizvodnju uređaja za dijagnostiku, membrana za ultrafiltraciju i biosenzora, za razvoj cjepiva i drugo (Sleytr i sur., 2011).

#### 2.4.1. Funkcija S-proteina

Obzirom na dosadašnja istraživanja, smatra se da S-proteini određuju i održavaju oblik stanice, djeluju kao imunomodulatori, molekularno sito i mjesto vezanja za različite molekule ili ione te bakterijama omogućavaju adheziju (Gerbino i sur., 2015). Osim biotehnoški važnih bakterija, patogeni mikroorganizmi također eksprimiraju S-proteine koji djeluju kao faktori virulencije i osiguravaju adheziju na stanice domaćina i komponente izvanstaničnog matriksa te koagregaciju s drugim mikroorganizmima (Alp i sur., 2020; Gerbino i sur., 2015; Sleytr i sur., 2014). Nadalje, S-proteini sudjeluju u formiranju biofilma i zaštiti bakterijske stanice od



nepovoljnih uvjeta poput promjene pH, radijacije, mehaničkog i osmotskog stresa, bakteriofaga i drugo (Gerbino i sur., 2015). Unatoč mnoštvu predloženih funkcija, ne postoji jedinstvena uloga S-sloja karakteristična za sve mikroorganizme koji ga posjeduju, a kod mnogih vrsta njegova uloga je i dalje nepoznata. Međutim, jasno je da su S-proteini od velikog značaja bakterijama koje ih proizvode zbog svoje visoke zastupljenosti, konvergente evolucije i metaboličkog opterećenja potrebnog za njihovu sintezu i održavanje (Fagan i sur., 2014).

Budući da S-proteini čine vanjski sloj mikroorganizama, ostvaruju izravan kontakt s okolinom zbog čega se smatra da su odgovorni za njihova površinska svojstva poput sposobnosti agregacije i adhezije na makromolekule ekstracelularnog matriksa i epitelne stanice (Gerbino i sur. 2015; Mobili i sur., 2010). Autoagregacija (nakupljanje bakterija istog soja) karakteristična za probiotičke sojeve, predstavlja prvi korak u adheziji na crijevne epitelne stanice (Janković i sur., 2012; Mobili i sur., 2010). Štoviše, BMK mogu spriječiti adheziju patogenih bakterija na crijevnu sluznicu formiranjem barijere uslijed autoagregacije (Li i sur., 2015). Sposobnost agregiranja pojedinih BMK s patogenima to jest koagregacija isto tako smanjuje vjerojatnost vezanja patogena na crijevni epitel i rezultira inhibicijom rasta patogenih sojeva u gastrointestinalnom i urogenitalnom traktu (Alp i sur., 2020; Li i sur., 2015). Uloga S-proteina u agregacijskim procesima istražuje se njihovim uklanjanjem s bakterijske površine djelovanjem kemijskih sredstava poput litijevog klorida. Prema tome, uklanjanje S-sloja rezultira smanjenom sposobnošću autoagregacije kod različitih vrsta iz roda *Lactobacillus* (Gerbino i sur., 2015; Hynönen i Palva, 2013). Osim toga, Alp i suradnici (2020) su pokazali da uklanjanje S-proteina uvelike smanjuje koagregaciju pojedinih sojeva BMK sa *Salmonella enterica* serotip *Enteritidis*. Kao što je već navedeno, adhezijska sposobnost jedan je od glavnih kriterija za selekciju potencijalnih probiotika. Preduvjet je za kolonizaciju crijevne sluznice, omogućava probiotičkim sojevima interakciju s domaćinom, modulaciju imunološkog sustava domaćina i antagonističko djelovanje prema nepoželjnim mikroorganizmima (Bermudez-Brito i sur., 2012). Uloga S-sloja u adheziji, demonstrirana je njegovim uklanjanjem kod soja *Lactobacillus acidophilus* M92 što rezultira smanjenom bakterijskom adhezijom na svinjski crijevni epitel kao i na mišje epitelne stanice tankog crijeva. Sposobnost adhezije na proteine izvanstaničnog matriksa kao što su kolagen, laminin, fibronektin i fibrinogen, intenzivno se istražuje kod raznih sojeva laktobacila, budući da potencijalno ima važnu ulogu u kompeticiji s patogenima (Gerbino i sur., 2015). Gerbino i suradnici (2015) navode primjer istraživanja u kojem je pokazana sposobnost S-proteina bakterije *Lactobacillus crispatus* da inhibiraju adheziju enterotoksičnog soja *E. coli* na laminin.

Druga važna funkcija S-proteina podrazumjeva njihovu ulogu mehaničke barijere koja bakterijama pruža zaštitu u nepovoljnim uvjetima poput onih u GIT-u. Usporedbom preživljavanja pojedinih *Lactobacillus* sojeva u simuliranim uvjetima želučanog i crijevnog soka prije i nakon uklanjanja S-proteina, ustanovljena je njihova zaštitna uloga. Nadalje, istraživanjem na *Lactobacillus acidophilus* NCC2628, opaženo je da je u odsutnosti peptona, ukupni sadržaj proteina stanične stijenke manji, dok je ekspresija S-proteina značajno pojačana u odnosu na kompletni medij. To sugerira da se S-proteini ponajprije eksprimiraju u uvjetima koji nisu optimalni za bakterijski rast. S-proteini odgovorni su i za otpornost mikroorganizama na ekstremne uvjete poput visoke temperature, gama-zračenja i prisutnosti teških metala. Osim toga, smatra se da su S-proteini uključeni u formiranje biofilma, što također osigurava veću otpornost mikroorganizama na različite stresne uvjete (Gerbino i sur., 2015).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

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

**Tablica 1.** Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, koji su korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB2	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB13	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB20	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MC1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	FP1	BHI, 37 °C, aerobno

##### 3.1.2. Stanične linije

Za ispitivanje sposobnosti kompetitivne ekskluzije patogene bakterije *S. enterica* i imunomodulacijskog djelovanja probiotičkih sojeva korištena je Caco-2 stanična linija. To je kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela.

### 3.1.3. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće hranjive podloge:

- a) za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline
  - MRS (De Man, Ragosa i Sharpe) agar („Biovit“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1;  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05; natrijev acetat 5,0; agar 20,2. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
  - MRS bujon („Biovit“, Italija) istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodataka agara („Biovit“, Italija).
- b) za održavanje i uzgoj bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1
  - BHI (Brain Heart Infusion) bujon („Biovit“, Italija) sastava (g/L destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1
  - XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar („Biolife“, Italija) sastava (g/L destilirane vode): ksiloza 3,5 g/L; L-lizin 5,0 g/L; laktoza 7,5 g/L; saharoza 7,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; kvašćev ekstrakt 3,0 g/L; deoksikolna kiselina 2,5 g/L, natrijev tiosulfat 6,6 g/L; amonij željezov citrat 0,8 g/L; fenol crveno 0,8 g/L; agar 13,5 g/L. 55 g podloge je resuspendirano u 1000 mL hladne destilirane vode, zatim zagrijavano uz miješanje dok se potpuno otopilo (bez autoklaviranja) te je ohlađeno na 45-50 °C, dobro promiješano i izliveno u sterilne Petrijeve zdjelice.
- d) za kultivaciju Caco-2 stanične linije
  - Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, „Capricorn Scientific GmbH“, Njemačka) s 10 % fetalnog goveđeg seruma („Gibco“, SAD)

### 3.1.4. Kemikalije

- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- bromfenol plavo, „Sigma-Aldrich“, SAD
- CBA kit, „LEGENDplex; Biolegend“, SAD

- citokin hTNF- $\alpha$ , „Miltenyi Biotec“, SAD
- Coomassie Brilliant Blue, „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- dekomplentirani fetalni teleći serum (FCS), „Gibco“, SAD
- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- dithiothreitol (DTT), „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12), „Capricorn Scientific GmbH“, Njemačka
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), „Sigma-Aldrich“, SAD
- fetalni goveđi serum (FBS), „Gibco“, SAD
- fosfatni pufer, „Capricorn Scientific GmbH“, Njemačka
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glicin, „Gram-Mol“, Hrvatska
- goveđi albumin (BSA), „Sigma“, SAD
- gvanidin hidroklorid (GHCl), „Sigma-Aldrich“, SAD
- I-Block, „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- karbonatni bikarbonatni pufer (pH = 9,6), „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- led, PBF, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- lipopolisaharidi *E. coli* 0.111:B4, „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijev dodecilsulfat (SDS), „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijev klorid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijeva lužina (NaOH), „Kemika“, Hrvatska
- Penicilin/Streptomycin (Pen/Strep), „Capricorn Scientific GmbH“, Njemačka
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin), „Sigma-Aldrich“, SAD
- Tris (hidroksimetil)-aminometan (Tris-HCl), „CarloErba“, Italija
- Triton X-100, „AppliChem“, Njemačka

- ZG16 protein [engl. *recombinant human secretory lectin ZG16 protein (Fc chimera)*], „Abcam“, Velika Britanija
- $\beta$ -merkaptoetanol, „Sigma-Aldrich“, SAD

### 3.1.5. Aparatura i pribor

- analitička vaga „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- automatske pipete, „Corning“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric 160, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- centrifuga s hlađenjem 5810R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- elektroforetske kadice, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyerove tikvice, „Golias“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- CO2 inkubator, „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- kadica za elektroforezu, „Eppendorf“, SAD
- kivete za centrifugiranje (15 mL i 50 mL), „Falcon“, Engleska
- kivete za centrifugiranje (15 mL), „Nerbe Plus“, Njemačka
- komora za elektroforezu „Sigma“, SAD
- laboratorijske čaše, „Gram-Mol“, Hrvatska
- laminar, „Iskra“, Slovenija
- liofilizator „Christ Alpha 1-2 LD plus“ (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH), Njemačka
- magnetna mješalica „Tehtnica“, Slovenija
- membrana za dijalizu (10-14 kDa), „SERVA Electrophoresis“, Njemačka
- mikrotitarske pločice (24 i 96 jažica), „Falcon“, Engleska

- mikrotitarska pločica od 96 jažica (Coating half area 96 well high binding plate), „Corning“, SAD
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio-Rad“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Corning“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- plastične tubice (1,5 mL i 2 mL), „Eppendorf“, SAD
- platforma za inkubaciju, „Bio-Rad“, Njemačka
- protočni citometar, LSR II, „Becton Dickinson“ SAD
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za kivete, „NeoLab“, Njemačka
- štapić po Drigalskom, „FL Medical“, Italija
- T-boca 25 cm<sup>3</sup>, „Corning“, SAD
- termomikser comfort, „Eppendorf“, SAD
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač Vortex V-1 plus, „BioSan“, Latvija
- zamrzivač (-20 °C), „Gorenje“, Slovenija
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija

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

Stanice Caco-2 stanične linije čuvane su u potpunom mediju DMEM/F12 s 10 % fetalnog telećeg seruma (FCS) uz dodatak 10 % dimetil-sulfoksida (DMSO) na -196 °C.

### 3.2.2. Kompetitivna ekskluzija potencijalno patogene bakterije *S. enterica* serovar Typhimurium FP1 sojevima BMK

Provedeno je *in vitro* ispitivanje kompetitivne ekskluzije patogene bakterije *S. enterica* serovar Typhimurium FP1 sojevima *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 koji sadrže S-sloj i *L. fermentum* MC1 koji proizvodi egzopolisaharide, primjenom Caco-2 stanične linije.

#### 3.2.2.1. Priprema Caco-2 stanične linije

Centrifugiranjem Caco-2 stanične linije, nakon odmrzavanja u vodenoj kupelji pri 37 °C, stanična suspenzija je prebačena u svježi medij i centrifugirana tijekom 5 minuta na 300 g. Uklonjen je supernatant koji je sadržavao ostatke DMSO. Stanice su nakon ispiranja resuspendirane s 1 mL svježeg EMEM medija prethodno temperiranog na 37 °C i nacijepljene u Petrijeve zdjelice promjera 5 cm. Nakon 24 sata propagacije, Caco-2 stanice su iz Petrijevih zdjelica inokulirane u T-bocu volumena 25 cm<sup>3</sup> gdje su održavane na temperaturi od 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub> uz dodatak 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog (56 °C tijekom 30 minuta) fetalnog goveđeg seruma. Medij je mijenjan svaka 2 dana, a stanice su uzgajane do subkonfluentnog stanja. Nakon ispiranja stanica fosfatnim puferom kako bi se uklonio zaostali medij, stanice su inkubirane u 1-2 mL 0,25 % (w/v) tripsina pri 37 °C 5-10 minuta kako bi se odvojile od podloge. Nakon što je utvrđeno da su se stanice odvojile od podloge, stanice su resuspendirane u mediju sa serumom i izbrojane u Bürker-Türkovoju komorici. Konačno, pripremljena je suspenzija stanica u koncentraciji 10<sup>5</sup> stanica/mL. U svaku od 24 jažice na mikrotitarskoj pločici dodan je po 1 mL suspenzije stanica. Stanice su zatim kultivirane u mediju uz dodatak seruma na 37 °C i u 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub> tijekom tjedan dana s izmjenom medija svaka dva dana. Prije postavljanja eksperimenta kompetitivne ekskluzije probiotičkim sojevima, Caco-2 stanice su isprane fosfatnim puferom tri puta.

#### 3.2.2.2. Priprema BMK i patogene bakterije *S. enterica*

Prekonoćne kulture sojeva BMK, uzgojene anaerobno pri 37 °C u MRS bujonu, centrifugirane su pri 4200 o/min tijekom pet minuta kako bi se stanice odvojile od podloge. Isti postupak proveden je s kulturom *S. enterica* serovar Typhimurium FP1, uzgojenom preko noći u BHI bujonu pri 37 °C u aerobnim uvjetima. Talози stanica BMK i patogene bakterije isprani su dva puta s fiziološkom otopinom te je izmjerena optička gustoća tako priređenih suspenzija pri A<sub>620</sub> u mikrotitarskoj pločici. Zatim je provedeno centrifugiranje pri 4200 o/min tijekom 10



minuta, a talozi stanica resuspendirani su u odgovarajućim volumenima EMEM kako bi se dobio OD = 1.

### 3.2.2.3. Kompetitivna ekskluzija sojevima BMK

U svaku jažicu koja sadrži Caco-2 stanice dodano je po 1 mL suspenzije BMK nakon čega je slijedila inkubacija od 1 sata pri 37 °C. Caco-2 stanice su zatim isprane fosfatnim puferom te je u jažice dodano po 1 mL suspenzije bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 i nastavljena je inkubacija tijekom 1 sata pri 37 °C. Nakon toga, stanice su ispirane 3 puta s 1 mL fosfatnog pufera po jažici kako bi se uklonile neadhezirane bakterijske stanice. Kako bi se Caco-2 stanice, zajedno sa stanicama koje su se na njih adhezirale, odlijepile od podloge, u jažice je dodan 1 mL 0,05 % (v/v) otopine Triton X-100. Sadržaj svake jažice je zatim centrifugiran 5 min pri 4200 o/min kako bi se dobio talog stanica, koji je zatim resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera te je određen broj bakterijskih stanica indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.

### 3.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

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

### 3.2.4. Određivanje sposobnosti adhezije sojeva bakterija mliječne kiseline na protein ZG16

Kako bi se ispitala sposobnost adhezije odabranih sojeva na protein ZG16, u jažice mikrotitarske pločice od 96 jažica najprije je dodano 50 µL proteina ZG16 odnosno I-Block reagensa (kontrola) koncentracije 8 µg/ml, nakon čega je provedena inkubacija na horizontalnoj mješalici (platformi) tijekom 4 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, sadržaj jažica je uklonjen i u njih je dodano 100 µL 1 %-tne otopine BSA u fosfatnom puferu

te je uslijedila prekonocna inkubacija pri 4 °C. Suspenzije sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 i *L. fermentum* MC1 kojima je prethodno podešena koncentracija na vrijednost 10<sup>6</sup> CFU/vijalici, pohranjene uz dodatak 10 %-tnog glicerola na -20 °C, su nakon otapanja i resuspendiranja u 10 mL DMEM/F12 medija, centrifugirane 15 minuta na 3220 g. Nakon odlijevanja nadtaloga, u epruvete s bakterijskim suspenzijama, dodano je 0,2 mL DMEM/F12 medija i podešena je koncentracija bakterija na 1000 CFU/μL. U jažice je dodano po 50 μL pripremljenih bakterijskih suspenzija te je uslijedila inkubacija tijekom 16 sati pri 37 °C i 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub>. Jažice su nakon inkubacije isprane tri puta sa 100 μL fosfatnog pufera, zagrijanim na 37 °C. U jažice je zatim dodano 50 μL 10 mM dithiothreitola te je uslijedila inkubacija na platformi tijekom 15 minuta, kako bi se odvojile adhezirane bakterijske stanice. Sadržaj jažica prebačen je u tubice od 2 mL, a jažice su isprane najprije sa 100 μL 1 %-tne otopine BSA u fosfatnom puferu, a zatim još jednom sa 100 μL fosfatnog pufera. Nakon toga je u tubice dodano po 1,5 mL fosfatnog pufera te je uslijedilo centrifugiranje tijekom 15 minuta na 3220 g. Nakon pažljivog odlijevanja nadtaloga, sadržaj tubica resuspendiran je u 50 μL fosfatnog pufera te je provedeno nasadivanje u duplikatu po 25 μL suspenzije na prethodno pripremljene MRS agar ploče. Nakon 48 sati anaerobne inkubacije pri 37 °C, izbrojane su porasle kolonije.

### 3.2.5. Izolacija S-proteina *L. brevis* sojeva

Prekonocne kulture sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 uzgojene propagacijom do 200 mL centrifugirane su 10 minuta pri 4200 o/min te je talog stanica ispran s fosfatnim puferom (pH = 7,4). S-proteini su ekstrahirani s površine stanica dodatkom 5 M GHCl-a uz inkubaciju na ledu i snažno miješanje tijekom 2 sata, nakon čega je slijedilo centrifugiranje tijekom 10 minuta pri 4200 o/min. Dobiveni ekstrakti proteina, koji se nalaze u supernatantu, su prebačeni u membranu za dijalizu (10-14 kDa) te je uslijedila dijaliza suspenzija S-proteina u destiliranoj vodi tijekom 72 sata uz česte izmjene. Nakon provedene dijalize, uzorci su liofilizirani u uređaju Christ Alpha 1-2 LD.

### 3.2.6. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) S-proteina

100 μL taloga stanica i 15 μL uzoraka proteina (supernatanata) sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20, dobivenih prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5., pomiješano je s

2x koncentriranog Laemmli pufera. Suspenzije su zatim prokuhane 5 minuta, centrifugirane na 13000 o/min tijekom 5 minuta te je 15  $\mu$ L supernatanta naneseo u jažice prethodno pripremljenog poliakrilamidnog gela. Osim toga, 1 mg prethodno liofiliziranih uzoraka resuspendirano je u 10  $\mu$ L destilirane vode te je dodan jednak volumen 2x koncentriranog Laemmli pufera. Suspenzije su zatim prokuhane 5 minuta, centrifugirane na 13000 o/min tijekom 5 minuta, 15  $\mu$ L supernatanta naneseo je u jažice prethodno pripremljenog poliakrilamidnog gela te je provedena SDS-PAGE elektroforeza. Uzorci su analizirani na 10 % (v/v) poliakrilamidnom gelu u komori za elektroforezu pri konstantnom naponu od 150 V tijekom 1 h. Kao standard je korišten protein ProSieve QuadColor (4,6-315 kDa). Nakon provedene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje koja sadrži 0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline tijekom najmanje 2 sata. Gel je zatim stavljen u otopinu octene kiseline [10 % (v/v)] do obezbojenja pozadine te skeniran.

**Priprema 2x koncentriranog Laemmli pufera (10 mL):**

1,25 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8)  
4 mL SDS [10 % (w/v)]  
2 mL glicerol (100 %)  
0,5 mL 0,5 M EDTA  
4 mg bromfenol plavo  
0,2 mL  $\beta$ -merkaptoetanol  
Nadopuniti destiliranom vodom do 10 mL.

**Priprema poliakrilamidnog gela (10 %):**

a) donji gel (za razdvajanje proteina):

Tris-HCl (pH 8,8) 2,5 mL  
Akrilamid 3 mL  
Destilirana voda 2,5 mL  
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin) 5  $\mu$ L  
APS (amonij-persulfat) 38  $\mu$ L

b) gornji gel (za sabijanje uzoraka):

Tris-HCl (pH 6,8) 3,195 mL  
Akrilamid 0,45 mL  
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamin) 7,5  $\mu$ L

APS (amonij-persulfat) 33,75  $\mu$ L

**Priprema 10x konc. pufera za elektroforezu (1000 mL):**

30 g Tris

144 g glicin

10 g SDS

Nadopuniti destiliranom vodom do 1000 mL.

**3.2.7. Izolacija egzopolisaharida vezanih na stanice soja *L. fermentum* MC1**

Izolacija egzopolisaharida vezanih na površinu soja MC1 provedena je prema postupku opisanom u Ferrari i sur. (2022). Ukratko, nakon 72 sata inkubacije pri 30 °C 500 mL soja *L. fermentum* MC1, uzgojenog u MRS bujonu uz dodatak 2 % (w/v) glukoze, centrifugirano je 30 minuta na 8000 o/min kako bi se stanice odvojile od podloge. Talog stanica je zatim ispran s fiziološkom otopinom, te je, nakon centrifugiranja 5 min pri 8000 o/min, inkubiran u jednom volumenu 2 M NaOH uz miješanje na magnetskoj mješalici. Nakon 24-satne inkubacije, suspenzija je centrifugirana pri 8000 o/min tijekom 30 minuta kako bi se uklonili netopljivi materijali. Egzopolisaharidi su istaloženi iz supernatanta dodatkom 4 volumena hladnog etanola, nakon čega je uslijedila prekonoćna inkubacija pri 4 °C. Nakon centrifugiranja pri 8000 o/min tijekom 30 minuta, talog je resuspendiran u destiliranoj vodi. Dijaliza suspenzije egzopolisaharida, otopljenih u destiliranoj vodi, provedena je u membrani za dijalizu veličine pora 12-14 kDa i destiliranoj vodi kao dijalizatu. Nakon provedene dijalize, uzorci su liofilizirani u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus i izvagani te je izračunat prinos EPS-a.

**3.2.8. Određivanje imunomodulacijskog djelovanja S-proteina i egzopolisaharida na Caco-2 staničnoj kulturi nakon tretmana s LPS-om i hTNF- $\alpha$ , određivanjem ekspresije proupalnih citokina CBA metodom protočnim citometrom**

Kako bi se odredio imunomodulacijski učinak S-proteina i egzopolisaharida (EPS) na Caco-2 stanicama podvrgnutim upalnim uvjetima uz dodatak BMK, izdvojenih proteina i egzopolisaharida, praćena je koncentracija izlučenih proupalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8 u kultivacijskom mediju. Upalni proces potaknut je primjenom lipopolisaharida (LPS) porijeklom iz bakterije *E. coli* 0.111:B4 i citokina hTNF- $\alpha$  (engl. *human tumor necrosis factor-*

$\alpha$ ). Otopina LPS-a iz *E. coli* pripremljena je u potpunom mediju (DMEM/F12 + glutamin + 10 % FBS), u koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$ , dok je citokin hTNF- $\alpha$ , pripremljen u koncentraciji od 20 ng/mL u potpunom mediju (DMEM/F12 + glutamin). Sojevima BMK podešen je multiplicitet infekcije (engl. *multiplicity of infection, MOI*) na 2,5 bakterija po stanici, nazvanim MOI 2,5.

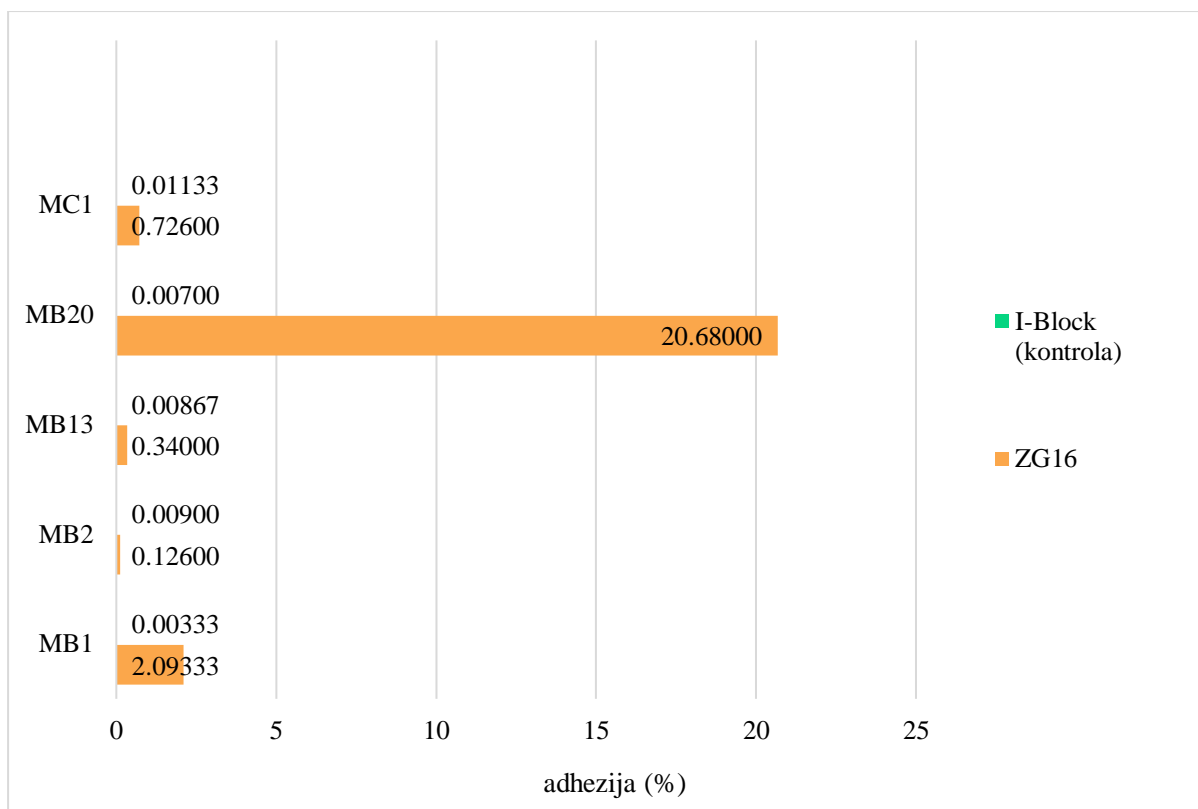
Prekonoćno uzgojene kulture sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 koji ekspimiraju S-proteine i *L. fermentum* MC1 koji proizvodi EPS-e, centrifugirane su pri 4200 o/min tijekom 5 minuta, a talozi stanica isprani su s fiziološkom otopinom. Koncentracija probiotičkih bakterija podešena je na vrijednost  $5 \times 10^5$  CFU/mL, koncentracija S-proteina, izoliranih prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5., podešena je na 25  $\mu\text{g/mL}$ , te koncentracija EPS-a, izoliranih prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7., podešena je na 0,5 mg/L. Caco-2 stanice nasadene su u mikrotitarsku pločicu od 96 jažica uz izmjenu potpunog medija (DMEM/F12 + glutamin + 10 % FBS + antibiotici) svaka dva dana. Nakon formiranja monosloja, medij je uklonjen iz jažica te je u njih dodano 0,1 mL potpunog medija (DMEM/F12 + glutamin) s 20 ng/mL hTNF- $\alpha$ , dok je u kontrolne jažice dodan samo 0,1 mL potpunog medija (DMEM/F12 + glutamin). Nakon kultivacije od 12 sati pri 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub>, medij je uklonjen te su jažice isprane s 0,2 mL potpunog medija (DMEM/F12 + glutamin). Zatim je u odgovarajuće jažice dodano 0,2 mL pripremljenog medija uz dodatak probiotičkih bakterija (MOI 2,5), odnosno S-proteina (25  $\mu\text{g/mL}$ ) ili EPS-a (0,5 mg/L). Nakon toga, u sve jažice dodano je 2  $\mu\text{L}$  otopine LPS-a konačne koncentracije od 1  $\mu\text{g/mL}$ . Uslijedila je kultivacija tijekom 16 sati pri 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub>. Nakon završene kultivacije, iz svake jažice uzorkovano je po 100  $\mu\text{L}$  medija u sterilnu mikrotitarsku pločicu od 96 jažica zaobljenog dna te je provedeno centrifugiranje pri 3000 g tijekom 10 minuta. Nadtalozni su prebačeni u sterilne tubice od 1,5 mL i pohranjeni na -80 °C. Nakon odmrzavanja, uzorci su analizirani CBA (engl. *cytometric bead array*) metodom, protočnim citometrom prema uputi proizvođača CBA kita za odabrane citokine. CBA metoda je kvantitativna imuno metoda koja se temelji na primjeni vezujućih i detekcijskih antitijela, kao i ELISA metoda, s detekcijom fluorescentnih signala protočnim citometrom, a omogućuje istovremenu i racionalnu detekciju većeg broja analita. Dobiveni podaci fluorescencije analizirani su korištenjem GainData® (arigo's ELISA Calculator, dostupno na poveznici <https://www.arigobio.com/ELISA-calculator>).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. ADHEZIJA SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Uspješna kolonizacija površine sluznice, koja je izravna posljedica bakterijske adhezije, nedvojbeno je primarni preduvjet za stabilno i učinkovito probiotičko djelovanje BMK (Yadav i sur., 2015). Prema tome, sposobnost adhezije na intestinalne površine, jedan je od najvažnijih kriterija prilikom selekcije potencijalnih probiotika (Gupta i sur., 2018). Crijevne epitelne stanice prekrivene su mukoznim slojem koji sprječava translokaciju crijevne mikrobiote u podležuća tkiva (Schroeder, 2019). Osim njegove zaštitne uloge, mukozni sloj djeluje kao mjesto vezivanja bakterija kao što su BMK koje imaju važnu ulogu u održavanju normalne funkcije crijeva i otpornosti na patogene mikroorganizme (Boekhorst i sur., 2006). Proteomskim analizama identificiran je lektinu sličan protein ZG16 (engl. *zymogen granule membrane protein 16, ZG16*) kao obilna komponenta mukusa (Bergström i sur., 2016). Funkcija proteina ZG16 još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, međutim poznato je da inhibira prodiranje bakterija u mukus koji prekriva epitel debelog crijeva (Javitt i sur., 2021). Budući da protein ZG16 može vezati Gram-pozitivne bakterije, u ovom radu ispitana je sposobnost adhezije sojeva BMK na protein ZG16 (Bergström i sur., 2016).

Sposobnost adhezije na rekombinantni ljudski sekretorni lektin ZG16 protein (engl. *recombinant human secretory lectin ZG16 protein, ZG16*), promatrana je *in vitro* kod sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 i *L. fermentum* MC1. Kao kontrola je korišten I-Block reagens, visoko pročišćeni reagens za blokiranje na bazi kazeina. Na slici 3 prikazani su rezultati ispitivanja adhezijske sposobnosti sojeva BMK, izraženi kao postotak adheziranih bakterija u odnosu na početni broj bakterija dodanih u jažice mikrotitarske pločice. Iz dobivenih podataka, vidljivo je da svi sojevi BMK u određenoj mjeri vežu protein ZG16, međutim MB20 daleko najuspješnije adhezira ZG16, dok soj MB2 pokazuje najslabiju adheziju na protein ZG16. Vezanje bakterija na kazein za sve istraživane sojeve BMK je manje od 0,01 %.



**Slika 3.** Adhezija sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1 na rekombinantni ljudski sekretorni lektin ZG16 protein (engl. *recombinant human secretory lectin ZG16 protein, ZG16*), odnosno I-Block reagens, visoko pročišćeni reagens za blokiranje na bazi kazeina, korišten kao kontrola

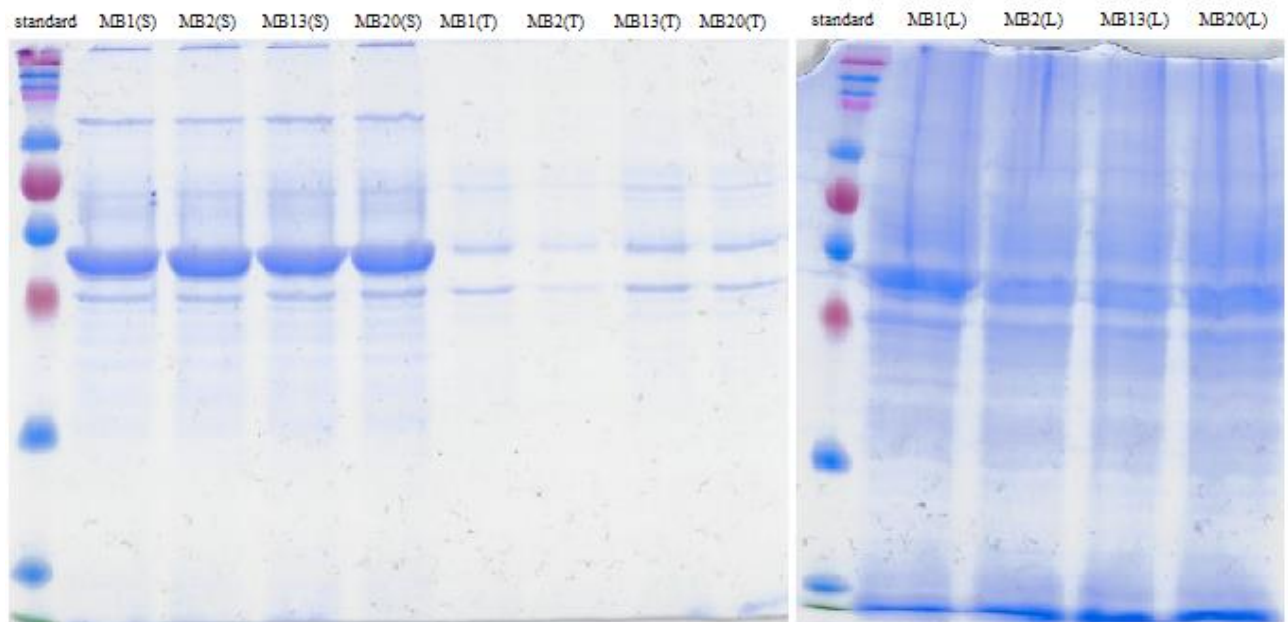
Nakon preživljavanja u uvjetima GIT-a, probiotički sojevi koji posjeduju adhezijska svojstva konkuriraju za nutrijente i mjesta vezivanja te koloniziraju intestinalni trakt. Adhezijom se produljuje vrijeme zadržavanja u crijevima, a time i blagotvorni učinak na zdravlje domaćina (Muscairello i sur., 2020; Uroić i sur., 2016). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da soj MB20 najbolje veže protein ZG16, što potvrđuje hipotezu o njegovoj potencijalnoj primjeni kao probiotik. Na slici 3 vidljiva je razlika u stupnju adhezije na ZG16 kod ispitivanih sojeva BMK iz čega se može zaključiti da je adhezijska sposobnost specifična za svaki pojedini soj. Dobiveni rezultati u skladu su s dosadašnjim analizama adhezije probiotičkih sojeva na površinu crijevne sluznice odnosno proteine ekstracelularnog matriksa. Yadav i suradnici (2015) su u svom radu ispitali sposobnost adhezije nekoliko sojeva *Lactiplantibacillus*

*plantarum* na imobilizirane proteine mucin i fibronektin, prilikom čega je opaženo da neki od ispitivanih sojeva uspješnije vežu odabrane proteine od ostalih.

## 4.2. ULOGA S-PROTEINA I EGZOPOLISAHARIDA SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U MODULACIJI IMUNOLOŠKOG SUSTAVA

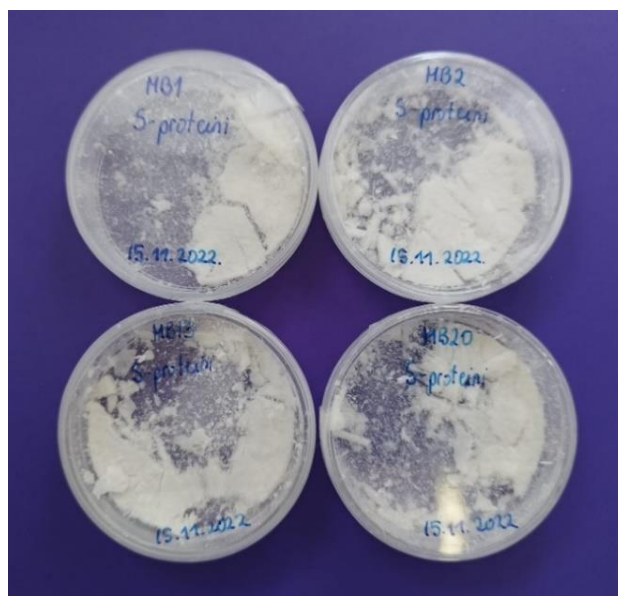
### 4.2.1. Izolacija S-proteina i egzopolisaharida *Lactobacillus* sojeva

Kako bi se ispitalo imunomodulacijsko djelovanje samih S-proteina, provedena je izolacija S-proteina prisutnih na površini stanica *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te je uspješnost izolacije potvrđena SDS-PAGE elektroforezom. Prema rezultatima SDS-PAGE elektroforeze, prikazanim na slici 4, vidljivo je da su u supernatantu prisutni S-proteini koji su se odvojili od stanica, dok se u staničnom talogu nalaze neznatne količine S-proteina što potvrđuje uspješnu izolaciju S-proteina svih sojeva BMK. Uzorci S-proteina su nakon provedene dijalize liofilizirani kako je prikazano na slici 5 te je provedena SDS-PAGE elektroforeza liofiliziranih uzoraka. Na slici 4 također su vidljive proteinske vrpce liofiliziranih uzoraka.



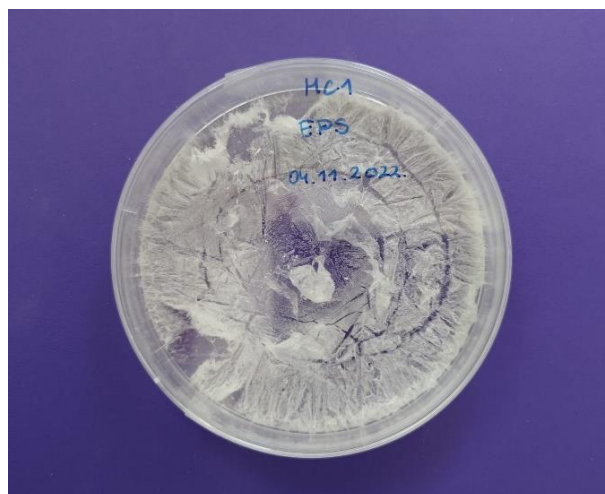
**Slika 4.** SDS-PAGE elektroforeza S-proteina sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 (redosljed stavljanja uzoraka na gel: standard – MB1<sub>supernatant</sub> – MB2<sub>supernatant</sub> – MB13<sub>supernatant</sub> – MB20<sub>supernatant</sub> – MB1<sub>talog</sub> – MB2<sub>talog</sub> – MB13<sub>talog</sub> – MB20<sub>talog</sub> – standard – MB1<sub>liof.</sub> – MB2<sub>liof.</sub> – MB13<sub>liof.</sub> – MB20<sub>liof.</sub>)





**Slika 5.** Prikaz liofiliziranih uzoraka S-proteina izoliranih iz sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20

Također, provedena je izolacija EPS-a vezanih na stanice *L. fermentum* MC1 kako bi se ispitala njihova uloga u modulaciji imunološkog sustava. Nakon liofilizacije, uzorak EPS-a je izvagan te je izračunat prinos EPS-a koji iznosi 285 mg/L (slika 6).

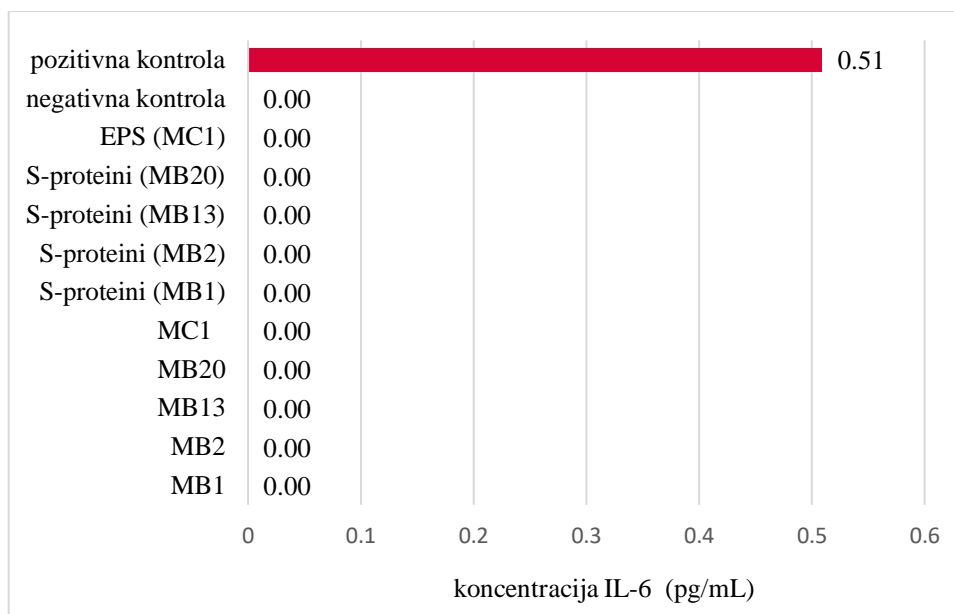


**Slika 6.** Prikaz liofiliziranog uzorka egzopolisaharida izoliranih iz soja *L. fermentum* MC1

#### 4.2.2. Imunomodulacijski učinak sojeva bakterija mliječne kiseline te izoliranih S-proteina i egzopolisaharida

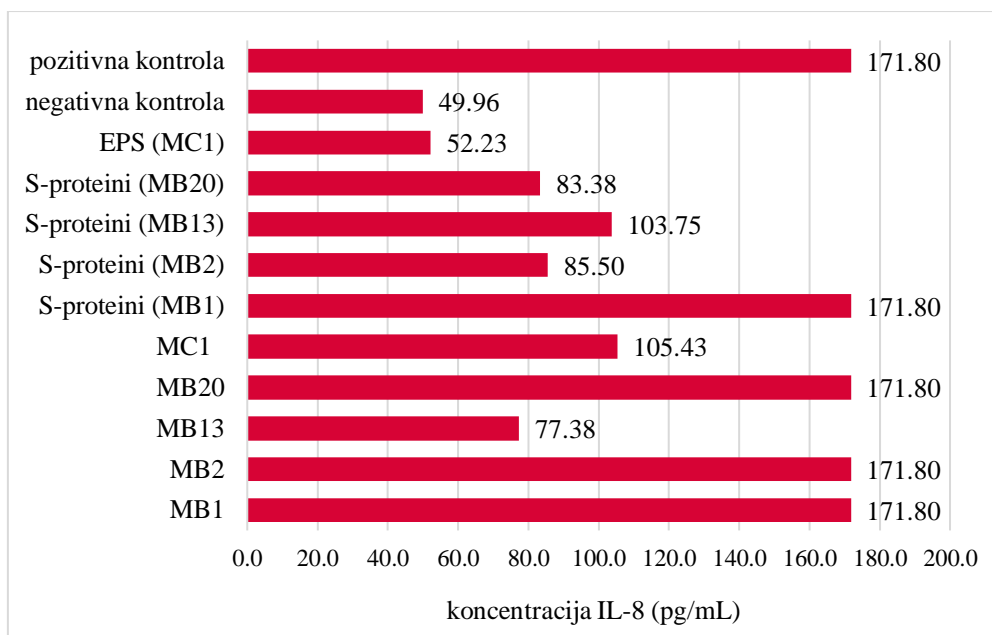
Prehrana i način života oblikuju sastav ljudske crijevne mikrobiote (Fang i sur., 2021). Disbioza crijevne mikrobiote popraćena je oslabljenom funkcijom crijevne mukozne barijere što dovodi do translokacije bakterija i razvoja različitih crijevnih poremećaja kao što je IBD (Cristofori i sur., 2021; Bermudez-Brito i sur., 21012). Uslijed upalnih procesa, dolazi do lučenja proupalnih citokina poput interleukina 8 (IL-8) (van Zyl i sur., 2021). Citokini imaju važnu ulogu u regulaciji upalnih procesa, međutim pretjerana proizvodnja potencijalno rezultira ozbiljnim oštećenjem crijevne epitelne barijere i razvojem bolesti (van Zyl i sur., 2021; Chen i sur., 2017). Osim sposobnosti adhezije, probiotici po definiciji posjeduju imunomodulacijska svojstva, što je ujedno i jedan od predloženih mehanizama njihovog blagotvornog djelovanja (Alp i sur., 2019; Harzallah i Belhadj, 2016). Osim toga, studije su pokazale da S-proteini i EPS koji posreduju u interakciji s crijevnim epitelnim stanicama, ujedno sudjeluju u imunomodulaciji (Xu i sur., 2020; Uroić i sur., 2016). Stoga je u ovom radu ispitano imunomodulacijsko djelovanje sojeva BMK koji sintetiziraju S-proteine i EPS-e te njihovih izoliranih S-proteina i EPS-a, primjenom Caco-2 stanične linije, nakon što je induciran upalni proces djelovanjem hTNF- $\alpha$  (engl. *human tumor necrosis factor- $\alpha$* ) i lipopolisaharida (LPS) iz bakterije *E. coli*. Imunomodulacijski učinak određen je mjerenjem proizvodnje četiri proupalna citokina; interleukina 6 (IL-6), IL-8, interleukina jedan beta (IL-1 $\beta$ ) i faktora nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ). Caco-2 stanice tretirane s hTNF- $\alpha$  i LPS-om predstavljaju pozitivnu kontrolu, dok su negativna kontrola Caco-2 stanice bez tretmana.

Na slici 7 prikazani su rezultati ispitivanja učinka S-proteina i EPS-a odnosno živih sojeva producenta, nakon tretiranja Caco-2 stanica s hTNF- $\alpha$  i naknadne stimulacije s LPS-om, na proizvodnju proupalnog citokina IL-6. Rezultati pokazuju da svi ispitivani sojevi BMK, kao i izolirani S-proteini i EPS u potpunosti inhibiraju proizvodnju IL-6, što potvrđuje njihov imunomodulacijski učinak, bez obzira na niske vrijednosti pozitivne kontrole.



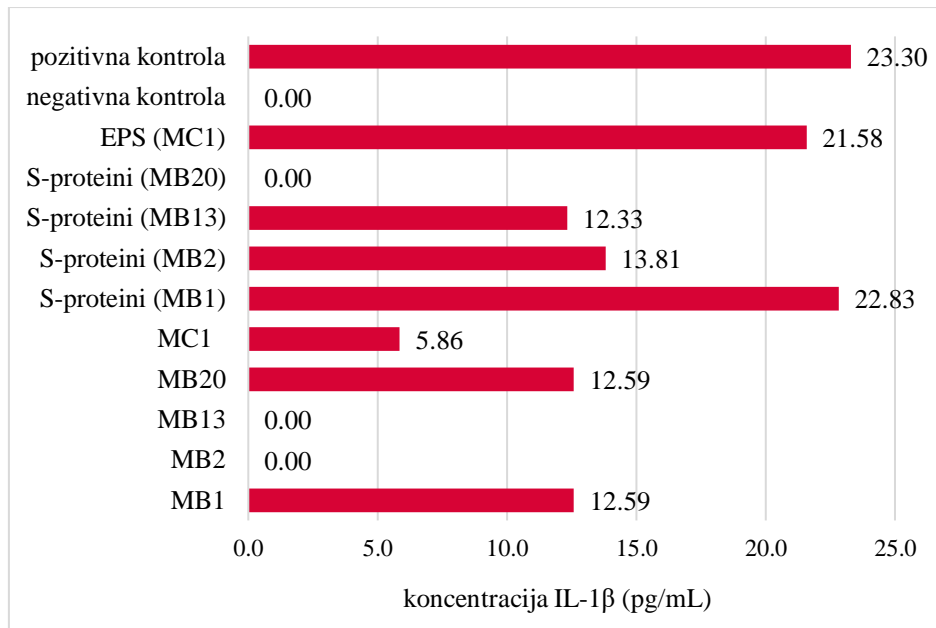
**Slika 7.** Utjecaj S-proteina izoliranih iz sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 [S-proteini (MB1), S-proteini (MB2), S-proteini (MB13), S-proteini (MB20)] i egzopolisahrida izoliranih iz soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 [EPS (MC1)] te sojeva producenta (*Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1) na proizvodnju interleukina 6 (IL-6), nakon predtretmana Caco-2 stanica s humanim faktorom nekroze tumora-alfa i naknadne stimulacije s lipopolisaharidima porijeklom iz bakterije *Escherichia coli*

Rezultati određivanja učinka S-proteina i EPS-a te živih sojeva producenta, na proizvodnju proupalnog citokina IL-8 nakon predtretmana Caco-2 stanica s hTNF- $\alpha$  i naknadne stimulacije s LPS-om, prikazani su na slici 8. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da sojevi MB1, MB2, MB20 i S-proteini izolirani iz soja MB1 ne smanjuju proizvodnju citokina IL-8 u usporedbi s pozitivnom kontrolom. Proteini izolirani iz sojeva MB2 i MB20 pokazuju bolje rezultate u odnosu na same sojeve producente, dok EPS izolirani iz soja MC1 najuspješnije inhibiraju proizvodnju IL-8. Gledajući sojeve koji eksprimiraju S-proteine na površini stanice, soj MB13 najznačajnije smanjuje proizvodnju IL-8.



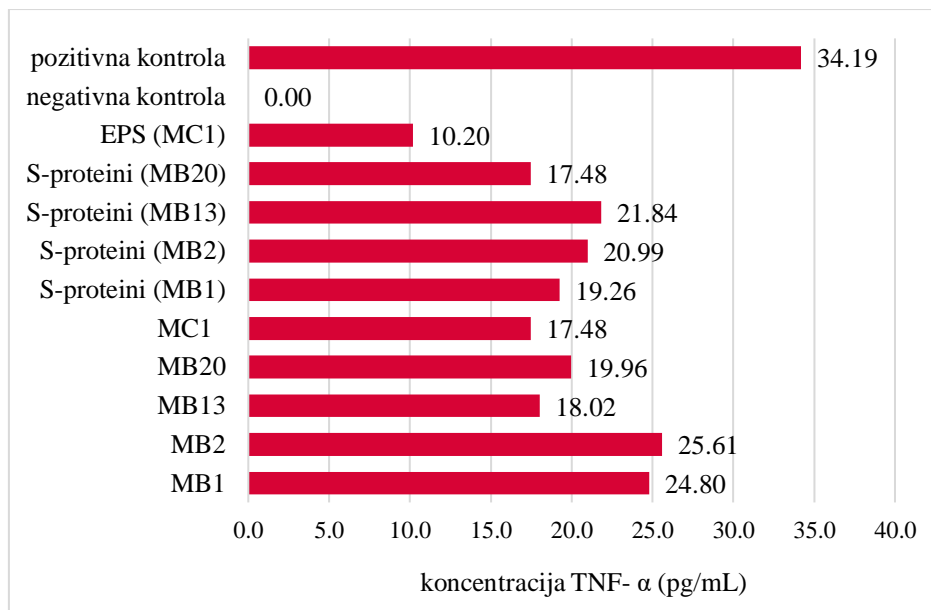
**Slika 8.** Utjecaj S-proteina izoliranih iz sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 [S-proteini (MB1), S-proteini (MB2), S-proteini (MB13), S-proteini (MB20)] i egzopolisahrida izoliranih iz soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 [EPS (MC1)] te sojeva producenta (*Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1) na proizvodnju interleukina 8 (IL-8), nakon predtretmana Caco-2 stanica s humanim faktorom nekroze tumora-alfa i naknadne stimulacije s lipopolisaharidima porijeklom iz bakterije *Escherichia coli*

Na slici 9 prikazani su rezultati određivanja učinka izoliranih S-proteina i EPS-a te sojeva koji ih proizvode na proizvodnju proupalnog citokina IL-1 $\beta$  nakon predtretmana Caco-2 stanica s hTNF- $\alpha$  i naknadne stimulacije s LPS-om. Vidljivo je da svi sojevi producenti smanjuju proizvodnju IL-1 $\beta$ , a sojevi MB2 i MB13 te S-proteini izolirani iz soja MB20 pokazuju najveći inhibitorni učinak. Međutim, EPS soja MC1 i S-proteini soja MB1 pokazuju najslabije imunomodulacijsko djelovanje.



**Slika 9.** Utjecaj S-proteina izoliranih iz sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 [S-proteini (MB1), S-proteini (MB2), S-proteini (MB13), S-proteini (MB20)] i egzopolisahrida izoliranih iz soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 [EPS (MC1)] te sojeva producenta (*Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1) na proizvodnju interleukina jedan beta (IL-1 $\beta$ ), nakon predtretmana Caco-2 stanica s humanim faktorom nekroze tumora-alfa i naknadne stimulacije s lipopolisaharidima porijeklom iz bakterije *Escherichia coli*

Rezultati određivanja učinka izoliranih S-proteina i EPS-a te sojeva koji ih proizvode na proizvodnju proupalnog citokina TNF- $\alpha$ , nakon predtretmana Caco-2 stanica s hTNF- $\alpha$  i naknadne stimulacije s LPS-om, prikazani su na slici 10. Prema dobivenim rezultatima, svi ispitivani sojevi BMK, kao i izolirani S-proteini i EPS inhibitorno djeluju na proizvodnju citokina TNF- $\alpha$ , a EPS izolirani iz soja MC1 pokazuju najbolji imunomodulacijski učinak.



**Slika 10.** Utjecaj S-proteina izoliranih iz sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 [S-proteini (MB1), S-proteini (MB2), S-proteini (MB13), S-proteini (MB20)] i egzopolisahrida izoliranih iz soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 [EPS (MC1)] te sojeva producenta (*Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 i *Limosilactobacillus fermentum* MC1) na proizvodnju faktora nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ), nakon predtretmana Caco-2 stanica s humanim faktorom nekroze tumora-alfa i naknadne stimulacije s lipopolisaharidima porijeklom iz bakterije *Escherichia coli*

Prethodna istraživanja također su pokazala da probiotičke bakterije mogu regulirati proizvodnju proupalnih citokina. Takanashi i suradnici (2013) pokazali su da *Lactobacillus casei* OLL2768 smanjuje razinu proupalnih citokina; IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  i monocitnog kemoatraktantnog proteina-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*, *MCP-1*), na BIE staničnoj liniji (engl. *bovine intestinal epithelial cells*) s izazvanim upalnim procesom, dodavanjem virulentnih pirogenih molekula (engl. *pathogen associated molecular patterns*, *PAMPs*) izdvojenih iz enterotoksične *E. coli* (ETEC). Osim toga, Sungur i suradnici (2017) su primjenom HeLa stanične linije (engl. *human cervical carcinoma cell line*, *HeLa*) demonstrirali protuupalni učinak EPS-a iz sojeva *Lactobacillus gasseri*, prilikom čega je opaženo da EPS povećavaju proizvodnju interleukina 10 (IL-10) za što se pretpostavlja da je razlog smanjene proizvodnje proupalnog citokina TNF- $\alpha$ . Gao i suradnici (2015) su primjenom IPEC-J2 stanične linije (engl. *porcine small intestinal cell epithelial line*) s izazvanim upalnim procesom uslijed tretiranja s LPS-om, pokazali da S-proteini i EPS te bakterija producent *L. rhamnosus*

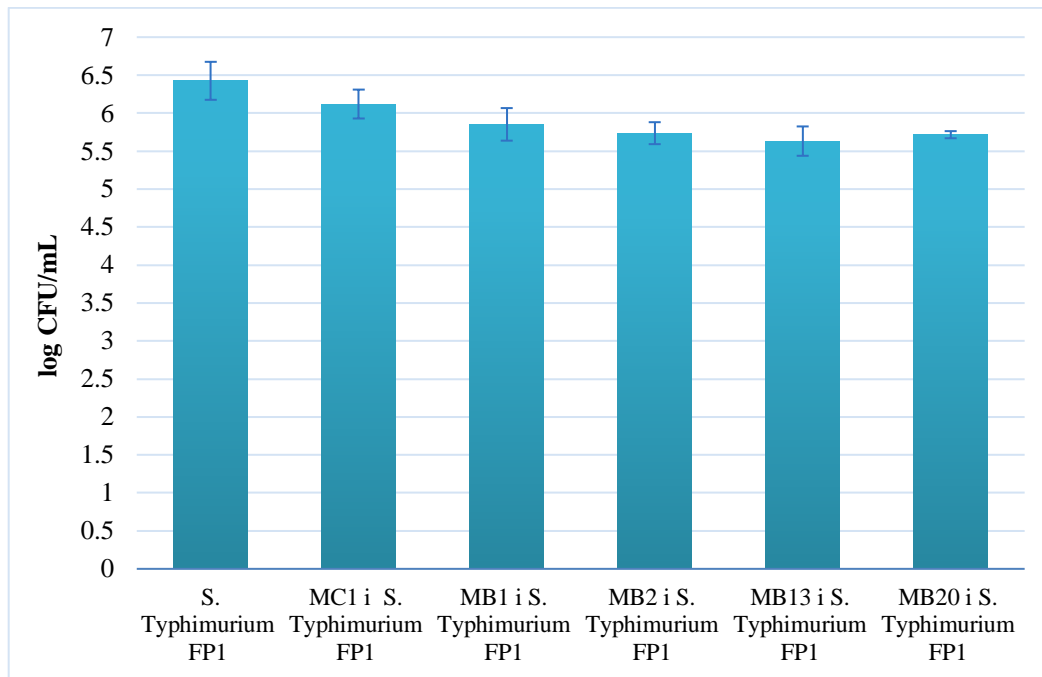
GG smanjuju proizvodnju proupalnih citokina i aktivaciju TLR receptora (engl. *toll-like receptors, TLRs*) na razini mRNA.

#### **4.3. ULOGA S-PROTEINA I EGZOPOLISAHARIDA SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U ADHEZIJI I KOMPETITIVNOJ EKSKLUZIJI PATOGENA**

Terapija antibioticima pokazuje se sve manje učinkovitom, obzirom na rastući broj patogenih bakterija koje su razvile otpornost na antibiotike i utjecaj antibiotika na uobičajenu crijevnu mikrobiotu. Iz tog razloga raste potreba za razvojem novih načina tretiranja infekcija uzrokovanih crijevnim patogenima, a probiotici već godinama pokazuju značajan terapijski potencijal (Gut i sur., 2018). Kao što je već rečeno, sposobnost adhezije na crijevne epitelne stanice, smatra se neophodnim svojstvom sojeva *Lactobacillus* za ostvarenje pozitivnog učinka na zdravlje domaćina (Zhang i sur., 2013). Adhezija probiotičkih bakterija prethodi privremenoj kolonizaciji GIT-a, a samim time i njihovom antagonističkom djelovanju prema enteropatogenima (van Zyl i sur., 2020; Chen i sur., 2007). Probiotici koji posjeduju adhezijska svojstva mogu spriječiti adheziju patogena natjecanjem za mjesta vezivanja na epitelnim stanicama crijeva pa tako i njihovu kolonizaciju GIT-a te infekcije (van Zyl i sur., 2020; Monteagudo-Mera i sur., 2019). Ključnu ulogu u posredovanju adhezije probiotičkih bakterija na crijevne epitelne stanice i mukus imaju S-proteini i egzopolisaharidi (EPS) (Alp i sur., 2019; Bermudez-brito i sur., 2012).

Sukladno, u ovom radu odeđen je utjecaj S-proteina i EPS-a sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka na adheziju, a time i kompetitivnu ekskluziju patogene bakterije *S. enterica* serovar Typhimurium FP1. Eksperiment je proveden *in vitro*, primjenom Caco-2 stanične linije. Na slici 11 prikazani su rezultati kompetitivne ekskluzije patogene bakterije sojevima *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 koji eksprimiraju S-proteine i *L. fermentum* MC1 koji sintetizira EPS-e, izraženi kao log(CFU/mL). Iako nije opažen visoki inhibitorni učinak sojeva BMK na adheziju patogene bakterije, rezultati potvrđuju da svih pet ispitanih sojeva BMK kompetitivno inhibira adheziju *S. Typhimurium* FP1 na Caco-2 stanice. Soj MB13 koji eksprimira S-sloj najuspješnije konkurira za vezanje na Caco-2 stanice, dok soj MC1, kod kojeg je ispitana uloga EPS-a, značajno ne ometa adheziju patogena u odnosu na adheziju patogena na Caco-2 stanice bez prisutstva korištenih sojeva BMK. Dobiveni rezultat može se pripisati tome da adhezija posredovana EPS-ima ovisi o različitim čimbenicima, poput

njihove strukture, vrste i koncentracije. Na primjer, molekule EPS-a mogu prekriti bakterijsku površinu i djelovati kao fizička barijera koja može ometati adheziju probiotika na površinu, u ovom slučaju na Caco-2 stanice. Osim toga, molekule EPS-a se mogu natjecati za mjesta vezivanja i tako kompetitivno inhibirati vezanje samih probiotika što može rezultirati adhezijom patogena posredstvom EPS-a.



**Slika 11.** Kompetitivna ekskluzija patogene bakterije *S. Typhimurium* FP1 sojevima *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1

Dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima dosadašnjih studija koje pokazuju važnu funkciju S-proteina u sprječavanju adhezije patogena i njihove kolonizacije crijevnih epitelnih stanica (van Zyl i sur., 2020). Chen i suradnici (2007) pokazali su da S-proteini, vezani na površinu *Lactobacillus crispatus* ZJ001, kompetitivno inhibiraju adheziju patogenih bakterija *S. Typhimurium* i *E. coli* O157:H7 primjenom HeLa stanične linije. Uloga S-sloja u adheziji, pokazana je njegovim uklanjanjem pomoću gvanidin hidroklorida kod soja *Levilactobacillus brevis* D6, što rezultira smanjenom adhezijom na Caco-2 stanice (Uroić i sur., 2016). Osim toga, Uroić i suradnici (2016) su primjenom Caco-2 stanične linije dokazali da prisutnost *L. brevis* D6 smanjuje adheziju *S. Typhimurium* FP1. EPS promiču kolonizaciju GIT-a posredovanjem adhezije na crijevne epitelne stanice. Posljedično, sojevi koji proizvode EPS-e mogu inhibirati kolonizaciju patogena natjecanjem za mjesta vezivanja i nutrijente (Xu i sur., 2019). Yang i suradnici (2015) u svom radu pokazali su da levan i reuteran, EPS koje sintetizira bakterija *L. reuteri*, inhibiraju adheziju enterotoksične *E. coli* (ETEC) na crijevnu sluznicu



svinja. S druge strane, Ruas-Madiedo i suradnici (2006) pokazali su utjecaj tri različite frakcije EPS-a na adheziju probiotičkih bakterija na crijevni mukus čovjeka. Prema rezultatima njihovog istraživanja, stupanj adhezije bakterije *L. rhamnosus* GG varira ovisno o koncentraciji i vrsti prisutnih EPS-a. Štoviše, frakcija EPS-a NB667 uvelike je smanjila adheziju *L. rhamnosus* GG, što upućuje na mogućnost vezanja EPS-a direktno na crijevni mukus, što rezultira kompetitivnom inhibicijom adhezije probiotika. Osim toga, pretpostavlja se da su EPS potencijalno prekrili površinske molekule bakterije koje sudjeluju u adheziji i onemogućili vezanje *L. rhamnosus* GG na crijevni mukus.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Određivanjem sposobnosti adhezije sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1 na protein ZG16, utvrđeno je da svi sojevi u određenoj mjeri vežu protein ZG16 te da MB20 ima najveći afinitet i sposobnost specifične adhezije za ljudski protein ZG16.
2. Određivanjem kompetitivne ekskluzije patogene bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 *in vitro*, dokazan je pozitivan učinak S-proteina prisutnih na površini stanica sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te egzopolisaharida koje sintetizira soj *L. fermentum* MC1 na adheziju i antagonističko djelovanje sojeva BMK.
3. Određivanjem imunomodulacijskog učinka izoliranih S-proteina i egzopolisaharida te sojeva producenta (*L. brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 i *L. fermentum* MC1) pokazano je da soj MB13 kao i izolirani proteini koje eksprimira, najuspješnije inhibiraju proizvodnju svih mjerenih proupalnih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8), što ukazuje na njegovu potencijalnu primjenu kao probiotik.

## 6. LITERATURA

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

Alp D, Kuleşan H, Altintaş AK (2020) The importance of the S-layer on the adhesion and aggregation ability of Lactic acid bacteria. *Mol Biol Rep* **47**, 3449-3457. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05430-6>

Antal I, Jelić M, Sila, S, Kolaček S, Tambić Andrašević A (2019) Ljudska mikrobiota i Mikrobiom. *Acta Med Croatica* **73**, 3-11.

Bergström JH, Birchenough GM, Katona G, Schroeder BO, Schütte A, Ermund A, Johansson ME, Hansson GC (2016) Gram-positive bacteria are held at a distance in the colon mucus by the lectin-like protein ZG16. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 13833-13838. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611400113>

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

Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J (2015) Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **12**, 303-310. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47>

Bintsis T (2018) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol* **4**, 665-684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>

Boekhorst J, Helmer Q, Kleerebezem M, Siezen RJ (2006) Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology (Reading)* **152**, 273-280. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28415-0>

Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**, 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>

Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z, Fang W (2007) The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* **115**, 307-312. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.007>

Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M., Francavilla R. (2021) Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Front Immunol* **12**, 578386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.578386>

Collado MC, Gueimonde M, Salminen S (2010) Probiotics in Adhesion of Pathogens: Mechanisms of Action. U: *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics* (Watson, RR, Preedy, VR, ured.) Academic Press str. 353-370. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374938-3.00023-2>

Colombo M, Castilho NPA, Todorov SD, Nero LA (2018) Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiol* **18**, 219. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1356-8>

DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E (2016) Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflamm Bowel Dis* **22**, 1137-1150. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000750>

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

de Moreno de LeBlanc A, LeBlanc JG (2014) Effect of probiotic administration on the intestinal microbiota, current knowledge and potential applications. *World J Gastroenterol* **20**, 16518-28. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16518>

Dimitrov Z, Gotova I, Chorbadijska E (2014) *In vitro* characterization of the adhesive factors of selected probiotics to Caco-2 epithelium cell line. *Biotechnol Biotechnol Equip*, **28**, 1079-1083. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.969948>

Dlamini ZC, Langa RLS, Aivegoro OA, Okoh AI (2019) Safety Evaluation and Colonisation Abilities of Four Lactic Acid Bacteria as Future Probiotics. *Probiotics & Antimicro Prot* **11**, 197-402. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9430-y>

Fagan RP, Fairweather NF (2014) Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol* **12**, 211-222. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3213>

Fang J, Wang H, Zhou Y, Zhang H, Zhou H, Zhang X (2021) Slimy partners: the mucus barrier and gut microbiome in ulcerative colitis. *Exp Mol Med* **53**, 772-787. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00617-8>

Ferrari M, Hameleers L, Stuart MC, Oerlemans MM, de Vos P, Jurak E, Walvoort MT (2022) Efficient isolation of membrane-associated exopolysaccharides of four commercial bifidobacterial strains. *Carbohydr Polym* **278**, 118913. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118913>

Gao K, Wang C, Liu L, Dou X, Liu J, Yuan L, Zhang W, Wang H (2015) Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine

intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. *J Microbiol Immunol Infect* **50**, 700-713. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.05.002>

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

Gou HZ, Zhang YL, Ren LF, Li ZJ, Zhabg L (2022) How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Front Micriobiol* **13**, 929346. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.929346>

Gupta R, Jeevaratnam K, Fatima A (2018) Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health (A Review) *J Emerg Technol Innov Res* **5**, 411-424.

Gut AM, Vasiljevic T, Yeager T, Donkor ON (2018) Salmonella infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology (Reading)* **164**, 1327-1344. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000709>

Harzallah D, Belhadj H (2013) Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. U: *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (Kongo, M, ured.) InTech str. 197-216. <https://doi.org/10.5772/50732>

Hynönen U, Palva A (2013) Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 5225-5243. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4962-2>

Janković T, Frece J, Abram M, Gobin I (2012) Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *IJSER* **6**, 19-24.

Javitt G, Kinzel A, Reznik N, Fass D (2021) Conformational switches and redox properties of the colon cancer-associated human lectin ZG16. *FEBS J* **288**, 6465-6475. <https://doi.org/10.1111/febs.16044>

Jurášková D, Ribeiro SC, Silva CCG (2022) Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria: From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods* **11**, 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>

Khalid K (2011) An overview of lactic acid bacteria. *Int J Biol Sci* **1**, 1-13.

Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM (2021) Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria *Mol* **26**, 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>

König H i Fröhlich J (2017) Lactic Acid Bacteria. U: König H, Uden G, Fröhlich J (ured.) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 2 izd., Springer, Berlin, Heidelberg str. 3-41. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_1)

Li M, Wang Y, Cui H, Li Y, Sun Y, Qiu HJ (2020) Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From the Gastrointestinal Tract of a Wild Boar as Potential Probiotics. *Front Vet Sci* **7**, 49. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00049>

Li Q, Liu X, Dong M, Zhou J, Wang Y (2015) Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *IJAPR* **3**, 84-92.

Maajid HS, Nurliyani N, Widodo W (2022) Exopolysaccharide production in fermented milk using *Lactobacillus casei* strains AP and AG. *AIMS Microbiol* **8**, 138-152. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2022012>

Megta AK, Pratap S, Kant A, Palva A, von Ossowski I, Krishnan V (2020) Crystal structure of the atypically adhesive SpaB basal pilus subunit: Mechanistic insights about its incorporation in lactobacillar SpaCBA pili, *CRSB* **2**, 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.11.001>

Mobili P, Gerbino E, Tymczynsyn E, Gómez-Zavaglia A (2010) S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putativerole in surface and probiotic properties of whole bacteria. U: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and*

*Microbial Biotechnology* (Méndez-Vilas, A, ured.) Formatex Research Center, Badajoz, str. 1224-1234.

Mokoena MP (2017) Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Mol* **22**, 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A (2019) Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 6463-6472. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>

Muscariello L, De Siena B, Marasco R (2020) Lactobacillus Cell Surface Proteins Involved in Interaction with Mucus and Extracellular Matrix Components. *Curr Microbiol* **77**, 3831-3841. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02243-5>

Pavkov-Keller T, Howorka S, Keller W (2011) The Structure of Bacterial S-Layer *Proteins* *Prog Mol Biol Transl Sci* **103**, 73-130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415906-8.00004-2>.

Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A (2019) Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr* **10**, 49-66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>

Pum D, Sleytr UB (2014) Reassembly of S-layer proteins. *Nanotechnology* **25**, 312001 <https://doi.org/10.1088/0957-4484/25/31/312001>

Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S (2006) Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J Food Prot* **69**, 2011-2015. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.8.2011>



Schroeder BO (2019) Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota, *Gastroenterol Rep* **7**, 3–12. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy052>

Shewale RN, Sawale PD, Khedkar CD, Singh A (2014) Selection criteria for probiotics: A review. *Int J Probiotics Prebiotics* **9**, 17-22.

Shin JS, Jung JY, Lee SG, Shin KS, Rhee YK, Lee MK i sur. (2016) Exopolysaccharide fraction from *Pediococcus pentosaceus* KFT18 induces immunostimulatory activity in macrophages and immunosuppressed mice. *J Appl Microbiol* **120**, 1390–1402. <https://doi.org/10.1111/jam.13099>

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D, Horejs CM, Tscheliessnig R (2011) Nanobiotechnology with S-Layer Proteins as Building Blocks. *Prog Mol Biol Transl Sci* **103**, 277-352. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415906-8.00003-0>

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D (2014) S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 823–864. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12063>

Socol CR, Porto de Souza Vandenberghe L, Rigon Spier M, Pedroni Medeiros AB, Yamaguishi CT, De Dea Lindner J i sur. (2010) The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol Biotechnol* **48**, 413–434.

Suárez LJ, Arboleda S, Angelov N, Arce RM (2021) Oral Versus Gastrointestinal Mucosal Immune Niches in Homeostasis and Allostasis. *Front Immunol* **12**, 705206. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705206>

Sungur T, Aslim B, Karaaslan C, Aktas B (2017) Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). *Anaerobe* **47**, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.013>

Takanashi N, Tomosada Y, Vilenna J, Murata K, Takahashi T, Chiba E i sur. (2013) Advanced application of bovine intestinal epithelial cell line for evaluating regulatory effect of lactobacilli

against heat-killed enterotoxigenic *Escherichia coli*-mediated inflammation. *BMC Microbiol* **13**, 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-54>

Vancamelbeke M, Vermeire S (2017) The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 821-834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>

van Zyl WF, Deane SM, Dicks LMT (2020) Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes* **12**, 1831339. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1831339>

Uroić K, Novak J, Hynönen U, Pietilä TE, Leboš Pavunc A, Kant R, Kos B, Palva A, Šušković J (2016) The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT - Food Sci Technol* **69**, 623-632. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.013>

Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J i sur. (2021) Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

Williams NT (2010) Probiotics. *Am J Health-Syst Pharm* **67** 449-458. <https://doi.org/10.2146/ajhp090168>

Xu Y, Cui F, Liu L, Shan Y, Liu B (2019) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocoll* **94**, 475-499. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032>

Yadav AK, Tyagi A, Kumar A, Saklani AC, Grover S, Batish VK (2015) Adhesion of indigenous *Lactobacillus plantarum* to gut extracellular matrix and its physicochemical characterization. *Arch Microbiol* **197**, 155-164. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1034-7>

Yang Y, Galle S, Le MH, Zijlstra RT, Gänzle MG (2015) Feed Fermentation with Reuteran- and Levan-Producing *Lactobacillus reuteri* Reduces Colonization of Weanling Pigs by

Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **81**, 5743-5752.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01525-15>

Zhang W, Wang H, Liu J, Zhao Y, Gao K, Zhang J (2013) Adhesive ability means inhibition activities for lactobacillus against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe* **22**, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.06.005>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja JANA HRSAN izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis