

# Potencijalne terapijske biomolekule probiotika kao živih lijekova

---

Čuljak, Nina

Doctoral thesis / Disertacija

2024

*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:159:778656>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-30**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Nina Čuljak

**POTENCIJALNE TERAPIJSKE  
BIOMOLEKULE PROBIOTIKA KAO ŽIVIH  
LIJEKOVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Nina Čuljak

**POTENCIJALNE TERAPIJSKE  
BIOMOLEKULE PROBIOTIKA KAO ŽIVIH  
LIJEKOVA**

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology

Nina Čuljak

**POTENTIAL THERAPEUTIC  
BIOMOLECULES OF PROBIOTICS AS  
LIVING DRUGS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
PhD Andreja Leboš Pavunc, Associate Professor

Zagreb, 2024

*Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Sveučilištu u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, u okviru znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika” IP-2019-04-2237 (voditelj: prof. dr. sc. Blaženka Kos), pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc. Dio eksperimenata vezan uz određivanje strukture egzopolisaharida proveden je na Zavodu za prirodne znanosti Sveučilišta u Trstu, Italija, u okviru FEMS-ove stipendije “Structural characterisation of the exopolysaccharides isolated from selected Lactobacillus fermentum MCI strain” (FEMS-GO-2021-034) pod voditeljstvom s doc. dr. sc. Paolom Cescutti.*

*Informacije o mentoru:*

dr. sc. Andreja Leboš Pavunc, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta

## ŽIVOTOPIS

Izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc rođena je 14. siječnja 1981. u Zagrebu. Diplomirala je 2006. godine, a doktorirala 2012. godine na Sveučilištu u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Od 2007. godine je zaposlena na Sveučilištu u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, najprije kao asistent, zatim kao viši asistent pa docent, te od 2022. godine u znanstvenonastavnom zvanju izvanredni profesor.

Aktivno je bila uključena u realizaciju 10 nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekata od čega na jednom projektu Ministarstva znanosti i obrazovanja, 8 potpora Sveučilišta u Zagrebu i 3 projekta Hrvatske zaklade za znanost; zatim na jednom tehnologijskom, razvojnoistraživačkom projektu i 2 projekata suradnje s gospodarstvom (Podravka d.d. i Belupo d.d.). Kao istraživač je sudjelovala na međunarodnom EUREKA projektu „Development of probiotic yoghurt technology with improved yoghurt characteristics“ (2006.-2009.), zatim FP7 SEEERA.NET projektu „Conservation and standardization of traditional technologies of fermented milk products based on autochthonous lactic acid bacteria“ (2010.-2012.) i bilateralnom projektu Hrvatska/Slovenija „Lactic acid bacteria as live biotherapeutic products“ (2014.-2015.). Sudjelovala je također na projektu financiranim iz European Education and Culture Executive Agency (EACEAE): HarISA - Harmonizacija i inovacije u doktorskim studijskim programima biljnog zdravlja za održivu poljoprivredu – Radionica za mentore na temu: Transfer of own experiences - mentoring doctoral students who are collaborators on a scientific research project. Aktivno sudjeluje u radu znanstvenog Centra izvrsnosti za bioprospekting mora „BioProspecting Jadranskog mora“ (BioProCro), Europskog fonda za regionalni razvoj.

Znanstveno-istraživački rad izv. prof. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc obuhvaća područje biotehnologije s posebnim naglaskom na bakterije mliječne kiseline u okviru probiotičkog i prebiotičkog koncepta te njihove primjene kao starter kultura uz izdvojena ispitivanja antimikrobnog djelovanja. Do sada je objavila 39 znanstvenih radova od kojih je 32 iz grupacije A1, 3 iz iz A2, a 4 iz grupacije A3 radova. Radovi su prema Web of Science citirani 811 puta;

a h-indeks iznosi 14. Aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim znanstvenim i stručnim skupovima i radionicama. Kao tajnica organizacijskih odbora je sudjelovala u organizaciji 3 međunarodna znanstvena skupa. 2009. godine je dobila FEMS-ovu stidendiju za tromjesečni boravak u Laboratoriju Génétique Microbienne, u istraživačkom institutu INRA, Francuska, za rad na projektu „The interaction between the host and its digestive microbiota and related microorganisms“. 2008. godine je dobila nagradu za najbolji poster u području Prehrambene biotehnologije na CEFood kongresu održanom u Cavtatu, pod naslovom “The use of *Lactobacillus plantarum* L4 for the production of probiotic drink with cabbage juice”, 2010. godine je dobila Potporu Biotehničke zaklade, a 2017. godine Srebrnu medalju na 9. međunarodnom sajmu inovacija, Agro Arca. Članica je Hrvatskog mikrobiološkog društva, Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog društva za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam te udruga Ljetna tvornica znanosti i Bioteka. Pod njenim mentorstvom izrađeno je 9 završnih i 9 diplomskih radova. Recenzirala je 39 radova u različitim hrvatskom i inozemnim znanstvenom časopisima. Suautorica je 5 skripta i 2 poglavlja u sveučilišnim udžbenicima. Aktivno sudjeluje kao članica Odbora za završne i diplomske radove, Povjerenstva za stručnu praksu, Povjerenstva za unutarnju prosudbu sustava osiguranja kvalitete na Sveučilištu u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

Na Fakultetu sudjeluje u nastavi na predmetima „Biotehnologija 4“, „Tehnologija antibiotika“, „Tehnologija enzima“, „Probiotici i starter kulture“ „Mikrobna ekologija“ i „Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje“ te aktivno sudjeluje u Smotri Sveučilišta, Danima otvorenih vrata PBF-a te Festivalu znanosti. 2018. godine je kao mentorica sudjelovala na Ljetnoj tvornici znanosti. Od 2018. Do 2020. je kao mentorica sudjelovala na projektu društveno korisnog učenja Europskog socijalnog fonda „U društvu mikroba“ u okviru kojeg je stvoren virtualni muzej mikroba „Microseum“. S udrugom Bioteka je sudjelovala na projektu PANDA (projektna nastava za darovitu djecu) i projektu Europskih strukturnih i investicijskih fondova „Razvoj mreže STEM ambasadora“.

## ZAHVALA

*Najprije zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc na strpljenju i vodstvu te nesebičnim savjetima i pomoći tijekom svih aspekata izrade ovog doktorskog rada. Hvala na smirenosti i sabranosti te usmjeravanju tijekom cijelog ovog, ponekad mukotrpnog, procesa.*

*Veliko hvala pročelnici Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura prof. dr. sc. Blaženki Kos, koja je osmislila te stručno i kritično vodila projekt u sklopu kojega je izrađen ovaj doktorski rad. Vaša motivacija i ljubav prema poslu su nadahnjujući.*

*Također, zahvaljujem i dr. sc. Jagodi Šušković, prof. emerita, prof. dr. sc. Jasni Novak, dr. sc. Martini Banić i dr. sc. Katarini Butorac od kojih sam samo mogla učiti i napredovati, kako poslovno, tako i privatno. Martinić i Ketii, vaša je kolegijalnost prerasla u prijateljstvo. Hvala na nesebičnoj podjeli znanja, podršci, slušanju, a ponajviše smijehu.*

*Hvala i svim ostalim djelatnicima Zavoda za biokemijsko inženjerstvo koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog doktorskog rada.*

*Zahvaljujem i svim suradnicima koji su doprinijeli izradi ovog doktorskog rada – Kreši, Željku i Ani iz Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji te Dyani i prof. dr. sc. Nadi Oršolić sa Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Posebno se zahvaljujem prof. Paoli Cescutti i dr. sc. Barbari Bellich pod čijim stručnim vodstvom sam provela 3 mjeseca u Trstu te kolegama Michaeli i Simoneu koji su mi boravak u Trstu učinili nezaboravnim.*

*Svim prijateljima i rodbini hvala na velikoj podršci i zajedničkim trenutcima. Iako niste uvijek znali, vaša prisutnost i riječ ohrabrenja su mi dale neizmjernu snagu.*

*Za kraj, zahvaljujem roditeljima, Senki i Slavenu, te bratu Marinku bez čije bi bezuvjetne podrške i vjere ovaj proces bio puno teži. Neizmjereno hvala!*



Tema doktorskog rada prihvaćena je na redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akad. god. 2021./2022. održanoj dana 20. svibnja 2022., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 25. listopada 2022. godine.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### POTENCIJALNE TERAPIJSKE BIOMOLEKULE PROBIOTIKA KAO ŽIVIH LIJEKOVA

Nina Čuljak, mag. ing. biotechn.

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

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

#### Sažetak:

Cilj ovog rada bio je istražiti pet odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK), izoliranih iz majčinog mlijeka, selekcioniranih producenata potencijalnih terapijskih biomolekula – S-proteina i egzopolisaharida (EPS-a). Proteomička analiza sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 je potvrdila prisutnost površinskih S-proteina, čija je tercijarna struktura određena primjenom I-TASSER servera. Dokazana je funkcionalna uloga S-proteina u preživljavanju simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta, adheziji na Caco-2 stanice te kompetitivnoj ekskluziji patogena. U genomu soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 su detektirani geni uključeni u Wzx/Wzy-ovisan put biosinteze EPS-a, a strukturna analiza EPS-a provedena NMR (*engl.* nuclear magnetic resonance) spektroskopijom je pokazala da se sastoji od dva polisaharida. Dokazana je uloga EPS-a u adheziji na Caco-2 stanice te kompetitivnoj ekskluziji *Escherichia coli* 3014. Ustanovljeno je antimikrobno djelovanje supernatanata ispitivanih sojeva BMK prema patogenim bakterijama te antioksidacijsko djelovanje ispitivanih sojeva. Povećanje ekspresije JAM-A, okcludina, ZO-1, MUC2 i ZG16 te smanjenje ekspresije proupalnih citokina IL-6, IL-8 i IL-1 $\beta$  *in vitro* ukazuju na regeneracijsko i imunomodulacijsko djelovanje sojeva BMK i njihovih biomolekula. Pozitivan učinak soja *L. fermentum* MC1 i njegovog EPS-a na upalne procese u crijevima miševa, regeneraciju crijevne sluznice i mikrobiotu, ukazuje na potencijalnu primjenu soja kao probiotika i njegovih EPS-a kao prebiotika. Sojevi BMK su zaštićeni mikroinkapsulacijom u alginatu, sa i bez dodatka galakto- ili frukto-oligosaharida, te nanoinkapsulacijom, što se očituje velikom stopom preživljavanja nepovoljnih uvjeta ( $> 10^8$  CFU/mL).

Broj stranica: 161

Broj slika: 63

Broj tablica: 14

Broj literaturnih navoda: 254

Broj priloga: 7

Jezik izvornika: hrvatski

**Ključne riječi:** probiotici, S-proteini, egzopolisaharidi, imunomodulacija, mikrobiota, inkapsulacija

**Datum obrane:** 04. listopada 2024.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Blaženka Kos, redoviti profesor u trajnom zvanju
2. dr. sc. Jadranka Frece, redoviti profesor u trajnom zvanju
3. dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor u trajnom zvanju
4. dr. sc. Jasna Novak, redoviti profesor (zamjena)

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### POTENTIAL THERAPEUTIC BIOMOLECULES OF PROBIOTICS AS LIVING DRUGS

Nina Čuljak, MSc

Thesis performed at Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology, University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology

Supervisor: PhD Andreja Leboš Pavunc, Associate Professor

#### Abstract:

The aim of this study was to investigate five lactic acid bacteria (LAB) strains, isolated from breast milk, selected as producers of potential therapeutic biomolecules – S-proteins and exopolysaccharides (EPSs). Proteomic analysis of strains *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 and MB20 confirmed the presence of surface S-proteins, whose tertiary structure was determined using the I-TASSER server. The functional role of S-proteins was demonstrated in terms of survival under simulated gastrointestinal tract conditions, adhesion to Caco-2 cells and competitive exclusion of pathogens. Genes involved in the Wzx/Wzy-dependent pathway of EPSs biosynthesis were detected in the genome of *Limosilactobacillus fermentum* MC1, and nuclear magnetic resonance (NMR) structural analysis revealed that EPSs consist of two polysaccharides. The role of EPSs in adhesion to Caco-2 cells and competitive exclusion of *Escherichia coli* 3014 was demonstrated. The antimicrobial activity of the supernatants of the tested LAB strains against pathogenic bacteria and the antioxidant activity of the tested strains were confirmed. The increase in the expression of JAM-A, occludin, ZO-1, MUC2 and ZG16, and the decrease in the expression of the proinflammatory cytokines IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$  indicate the regenerative and immunomodulatory effects of the LAB strains and their biomolecules. Positive effects of *L. fermentum* MC1 and its EPSs on inflammatory processes in the intestine of mice, the regeneration of the intestinal mucosa and the microbiota indicate potential application of the strain *L. fermentum* MC1 as probiotic and its EPSs as prebiotics. The LAB strains were protected by microencapsulation in alginate, with and without the addition of galacto- or fructo-oligosaccharides, and by nanoencapsulation, as evidenced by a high survival rate under unfavourable conditions ( $> 10^8$  CFU/mL).

Number of pages: 161

Number of figures: 63

Number of tables: 14

Number of references: 254

Number of supplements: 7

Original in: Croatian

Key words: probiotics, S-proteins, exopolysaccharides, immunomodulation, microbiota, encapsulation

Date of the thesis defense: October 4<sup>th</sup>, 2024

#### Reviewers:

1. PhD Blaženka Kos, Full professor having a tenure
2. PhD Jadranka Frece, Full professor having a tenure
3. PhD Nada Oršolić, Full professor having a tenure
4. PhD Jasna Novak, Full professor (substitute)

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

## PROŠIRENI SAŽETAK

Iz uzoraka majčinog mlijeka su prethodno izolirani sojevi bakterija mliječne kiseline (BMK), od kojih su neki producenti potencijanih terapijskih biomolekula – S-proteina i egzopolisaharida (EPS-a). Sekvencioniranjem čitavih genoma odabranih sojeva BMK ustanovljeno je da četiri potencijalna soja producenta S-proteina pripadaju vrsti *Levilactobacillus brevis*, dok soj producent EPS-a pripada vrsti *Limosilactobacillus fermentum*. Detaljna pretraga genoma sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te proteomička analiza površinskih proteina provedena tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (*engl.* liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS) potvrdile su prisutnost S-proteina na površini ispitivanih sojeva, a terciarna struktura S-proteina pretpostavljena je pomoću I-TASSER servera. Dokazana je pozitivna uloga S-proteina u funkcionalnim svojstvima sojeva producenata, poput preživljavanja u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT-a), u adheziji na Caco-2 staničnu liniju te u kompetitivnoj ekskluziji potencijalnih patogena *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, a kod sojeva MB13 i MB20 i ekskluziji *Escherichia coli* 3014. Detaljnom genomičkom analizom soja *L. fermentum* MC1, producenta EPS-a, pronađeni su geni uključeni u aktivaciju prekursora, biosintezu te polimerizaciju i transport EPS-a, koji su dio Wzx/Wzy-ovisnog puta biosinteze EPS-a. Strukturna karakterizacija izoliranih EPS-a provedena je <sup>1</sup>H i 2D NMR (*engl.* nuclear magnetic resonance) spektroskopijom, a rezultati su pokazali da se EPS sastoji od dva polisaharida, od kojih je glavni sastavljen od ponavljajućih jedinica 1,6 galaktofuranoze s grananjima glukoze na drugom ugljikovom atomu. Sposobnost adhezije soja *L. fermentum* MC1 na Caco-2 stanice potvrđena je vizualizacijom pomoću fluorescencijskog mikroskopa pri MOI10 i MOI50 nakon 4 i 12 sati inkubacije. Dokazana je i pozitivna uloga EPS-a (1 mg/mL) u adheziji soja *L. fermentum* MC1 na Caco-2 staničnu liniju te u kompetitivnoj ekskluziji *E. coli* 3014. Turbidimetrijskom metodom je ustanovljeno jako antimikrobno djelovanje supernatanta svih ispitivanih sojeva BMK prema potencijalno patogenim bakterijama (postotak inhibicije > 60 %), dok je metodom hvatanja radikala DPPH-a utvrđeno snažno antioksidacijsko djelovanje svih ispitivanih sojeva (postotak uklanjanja DPPH radikala > 45 %). *In vitro* eksperimenti na staničnim kulturama humanih kolonocita dokazali su regeneracijsko djelovanje ispitivanih sojeva i njihovih biomolekula što se očitivalo povećanjem ekspresije proteina uključenih u očuvanju crijevne cjelovitosti (JAM-A, okcludin, ZO-1, MUC2, ZG16) u odnosu na kontrolu, a najviše su se istaknuli sojevi MB2 i MC1, S-proteini soja MB1 te EPS-i izolirani iz soja MC1. Također, ustanovljeno je i imunomodulacijsko djelovanje ispitivanih BMK i njihovih biomolekula što se očitivalo smanjenjem ekspresije ispitivanih

proupalnih citokina IL-6, IL-8 i IL-1 $\beta$ . Iz uzoraka fecesa bolesnih i zdravih eksperimentalnih miševa izolirana je DNA te je provedeno sekvencioniranje V1-V3 regije 16S rRNA gena. Dokazano je da je *in vivo* kaniliranje eksperimentalnih miševa sojem MC1 i njegovim EPS-ima promijenilo sastav fekalnog mikrobioma. Hranjenje miševa s DSS-induciranim kolitisom sa sojem MC1 te njegovim EPS-ima uzrokovalo je povećanje relativne zastupljenosti koljena *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Firmicutes* te smanjenje *Candidatus saccharibacteria*, *Chlamydiae*, te u slučaju hranjenja EPS-ima, i *Proteobacteria*. Što se tiče hranjenja zdravih miševa sojem MC1 i njegovim EPS-ima, uočen je značajan pad relativne zastupljenosti koljena *Candidatus saccharibacteria* te porast relativne zastupljenosti koljena *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* i, u slučaju hranjenja EPS-ima, *Actinobacteria*. Vezano uz rezultate imunskih promjena, tretiranje miševa s EPS-ima je pokazalo najveće smanjenje razine upale i krvarenja kao posljedica DSS-induciranog kolitisa. Osim toga, povećan broj eritrocita, hemoglobina i hematokrita ukazuju na smanjenje anemije kod skupine miševa s induciranim kolitisom hranjenih EPS-ima. Smanjenje upale kod bolesnih miševa hranjenih sojem MC1 ili njegovim EPS-ima očitivalo se i kroz smanjenje ekspresije upalnih biljega te molekularnog biljega NOX2 koji ukazuje na apoptozu kod miševa s DSS-induciranim kolitisom, što ukazuje na njihovu pozitivnu ulogu u smanjenju upalnih procesa u crijevima. Mikroinkapsulacija ekstruzijom u alginatu, sa ili bez dodatka galaktooligosaharida (GOS) i fruktooligosaharida (FOS) kao prebiotičkih supstrata, pokazala se pogodnom metodom za očuvanje vijabilnosti ispitivanih sojeva budući da je vrijednost CFU/g bila  $> 10^8$  nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije te izlaganja simuliranim uvjetima GIT-a i nakon jednomjesečnog skladištenja, a najbolji su rezultati postignuti mikroinkapsulacijom u alginatu uz dodatak GOS-a. Mjerenje zeta potencijala potvrdilo je uspješnu nanoinkapsulaciju sojeva BMK metodom sloj po sloj. Preživljavanje liofilizacije sojeva producenata S-proteina pokazalo se uspješnijim nakon nanoinkapsulacije, dok je soj MC1 bolje preživio u slobodnom obliku. Preživljavanje svih ispitivanih sojeva BMK u simuliranim uvjetima GIT-a bilo je uspješnije nakon nanoinkapsulacije. S druge strane, nanoinkapsulacija je pozitivno utjecala na preživljavanje jednomjesečnog skladištenja samo kod soja MC1. Također, i nanoinkapsulirane i slobodne stanice su u svim slučajevima preživjele u velikom broju ( $> 10^8$  CFU/mL).

## EXTENDED SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) strains were previously isolated from breast milk samples, some of which produce potential therapeutic biomolecules – S-proteins and exopolysaccharides (EPSs). Whole genome sequencing of selected LAB strains revealed that four potential S-protein producer strains belong to the species *Levilactobacillus brevis*, while the EPS producer strain belongs to the species *Limosilactobacillus fermentum*. A detailed genome search of *L. brevis* strains MB1, MB2, MB13 and MB20 and liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) proteomic analysis of the surface proteins confirmed the presence of S-proteins on the surface of the tested strains, and the tertiary structure of the S-proteins was hypothesized using the I-TASSER server. The positive role of S-proteins in the functional properties of the producer strains, such as survival under unfavorable conditions in the gastrointestinal tract (GIT), adhesion to the Caco-2 cell line and competitive exclusion of potential pathogens *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 and, in case of strains MB13 and MB20, *Escherichia coli* 3014, was demonstrated. Structural characterization of the isolated EPSs was performed using <sup>1</sup>H and 2D nuclear magnetic resonance (NMR) techniques. The results showed that EPS consists of two polysaccharides, the main one of which is composed of repeating units of 1,6 galactofuranose with glucose branches at the second carbon atom. The ability of *L. fermentum* MC1 strain to adhere to Caco-2 cells was confirmed by visualization with a fluorescence microscope at MOI10 and MOI50 after 4 and 12 hours of incubation. The positive role of EPSs (1 mg/mL) in the adhesion of the *L. fermentum* MC1 strain to the Caco-2 cell line and in the competitive exclusion of *E. coli* 3014 was also demonstrated. The turbidimetric method showed strong antimicrobial activity of the supernatants of all tested LAB strains against potentially pathogenic bacteria (percentage of inhibition > 60 %), while the DPPH radical scavenging method showed strong antioxidant activity of all tested strains (percentage of DPPH radical scavenging > 45 %). *In vitro* experiments on cell cultures of human colonocytes demonstrated the regenerative effect of the tested strains and their biomolecules, which was shown in an increase in the expression of proteins involved in the maintenance of intestinal integrity (JAM-A, occludin, ZO-1, MUC2, ZG16) compared to the control, with strains MB2 and MC1, S-proteins of strain MB1 and EPSs isolated from strain MC1 standing out. In addition, the immunomodulatory effect of the examined LAB strains and their biomolecules was noted, which manifested itself in a reduction in the expression of the studied proinflammatory cytokines IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$ . DNA was isolated from fecal samples of diseased and healthy experimental mice and sequencing of the V1-V3 region of the 16S rRNA gene was performed. It was shown that *in vivo* cannulation of experimental mice with strain MC1 and its EPSs alters

the composition of the fecal microbiome. Feeding mice with DSS-induced colitis with strain MC1 and its EPSs resulted in an increase in the relative abundance of *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* and a decrease in *Candidatus saccharibacteria*, *Chlamydiae* and, in the case of EPS feeding, *Proteobacteria*. When healthy mice were fed strain MC1 and its EPSs, a significant decrease in the relative abundance of *Candidatus saccharibacteria* and an increase in the relative abundance of *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and, in the case of EPS feeding, *Actinobacteria* was observed. As for the results of immune changes, treatment of mice with EPSs showed the best reduction in the degree of inflammation and bleeding as a result of DSS-induced colitis. In addition, the increased number of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit count indicated a decrease in anemia in the group of mice with induced colitis that received EPSs. The reduction in inflammation in diseased mice fed with strain MC1 or its EPSs was also reflected in a decrease in the expression of inflammatory markers and the molecular marker NOX2, which indicates apoptosis, suggesting their positive role in reducing inflammatory processes in the intestine. Microencapsulation by extrusion in alginate, with or without the addition of galactooligosaccharides (GOS) and fructooligosaccharides (FOS) as prebiotic substrates, proved to be a suitable method for maintaining the viability of the tested strains, as the value of CFU/g after microencapsulation and freeze-drying, and exposure to simulated GIT conditions as well as after one month of storage was  $> 10^8$ , and the best results were obtained by microencapsulation in alginate with addition of GOS. The measurement of zeta potential confirmed the successful nanoencapsulation of LAB strains by the layer-by-layer method. Survival of the lyophilized S-protein producing strains proved to be more successful after nanoencapsulation, while strain MC1 survived better in free form. Survival of all tested BMK strains under simulated GIT conditions was more successful after nanoencapsulation. On the other hand, nanocapsulation only had better effect on the survival of strain MC1 when stored for one month. In addition, both nanoencapsulated and free cells survived all tested unfavourable conditions in large numbers ( $> 10^8$  CFU/mL).

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	5
2.1. Bakterije mliječne kiseline .....	5
2.1.1. Stanična stijenka bakterija mliječne kiseline.....	5
2.1.2. Klasifikacija bakterija mliječne kiseline.....	6
2.1.3. Metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline.....	6
2.2. Probiotici.....	7
2.2.1. Mehanizam djelovanja probiotika .....	7
2.2.1.1. Zaštita od patogena .....	8
2.2.1.2. Promicanje funkcije crijevne barijere .....	9
2.2.1.3. Imunomodulacija .....	9
2.2.1.4. Dodatni mehanizmi probiotičkog djelovanja .....	9
2.2.2. Humana mikrobiota .....	10
2.2.2.1. Majčino mlijeko – izvor probiotičkih bakterija.....	10
2.2.3. Tržište probiotika.....	11
2.2.4. Problemi i rješenja.....	11
2.3. Druga generacija probiotika .....	12
2.4. Postbiotici i paraprobiotici.....	13
2.5. Potencijalne terapijske biomolekule .....	15
2.4.1. S-proteini .....	16
2.4.1.1. Potencijalne primjene u biotehnologiji .....	19
2.4.2. Egzopolisaharidi.....	19
2.4.2.1. Biosinteza egzopolisaharida kod BMK.....	20
2.4.2.2. Primjena egzopolisaharida .....	22
2.5. Sustavi isporuke i strategije održavanja vijabilnosti probiotika.....	25
2.5.1. Mikroinkapsulacija probiotika .....	26
2.5.2. Nanoinkapsulacija probiotika.....	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	29
3.1. Materijali.....	29
3.1.1. Mikroorganizmi .....	29
3.1.2. Stanične linije .....	29
3.1.3. Hranjive podloge .....	30
3.1.4. Kemikalije .....	31
3.1.5. Aparatura i pribor .....	34
3.2. METODE RADA .....	37
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama.....	37



3.2.2. Čuvanje i priprema staničnih linija .....	37
3.2.3. Izolacija genomske DNA iz sojeva BMK .....	38
3.2.4. Karakterizacija BMK na temelju 16S rRNA sekvencioniranja.....	38
3.2.4.1. Amplifikacija 16S rRNA PCR metodom .....	38
3.2.4.2. Sekvenciranje 16S rRNA gena .....	39
3.2.5. Karakterizacija BMK na temelju sekvencioniranja čitavog genoma .....	39
3.2.6. Karakterizacija S-proteina sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka.....	40
3.2.6.1. Uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih sojeva producenata .....	40
3.2.6.2. Ekstrakcija i natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza ( <i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) površinskih proteina .....	40
3.2.6.3. Identifikacija i karakterizacija S-proteina .....	41
3.2.6.4. Izolacija S-proteina <i>L. brevis</i> sojeva .....	41
3.2.7. Karakterizacija egzopolisaharida soja BMK izoliranog iz majčinog mlijeka.....	42
3.2.7.1. Izolacija egzopolisaharida iz soja <i>L. fermentum</i> MC1 .....	42
3.2.7.2. Kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica ( <i>engl.</i> Size-exclusion chromatography, SEC).....	43
3.2.7.3. Afinitetna kromatografija (Con A Sepharose 4B).....	43
3.2.7.4. <sup>1</sup> H NMR i 2D NMR analize .....	44
3.2.8. Adhezija na crijevne epitelne Caco-2 stanice.....	44
3.2.8.1. Vizualizacija adhezije sojeva BMK na Caco-2 staničnu liniju .....	45
3.2.9. Kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija sojevima BMK, izoliranih iz majčinog mlijeka, primjenom Caco-2 stanične linije .....	46
3.2.10. Preživljavanje probiotičkih bakterija, producenata S-proteina, u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT-a).....	47
3.2.10.1. Priprema simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva.....	47
3.2.10.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje probiotičkih bakterija .....	47
3.2.11. Određivanje antimikrobne aktivnosti sojeva BMK turbidimetrijskom metodom..	47
3.2.12. Ispitivanje antioksidacijskog djelovanja intaktnih stanica sojeva BMK producenata potencijalnih terapijskih biomolekula .....	48
3.2.13. In vitro ispitivanje utjecaja BMK i njihovih terapijskih biomolekula na upalne procese u crijevima.....	48
3.2.13.1. Utjecaj BMK i njihovih terapijskih biomolekula na regeneraciju crijevne sluznice .....	48
3.2.13.2. Utjecaj BMK i njihovih terapijskih biomolekula na imunomodulacijsko djelovanje .....	50
3.2.14. In vivo učinak <i>L. fermentum</i> MCI i njegovih EPS-a na modulaciju crijevne mikrobiote i upalne procese miševa s izazvanom upalnom bolešću crijeva.....	51
3.2.14.1. Priprema probiotičke suspenzije soja <i>L. fermentum</i> MCI i potencijalne terapijske biomolekule za kaniliranje miševa .....	51
3.2.14.2. Pokusne životinje .....	51
3.2.14.3. Plan pokusa .....	52
3.2.14.4. Indukcija kolitisa.....	53
3.2.14.5. Praćenje promjene tjelesne mase životinja .....	53

3.2.14.6. Uzorkovanje krvi .....	53
3.2.14.7. Izolacija DNA iz fecesa miševa i sekvencioniranje .....	54
3.2.14.8. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom ( <i>engl.</i> quantitative polymerase chain reaction, qPCR).....	54
<b>3.2.15. Mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata S-proteina i egzopolisaharida, u alginatu .....</b>	<b>56</b>
3.2.15.1. Mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata S-proteina i egzopolisaharida, u alginatu uz dodatak prebiotika .....	57
<b>3.2.16. Nanoinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata S-proteina i egzopolisaharida, „layer by layer“ metodom .....</b>	<b>57</b>
3.2.16.1. Mjerenje zeta potencijala .....	58
<b>3.2.17. Preživljavanje mikro- i nanokapsula sojeva BMK, producenata S-proteina i EPS-a, u nepovoljnim uvjetima te tijekom dugotrajnog skladištenja .....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.18. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.19. Statistička analiza i prikaz rezultata.....</b>	<b>59</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Karakterizacija potencijalnih terapijskih biomolekula .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.1. Karakterizacija S-proteina izoliranih iz <i>L. brevis</i> i njihova funkcionalna uloga ...</b>	<b>61</b>
4.1.1.1. 16S rRNA i sekvencioniranje čitavog genoma sojeva producenata S-proteina .....	61
4.1.1.2. Proteomička karakterizacija S-proteina sojeva <i>L. brevis</i> LC-MS analizom i predikcija tercijarne strukture .....	65
4.1.1.3. Uloga S-proteina ispitivanih <i>L. brevis</i> sojeva u preživljavanju simuliranih uvjeta GIT-a .....	66
4.1.1.4. Uloga S-proteina ispitivanih <i>L. brevis</i> sojeva u adheziji na Caco-2 staničnu liniju .....	68
4.1.1.5. Uloga S-proteina ispitivanih <i>L. brevis</i> sojeva u kompetitivnoj ekskluziji potencijalno patogenih bakterija .....	69
<b>4.1.2. Karakterizacija egzopolisaharida iz <i>L. fermentum</i> i njihova funkcionalna uloga .</b>	<b>71</b>
4.1.2.1. 16S rRNA i sekvencioniranje čitavog genoma soja producenta egzopolisaharida .....	71
4.1.2.2. Geni odgovorni za biosintezu egzopolisaharida kod <i>L. fermentum</i> MC1 .....	73
4.1.2.3. Izolacija i strukturna karakterizacija egzopolisaharida kojeg proizvodi <i>L. fermentum</i> MC1 .....	75
4.1.2.4. Uloga EPS-a iz <i>L. fermentum</i> MC1 u adheziji na Caco-2 staničnu liniju .....	82
4.1.2.5. Uloga EPS-a iz <i>L. fermentum</i> MC1 u kompetitivnoj ekskluziji patogenih bakterija .....	84
<b>4.2. Određivanje antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja sojeva producenata S-proteina i egzopolisaharida .....</b>	<b>85</b>
4.2.1. <i>Određivanje antimikrobnog djelovanja sojeva BMK turbidimetrijskom metodom</i>	85
4.2.2. <i>Antioksidacijsko djelovanje sojeva BMK.....</i>	86
<b>4.3. In vitro ispitivanje regeneracijskog i imunomodulacijskog djelovanja S-proteina i egzopolisaharida te sojeva producenata na staničnoj kulturi humanih kolonocita.....</b>	<b>87</b>
4.3.1. <i>Regeneracija crijevne sluznice staničnih kultura humanih kolonocita .....</i>	87
4.3.2. <i>Imunomodulacijsko djelovanje .....</i>	100
<b>4.4. In vivo ispitivanje učinka soja <i>L. fermentum</i> MC1 i njegovog egzopolisaharida u modulaciji fekalnog mikrobioma i imunomodulaciji .....</b>	<b>104</b>
4.4.1. <i>Utjecaj na fekalnu mikrobiotu eksperimentalnih miševa.....</i>	104

4.4.2. Imunomodulacijski učinak hranjenja sojem <i>L. fermentum</i> MCI i njegovim EPS-ima na upalne procese u crijevima.....	116
4.5. Sustavi isporuke i strategije održavanja vijabilnosti sojeva BMK producenata potencijalnih terapijskih biomolekula.....	125
4.5.1. Mikroinkapsulacija odabranih sojeva BMK.....	125
4.5.2. Nanoinkapsulacija odabranih sojeva BMK.....	130
5. ZAKLJUČCI.....	135
6. LITERATURA.....	137
7. PRILOZI	
8. ŽIVOTOPIS	

## **1. UVOD**

Humani gastrointestinalni trakt (GIT) predstavlja kompleksan ekosustav koji se sastoji od milijardi mikroorganizama, od kojih 98 % čine bakterije iz koljena *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Proteobacteria* (Das i Nair, 2019). Brojni okolišni čimbenici, kao što su neuravnotežena prehrana, nedostatak fizičke aktivnosti i pušenje, mogu utjecati na sastav crijevne mikrobiote, a dokazano je da je promjena u njenom sastavu, tzv. disbioza, povezana s patologijom kardiovaskularnog sustava, GIT-a i jetre te emocionalnim poremećajima (Trush i sur., 2020). Saznanja o štetnosti crijevne disbioze dovela su do povećane potražnje za probioticima, koji su definirani kao živi mikroorganizmi koji, primjenjeni u odgovarajućoj količini, imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina (FAO/WHO, 2001). Zbog svog antagonističkog djelovanja prema ciljanim patogenima, probiotici predstavljaju i obećavajuću alternativnu strategiju u borbi protiv rastućeg problema rezistencije bakterija na antimikrobne lijekove (Elshagabee i Rokana, 2022). U tijeku je razvoj probiotika nove generacije (*engl.* next-generation probiotics) koji su definirani kao “živi bioterapijski pripravci” (*engl.* live biotherapeutic products, LBPs), a odnose se na bakterije koje će liječiti ili spriječiti simptome bolesti. Ove nove proizvode znanstvenici još nazivaju i “probiotici 2.0” ili “dizajnirani probiotici” (Maxmen, 2017).

Često se kao probiotici koriste bakterije mliječne kiseline (BMK), koje su u visokim koncentracijama zastupljene u fermentiranim prehrambenim proizvodima. Osim toga, BMK su prisutne i u majčinom mlijeku, koje predstavlja bogat izvor nutrijenta, poput proteina, lipida, ugljikohidrata, vitamina i minerala, zbog čega se smatra optimalnom hranom za novorođenčad (Boquien, 2018). Posebno su značajne BMK koje imaju sposobnost proizvodnje potencijalnih terapijskih biomolekula – površinskih (*engl.* surface, S) proteina i egzopolisaharida (*engl.* exopolysaccharides, EPS).

S-proteini su dvodimenzionalne, parakristalne, monomolekularne kristalne strukture površinskih (gliko)proteina koji prekrivaju staničnu površinu stotina različitih vrsta gotovo svih taksonomskih skupina Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija i arheja u obliku sloja (S-sloj) (Assandri i sur., 2023). Primarna struktura sadrži dvije funkcionalne regije – vezujuću, odgovornu za vezanje proteina na staničnu stijenkku, te kristalizacijsku, koja posreduje u združivanju S-proteina, ali i u vezanju bakterija na različite strukture (Sagmeister i sur., 2024). Kao najudaljeniji sloj koji prekriva površinu stanice, sloj S-proteina je u izravnom doticaju s njenim mikrookolišem, te se uloga S-proteina može proučavati iz dvije različite perspektive – uloga u adheziji bakterije na različite površine i supstrate te uloga kao mehanička barijera u štetnom okolišu (Gerbino i sur., 2015). Ekspresija S-proteina u probiotičkim bakterijama je

rijetka, ali poželjna osobina, jer se pokazalo da ima važnu ulogu u ekspresiji probiotičkih svojstava soja producenta budući da štiti stanice od nepovoljnih uvjeta okoline (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016), ali i utječe na mnoga svojstva stanične površine, uključujući površinsko prepoznavanje, autoagregaciju i koagregaciju te adheziju na različite epitelne i subepitelne strukture (Banić i sur., 2022; Novak i sur., 2021; Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018). Karakteristična svojstva za S-proteine *Lactobacillus* sojeva su njihova veličina u rasponu od 25 do 71 kDa, neglikoziliranaost, bazičnost, te posjedovanje N-terminalnog signalnog peptida sastavljenog od 25 – 30 aminokiselina tipičnih za Sec-put izbacivanja proteina kroz citoplazminu membranu, a djeluju kao zaštitni omotači, molekularna sita, mreže za molekule i ione, adhezini i mjesta na površini stanice za prepoznavanje (Alp i sur., 2020; Avall-Jääskeläinen i Palva, 2005). Poznato je da se S-proteini *Lactobacillus* sojeva međusobno razlikuju po sastavu i redosljedu aminokiselina u molekuli, iako pripadaju istoj bakterijskoj vrsti kao što je to slučaj kod vrste *Levilactobacillus brevis* (Banić i sur., 2018).

Osim S-proteina, biomolekule koje sve više dobivaju na važnosti su EPS-i, ugljikohidratni polimeri velike molekulske mase (Butorac i sur., 2021). Oni mogu biti kovalentno vezani na površinu stanične stijenke i formirati kapsulu, ili su samo djelomično vezani, a djelomično otpušteni u mikrookoliš stanice producenta (Ferrari i sur., 2022), a dijele se na homo- i hetero- polisaharide, ovisno o tome da li su građeni od jedne ili više različitih monosaharidnih podjedinica (Zhou i sur., 2019b). Homoegzopolisaharidi su razgranati ili nerazgranati, sastoje se od glukoze ili fruktoze i kategorizirani su u  $\alpha$ -D-glukane,  $\beta$ -D-glukane, fruktane i poligalaktane, dok su heteroegzopolisaharidi složeni polimeri sastavljeni od okosnice ponavljajućih podjedinica, razgranatih ili nerazgranatih, koji se sastoje od tri do osam monosaharida, derivata monosaharida ili supstituiranih monosaharida (Torino i sur., 2015). Poznato je da brojni mikroorganizmi kao što su alge, gljive, kvasci i bakterije proizvode EPS-a kako bi se bolje prilagodili okolišu i kako bi se nosili s nepovoljnim uvjetima rasta stvaranjem biofilma (Rana i Upadhyay, 2020). Među mikrobnim polisaharidima, EPS-i koje proizvode BMK odabrani su za različite industrijske primjene zbog svog GRAS (*engl.* generally regarded as safe) statusa (Badel i sur., 2011), a poznato je da sudjeluju u poboljšanju organoleptičkih svojstava i produljenju roka trajanja fermentirane hrane (Daba i sur., 2021). Također, prepoznato je i njihovo antimikrobno, imunomodulatorno, protuupalno, antioksidativno, antitumorsko, antivirusno, anti-dijabetičko, anti-ulkusno i kolesterol-snižavajuće djelovanje (Hussain i sur., 2017), zbog čega su EPS-i koje proizvode BMK od velikog interesa. Međutim, ograničavajući faktor u njihovoj industrijskoj primjeni je nizak prinos u odnosu na druge

industrijski važne mikroorganizme (Jurášková i sur., 2022), ali se njegova proizvodnja može povećati promjenom uvjeta uzgoja soja producenta i genetičkim inženjerstvom (Zhang i sur., 2020).

Probiotici imaju brojne zdravstvene prednosti i veliki potencijal za široku primjenu, kao što su prevencija bolesti GIT-a i alergija, antidepresivno, antikancerogeno i imunomodulacijsko djelovanje (Zommiti i sur., 2020). Međutim, njihovu aktivnost narušavaju metode proizvodnje, skladištenje i nepovoljni uvjeti u probavnom traktu (Vivek i sur., 2023). Jedna od tehnika primjene probiotika je mikrokapsulacija u zaštitnim kapsulama koje čine fizičku barijeru za poboljšanje preživljavanja i biorasploživosti probiotika (Razavi i sur., 2021), a zbog svojih pozitivnih karakteristika često se kao nosač za isporuku u mikrokapsulama koristi alginat (Wang i sur., 2022). Nadalje, kako bi se produljilo vrijeme preživljavanja inkapsuliranih probiotika tijekom skladištenja i u ljudskom GIT-u, mogu se dodati prebiotički supstrati koji su neprobavljivi ili samo djelomično probavljivi u GIT-u kako bi se stimulirao rast mikrobiote i probiotika u ljudskom crijevu (Misra i sur., 2022). Također, još jedna metoda zaštite stanica je nanoinkapsulacija koja predstavlja alternativu mikroinkapsulaciji, a olakšava ciljanu isporuku i kontrolirano otpuštanje probiotika u crijevima (Xu i sur., 2022).

Stoga je u ovom radu provedena detaljna genomička karakterizacija sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka sa specifičnim svojstvom proizvodnje potencijalnih terapijskih biomolekula, S-proteina i EPS-a, te strukturna karakterizacija samih biomolekula. Također, provedeno je *in vitro* ispitivanje funkcionalne uloge izoliranih biomolekula u okviru probiotičkog koncepta, ali i antimikrobno i antioksidativno djelovanje sojeva producenata. Također, ispitana je *in vitro* regeneracijska i imunomodulacijska sposobnost odabranih sojeva BMK i njihovih biomolekula na staničnim kulturama humanih kolonocita praćenjem ekspresije proteina čvrstog spoja te citokina. Primjenom metagenomičkih istraživanja praćen je utjecaj odabranog probiotičkog soja MC1 i njegovih EPS-a na sastav fekalne mikrobiote miševa s induciranim kolitisom *in vivo*, a ispitana je i njihova učinkovitost u modulaciji imunološkog odgovora domaćina. Konačno, okarakterizirani probiotički sojevi BMK su proizvedeni kao „živi bioterapijski pripravci“ sušenjem u liofilizatoru, nakon provedenog optimiranja sastava protektivnih matriksa i postupaka mikro- i nano- inkapsulacije.

Rezultati predloženih istraživanja autohtonih sojeva BMK doprinijet će boljem razumijevanju mehanizama djelovanja probiotika, s prednošću njihovog QPS (*engl.* Qualified Presumption of Safety) statusa, što je u skladu sa smjernicama koje navode EFSA (*engl.* European Food Safety Authority) i FAO UN (*engl.* Food and Agriculture Organisation of the

United Nations). Rezultati disertacije bi mogli doprinijeti razvoju sljedeće generacije probiotika, od dodataka prehrani i „alternativnog lijeka“ do „jednog od lijekova izbora“.



## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine sveprisutnu bakterijsku skupinu koja je široko rasprostranjena u prirodi u nišama mliječnog (fermentiranog), mesnog i biljnog podrijetla, gastrointestinalnog (GI) i urogenitalnog trakta ljudi i životinja te u tlu i vodi (Duar i sur., 2017). Pojam BMK se odnosi na Gram-pozitivne, nesporulirajuće, nerespirirajuće koke ili štapiće s niskim sadržajem gvanina i citozina (G + C) koji proizvode mliječnu kiselinu kao glavni krajnji proizvod fermentacije ugljikohidrata (Bintsis, 2018). Zahvaljujući svom svestranom metabolizmu i sposobnosti sintetiziranja širokog spektra korisnih metabolita uz mliječnu kiselinu, BMK se intenzivno koriste u biotehnologiji, prehrani i terapijskim proizvodima, a neke od primjena uključuju njihovu upotrebu kao dodatne prepreke za kvarenje i patogene mikroorganizme, antifungalna i antimikotoksigena sredstva, proizvođače bakteriocina i nutraceutika, probiotike i starter kulture (Mora-Villalobos i sur., 2020). Nakon procjene sigurnosti, Uprava za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (*engl.* US Food and Drug Administration, US FDA) i Europska agencija za sigurnost hrane (*engl.* European Food Safety Authority, EFSA) uvstile su brojne vrste BMK, i prehrambene aditive dobivene od njih, na popis opće priznatih kao sigurnih (*engl.* Generally Recognized as Safe, GRAS) ili im je u skladu s tim odobren status kvalificirane pretpostavke sigurnosti (*engl.* Qualified presumption of safety, QPS) (Hoxha i sur., 2022).

### 2.1.1. Stanična stijenka bakterija mliječne kiseline

Stanična stijenka Gram-pozitivnih bakterija predstavlja vrlo složenu strukturu koja se sastoji od debelog sloja peptidoglikana, heteropolimera naizmjenično poredanih N-acetilglukozaminskih (GlcNAc) i N-acetilmuraminskih (MurNAc) kiselina povezanih  $\beta$ -1,4 vezama, koji može sadržavati sekundarne polimere kao što su teihonske kiseline, polisaharidi i proteini (Martinez i sur., 2020). Zbog svojeg izloženog položaja, stanična stijenka ima višestruke funkcije, od kojih neke mogu biti oprečne – stanična stijenka odvaja unutrašnjost bakterije od vanjskog okoliša i štiti stanicu od štetnih utjecaja okoline, dok, s druge strane, stanična stijenka omogućava razmjenu supstrata i informacija između okoline i unutrašnjosti stanice, čime se bakteriji omogućava komunikacija s okolinom. Stoga, stanična stijenka mora biti dovoljno čvrsta budući da bakteriji osigurava održavanje cjelovitosti i oblika stanice, ali mora biti i dovoljno fleksibilna kako bi se bakterija mogla razmnožavati i rasti (Dörr i sur., 2019).

### 2.1.2. Klasifikacija bakterija mliječne kiseline

Taksonomska reorganizacija BMK je 2020. godine preklasificirala više od 300 vrsta u 7 rodova i 2 obitelji u jednu obitelj, *Lactobacillaceae*, s 31 rodom, uključujući *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus*, *Convivina*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* i 23 roda (*Amylolactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* i *Secundilactobacillus*) koja su prije bili klasificirani kao vrsta *Lactobacillus* (Zheng i sur., 2020). Filogenetska raznolikost *Lactobacillaceae* usklađena je s njihovom metaboličkom raznolikošću u smislu tolerancije na kisik, organskih kiselina ili ugljikohidrata koje koriste i spektra metabolita koje proizvode. Do 2020. metaboličke preferencije smatrane su svojstvom specifičnom za vrstu, što je bio težak prijedlog u rodu s više od 250 vrsta. Trenutna taksonomija olakšava povezivanje taksonomije ili organizama s njihovom ekologijom i metaboličkim preferencijama (Qiao i sur., 2022).

### 2.1.3. Metabolička aktivnost bakterija mliječne kiseline

Metabolička aktivnost BMK dobila je veliki fokus u istraživanju i industriji. Glavna metabolička aktivnost BMK je razgradnja različitih ugljikohidrata i srodnih spojeva za dobivanje energije i molekula ugljika, međutim metaboličke aktivnosti poput razgradnje proteina, lipida i drugih spojeva također su važne za normalan rast (Saeed i Salam, 2013). BMK se ovisno o produktima metabolizma ugljikohidrata dijele na homofermentativne i heterofermentativne koji osim mliječne kiseline proizvode i druge metabolite (etanol, CO<sub>2</sub>, octena kiselina), a među njih se ubrajaju vrste poput *Limosilactobacillus fermentum* i *Levilactobacillus brevis* (Bintsis, 2018).

Među brojnim proizvodima metabolizma BMK ističu se bakteriocini, ribosomski sintetizirani antibakterijski peptidi koji posjeduju uzak spektar za sprječavanje rasta drugih srodnih bakterija, a čija bi upotreba mogla zamijeniti antibiotike u borbi protiv bakterija otpornih na djelovanje antibiotika, do čega je došlo zbog njihove zlouporabe u kliničkim uvjetima, hrani za životinje i u prehrambenoj industriji (Gradisteanu Pircalabioru i sur., 2021).

## 2.2. Probiotici

Prvu definiciju probiotika iznio je 1908. Metchnikoff, koji je predložio da konzumacija fermentiranih mliječnih proizvoda produljuje život (učinak dugovječnosti), a pojam probiotik prvi je upotrijebio Parker (1974.) za definiranje tvari i organizama koji uzrokuju mikrobnu ravnotežu u gastrointestinalnom traktu (GIT). Terminologija probiotika se mijenjala kroz godine sve do 2014. godine kada ih je Međunarodna znanstvena udruga za probiotike i prebiotike (*engl.* International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP) definirala kao “žive mikroorganizme koji, kada su primijenjeni u odgovarajućim količinama, iskazuju pozitivne učinke na zdravlje domaćina” (Hill i sur., 2014). Od tada, ovu definiciju naširoko koristi znanstvena zajednica i ona je kriterij za razmatranje lijekova, hrane i dodataka kao probiotičkih proizvoda u većini vladinih institucija.

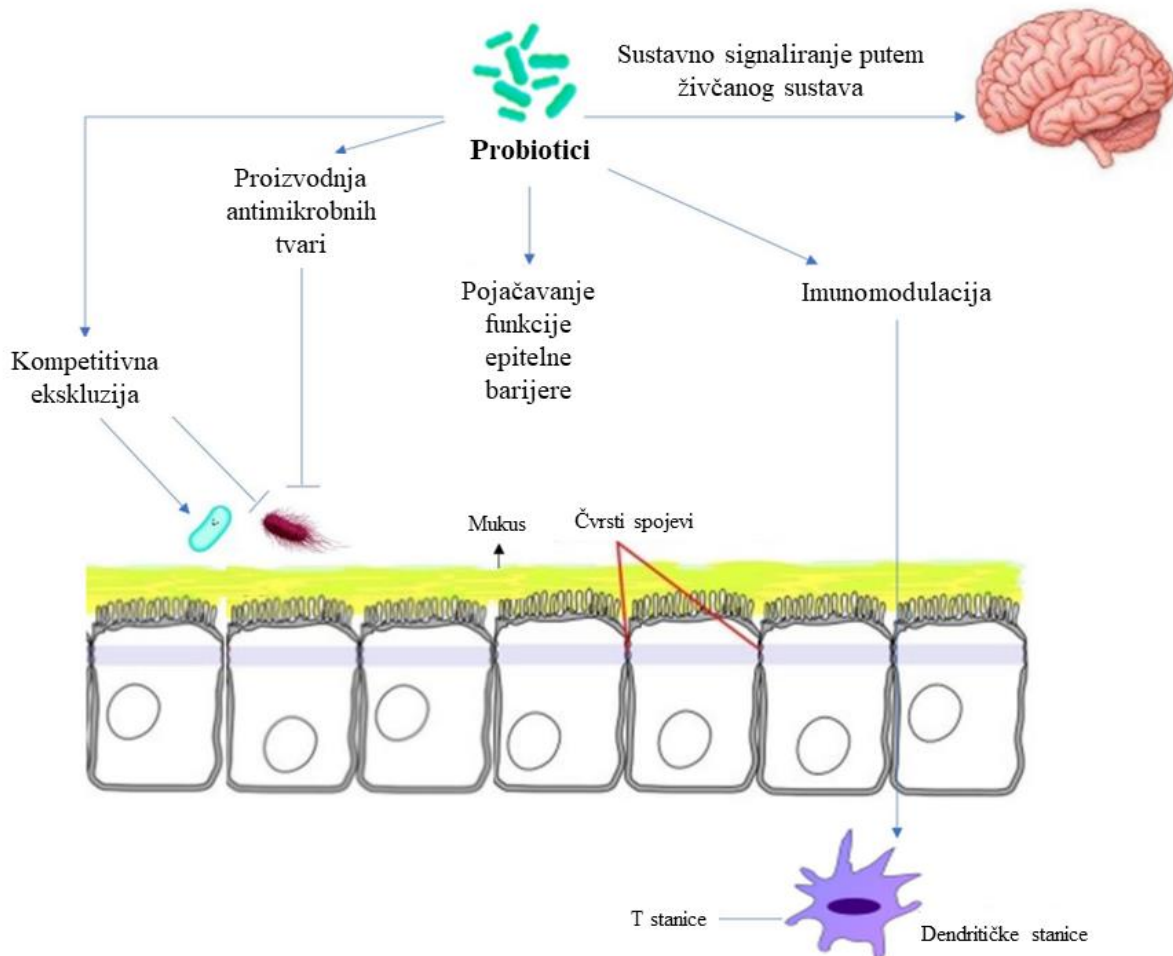
Prednosti probiotika povezane su s modulacijom crijevne mikrobiote, ublažavanjem nutritivnih intolerancija na laktozu, povećanjem biorasploživosti makro i mikronutrijenata i ublažavanjem incidencija alergija kod osjetljivih pojedinaca (Roobab i sur., 2020). Probiotici se mogu konzumirati ili uključivanjem u hranu ili piće u obliku mliječnih ili nemliječnih namirnica ili kao suplementi (Fenster i sur., 2019).

Komercijalni probiotici su uglavnom pripadnici BMK kao što su *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., ali i mnogi drugi, npr. *Saccharomyces*, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Enterococci* i *Weissella* spp. koji su odabrani nasumično iz crijeva ili tradicionalne fermentirane hrane koja ima dugu povijest sigurne uporabe (Singh i sur., 2022).

### 2.2.1. Mehanizam djelovanja probiotika

Smatra se da se pozitivan učinak probiotika na zdravlje domaćina iskazuje sljedećim mehanizmima – kompetitivnom ekskluzijom patogena natječući se za hranjive tvari i receptore za njihovo vezanje što otežava njihovo preživljavanje i prianjanje na sluznicu crijeva; proizvodnjom antimikrobnih tvari (kratkolančane masne kiseline, organske kiseline, vodikov peroksid, bakteriocini) koje inhibiraju rast patogena; promicanjem funkcije epitelne barijere pojačavanjem proizvodnje proteina mucina i povećanjem ekspresije proteina čvrstog spoja (*engl.* tight junction, TJ) koji sprječavaju premještanje patogena iz crijeva u krv; reguliranjem imuniteta domaćina modulirajući sazrijevanje i funkciju dendritičkih stanica koje naknadno povećavaju aktivnost T stanica koje igraju važnu ulogu u imunološkoj homeostazi; reguliranjem proizvodnje neurotransmitera (serotonin, dopamin, gama aminomaslačna kiselina) u crijevima kroz sustav crijeva-mozak (slika 1). Važno je istaknuti da neka svojstva

probiotika mogu biti ujednačena kod različitih vrsta ili čak rodova, dok druga svojstva mogu biti specifična za vrstu ili čak soj, a u nastavku su ukratko objašnjeni glavni mehanizmi djelovanja probiotika (Suez i sur., 2019).



**Slika 1.** Mehanizam djelovanja probiotika (prema Latif i sur., 2023)

### 2.2.1.1. Zaštita od patogena

Probiotici mogu sprječiti kolonizaciju patogena vezanjem na epitelne stanice i fizičkim blokiranjem prianjanja patogena te natjecanjem za hranjive tvari. Osim toga, probiotici proizvode i antimikrobne tvari, od kojih se mogu istaknuti bakteriocini, spojevi koji pokazuju antimikrobno djelovanje prema drugim bakterijama (Hernández-González i sur., 2021). Drugi mehanizmi mogu uključivati prekid međustanične komunikacije tzv. quorum sensing (QS) inhibicijom signalnih molekula (autoinduktora) koji su odgovorni za primanje i slanje poruka koje bakteriji služe za donošenje odluka o njejoj aktivnosti, na primjer lučenju čimbenika virulencije (Suez i sur., 2019).

### **2.2.1.2. Promicanje funkcije crijevne barijere**

Temeljni mehanizmi za stabilizaciju funkcije crijevne barijere pomoću probiotika uključuju pojačanu regulaciju TJ proteina (klaudin-1, okludin i ZO-1), poboljšani transepitelni električni otpor, promicanje izlučivanja sluzi (povećanjem ekspresije MUC2, MUC3 i MUC1 u epitelnim stanicama debelog crijeva), povišenje razine butirata, kao i modulaciju mikrobioma (Suez i sur., 2019).

### **2.2.1.3. Imunomodulacija**

Imunomodulacijski učinak probiotika pripisuje se otpuštanju citokina, uključujući interleukine (IL), faktore nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF), interferone (IFN), transformirajući faktor rasta (*engl.* transforming growth factor, TGF) i kemokine iz imunoloških stanica (limfocita, granulocita, makrofaga, mastocita, epitelnih i dendritičnih stanica) koje dalje reguliraju urođeni i stečeni imunološki sustav. Zabilježeno je da probiotici stupaju u interakciju s enterocitima te dendritičkim, Th1, Th2 i Treg stanicama u crijevima modulirajući tako stečeni imunitet u pro- i/ili protuupalno djelovanje (Azad i sur., 2018). Mehanizam imunološke regulacije uključuje dvije različite kategorije probiotika – imunostimulirajuće i imunoregulacijske. Imunostimulirajući probiotici imaju sposobnost djelovanja protiv infekcija i stanica raka, potičući proizvodnju IL-12, koji aktivira NK stanice i razvija Th1 stanice, a djeluju i protiv alergija kroz ravnotežu između Th1 i Th2. S druge strane, imunoregulacijski probiotici karakterizirani su proizvodnjom IL-10 i Treg stanica, što rezultira smanjenjem alergija, upalnom bolesti crijeva (*engl.* inflammatory bowel disease, IBD), autoimunih bolesti i upalnih odgovora (Chiba i sur., 2010).

### **2.2.1.4. Dodatni mehanizmi probiotičkog djelovanja**

Jedan od preduvjeta za komercijalne probiotike uključuje otpornost prema žučnim solima tako što proizvode hidrolazu žučnih soli (*engl.* bile salt hydrolase, BSH) koje dekonjugiraju glicin ili taurin iz steroidne jezgre (Bourgin i sur., 2021). Također se smatra da probiotici utječu na signaliziranje u crijevnom i središnjem živčanom sustavu te imaju anksiolitičke, antidepresivne i antinociceptivne učinke na domaćina (Sarkar i sur., 2016). Važno je imati na umu da se jasni učinci probiotika na životinjskim modelima ne moraju nužno prevesti u isti učinak kod ljudi. Stoga, unatoč mogućnosti probiotika da blagotvorno utječu na sustav crijeva-mozak, ključni molekularni igrači još uvijek su nepoznati i bit će ključni za ispravno prevođenje nalaza u životinjskim modelima na terapije relevantne za ljude (Suez i sur., 2019).

## 2.2.2. Humana mikrobiota

Mikrobni svijet je u stanju kolonizirati svaki dio ljudskog tijela koji je izravno izložen okolišu, s većinom mikrobnih zajednica koje žive u GIT-u. Ljudski GIT jedan je od najsloženijih poznatih ekosustava u kojemu se nalazi jedna od najrazličitijih i najbogatijih ekoloških niša na zemlji koju kolonizira više od 100 bilijuna mikroorganizama, čija se težina procjenjuje na 1,5 kg, koji imaju ključnu ulogu u ljudskom zdravlju. Brojni pokusi i istraživanja sastava mikrobiote ljudskih crijeva su pokazali da se sastoji od zapanjujuće mikrobne raznolikosti s više od tisuću simbiotskih i/ili komenzalnih mikrobnih vrsta među kojima se mogu pronaći arheje, bakterije, viruse (uključujući bakteriofage), a čak su pronađeni i jednostanični eukarioti, uključujući gljivične vrste i druge mikrobne zajednice koje obuhvaćaju nearhealne i nebakterijske mikrobne vrste (Zommiti i sur., 2020). Dokazano je da je sastav mikrobiote jedinstven i da se mijenja kroz život (Rinninella i sur., 2019). Istraživanja o interakcijama između domaćina i mikroorganizama su pokazala regulatornu funkciju crijevne mikrobiote kao ključnog moderatora koji odlučuje o zdravstvenom statusu domaćina, budući da promjena u njenom sastavu, tzv. disbioza, može dovesti do raznih bolesti (Centurion i sur., 2021).

Bakterijska komponenta crijevne mikroflore i njezina središnja uloga u dobrobiti ljudi bila je inspiracija za poticanje velikih projekata kao što su Projekt humanog mikrobioma (*engl.* Human Microbiome Project, HMP) i Metagenomika humanog intestinalnog trakta (*engl.* Metagenomics of the Human Intestinal Tract, MetaHIT).

### 2.2.2.1. Majčino mlijeko – izvor probiotičkih bakterija

Majčino mlijeko predstavlja izvor esencijalnih hranjivih tvari i bioaktivnih spojeva koji podržavaju rast i imunološki razvoj tijekom dojenačke dobi. Osim makro- i mikronutrijenata te bioaktivnih spojeva, majčino mlijeko sadrži i mnoštvo bakterijskih vrsta (Lyons i sur., 2020). Prije se smatralo da su bakterije izolirane iz majčinog mlijeka posljedica kontaminacija s majčine kože i usne šupljine djeteta ili zbog nepravilnog rukovanja ili skladištenja prilikom uzimanja uzoraka. Međutim, danas je široko prihvaćeno da majčino mlijeko ima svoj jedinstveni mikrobiom koji se sastoji od mnogih komenzalnih bakterija (Lyons i sur., 2020). Ova spoznaja ide u korist njihovoj primjeni kao potencijalnih probiotika budući da zadovoljavaju kriterij da su izolirani iz ljudskih izvora, što je jedan od preduvjeta za njihovu upotrebu kod ljudi (Gupta i sur., 2018). Otkriće anaerobnih vrsta povezanih s crijevnim sredinama koje ne mogu postojati u aerobnim okruženjima potaknulo je zanimanje za složenost podrijetla bakterija u majčinom mlijeku. Ova otkrića ukazuju na premještanje živih bakterija iz

majčinog crijeva endogenim putem do mliječnih žlijezda (entero-mliječni put), a uključuje složene interakcije između epitelnih stanica, imunoloških stanica i bakterija (Selvamani i sur., 2021).

Mehanizam premještanja uključuje imunološke stanice, dendritične stanice i CD18 stanice koje dostavljaju nepatogene bakterije iz lumena crijeva u mliječnu žlijezdu za vrijeme laktacije. Dendritičke stanice mogu prodrijeti u epitel crijeva otvaranjem čvrstih spojeva između crijevnih epitelnih stanica i preuzeti bakterije iz lumena crijeva. Bakterije se naknadno transportiraju pomoću makrofaga do mezenterijskih limfnih čvorova i konačno do mliječnih žlijezda. Tijekom kasne trudnoće i dojenja, smatra se da se premještanje događa češće zbog promijenjene regulacije čvrstih spojeva u probavnom traktu što rezultira izljevom imunoloških stanica u mliječne žlijezda (Fernández i sur., 2013). Dokazi koji podupiru entero-mliječni put uključuju prisutnost bakterijskih zajednica u kolostrumu prikupljenom prije prvog sisanja dojenčeta (Damaceno i sur., 2017) te prisutnost oralno primijenjenih probiotičkih sojeva u mlijeku dojilja u istraživanjima provedenim na ljudima i životinjama (De Andrés i sur., 2017; Abrahamsson i sur., 2009).

### **2.2.3. Tržište probiotika**

U vremenima u kojima pojedinci postaju sve više usklađeni sa značajem preventivne zdravstvene zaštite i nevjerojatnim utjecajem probiotičkih bakterija na dobrobit ljudi, tržište doživljava neviđeni porast. Svijest potrošača potiče eksponencijalni rast probiotika, budući da njihova učinkovitost privlači pažnju, iako se u mnogim zemljama ne smatraju lijekovima i uglavnom nisu regulirani (de Simone, 2019). Očekuje se da će tržište probiotika doživjeti značajnu ekspanziju i do 2027. godine dosegnuti tržišnu vrijednost od 85,4 milijarde USD, u usporedbi s procijenjenih 57,8 milijardi USD u 2022. Ključne tvrtke na ovom tržištu uključuju Danone (Francuska), Yakult Honsha Co., Ltd. (Japan), ADM (SAD), Probi (Švedska) i Nestle (Švicarska).

### **2.2.4. Problemi i rješenja**

Iako postoje brojna istraživanja koja ističu pozitivnu ulogu probiotika u promicanju zdravlja i borbi protiv bolesti, postoji nekoliko ograničenja koja ometaju primjenu konvencionalnih probiotika. Glavni problem za većinu probiotika je preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom njihove izloženosti niskom pH nakon fermentacije, koncentraciji kisika tijekom procesa hlađenja i skladištenja te njihova vijabilnost tijekom prolaska kroz ljudski GIT zbog kiselog okoliša (Mazhar i sur., 2020). Također, učinkovitost konvencionalnih probiotika je



statistički marginalna jer su učinci vrlo specifični za soj i mogu varirati među domaćinima (Zhang i sur., 2022).

Personalizirana medicina je napredni pristup koji uzima u obzir varijabilnost uključujući genetiku, okoliš i stil života među pojedincima i karakterizira jedinstvene složene metaboličke obrasce specifične za bolest svakog pacijenta, a temelji se na rutinskim analizama mikrobioma pojedinca i prediktivnom odgovoru pojedinca na različite hranjive tvari i terapijske agense, čime se stvara prilika za razvoj novih terapijskih strategija specifičnih za bolesti (Savoia i sur., 2017). Uzimajući u obzir ove točke, probiotici druge generacije i razvoj dizajnerskih probiotika mogu predstavljati razumnu benignu strategiju u eri personalizirane medicine koja se može koristiti za preoblikovanje crijevnog mikrobioma i, na taj način, pomaže u ublažavanju ciljanih bolesti (Singh i Natraj, 2021).

### **2.3. Druga generacija probiotika**

Nature Microbiology je 2017. prvi puta službeno predložio koncept druge generacije probiotika (*engl.* next generation probiotics, NGP) prema kojemu se NGP-ovi razlikuju od tradicionalnih probiotika i da se pridržavaju atributima „aktivnih bioloških agensa“ prema smjernicama US FDA: (1) sadrže žive organizme, poput bakterija; (2) primjenjivi su za prevenciju, liječenje ili izlječenje bolesti ili stanja kod ljudi; i (3) nisu cjepivo, što je slično definiciji živih bioterapijskih proizvoda (*engl.* live biotherapeutic products, LBP). NGP-ovi bi trebali biti podvrgnuti kliničkim ispitivanjima i moraju ih odobriti relevantna regulatorna tijela prije nego što se stave na tržište, a mogu se proučavati u laboratorijima već uključenim u istraživanja konvencionalnih probiotika i mikrobioma, dok se LBP-ovima bave start-up biotehnoške ili farmaceutske tvrtke s marketinškim interesom (O’Toole i sur., 2017). U tablici 1 prikazane su razlike u značajkama konvencionalnih probiotika i probiotika druge generacije.

**Tablica 1.** Značajke konvencionalnih probiotika i probiotika druge generacije (*prema Singh i Natraj, 2021*)

KONVENCIONALNI PROBIOTICI	DRUGA GENERACIJA PROBIOTIKA
Izolirani iz crijeva, majčinog mlijeka i fermentirane hrane	Uglavnom potječu od komenzala
Pripadaju uglavnom rodovima <i>Lactobacillus</i> spp. i <i>Bifidobacterium</i> spp.	Identificirani iz rezultata usporedbe zdravih i bolesnih životinja/ljudi
Duga povijest korištenja	Korištene platforme za istraživanje NGS/mikrobiote (multi-omička istraživanja)
GRAS status na razini soja (US FDA) ili QPS na razini vrste (EFSA)	Pripadaju različitim rodovima
Smatraju se sigurnima, kao hrana ili dodatak prehrani	Strogi sigurnosni i regulatorni propisi
Ne uključuju genetički modificirane mikroorganizme i općenito ciljaju zdravu populaciju ljudi	Uključuju genetički modificirane bakterije i ciljaju specifične bolesti
Ostali rodovi uključuju <i>Streptococcus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> itd.	Potrebne su višestranne informacije (mehanizmi) Pojedinačni sojevi mogu funkcionirati različito Uključeni u kategorije prehrambenih aditiva za LBP (lijekovi)

Personalizirana medicina je napredni pristup koji uzima u obzir varijabilnosti poput genetike, okoliša i stila života među pojedincima i karakterizira jedinstvene složene metaboličke obrasce specifične za bolest svakog pacijenta (Savoia i sur., 2017). Ovaj futuristički pristup temelji se na rutinskim analizama mikrobioma pojedinca i prediktivnom odgovoru pojedinca na različite hranjive tvari i terapijske agense, čime se stvara prilika za razvoj novih terapijskih strategija specifičnih za bolesti.

## 2.4. Postbiotici i paraprobiotici

Kao što je već spomenuto, termin probiotici se odnosi na žive mikroorganizme koji mogu pozitivno djelovati na zdravlje domaćina. Međutim, saznanja da određeni mehanizmi i kliničke dobrobiti nisu bili direktno povezani sa živim mikroorganizmima dovela su do uvođenja novih pojmova kao što su postbiotici i paraprobiotici, a odnose se na mikrobne dijelove ili ostatke stanice te nežive stanice koji također mogu djelovati kao promotori zdravlja s dodanom bioaktivnošću ukoliko su dodani u odgovarajućoj dozi (Barros i sur., 2020). Pojam postbiotici se odnosi na topljive čimbenike, poput metaboličkih proizvoda ili nusproizvoda koje izlučuju žive bakterije ili se oslobađaju nakon lize bakterija, a koji mogu imati pozitivan učinak na potrošača. Ove komponente imaju proizvodne prednosti u odnosu na probiotike jer nije

potrebna vijabilnost stanica što čini tehnološki razvoj i primjenu u prehrani povoljnijom. Paraprobiotici su, s druge strane, inaktivirane intaktne (nežive) mikrobne stanice ili stanične frakcije koje su potpuno izgubile svoju vijabilnost nakon izlaganja čimbenicima koji mijenjaju strukturu mikrobnih stanica, kao što su lomljenje niti DNA, poremećaj stanične membrane ili mehaničko oštećenje stanične ovojnice, ali koji imaju koristi za zdravlje potrošača (Monteiro i sur., 2023).

Većina *in vitro* i *in vivo* istraživanja usmjerena je na postbiotike i paraprobiotike dobivene iz različitih sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, te u manjoj mjeri iz vrsta *Saccharomyces*. Unatoč činjenici da mehanizmi uključeni u većinu bioaktivnih djelovanja postbiotika i paraprobiotika nisu u potpunosti shvaćeni, znanstveni dokazi podupiru da postbiotici i paraprobiotici posjeduju različita funkcionalna/bioaktivna svojstva poput antimikrobnih, antioksidativnih i imunomodulatornih aktivnosti izravnim ili neizravnim putevima (Cuevas-González i sur., 2020). Pretpostavlja se da izravni mehanizmi nastaju iz interakcija između postbiotika ili paraprobiotika s različitim molekulama ili receptorima putem inhibicijskog djelovanja (Aguilar-Toalá i sur., 2018), dok neizravni mehanizmi uključuju homeostazu mikrobiote i/ili metaboličke i signalne puteve domaćina čime se utječe na specifične fiziološke reakcije (Sharma i Shukla, 2016). Izolacija paraprobiotika i postbiotika iz različitih probiotičkih bakterija uključuje tehnike razbijanja stanica poput toplinske obrade, enzimskih tretmana, ekstrakcije otapalom, zračenja (ionizirajuće i UV zrake), visokog tlaka i ultrazvuka, ali i brojne druge (Teame i sur., 2020).

Za primjenu postbiotika i paraprobiotika u ljudskoj hrani, hrani za životinje i farmaceutskoj industriji potrebno je prevesti znanstvena znanja u komercijalne primjene i stvoriti most između znanosti i industrije. Trenutačno je nekoliko paraprobiotičkih proizvoda s dokazanim učinkom u prevenciji ili liječenju nekih bolesti komercijalno dostupno kao suplementi (tablica 2).

**Tablica 2.** Komercijalni postbiotički i paraprobiotički proizvodi za ljudsku upotrebu (*prema Cuevas-González i sur., 2020*)

NAZIV PROIZVODA	POSTBIOTIK	PROIZVOĐAČ	DJELOVANJE
Bactistatin®	Metaboliti <i>B. subtilis</i> VKPM V-2335	Kraft (Rusija)	Obnavlja mikrobnu ekologiju probavnog trakta
Pro-Symbioflor®	Lizati i supernatanti bakterija <i>E. faecalis</i> DSM 16440 and <i>E. coli</i> DSM 17252	SymbioPharm (Njemačka)	Učinkovit u liječenju želučano-crijevnih bolesti, obučava imunološki sustav i razvoj atopijskog dermatitisa
Hylak® Forte	Metaboliti <i>E. coli</i> DSM 4087, <i>S. faecalis</i> DSM 4086, <i>L. acidophilus</i> DSM 414 i <i>L. helveticus</i> DS 4183	Ratiopharm/Merckle (Njemačka)	Korisno za nadutost, proljev i zatvor, kronični gastritis, kao i salmoneloza i proljev izazvan zračenjem
CytoFlora®	Stanična stijenka različitih sojeva <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> i <i>Streptococcus</i>	BioRay Inc. (SAD)	Promiče uravnotežen imunološki odgovor i poboljšava simptome kod autistične djece
Del-Immune V®	Peptidoglikan stanične stijenke i DNA fragmenti <i>L. rhamnosus</i>	Pure Research Products (SAD)	Ublažava težinu gastrointestinalnih bolesti kod djece
NAZIV PROIZVODA	PARAPROBIOTIK	PROIZVOĐAČ	DJELOVANJE
Pylopass™	Liofilizirane nežive stanice <i>L. reuteri</i> DSMZ 17648	Novozymes (Njemačka)	Učinkovit u kontroli infekcije bakterijom <i>H. pylori</i>
Lacteol® Fort	Nežive stanice <i>L. acidophilus</i> LB	Carnot Laboratories (Francuska)	Učinkovit u liječenju dijareje

## 2.5. Potencijalne terapijske biomolekule

Prema dosadašnjim istraživanjima, specifični izvanstanični proizvodi metabolizma i određene komponente stanične ovojnice, prisutne na površini bakterijskih stanica, sudjeluju u interakcijama s mikrokolišom i uključene su u probiotičko djelovanje bakterijskih sojeva koji ih proizvode. Stoga, glavno područje istraživanja ovog doktorskog rada obuhvaća ulogu specifičnih površinskih (*engl.* surface, S) proteina, tzv. S-proteina, kao i ulogu egzopolisaharida (EPS), izvanstaničnih specifičnih proizvoda metabolizma nekih sojeva BMK, za koje je ustanovljena zaštitna uloga u stresnim okolišnim uvjetima, u interakcijama bakterija-bakterija i bakterija-mukus/epitelne stanice, te imunomodulacijskom djelovanju u intestinalnom traktu (Butorac i sur., 2021; Angelin i Kavitha, 2020; Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018).

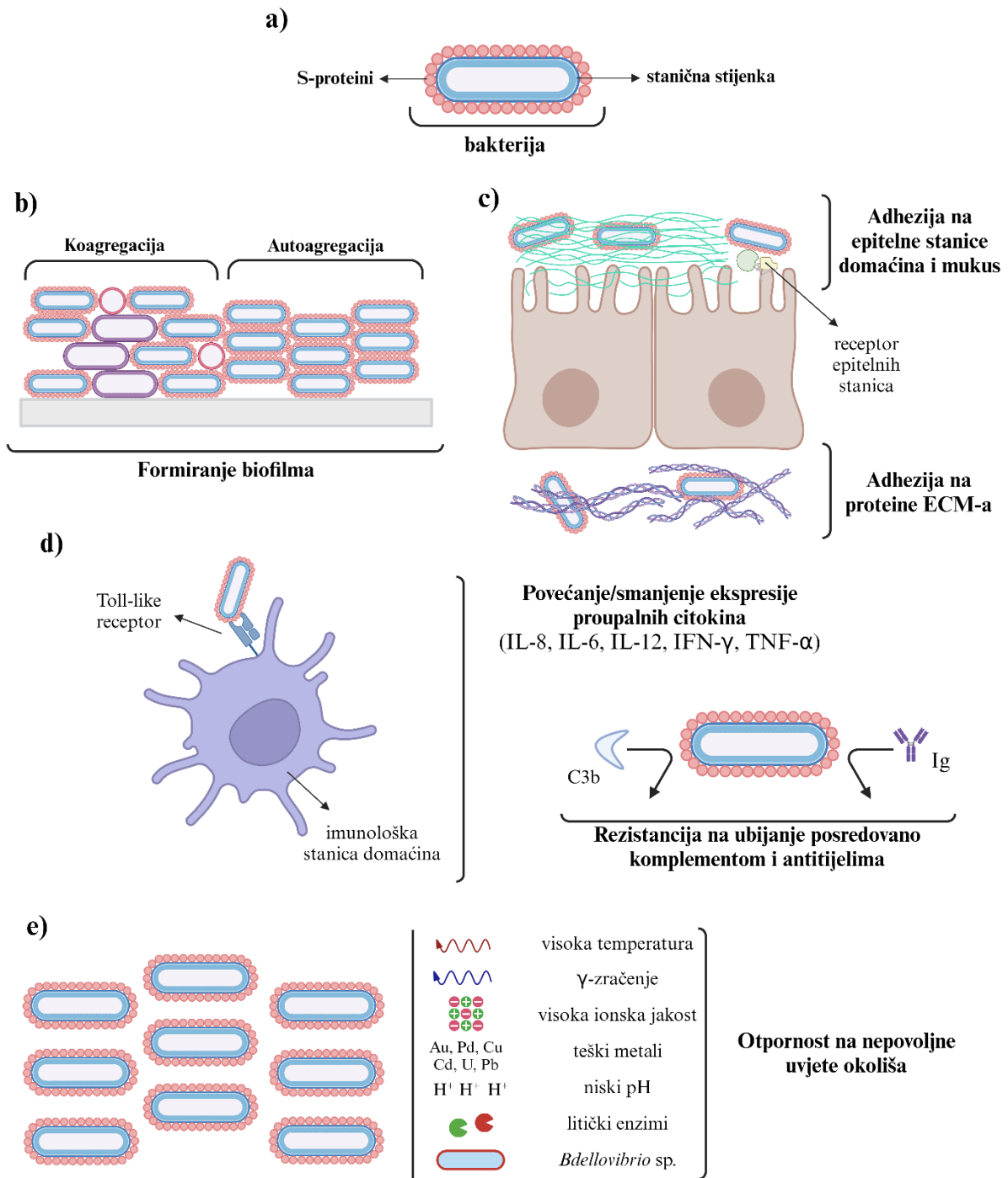
### 2.4.1. S-proteini

Površinski proteini (S-proteini) su dvodimenzionalne, parakristalne, monomolekularne kristalne strukture površinskih (gliko)proteina koji prekrivaju staničnu površinu stotina različitih vrsta gotovo svih taksonomskih skupina Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te arheja u obliku sloja, tzv. S-sloj (Assandri i sur., 2023). Molekulska masa S-proteina laktobacila kreće se između 25-71 kDa, što je niže u donosu na 40-200 kDa molekulsku masu S-proteina drugih rodova (Alp i sur., 2020). Otpornost S-proteina na ekstremne okolišne uvjete ukazuje na njihovu moguću ulogu u zaštiti i stabilnosti stanica, a smatra se da im to omogućuje prisutnost puno kopija *slp* gena u genomu. Kao najudaljeniji sloj koji prekriva površinu stanice, sloj S-proteina je u izravnom doticaju s njenim mikrookolišem, te se uloga S-proteina može proučavati iz dvije različite perspective (Gerbino i sur., 2015) – uloga u adheziji bakterije na različite površine i supstrate te uloga kao mehanička barijera u štetnom okolišu (slika 2). Ekspresija S-proteina u probiotičkim bakterijama je rijetka, ali poželjna osobina, jer se pokazalo da ima važnu ulogu u ispoljavanju probiotičkih svojstava soja proizvođača, budući da štiti stanice od nepovoljnih uvjeta okoline, ali i utječe na mnoga svojstva stanične površine, uključujući površinsko prepoznavanje, autoagregaciju i koagregaciju te adheziju na različite epitelne i subepitelne strukture (Banić i sur., 2022; Novak i sur., 2021; Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018). Među BMK koje poseduju S-sloj su sojevi koji pripadaju vrstama kao što su *L. brevis*, *L. cripatus*, *L. buchneri*, *L. helveticus* i *L. acidophilus* (Teame i sur., 2020).

Proteini S-sloja imaju ulogu u adheziji bakterije producenta na različite supstrate i površine, što je povezano s procesima autoagregacije i koagregacije, adhezije na epitelne stanice, gastrointestinalni mukus i makromolekule izvanstaničnog matriksa (*engl.* extracellular matrix, ECM), formiranje biofilma te interakcije s imunološkim sustavom (slika 2b-d). Kod odabira probiotičkih sojeva uključenost S-proteina u proces autoagregacije važna je predispozicija budući da omogućuje stanicama kolonizaciju domaćina, dok koagregacija predstavlja mehanizam kompetitivne ekskluzije koji doprinosi smanjenju patogenog opterećenja kod infekcije (Alp i sur., 2020). Mikrobna adhezija na crijevne epitelne stanice (Caco-2, HeLa i Hep-2) je važan početni korak u uspješnoj kolonizaciji crijeva domaćina, dok adhezija na proteine ECM-a (fibronektin, fibrinogen, kolagen, laminin) doprinosi kompetitivnoj ekskluziji patogena, a prepoznata je pozitivna uloga S-proteina i u ovim procesima (Alp i sur., 2020; Klotz i sur., 2020; Banić i sur., 2018). Također, S-proteini imaju utjecaj i na formaciju biofilma, nakupine bakterija koje su pričvršćene za površinu i/ili jedna za drugu (Vestby i sur., 2020), budući da imaju ulogu u vezanju različitih bakterijskih vrsta na

različite površine. S-proteini patogenih i nepatogenih mikroorganizama uključeni su u interakciju bakterija s imunološkim sustavom domaćina – pokazalo se da je interakcija S-proteina s Toll-like receptorima (TLR2 i TLR4) odgovorna za modulaciju obrasca citokina koje oslobađaju monociti, makrofagi i dendritičke stanice, te se pokazalo da zaštitna uloga S-proteina protiv humoralnih obrana kao što su komplement i protutijela doprinosi patogenosti nekih mikroorganizama (Gerbino i sur., 2015).

Osim uloge u adheziji bakterija, S-proteini mogu djelovati kao mehaničke barijere koje stabiliziraju i štite bakterije u štetnom okolišu, što uključuje otpornost na stresne utjecaje GIT-a (proteolitički enzimi, probavni sokovi, niski pH) te otpornost na druge stresne uvjete (visoka temperatura, niski pH, teški metali,  $\gamma$ -zračenje, visoka ionska jakost, predatorstvo *Bdellovibrio bacteriovorus*) (slika 2e).



**Slika 2.** **a)** Skenirajući elektronski mikroskop (60000x) i shema koja prikazuje protein S-sloja koji tvore najudaljeniji sloj u bakterijskoj stanici, **b)-e)** neke od glavnih funkcija koje se pripisuju proteinima S-sloja kod različitih vrsta bakterija (slika napravljena pomoću BioRender.com, prema Gerbino i sur., 2015)

### **2.4.1.1. Potencijalne primjene u biotehnologiji**

Proteini S-sloja karakterizirani su svojom ulogom u održavanju oblika stanice, djelujući kao molekularna sita, služeći kao mjesta vezivanja za velike molekule, ione ili fage; i posredovanju u površinskoj adheziji (Sleytr i sur., 2014). Osim toga, neki su od najzastupljenijih proteina koje sintetizira stanica, što ih čini metabolički skupima, ali također naglašava njihovu važnost za organizam (Fagan i Fairweather, 2014). Njihova visoka ekspresija, periodičnost i svojstva samosastavljanja učinila su ih metom za brojne primjene u biotehnologiji i nanotehnologiji (Sleytr i sur., 2014). Pore koje prolaze kroz S-slojeve pokazuju identičnu veličinu i morfologiju te su u rangu ultrafiltracijskih membrana, a funkcionalne skupine na površini i u porama proteinske rešetke S-sloja dostupne su za kemijske modifikacije i za vezanje funkcionalnih molekula na vrlo precizan način što omogućava podešavanje svojstava površine i karakteristika molekularnog prosijavanja ultrafiltracijskih membrana S-sloja (Schuster i Sleytr, 2021). Prepoznata je uloga ultrafiltracijskih membrana S-sloja kao matrica za kontroliranu imobilizaciju funkcionalnih biomolekula (npr. liganada, enzima, antitijela i antigena) prema potrebi za mnoge primjene (npr. biosenzori, dijagnostika, enzimske i afinitetne membrane). Promotori i/ili signalna sekvenca gena proteina S-sloja *Lactobacillus* vrsta korišteni su za unutarstaničnu ili izvanstaničnu heterolognu proizvodnju proteina kod BMK kako bi neadherentne BMK postale adherentne (Johnson i sur., 2016). Također, od velikog je interesa razvoj živih mukoznih cjepiva koja koriste sojeve *Lactobacillus* koji na svojoj površini posjeduju S-slojeve sastavljene od hibridnih proteina zahvaljujući njihovom GRAS statusu i sposobnosti izazivanja imunološkog odgovora kao nositelja antigena (Hynonen i Palva, 2013). Potencijal proteina S-sloja kao nositelja antigena također je prepoznat budući da bi polisaharidi ili proteini mogli biti kemijski povezan sa S-slojevima da izazovu imunološki odgovor. Proteini S-sloja se također mogu koristiti kao predlošci za formiranje pravilno raspoređenih metalnih nanočestica (Wuyts i sur., 2017), a zbog njihove stabilnosti u štetnim uvjetima GIT-a imaju potencijalnu primjenu kao zaštitni omotač prilikom oralne administracije nestabilnih nanonosaa lijekova (Pfeifer i sur., 2022).

### **2.4.2. Egzopolisaharidi**

Osim S-proteina, biomolekule koje sve više dobivaju na važnosti su egzopolisaharidi (Butorac i sur., 2021). Egzopolisaharidi su izvanstanične makromolekule koje mogu biti kovalentno vezane na površinu stanične stijenke i formirati kapsulu, ili su samo djelomično vezani, a djelomično otpušteni u mikrookoliš stanice producenta, te se dijele na homo- i heteropolisaharide, ovisno o tome da li su građeni od jedne ili više različitih monosaharidnih



podjedinica (Angelin i Kavitha, 2020). Za razliku od homopolisaharida koji su obično građeni od D-glukoze ili D-fruktoze, heteropolisaharidi imaju vrlo složenu strukturu čija se okosnica sastoji od nekoliko ponavljajućih jedinica koje mogu biti razgranate ili nerazgranate strukture, a obično sadrži D-glukozu, D-galaktozu ili L-ramnozu u različitim omjerima. Međutim, mogu sadržavati i druge šećere ili supstituente, ali u manjoj mjeri, kao što su neki monosaharidi (riboza i fruktoza), N-acetilirani monosaharidi (uključujući N-acetil-glukozamin i N-acetil galaktozamin) te anorganski supstituenti (kao što su glukuronska kiselina, fosfat, glicerol, itd.) (Daba i sur., 2021). Poznato je da alge, gljive, bakterije i kvasci proizvode egzopolisaharide kako bi povećali svoju prilagodljivost okolišu i kako bi se bolje nosili s teškim i nepovoljnim uvjetima tako što formiraju biofilm na površinama (Rana i Upadhyay, 2020). EPS-i koje proizvode BMK od velikog su značaja zahvaljujući njihovom GRAS statusu te mogućnosti njihove primjene kao probiotika. Većina vrsta BMK, posebno *Fructilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Limosilactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Weissella*, sposobne su sintetizirati različite EPS-e (Angelin i Kavitha, 2020; Zheng i sur., 2020). Pokazalo se da su, osim što pridonose poboljšanju okusa i produljenju roka trajanja fermentirane hrane, EPS-i koje proizvode probiotičke bakterije dobili veliku važnost u terapijskim primjenama zahvaljujući antimikrobnoj, imunomodulatornoj, antiupalnoj, antioksidativnoj, antitumorskoj, antivirusnoj, antidijabetičkoj, antiulkusnoj aktivnosti i aktivnosti snižavanja kolesterola (Angelin i Kavitha, 2020). EPS-i *Lactobacillus* sojeva razlikuju se po kemijskom sastavu i strukturi, što izravno utječe na njihovu zaštitnu ulogu stanice producenta u nepovoljnim okolišnim uvjetima, adhezijskim svojstvima i interakciji sa specifičnim receptorima obrambenog sustava domaćina, što je do sada vrlo malo istraženo kod sojeva BMK koje proizvode EPS-e (Castro-Bravo i sur., 2018).

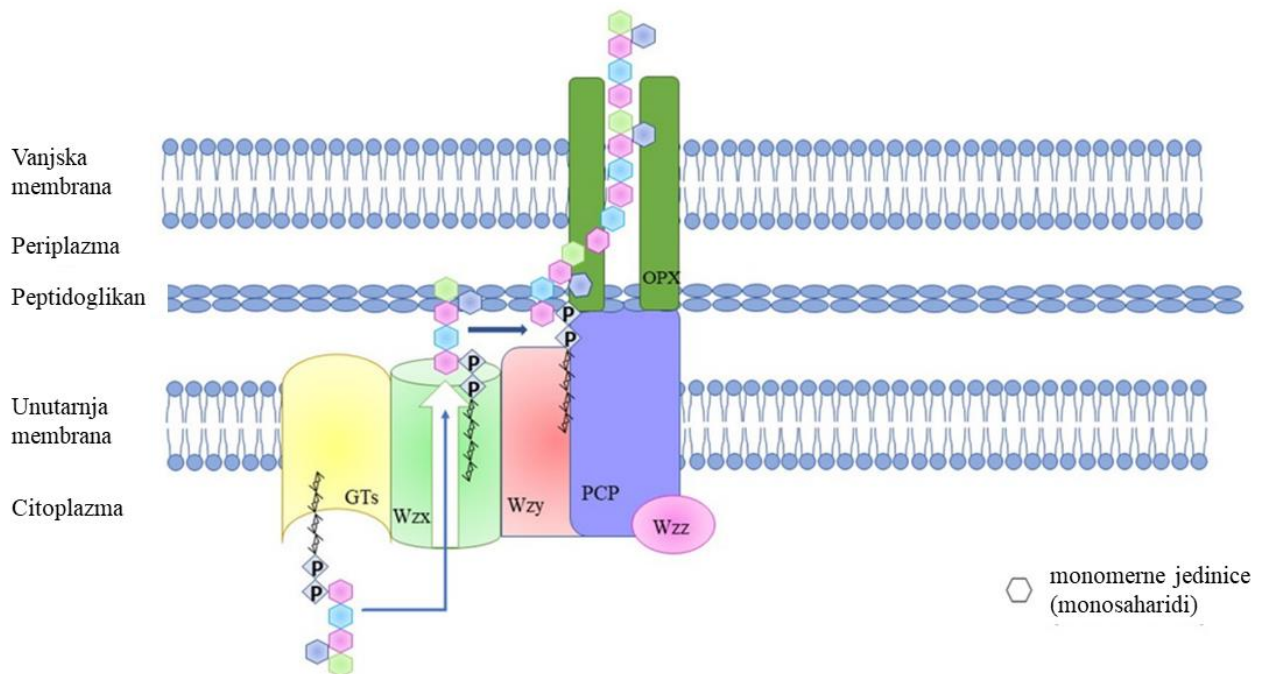
#### **2.4.2.1. Biosinteza egzopolisaharida kod BMK**

Unatoč velikoj raznolikosti u strukturi, četiri su opća puta kojima mikroorganizmi proizvode EPS-e: (1) put izvanstanične sinteze, (2) put ovisan o ABC (*engl.* ATP-binding cassette) transporteru, (3) put ovisan o sintazi te (4) Wzx/Wzy-ovisan put (Schmid, 2018). Međutim, većina sojeva BMK, uključujući rodove *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*, koristi Wzx/Wzy-ovisan put za sintezu EPS-a (Zeidan i sur., 2017) koji je podijeljen u pet koraka (slika 3):

1. Transport i fosforilacija monosaharida i disaharida – dva alternativna puta, fosfotransferazni sustav (*engl.* phosphotransferase system, PTS) ili permeaze, su bitna za uvoz monosaharida

ili disaharida. PTS može sinkronizirano izvršiti transport i fosforilaciju, dok permeaze transportirane šećere moraju dalje fosforilirati djelovanjem kinaza.

2. Stvaranje šećernih nukleotida (aktivacija monosaharida) – prvo, fosfoglukomutaza i galaktoza-1-fosfat uridiltransferaza posreduju u prijelazu iz glukoza-6-fosfata i galaktoza-1-fosfata u glukoza-1-fosfat, koja se može pretvoriti u UDP-glukozu, UDP-galaktozu ili dTDP-ramnozu djelovanjem enzima kao što su UDP-glukoza pirofosforilaza, UDP-galaktoza 4-epimeraza, dTDP-glukoza pirofosforilaza, dTDP-glukoza 4,6-dehidrataza i dTDP-4-dehidroramnoza 3,5-epimeraza.
3. Sinteza ponavljajućih jedinica – pojedinačne ponavljajuće jedinice, vezane na undekaprenol difosfatno sidro smješteno na unutarnjoj površini membrane, slažu se u niz pomoću glikoziltransferaza.
4. Premještanje ponavljajućih jedinica s unutarstanične na izvanstaničnu površinu – ponavljajuće jedinice se premještaju u periplazmatski prostor ili na vanjsku membranu pomoću flipaze (Wzx).
5. Polimerizacija ponavljajućih jedinica i oslobađanje dugog lanca – ponavljajuće jedinice se povezuju djelovanjem polimerize (Wzy) kako bi se formirao dugi lanac te se, na kraju, EPS oslobađa u izvanstanični prostor.



**Slika 3.** Biosinteza egzopolisaharida Wzx/Wzy-posredovanim putem (prema Rana i Upadhyay, 2020)

#### **2.4.2.2. Primjena egzopolisaharida**

Zahvaljujući brojnim zdravstvenim dobrobitima i funkcionalnim ulogama, prepoznata je mogućnost primjene EPS-a u brojnim industrijama (Nguyen i sur., 2020), ali samo nekoliko njih pokazuje značajnu komercijalnu vrijednost (Rana i Upadhyay, 2020). Količina EPS-a koje proizvode BMK razlikuje se od vrste do vrste te su one značajno manje od količine koju proizvode drugi industrijski važni mikroorganizmi (Jurášková i sur., 2022). Međutim, kombinacija tehnologije genetičkog inženjerstva s genetskom modifikacijom odgovarajućih sojeva producenata i optimalnim uvjetima uzgoja može učinkovito poboljšati prinos EPS-a i smanjiti troškove, čineći industrijsku proizvodnju EPS-a mogućom (Zhang i sur., 2020). Štoviše, glavni troškovi proizvodnje EPS-a vraćaju se na visoku cijenu supstrata, uglavnom šećera kao što su glukoza i saharoza, te bi više pažnje trebalo usmjeriti na potrošnju jeftinih sirovina kao što su mliječni ili poljoprivredni otpad koji će smanjiti troškove proizvodnje EPS-a (Daba i sur., 2021).

##### *Upotreba u istraživačkim laboratorijima*

Biopolimer nazvan egzopolisaharid akrilamid (EPAA) je dobra alternativa koja se potencijalno može koristiti u laboratorijima kao gelirajući agens, odnosno kao djelomična zamjena za agar prilikom uzgoja bakterija, a njegova glavna značajka je da ne utječe na rast mikroorganizama, morfologiju kolonija i biokemijska svojstva soja (Andhare i sur., 2014). Pululan, još jedan mikrobn EPS, linearni je homopolisaharid koji se sastoji od ponavljajućih D-glukopiranozilnih jedinica povezanih 1,3- $\alpha$  i 1,6- $\alpha$  glikozidnim vezama, a koristi se u inženjeringu koštanog tkiva zahvaljujući brojnim terapijskim prednostima, uključujući biorazgradivost, biokompatibilnost, netoksičnost, antimikrobno djelovanje i adsorpciju (Manivannan i sur., 2023). Osim toga, egzopolisaharidi se, zahvaljujući visokom afinitetu prema teškim metalima u otpadnim vodama, mogu koristiti u bioremedijaciji u svrhu rješavanja problema kontaminacije vode i tla teškim metalima poput kadmija, žive, kobalta i olova (Raj i sur., 2018).

##### *Upotreba u prehrambenoj industriji*

Egzopolisaharidi koje proizvode BMK imaju primjenu u brojnim pekarskim, mliječnim i mesnim prehrambenim proizvodima zbog njihovih funkcionalnih učinaka na procesiranje hrane zahvaljujući interakcijama sa sastojcima hrane, posebice proteinima, koji se očituju poboljšanim reološkim i senzorskim svojstvima (Abarquero i sur., 2022). Ovisno o sastavu monomera, vrsti veza, broju i duljini bočnih lanaca te molekularnoj masi, EPS-i mogu djelovati

kao teksturizatori, stabilizatori, viskozifikatori, biozgušnjivači ili emulgatori (Korcz i Varga, 2021).

Pozitivan učinak EPS-a na pekarske proizvode temelji se na njihovoj sposobnosti da vežu vodu i tvore mrežu s različitim komponentama tijesta, zbog čega mogu poboljšati reologiju, strukturu i volumen kruha, što rezultira smanjenim stopama ustajanja i produljenim vijekom trajanja (Korcz i Varga, 2021). Buduće perspektive usmjerene su na korištenje EPS-a iz BMK za proizvodnju bezglutenskog kruha, budući da EPS-i potencijalno mogu djelovati kao hidrokoloide poboljšavajući njihova reološka svojstva (Torino i sur., 2015). Gluten je glavni protein koji stvara strukturu u brašnu i kao posljedica njegove bitne uloge u određivanju viskoelastičnih svojstava tijesta daje doprinos izgledu, teksturi, strukturi mrvica i okusu konačnog pečenog proizvoda. U posljednje vrijeme su potrošači, osobito osobe s celijakijom, u potrazi za bezglutenskim proizvodima s boljim svojstvima, a *in situ* proizvodnja EPS-a mogla bi zamijeniti gluten, što bi omogućilo proizvodnju kruha bez glutena s prihvatljivim senzorskim svojstvima (Lynch i sur., 2018).

Sposobnost EPS-a da vežu vodu i utječu na viskoznost ima pozitivnu ulogu i u mliječnim proizvodima zato što se time sprječava sinereza i poboljšava okus u ustima (Daba i sur., 2021). U mliječnoj industriji postoji potražnja za nemasnim ili bezmasnim fermentiranim mliječnim proizvodima (Leroy i De Vuyst, 2016). U mliječnim proizvodima, kao i u ostalim namirnicama, mast ima ključnu ulogu u određivanju fizičkih i tehnoloških svojstava. Uklanjanje masnoće iz mliječnih proizvoda, bilo potpuno ili djelomično, rezultira gubitkom okusa ili slabljenjem teksture i, posljedično, smanjuje njihovu prihvatljivost (Wang i sur., 2024). Međutim, kremastost i čvrstoća mliječnih proizvoda s niskim udjelom masti mogu se poboljšati ugradnjom EPS-a ili dodavanjem sojeva koji ih mogu proizvesti (Nampoothiri i sur., 2017).

Egzopolisaharidi koje proizvode BMK općenito se kod mesnih proizvoda smatraju čimbenicima kvarenja (Prechtl i sur., 2018). Međutim, Loeffler i sur. (2020) su nedavno opisali pozitivnu ulogu BMK koje proizvode EPS-e u različitoj mesnoj matrici, kao što su nemasne fermentirane kobasice. Korcz i Varga (2021) navode da su *in situ* formirani EPS-i utjecali na kvalitetu fermentiranih mesnih proizvoda, što nedvojbeno proširuje mogućnosti njihove primjene, posebice u mesnim proizvodima smanjene masnoće, budući da njihova potrošnja trenutno raste. Međutim, kako bi se zajamčila njihova kvaliteta, koncentracija EPS-a u mesnom proizvodu mora biti unutar dobro definiranog raspona (Loeffler i sur., 2020).

### *Upotreba u kozmetici*

Dekstran ( $\alpha$ -1,6 vezane jedinice D-glukoze s različitim stupnjem  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 ili  $\alpha$ -1,4 grananja), hijaluronska kiselina (linearni polisaharid koji se sastoji od naizmjenično povezanih  $\beta$ -1,3 N-acetilglukozamina i  $\beta$ -1,4 glukuronske kiseline), levan ( $\beta$ -2,6 vezane  $\beta$ -D-fruktofuranoze s povremenim  $\beta$ -2,1 grananjima) i ksantan guma (1,4-vezani  $\beta$ -D-glukozeni ostatci) primjenjuju se u kozmetici budući da djeluju kao ovlaživači i zgušnjivači (Yildiz i Karatas, 2018).

### *Upotreba u farmaceutskoj industriji i medicini*

Brojne su mogućnosti primjene EPS-a u farmaceutskoj industriji zahvaljujući njihovim već spomenutim pozitivnim djelovanjima. Obećavajuća je njihova primjena kao mikro-i nanonosača pametnih lijekova zbog njihove sposobnosti stvaranja hidrogelova i zadržavanja velikih količina vode unutar njihovih 3D mreža dok oni sami ostaju netopljivi. To znači da takvi gelovi mogu zarobiti lijekove unutar svojih struktura i/ili ih u isto vrijeme adsorbirati na vanjskim površinama što može produljiti zadržavanje lijeka, povećati njegovu bioraspoloživost i smanjiti dozu, što kao posljedica smanjuje citotoksičnost lijeka (Liu i sur., 2008). EPS-i pokazuju različite brzine otpuštanja lijeka zbog brojnih karakteristika kao što su biorazgradivost, bioadhezija, ionska, pH i temperaturna osjetljivost, a mogli bi se primijeniti kao nositelji antigena ili kao sami antigeni u pripremi cjepiva koja rezultiraju stvaranjem protutijela i tako osiguravaju snažne imunološke odgovore (Moscovici, 2015).

Osim prethodno navedenih prednosti EPS-a, raznolika struktura, karakteristike, netoksičnost i sigurnost predstavljaju poticajne čimbenike za proučavanje njihove primjene kao hidrogelova. Interpenetrirajuća polimerna mreža (*engl.* interpenetrating polymer network, IPN) predstavlja obećavajuću pametnu medicinsku primjenu hidrogela koja se sastoji od prodiranja EPS-a na molekularnoj razini. Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (*engl.* International Union for Pure and Applied Chemistry, IUPAC) definira IPN kao polimer koji sadrži dvije ili više mreža koje su djelomično isprepletene na molekularnoj razini, ali nisu međusobno kovalentno povezane. IPN mikrosfere kombiniranih alginata i sintetičkih ili prirodnih polimera pokazale su karakteristike zarobljavanja i produženog otpuštanja raznih lijekova kao što su antibiotici te antitumorski, antikoagulansi, protuupalni, nesteroidni protuupalni i antihipertenzivni lijekovi (Matricardi i sur., 2013).

Nanočestice obložene polisaharidima primijenjene u polju dijagnostike, posebno kvantnih točaka i magnetskih materijala, mogle bi učinkovito doprinijeti medicinskom slikanju,

dijagnozi i terapiji. Pokazalo se da modificiranje kolesterolskog pululana amino skupinama može rezultirati povećanjem intenziteta fluorescencije u tumorskim stanicama, u usporedbi s tradicionalnim liposomima s kvantnim točkama (Parajapati i sur., 2013).

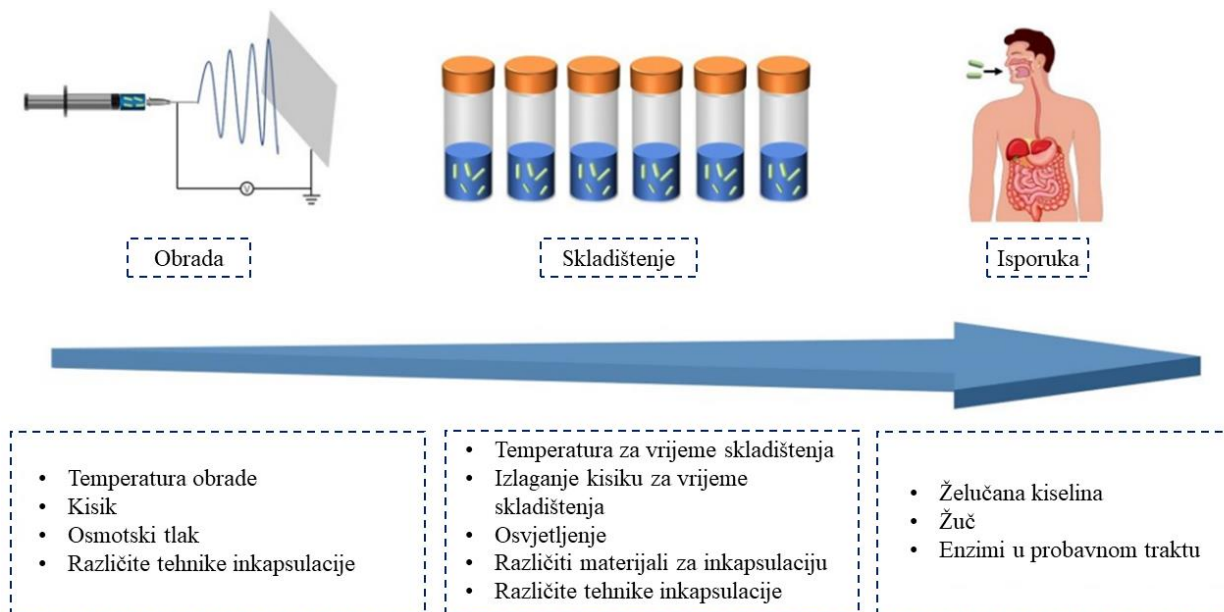
### *Upotreba u agrikulturi*

Biosurfaktanti su površinski aktivni spojevi niske molekulske težine koje proizvode bakterije kao što su *Staphylococcus* spp., *Acinetobacter* spp. i *Bacillus* spp. Ove molekule pomažu u pokretljivosti, signalizaciji i stvaranju biofilma i tako potiču interakciju s biljnim mikrobima posredovanu EPS-ima (Esawy i sur., 2012). EPS-i inhibiraju interakciju između biljke i biljnih patogena te povećavaju bioraspoloživost hranjivih tvari za biljku uklanjanjem poliaromatskih ugljikovodika poput naftalena i fenantrena te teških metala poput olova i žive. EPS-i se mogu koristiti za poboljšanje kvalitete tla remedijacijom tla i mogu zamijeniti štetne surfaktante koji se trenutno koriste za sintezu pesticida u industriji proizvodnje pesticida (Arora i sur., 2015). EPS-i gelan i kurdlan uglavnom se koriste u poljoprivrednim praksama jer djeluju kao poboljšivači tla što dovodi do poboljšanja kapaciteta zadržavanja vode obradivog zemljišta (Zhou i sur., 2024).

## **2.5. Sustavi isporuke i strategije održavanja vijabilnosti probiotika**

Probiotici imaju nekoliko ciljeva u ljudskom tijelu, kao što su usta, GIT, respiratorni trakt i urinarni trakt te vagina. Probiotici u crijevima pomažu ljudskoj probavi razgradnjom neprobavljivih složenih ugljikohidrata, proizvodeći kratkolančane masne kiseline koje mijenjaju pH debelog crijeva, inhibirajući tako rast patogenih bakterija. Osim proizvodnje kratkolančanih masnih kiselina, probiotici također mogu proizvoditi mliječnu kiselinu, antibakterijske peptide, bakteriocine i reaktivne kisikove vrste, ili se mogu natjecati s patogenim bakterijama za receptore na crijevnoj sluznici (Barajas-Álvarez i sur., 2023). Međutim, primjena probiotika u prehrambenim proizvodima nije jednostavan postupak, budući da neki od ovih mikroorganizama mogu izgubiti svoju vijabilnost prije konzumiranja (tijekom obrade i skladištenja) ili tijekom probave (de Souza Simões i sur., 2017). Kako bi se prevladala spomenuta ograničenja (slika 4), istražuju se različiti sustavi pomoćnih tvari i nosača za dostavu probiotika ključni za osiguravanje dovoljne količine i otpuštanje probiotika u debelom crijevu, kao i njihovo bolje preživljavanje u stresnim uvjetima unutar ljudskog GIT-a (Centurion i sur., 2021). Prisutnost antimikrobnog enzima lizozima u ustima, niski pH u želucu, žučne soli i probavni enzimi u tankom crijevu te okolišni uvjeti poput osmotskog tlaka i oksidativnog stresa su glavne prepreke preživljavanju probiotika u GIT-u (Wang i sur., 2022). Stoga je važno imati na umu da je, kada se ovi sojevi primjenjuju u svrhu poboljšanja zdravlja, potrebno da

zadovoljavaju tehnološki kriterij prema kojem bi dnevna doza živih probiotičkih bakterija trebala iznositi minimalno  $10^7$  CFU/mL u trenutku oralne konzumacije (Phoem i sur., 2015).



**Slika 4.** Glavni čimbenici koji utječu na preživljavanje probiotika tijekom obrade, skladištenja i isporuke (prema Xu i sur., 2022)

Stoga je fokus istraživača usmjeren na zaštitu probiotičkih bakterija i promicanje njihove uspješne oralne primjene i dostave na ciljno mjesto djelovanja u crijevima, a najčešći pristupi zaštite probiotičkih stanica su tehnike inkapsulacije (Rashidinejad i sur., 2022).

### 2.5.1. Mikroinkapsulacija probiotika

Jedna od primjenjivanih tehnika za isporuku probiotika je mikroinkapsulacija bioaktivnih komponenti u zaštitne omotače koji pružaju fizičku barijeru za poboljšanje preživljavanja i biorasploživosti probiotika (Razavi i sur., 2021). Posljednjih desetljeća razvijene su suvremene i inovativne metode mikroinkapsulacije koje su dovele do nastajanja širokog spektra funkcionalnih probiotičkih mikrokapsula, a među njima su najčešće korištene metode ekstruzije, emulzije i sušenja raspršivanjem (Rodrigues i sur., 2020) u kojima se inkapsulacija probiotičkih stanica odvija putem različitih mehanizama kao što su sol-gel imobilizacija, ionska koacervacija i emulzijska polimerizacija, koristeći polisaharide i proteine kao najčešće materijale matriksa (Singh i sur., 2018). Najčešće korišteni nosači za kapsuliranje probiotika su lipidne emulzije, ionski polisaharidi, mliječni proteini i mikrobnog egzopolisaharidi (karagenan, alginat, kitozan, gelan i ksantan gume), te je dokazano da polimerni nosači povećavaju održivost probiotika tijekom proizvodnje, skladištenja i prolaska kroz kiseli želudac (Asgari i sur., 2020).

Još jedan pristup koji se može koristiti za povećanje preživljavanja inkapsuliranih probiotika tijekom skladištenja i unutar GIT-a ljudi je dodatak prebiotičkih supstrata, koji su neprobavljivi ili samo djelomično probavljivi u GIT-u, a stimuliraju rast prisutne mikrobiote i probiotika u ljudskim crijevima (Rashidinejad i sur., 2022). Pokazalo se da dodavanje oligosaharida, kao što su  $\beta$ -glukan i fruktooligosaharidi, rezultira poboljšanjem preživljavanja probiotika. Prebiotici nisu razgrađeni enzimima u GIT-u, ali ih mogu iskoristiti bifidobakterije, bakterije mliječne kiseline i druge poželjne bakterijske vrste u debelom crijevu (Liao i sur., 2019).

### 2.5.2. Nanoinkapsulacija probiotika

Iako se pokazalo da mikroinkapsulacija pospješuje preživljavanje probiotika, nedostatak ove metode predstavljaju nekontrolirana veličina mikrokapsula, curenje i niska *in vivo* efikasnost (Wang i sur., 2019). Stoga se u zadnje vrijeme kao alternativa pojavila metoda individualne inkapsulacije stanica u nanokapsule, koja olakšava ciljanu isporuku i kontrolirano otpuštanje probiotika u crijevima (Xu i sur., 2022). Jedinstvene biološke i fizikalno-kemijske karakteristike nanokapsula, kao što su manje veličine čestica, veća površina i povećana reaktivnost, poboljšavaju učinkovitost inkapsuliranih probiotika, čime se osigurava logično rješenje za ljudsko zdravlje i sigurnost (Singh i sur., 2022). Među različitim metodologijama inkapsulacije stanica, ističu se elektropredenje i metoda „sloj po sloj“ (*engl.* layer-by-layer, LbL) (Razavi i sur., 2021).

Elektropredenje se sastoji od tri temeljne komponente: kolektor, pumpa štrcaljka i visokonaponski izvor energije. Polimerna kapljica se za vrijeme postupka drži na vrhu štrcaljke pomoću površinske napetosti. Zatim, električni nabijen mlaz otopine polimera izbija u stožac, nakon elektrostatske sile nastale suprotstavljanjem izvora visokog napona površinskoj napetosti. Na kraju, otapalo ispari i mlaz se skruti u nanočesticu (Zhao i sur., 2018). Ova metoda je pokazala veliki potencijal za inkapsulaciju bakterijskih stanica nanovlaknima koja štite probiotičke stanice od surovih uvjeta okoline i povećavaju njihov opstanak u crijevima (Razavi i sur., 2021).

Još jedna obećavajuća metoda je i LbL metoda čiji se princip temelji na slaganju slojeva polielektrolita suprotnih naboja putem elektrostatskih interakcija, a omogućuje brzu izgradnju tankih filmova na ekonomičan i kontroliran način (Zhao i sur., 2019). Pokazalo se da inkapsulacija probiotičkih stanica pomoću LbL tehnike osigurava veću zaštitu bakterija u GIT-u i potiče mikrobnu adheziju i rast na ciljanim mjestima (Wang i sur., 2019; Anselmo i sur.,



2016). Kako bi se postiglo uspješno inkapsuliranje stanica, važno je odabrati ispravan materijal za zaštitu budući da u velikoj mjeri utječu na učinkovito oblaganje stanica. Polikationi s pozitivnim nabojem mogu posjedovati antiperoksidacijska, antitumorska i antiupalna svojstva, dok se polianioni s negativnim nabojem uvelike primjenjuju u isporuci lijekova i kemijskoj sintezi. Ti polielektroliti (polikationi i polianioni) se razlikuju prema strukturi lanaca, elektrostatskim silama, reaktivnim aminskim skupinama, aktivnim kemijskim vezama i nukleofilnosti (Li i sur., 2022). Nedostatak ove metode je što uglavnom iziskuje mnogo vremena, a automatizaciju koraka slaganja polimera teško je provesti u većem mjerilu (Centurion i sur., 2021).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu su korišteni sojevi BMK, izolirani iz majčinog mlijeka, koji imaju sposobnost proizvodnje potencijalnih terapijskih biomolekula – S-proteina i egzopolisaharida (tablica 3). Osim sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka, korišteni su i test-mikroorganizmi *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1, *Staphylococcus aureus* 3048 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 u svrhu provedbe eksperimenata kompetitivne ekskluzije i turbidimetrijskog određivanja antimikrobnog djelovanja (tablica 4). Svi navedeni sojevi dio su Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

**Tablica 3.** Sojevi BMK, izolirani iz majčinog mlijeka, producenti potencijalnih terapijskih biomolekula korišteni u ovom radu

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta	Biomolekula
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB1	MRS, 37 °C, anaerobno	S-proteini
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB2	MRS, 37 °C, anaerobno	S-proteini
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB13	MRS, 37 °C, anaerobno	S-proteini
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB20	MRS, 37 °C, anaerobno	S-proteini
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MC1	MRS, 37 °C, anaerobno	egzopolisaharidi

\*anaerobni uvjeti postignuti su pomoću sustava Anaerocult A (Merck, Njemačka)

**Tablica 4.** Test-mikroorganizmi korišteni u ovom radu

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Escherichia coli</i> 3014	3014	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Salmonella enterica</i> serotip Typhimurium FP1	FP1	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i> 3048	3048	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	19111	BHI, 37 °C, aerobno

#### 3.1.2. Stanične linije

Caco-2 stanična linija, koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela, korištena je u ovom radu u svrhu proučavanja adhezije BMK, u kompetitivnoj ekskluziji potencijalno patogenih *E. coli* 3014 i *S. Typhimurium* FP1. Caco-2 stanična linija korištena u eksperimentima dio je Zbirke laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (American Type Culture Collection, ATCC HTB-37, SAD).

Osim toga, u svrhu ispitivanja *in vitro* imunomodulacijskog djelovanja BMK i njihovih potencijalnih terapijskih biomolekula korištene su Caco-2 i HT29 stanice koje su dio zbirke banke staničnih kultura Laboratorija za imunologiju Sveučilišta u Zagrebu Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji.

### 3.1.3. Hranjive podloge

U ovom radu su korištene sljedeće podloge:

- a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj BMK roda *Lactobacillus*
  - MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biolife“, 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 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
  - MRS bujon („Biolife“, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodatka agara.
- b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test-mikroorganizama
  - BHI (Brain Heart Infusion) agar („Biolife“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
  - BHI bujon („Biolife“, Italija) istog je sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.
- c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterije *Escherichia coli* 3014
  - Rapid *E. coli* 2 agar („Biovit“, Italija) sastava (g/L destilirane vode): mesni pepton 5; želatin pepton 5; NaCl 5; kvašćev ekstrakt 3; selektivni kromogeni supstrat 6; agar 13.
- d) selektivna hranjiva podloga za izolaciju bakterije *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1
  - XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar („Biolife“, Italija) sastava (g/L destilirane vode): ksiloza 3,5; L-lizin 5,0; laktoza 7,5; saharoza 7,5; NaCl 5,0; kvašćev ekstrakt 3,0; deoksikolna kiselina 2,5, natrijev tiosulfat 6,6; amonij željezov citrat 0,8; fenol crveno 0,8; agar 13,5. 55 g podloge je resuspendirano u 1 L hladne destilirane vode, zatim zagrijavano uz miješanje (bez autoklaviranja) te ohlađeno na 45 – 50 °C, dobro promiješano i izliveno u sterilne Petrijeve zdjelice.
- e) hranjive podloge za kultivaciju Caco-2 i HT29 staničnih linija
  - Ham's F-12 medij + L-glutamin, „Capricorn Scientific“, Njemačka
  - DMEM/F12 + L-glutamin, „Capricorn Scientific“, Njemačka

### 3.1.4. Kemikalije

- 2,2-difenil-1-pikril-hidzaril-hidrat (*engl.* 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH), „Sigma-Aldrich“, SAD
- 5-fluorouracil (5FU), „Sigma-Aldrich“, SAD
- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- AlexaFluor 488 konjugirano sekundarno antitijelo, „Proteintech“, SAD
- alginat, „Fluka“, Švicarska
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- Anti-Junctional Adhesion Molecule 1/JAM-A antitijelo, „Abcam“, UK
- bromfenol plavo, „Sigma-Aldrich“, SAD
- CBA kit, LEGENDplex, „Biolegend“, SAD
- citokin hTNF- $\alpha$ , „Miltenyi Biotec“, Njemačka
- Coomassie Brilliant Blue, „Sigma-Aldrich“, SAD
- CoraLite<sup>®</sup> Plus 488 konjugirano okludin antitijelo, „Proteintech“, SAD
- CoraLite<sup>®</sup> Plus 488 konjugirano ZO-1 antitijelo, „Proteintech“, SAD
- DAPI boja (*engl.* 4',6-diamidino-2-phenylindole), „Sigma-Aldrich“, SAD
- deoksinukleotidi (*engl.* deoxynucleotide triphosphates, dNTPs), „Takara“, Japan
- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- deuterij oksid (D<sub>2</sub>O), „Sigma-Aldrich“, SAD
- dimetil sulfoksid (*engl.* dimethyl sulfoxide, DMSO), „Kemika“, Hrvatska
- elektronski brojač Horiba ABX169, „Micros“, Francuska
- eozin, „Acros Organics“, Belgija
- etanol 70 % (v/v), „Kemika“, Hrvatska
- etanol 96 % (v/v), „Kemika“, Hrvatska
- etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), „Sigma-Aldrich“, SAD
- fetalni goveđi serum (*engl.* fetal bovine serum, FBS), „Gibco“, SAD
- fosfatni pufer (*engl.* phosphate-buffered saline, PBS), „Kemika“, Hrvatska
- fruktooligosaharid (FOS), „Sigma Aldrich“, SAD
- galaktooligosaharid (GOS), „Biosynth“, Švicarska
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska

- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- GoTaq Flexi pufer bez MgCl<sub>2</sub>, „Applied Biosystems“, SAD
- goveđi albumin (*engl.* bovine serum albumin, BSA), „Sigma-Aldrich“, SAD
- gvanidin hidroklorid (*engl.* guanidine hydrochloride, GHCl), „Sigma-Aldrich“, SAD
- hematoksilin, „Merck“, Njemačka
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, „Applied Biosystems“, Njemačka
- Incucyte Nuclight Rapid Red boja, „PHI AB“, SAD
- Incucyte<sup>®</sup> Nuclight Rapid Red boja, „Sartorius AG“, Njemačka
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- kalcijev klorid „Gram-mol“, Hrvatska
- klorovodična kiselina (HCl), „Sigma-Aldrich“, SAD
- led, PBF, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- lipopolisaharidi *E. coli* 0.111:B4, „Sigma-Aldrich“, SAD
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- magnezij klorid (MgCl<sub>2</sub>), „Applied Biosystems“, SAD
- Maxwell 16S Tissue DNA purification kit, „Promega“, SAD
- metil manozid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- metotreksat (*engl.* methotrexate, MTX), „MedChemExpress“, SAD
- MUC2 antitijelo, „Proteintech“, SAD
- Narketan<sup>®</sup>, „Vetoquinol“, Francuska
- natrij dekstran sulfat (*engl.* dextran sulfate sodium, DSS), „MP Biomedicals“, SAD
- natrijev alginat, „Fluka“, Švicarska
- natrijev citrat, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS), „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijev klorid (NaCl), „Kemika“, Hrvatska
- natrijev nitrat (NaNO<sub>3</sub>), „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijeva lužina (NaOH), „Kemika“, Hrvatska
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- NucleoSpin<sup>®</sup>RNA kit, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- obrano mlijeko, „Sigma-Aldrich“, SAD
- pankreatin, „Fluka“, Švicarska

- parafin, „Sigma-Aldrich”, SAD
- paraformaldehid, „Merck“, Njemačka
- Penicilin/Streptomycin (Pen/Strep), „Capricorn Scientific GmbH“, Njemačka
- pepsin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- početnice, „Invitrogen“, SAD
- poli(dialildimetilamonij klorid) (PDDA), „Sigma-Aldrich“, SAD
- poli(stirensulfonat) (PSS), „Sigma-Aldrich“, SAD
- QIAquick PCR purification kit, „Qiagen”, Njemačka
- RNase A, „Qiagen“, Njemačka
- sekundarno antitijelo VectaFluor™ Excel Amplified Anti-Rabbit IgG konjugirano s DyLight™ 488 Antibody Kit Green, „Abcam”, UK
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6 – 315 kDa), „Lonza“, SAD
- standardna mišja hrana 4RF21, „Mucedola S.R.L.”, Italija
- SYBR Green boja, „Thermo Fischer Scientific”, SAD
- Taq polimeraza, „Takara”, Japan
- TEMED (N', N', N', N'-tetrametiletilen), „Sigma-Aldrich“, SAD
- trikloroetna kiselina (*engl.* trichloroacetic acid, TCA), „Termo Fisher Scientific”, SAD
- tripsin, „Merck”, Njemačka
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba Reagents GmbH“, Njemačka
- Triton X-100, „AppliChem“, Njemačka
- vacutainer, „Abaxis”, Ujedinjeno Kraljevstvo
- VetScan® kit, „Abaxis”, Ujedinjeno Kraljevstvo
- ViaFluor 488 boja, „Biotium”, SAD
- Xylapan®, „Vetoquinol Biowet”, Poljska
- ZG-16 antitijelo, „Abcam”, UK
- ZG16 protein [*engl.* recombinant human secretory lectin ZG16 protein (Fc chimera)], „Abcam“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- žučne soli, „Difco”, SAD
- β-merkaptoetanol, „Sigma-Aldrich“, SAD

### 3.1.5. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Kern & Sohn”, Njemačka
- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec-nano, „Shimadzu“, Japan
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- celulozna vata, „Lola Ribar“, Hrvatska
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- CO<sub>2</sub> inkubator, „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- detektor Smartline RI Detector 2300/2400, „Knauer“, Njemačka
- digitalna vaga, „Kern & Sohn”, Njemačka
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- filter za špricu 0,22 µm, „NeoLab“, Njemačka
- fluorescencijski mikroskop EVOS FLc Cell Imager, „Thermo Fisher Scientific“, SAD
- grijač, „Lincar“, Italija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- igle, „B. Braun“, Njemačka
- inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, „Brouwer CH“, Švicarska
- invertni biološki mikroskop XDS-1, „OPTIKA Microscopes“, Italija
- kadica za elektroforezu, „Eppendorf“, SAD
- kivete 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- kivete za centrifugiranje 15 mL i 50 mL, „Falcon“, Engleska
- kivete za mjerenje zeta potencijala, „Malvern Panalytical“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- kolektor frakcija, „LKB Bromma“, Austrija
- kolona ConA Sepharose 4B, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kolona Sephacryl S-300, „GE Healthcare“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- kolona Sephacryl S-400, „GE Healthcare“, Ujedinjeno Kraljevstvo



- kromatograf isključenjem na osnovi veličine čestica, „Knauer“, Njemačka
- laboratorijske čaše, „Gram-mol“, Hrvatska
- laminar, „Iskra“, Slovenija
- ledomat, „Scotsman“, SAD
- lijevak, „Normax“, Portugal
- liofilizator CHRIST Alpha 1–2 LDplus, „Martin Christ“, Njemačka
- magnetna mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- Maxwell 16 Research System instrument, „Promega“, SAD
- mikrobiološka ušica, „Syntesys“, Italija
- mikroskop aZeiss Axio Star, „Carl Zeiss Microscopy GmbH“, Njemačka
- mikrotitratske pločice s 96 i 24 jažice, „Falcon“, SAD
- mjerač vodljivosti, „Hanna Instruments“, SAD
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio-Rad“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- NMR tube, „Sigma-Aldrich“, SAD
- NMR Varian 500 MHz, „Agilent Technologies“, SAD
- PCR uređaj ABI 2720, „Applied Biosystems“, SAD
- pećnica, „Mettler“, Njemačka
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta, „Isolab“, Njemačka
- protočni citometar LSR II, „Becton Dickinson“, SAD
- sonikator Sonopuls mini20, „Bandelin“, Njemačka
- Spectra/Por dialysis membrane (12-14 kDa), „Spectrum Laboratories“, SAD
- spektrofotometar NanoPhotometer<sup>®</sup> N60, „Implen GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za kivete, „NeoLab“, Njemačka
- sterilna gaza, „Konstill“, Slovenija
- šprice, „Chirana“, Slovačka
- T-boca 25 cm<sup>3</sup>, „Corning“, SAD
- termomikser comfort, „Eppendorf“, SAD

- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler, „Applied Biosystems“, Njemačka
- VetScan® VS2, „Abaxis“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Inkolab“, Hrvatska
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD
- Zetasizer Ultra, „Malvern Panalytical“, Ujedinjeno Kraljevstvo

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi BMK, producenti S-proteina i egzopolisaharida (tablica 3), čuvani su pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u MRS bujonu uz dodatak 15 % glicerola, dok su test-mikroorganizmi (tablica 4) čuvani pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u BHI bujonu uz dodatak 15 % glicerola. Dan prije ekperimenta sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta navedenim u tablicama 3 i 4.

### 3.2.2. Čuvanje i priprema staničnih linija

Caco-2 stanična linija čuva se u Ham's F-12 mediju s L-glutaminom na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  uz dodatak DMSO-a koji ima krioprotektivnu ulogu. Zamrznuta Caco-2 stanična linija otopljena je u vodenoj kupelji pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  te je centrifugiranjem ( $125 \times g$ , 5 – 7 min) uklonjen supernatant s ostacima medija i DMSO-a. Biomasa stanica je potom isprana s 1 mL svježeg Ham's F-12 medija prethodno zagrijanog na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nakon čega su stanice nacijepljene u T-bocu volumena  $25\text{ cm}^3$  i uzgajane u inkubatoru pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  u 5 %-tnoj atmosferi  $\text{CO}_2$ . Za uzgoj stanica korišten je Ham's F-12 s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog ( $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 30 min) FBS-a, uz izmjenu medija svakih 48 h. U T-boci su stanice uzgajane u monosloju do subkonfluentnog stanja. Kako bi se stanice iz subkonfluentnog monosloja prevele u suspenziju, prvo su isprane PBS-om (pH = 7,4) radi uklanjanja ostataka medija koji zbog  $\alpha_2$ -makroglobulina prisutnog u serumu ima antitripsinsku aktivnost. Zatim su stanice inkubirane u 0,25 %-tnom (w/v) tripsinu pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se odlijepile od podloge. Odljepljivanje stanica, koje se uočava prelaskom stanica iz vretenastog u okrugli oblik, detektirano je pod mikroskopom. Nakon odljepljivanja stanica, uklonjen je tripsin te su stanice resuspendirane u mediju sa serumom kako bi se zaustavilo proteolitičko djelovanje tripsina. Stanice su izbrojane u komorici po Bürker-Türku pomoću invertnog mikroskopa te je izračunata koncentracija stanica u uzorku. U mikrotitarsku pločicu s 24 jažice nasađena je suspenzija Caco-2 stanica koncentracije  $10^5$  stanica/mL. Stanice su potom inkubirane tjedan dana pri prethodno navedenim uvjetima za uzgoj do subkonfluentnosti, uz izmjenu medija svakih 48 h. Prije ekperimenta, Caco-2 stanice su isprane tri puta fosfatnim puferom.

Što se tiče HT-29 stanične linije, čuvanje i priprema je slična kao i kod Caco-2 stanica, uz razliku u mediju koji je kod HT-29 stanica DMEM/F12.

### **3.2.3. Izolacija genomske DNA iz sojeva BMK**

Ekstrakcija genomske DNA sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka provedena je pomoću Genomic Wizard DNA Purification kita iz bakterijske biomase izdvojene centrifugiranjem 10 mL prekonoćne bakterijske kulture 5 min pri 13000 g. Nakon uklanjanja supernatanta, talog stanica je resuspendiran u 480  $\mu$ L EDTA (50 mM, pH = 8) i 120  $\mu$ L otopine lizozima (10 mg/mL) te je dobivena suspenzija inkubirana u vodenoj kupelji 45 min pri 37 °C. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 5 min pri 13000 g te je dobiveni talog potom resuspendiran u 600  $\mu$ L otopine za lizu jezgre i inkubiran u vodenoj kupelji 5 min pri 80 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, lizatu je dodano 3  $\mu$ L otopine RNAze te je dobivena suspenzija inkubirana 30 min pri 37 °C. Zatim je uzorku sobne temperature dodano 200  $\mu$ L otopine za taloženje proteina te je vorteksiran 20 s, inkubiran 5 min na ledu i centrifugiran na 13000 g 5 min. Izdvojeni supernatant koji sadrži DNA prebačen je u čistu kivetu u koju je prethodno dodano 600  $\mu$ L izopropanola sobne temperature, nakon čega se uzorak miješao okretanjem kivete dok niti DNA nisu formirale vidljivu masu. Supernatant je zatim uklonjen centrifugiranjem 5 min pri 13000 g te je nakon sušenja kivete na čistom apsorbirajućem papiru, talog DNA ispran sa 600  $\mu$ L 70 % (v/v) etanola. Centrifugiranjem 5 min pri 13000 g uklonjen je supernatant, a talogu je nakon 10 – 15 min sušenja na zraku dodano 100  $\mu$ L otopine za rehidraciju DNA nakon čega je uslijedila inkubacija u vodenoj kupelji 1 h pri 65 °C. Dobivenim uzorcima spektrofotometrijski je izmjerena koncentracija DNA uređajem BioSpec-nano te su uzorci pohranjeni pri 4 °C.

### **3.2.4. Karakterizacija BMK na temelju 16S rRNA sekvencioniranja**

#### **3.2.4.1. Amplifikacija 16S rRNA PCR metodom**

Reakcijska smjesa potrebna za umnožavanje 16S rDNA regije sadržavala je 1x GoTaq Flexi pufera bez  $MgCl_2$ , 1,5 mM  $MgCl_2$ , 1,5  $\mu$ M početnica UNI16SF (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i UNI16SR (5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3'), 0,2 mM dNTP-ova, 0,025 U/ $\mu$ L Taq polimeraze i 1 ng/ $\mu$ L DNA. PCR program se sastojao od početne denaturacije na 96 °C kroz 5 min, 30 ciklusa po 30 s denaturacije pri 96 °C, 30 s komplementarnog vezanja pri 55 °C i 30 s elongacije pri 72 °C, nakon čega je slijedilo 5 min završne elongacije pri 72 °C. Dobiveni PCR produkti su pročišćeni primjenom QIAquick PCR purification kita prema uputama proizvođača, kako bi se uklonio višak početnica, nukleotida, enzima, soli i drugih nečistoća, nakon čega je spektrofotometrijski izmjerena koncentracija dsDNA uređajem BioSpec-nano. Pročišćeni PCR produkti su sekvencirani u ovlaštenoj instituciji MacroGen (Nizozemska).

### 3.2.4.2. Sekvenciranje 16S rRNA gena

Sekvenciranje umnožene 16S rRNA provedeno je u servisu MacroGen korištenjem automatskog četverokapilarnog uređaja ABI 3730xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, SAD) koji radi na principu Sangerove dideoksi metode zaustavljanja sinteze DNA ugradnjom 2',3'-dideoksinukleotida (*engl.* dideoxynucleotide triphosphates, ddNTPs). Za provođenje reakcije osigurana je jednolančana DNA (kalup), DNA polimeraza, DNA početnice, dNTP te ddNTP. Uzorak DNA podijeljen je u 4 različite reakcije sekvenciranja od kojih svaka sadrži DNA polimerazu i sve potrebne deoksinukleotide (dATP, dGTP, dCTP i dTTP). Dodatno, u svaku od četiri reakcije dodan je jedan od različito fluorescentno ili radioaktivno obilježenih ddNTP-ova u 100 puta manjoj koncentraciji od standardnog dNTP-a kako bi se omogućila transkripcija cijele sekvence, a u isto vrijeme i nastajanje dovoljno fragmenata. Budući da ddNTP ne sadrži 3'-OH skupinu potrebnu za stvaranje fosfodiesterske veze između dva nukleotida, njegovom ugradnjom u rastući lanac DNA polimeraza ne može nastaviti elongaciju lanca pa dolazi do zaustavljanja sinteze DNA na različitim mjestima i nastaju fragmenti različitih duljina. Uzorci putuju kroz četiri kapilare pri čemu laser pobuđuje fluorescenciju, a detektor na osnovi različitih valnih duljina emitirane fluorescencije identificira boju tj. ddNTP koji se nalazi na kraju svakog DNA fragmenta. Na taj način je pomoću četiri odvojene reakcije i smjese 4 dNTP-a te jednog obilježenog ddNTP-a, dobivena kompletna informacija o slijedu nukleotida u analiziranoj DNA. Dobiveni rezultati su uspoređeni s poznatim sekvencama u NCBI (*engl.* National Center for Biotechnology Information) bazi podataka primjenom BLASTn algoritma (*engl.* Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) dostupnog na poveznici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

### 3.2.5. Karakterizacija BMK na temelju sekvencioniranja čitavog genoma

Genomi sojeva producenata S-proteina (*Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20) i egzopolisaharida (*Limosilactobacillus fermentum* MC1) sekvencirani su u IGA Technology servisu (Italija). Kvaliteta i koncentracija DNA su provjerene korištenjem Qubit 2.0 fluorometra i Agilent 2100 Bioanalyzer uređaja te je potom provedeno sekvenciranje na MiSeq 2500 uređaju prema postupku opisanom u Banić i sur. (2018). Funkcionalna anotacija i kategorizacija gena sojeva BMK, producenata S-proteina i EPS-a, provedena je primjenom RAST (*engl.* Rapid Annotations using Subsystems Technology) servera prema uputama u Aziz i sur. (2008) te PATRIC baze podataka. Kao ulazna datoteka za navedene bioinformatičke metode korištena je sekvenca genoma izoliranih sojeva u FASTA formatu. *In silico* identifikacija klastera gena uključenih u biosintezu bakteriocina potencijalno prisutnih u

genomima *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1 provedena je pomoću BAGEL4 servera (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) (van Heel i sur., 2018).

### **3.2.6. Karakterizacija S-proteina sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka**

#### **3.2.6.1. Uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih sojeva producenata**

Prekonoćne bakterijske kulture ispitivanih sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 su centrifugirane pri 4200 o/min tijekom 5 minuta te je talog stanica ispiran dva puta sterilnom fiziološkom otopinom. Stanice su zatim suspendirane u 3 M GHCl-u i inkubirane pri 37 °C tijekom 1 sata. Nakon inkubacije, stanice su centrifugirane pri 4200 o/min tijekom 5 min te su dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom i korištene za pokuse utvrđivanja uloge S-proteina u funkcionalnim svojstvima sojeva producenata.

#### **3.2.6.2. Ekstrakcija i natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) površinskih proteina**

Suspenzije stanica sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 centrifugirane su 5 min pri 4200 o/min. Dobiveni talozi stanica su isprani destiliranom vodom i resuspendirani u 50 µL 2x koncentriranog Laemmli pufera [1,25 mL 1 M Tris-HCl pH = 6,8; 4 mL 10 % (w/v) SDS; 2 mL 100 % (v/v) glicerol; 0,5 mL 0,5 M EDTA; 4 mg bromfenol plavo; 0,2 mL β-merkaptotanol]. Tako priređeni uzorci su prokuhani 5 min te je 20 µL nanoseno u jažice unaprijed pripremljenog poliakrilamidnog 10 % (v/v) gela. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu u puferu za elektroforezu (1x koncentriran) pri konstantnom naponu od 100 V tijekom 2,5 h. Pritom je korišten standard ProSieve QuadColor Protein Marker koji sadrži proteine poznate molekulske mase u rasponu 4,6 – 315 kDa. Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) kroz najmanje 2 h, a zatim u 10 % (v/v) otopini octene kiseline do obezbojenja pozadine. Naposljetku su iz gela izrezane vrpce veličine oko 50 kDa koje odgovaraju S-proteinima koje proizvode sojevi *L. brevis*.

#### **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	5 µL
APS	38 µL

b) gornji gel (za sabijanje uzoraka)

Tris-HCl (pH 6,8)	3,195 mL
akrilamid	0,45 mL
TEMED	7,5 $\mu$ L
APS	33,75 $\mu$ L

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

Tris	30 g
glicin	144 g
SDS	10 g

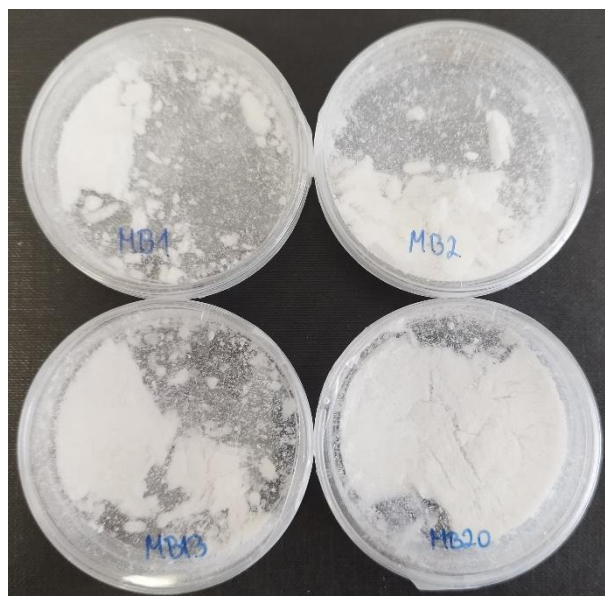
- nadopuniti destiliranom vodom do 1000 mL.

**3.2.6.3. Identifikacija i karakterizacija S-proteina**

Proteinske vrpce koje su veličinom odgovarale S-proteinima laktobacila, izrezane su iz gela i tripsinizirane. Dobiveni triptički peptidi su analizirani tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (*engl.* liquid chromatography–mass spectrometry, LC-MS), čiji su rezultati uspoređeni s Mascot bazom podataka. Tercijarna struktura izoliranih S-proteina sojeva *L. brevis* pretpostavljena je I-TASSER serverom.

**3.2.6.4. Izolacija S-proteina *L. brevis* sojeva**

Prekonoćne kulture *L. brevis* sojeva s dokazanom ekspresijom S-proteina na površini stanica uzgojene su propagacijom u 400 mL tekuće MRS podloge pri 37 °C, nakon čega je provedeno centrifugiranje tijekom 10 min pri 4200 o/min i temperaturi od 4 °C. Talog je ispran dva puta s fosfatnim puferom (pH = 7,4), a ekstrakcija S-proteina provedena je primjenom 5 M GHCl-a uz inkubaciju tijekom 2 sata na ledu. Ekstrakti proteina odvojeni su centrifugiranjem tijekom 10 min pri 4200 o/min i temperaturi od 4 °C. Dijaliza izoliranih S-proteina provedena je korištenjem Spectra/Por membrane (12 – 14 kDa) u fosfatnom puferu (pH = 7,4), pri 4 °C na magnetnoj mješalici. Nakon dijalize uzorci su liofilizirani (slika 5) u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus te su korišteni u eksperimentima ispitivanja imunomodulacijskog i regeneracijskog djelovanja *in vitro*.



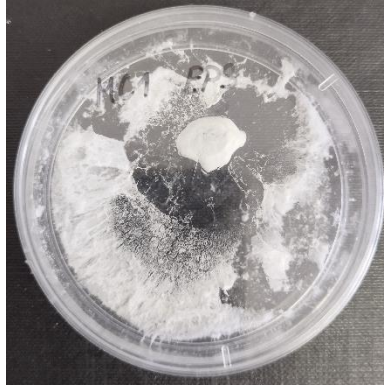
**Slika 5.** Prikaz liofiliziranih uzoraka S-proteina sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka (vlastita fotografija)

### **3.2.7. Karakterizacija egzopolisaharida soja BMK izoliranog iz majčinog mlijeka**

#### **3.2.7.1. Izolacija egzopolisaharida iz soja *L. fermentum* MC1**

Po 100  $\mu$ L prekonoćne kulture soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 je naciijepljeno na MRS krutu hranjivu podlogu s dodatkom 2 % w/v glukoze, nakon čega je provedena anaerobna inkubacija tijekom 4 dana pri 30 °C. Nakon inkubacije, biomasa stanica je prikupljena s površine podloge te resuspendirana u fiziološkoj otopini. Dobivena suspenzija je nakon uklanjanja taloga stanica centrifugiranjem tretirana s TCA u konačnoj koncentraciji od 20 % (w/v), s ciljem uklanjanja proteina, na magnetnoj mješalici pri 4 °C kroz 2 sata. Supernatant je izdvojen centrifugiranjem 30 min pri 4 °C i 8000 o/min, ohlađen na ledu, te je provedeno taloženje EPS-a iz supernatanta dodatkom 4 volumena hladnog 96 % (v/v) etanola uz miješanje staklenim štapićem. Dobivena suspenzija je inkubirana preko noći pri -20 °C kako bi se potaknulo taloženje EPS-a. Nakon inkubacije, EPS-i su izdvojeni centrifugiranjem 30 min pri 4 °C i 8000 o/min. Talog EPS-a je resuspendiran u destiliranoj vodi i dijaliziran korištenjem Spectra/Por tube za dijalizu veličine pora 12 – 14 kDa tijekom 3 dana uz česte izmjene vode. Nakon dijalize, uzorak je liofiliziran u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus te je masa liofiliziranih EPS-a izvagana na analitičkoj vagi (slika 6).





**Slika 6.** Prikaz liofiliziranog uzorka EPS-a izoliranog iz *L. fermentum* MC1 (vlastita fotografija)

### **3.2.7.2. Kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica (engl. *Size-exclusion chromatography, SEC*)**

Kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica korištena je u svrhu purifikacije uzoraka EPS-a izoliranih iz soja *L. fermentum* MC1. Kromatografija je provedena primjenom Sephacryl S-300 HR (1,6 cm i.d. · 90 cm), koja ima moć razdvajanja molekula u rasponu od  $1 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^5$  Da, i Sephacryl S-400 HR (1,6 cm i.d. · 90 cm) kolona, koja ima moć razdvajanja molekula u rasponu od  $1 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^6$  Da. Uzorci su otopljeni u otopini 0,05 M NaNO<sub>3</sub> u konačnoj koncentraciji od 10 mg/mL, pri čemu je korišten detektor refraktivnog indeksa K-2301, a frakcije su se skupljale pomoću kolektora svakih 12 min uz protok od 8,4 mL/h. Nakon razdvajanja smjese, prikupljene su frakcije od interesa, dijalizirane u destiliranoj vodi te liofilizirane.

### **3.2.7.3. Afinitetna kromatografija (*Con A Sepharose 4B*)**

Afinitetna kromatografija na ConA Sepharose 4B koloni korištena je kako bi se pročistili EPS-i izolirani iz soja MC1, a radi se o proteinu konkanavalin A koji je vezan na sefarozni nosač metodom cijanogen bromida. Uzorak EPS-a dobiven nakon izolacije je otopljen u puferu za vezanje (20 mM Tris-HCl, pH = 7,4) i nanesen na kolonu pri protoku od 15 cm/h (slika 7). Nakon vezanja, uzorak je eluiran koristeći 0,2 M metil-manozid, a sakupljena frakcija je zatim dijalizirana u destiliranoj vodi i liofilizirana.



**Slika 7.** Postavka aparature za afinitetnu kromatografiju (*vlastita fotografija*)

#### **3.2.7.4. $^1\text{H}$ NMR i 2D NMR analize**

Provedena je analiza EPS-a izoliranih iz soja MC1 primjenom NMR (*engl.* nuclear magnetic resonance) spektroskopije. Uzorci EPS-a (2 – 8 mg) su pripremljeni tako da su otopljeni u 99,9 %  $\text{D}_2\text{O}$  i liofilizirani, te je postupak ponovljen još jednom. Zatim je liofilizirani uzorak otopljen u 600  $\mu\text{L}$  99,9 %  $\text{D}_2\text{O}$  i prebačen u prethodno pripremljenu NMR tubu, te podvrgnut NMR analizi na 500 MHz VarianUNITY INOVA NMR spektrofotometru pri 50 °C. Kemijski pomaci su izraženi u ppm koristeći acetone kao interni standard (22,225 za  $^1\text{H}$  i 31,07 ppm za  $^{13}\text{C}$ ), a NMR spektri su obrađeni korištenjem MestreNova softvera.

#### **3.2.8. Adhezija na crijevne epitelne Caco-2 stanice**

Ispitivanje adhezije bakterijskih stanica na Caco-2 staničnu liniju je provedeno u dva odvojena eksperimenta. U prvom eksperimentu se ispitivao utjecaj S-proteina na sposobnost adhezije soja BMK na Caco-2 stanice ovisno o prisutnosti S-proteina na površini stanica producenata, dok se u drugom eksperimentu ispitivao učinak dodatka egzopolisaharida na adheziju soja producenta na Caco-2 stanice.

U prvom eksperimentu, prekonočno uzgojene stanice sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 su prikupljene centrifugiranjem (5 minuta pri 4200 o/min), isprane dva puta te suspendirane u fiziološkoj otopini. Suspenzija je podijeljena na dva dijela – stanice sojeva producenata kojima nije uklonjen S-sloj (S+) i stanice kojima je S-sloj uklonjen (S-) prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6.1. Biomasa bakterijskih stanica suspendirana je u EMEM mediju do postizanja vrijednosti  $OD_{620} = 1$  te je broj živih bakterija određen indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.18. U drugom eksperimentu, stanice prekonočne kulture soja *L. fermentum* MC1 prikupljene su centrifugiranjem (5 min pri 4200 o/min) i isprane dva puta u fosfatnom puferu (pH = 7,4). Isprana biomasa bakterijskih stanica podijeljena je na dva dijela – jedan dio je suspendiran u EMEM mediju do postizanja vrijednosti  $OD_{620} = 1$ , a drugi dio u EMEM mediju uz dodatak 1 mg/mL EPS-a. Broj živih bakterija u priređenim suspenzijama određen je indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.18.

Potom je u svaku jažicu s Caco-2 stanicama dodan 1 mL priređenih bakterijskih suspenzija. Nakon 1 h inkubacije pri 37 °C, Caco-2 stanice su isprane tri puta s fosfatnim puferom kako bi se uklonile neadhezirane bakterije. Caco-2 stanice su zatim lizirane 10 min pri 37 °C u 0,05 % (v/v) otopini Triton X-100, nakon čega je sadržaj jažice centrifugiran kako bi se prikupile adhezirane bakterijske stanice. Talog bakterijskih stanica je resuspendiran u fosfatnom puferu te je broj adheziranih stanica (izražen u CFU/mL) određen indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.18. Rezultati su prikazani kao  $\Delta \log(\text{CFU/mL}) = \log(\text{CFU/mL})_{\text{prije adhezije}} - \log(\text{CFU/mL})_{\text{nakon adhezije}}$ .

### **3.2.8.1. Vizualizacija adhezije sojeva *BMK* na Caco-2 staničnu liniju**

U svrhu ispitivanja adhezijskih svojstava soja *L. fermentum* MC1, izoliranog iz majčinog mlijeka, na Caco-2 staničnu liniju, stanice su nakon naciepljivanja na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica, u konačnom volumenu od 100  $\mu$ L Dulbeccovog modificiranog hranjivog (*engl.* Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12, DMEM/F-12) medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, obojane u suspenziji sa Incucyte Rapid Red bojom. Caco-2 stanice su zatim, nakon ispiranja sa 100  $\mu$ L DMEM/F-12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, inokulirane bakterijskom suspenzijom s podešenim multiplicitetom infekcije (*engl.* multiplicity of infection, MOI) od 50 bakterija po stanici (MOI 50) i 10 bakterija po stanici (MOI 10). Bakterijske stanice probiotičkih sojeva su prethodno dva puta isprane s fosfatnim puferom centrifugiranjem pri 4200 o/min tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je suspendiran u 200  $\mu$ L

PBS pufera te je dodana VioFluor 488 boja do konačne koncentracije od 5  $\mu$ M, nakon čega su inkubirani pri 37 °C tijekom 15 min. Obojanim bakterijskim stanicama se dodalo 2 mL zagrijanog DMEM/F-12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom, nakon čega je slijedila inkubacija 5 min na sobnoj temperaturi. Suspenzije bakterijskih stanica su centrifugirane pri 4200 o/min tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi, talozi su suspendirani u 80  $\mu$ L DMEM/F-12 medija obogaćenog s 10 % fetalnog goveđeg seruma i L-glutaminom te su odgovarajući volumeni pripremljenih koncentracija probiotičkih sojeva dodani u svaku jažicu. Nakon inkubacije od 4 i 12 sati, neadhezirane bakterijske stanice su isprane tri puta s fosfatnim puferom i fiksirane preko noći pri 37 °C dodatkom 4 %-tnog paraformaldehida. Nakon fiksiranja i ispiranja s fosfatnim puferom, jezgre stanice su obojane s DAPI (*engl.* 4',6-diamidino-2-phenylindole), a detekcija adheziranih stanica je provedena na EVOS FLc Cell Imager uređaju pri povećanju od 20x.

### **3.2.9. Kompetitivna ekskluzija patogenih bakterija sojevima BMK, izoliranih iz majčinog mlijeka, primjenom Caco-2 stanične linije**

Ispitivanje predinkubacije BMK adhezije bakterijskih stanica na Caco-2 staničnu liniju je provedeno u dva odvojena eksperimenta. Sojevi koji ekspimiraju S-proteine su podijeljeni u dvije kivete pri čemu su prvu paralelu činili sojevi s prisutnim S-proteinima, a drugu paralelu ti isti sojevi, ali kojima je uklonjen sloj S-proteina prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6.1. Uzorci su zatim centrifugirani 5 min pri 4200 o/min te je talog stanica resuspendiran u odgovarajućem volumenu MEM medija. U slučaju soja MC1, ispitan je i dodatak EPS-a izoliranih iz soja producenta na kompetitivnu ekskluziju u koncentracijama od 0,5 i 1 mg/mL te samih EPS-a u istim koncentracijama – biomasa stanica resuspendirana je u odgovarajućem volumenu MEM medija uz dodatak 0,5 ili 1 mg/mL EPS-a (slučajevi MC1 + 0,5 mg/mL EPS i MC1 + 1 mg/mL EPS), odnosno u jažicu je dodan samo 0,5 ili 1 mg/mL EPS-a resuspendiranih u MEM mediju (slučajevi 0,5 mg/mL EPS i 1 mg/mL EPS). Prije eksperimenta, indirektnom metodom se odredio početan broj stanica (CFU/mL) suspenzijama BMK i potencijalno patogenih bakterija prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.18.

Caco-2 epitelne stanice su isprane 3 puta u fosfatnom puferu (pH = 7,4) nakon čega se u jažicu dodalo 1 mL suspenzije BMK s podešenim OD = 1 ili samih EPS-a te su stanice inkubirane 1 h pri 37 °C. Nakon inkubacije, Caco-2 stanice su ispirane fosfatnim puferom te je u jažice dodano po 1 mL suspenzije potencijalno patogenih bakterija i nastavljena je inkubacija pri 37 °C kroz 1 h. Jažice su nakon inkubacije isprane 3 puta s 1 mL PBS-a kako bi se uklonile bakterijske stanice koje se nisu adhezirale te su inkubirane 10 min u 0,05 % (v/v) otopine Triton

X-100. Sadržaj svake jažice je prebačen u kivetu i centrifugiran 5 min pri 13000 o/min. Potom je talog stanica resuspendiran u 1 mL fosfatnog pufera, a broj adheziranih stanica se odredio indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.18.

### **3.2.10. Preživljavanje probiotičkih bakterija, producenata S-proteina, u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT-a)**

#### ***3.2.10.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva***

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

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

#### ***3.2.10.2. Učinak simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva na preživljavanje probiotičkih bakterija***

Ispitan je učinak simuliranih uvjeta GIT-a na preživljavanje 4 soja BMK producenata S-proteina, izoliranih iz majčinog mlijeka, uzgojenih u MRS bujonu, a ispitivanja su provedena na nativnim stanicama i na stanicama kojima je uklonjen S-sloj. Stanice su prikupljene centrifugiranjem (5 min pri 4200 o/min), isprane dva puta te resuspendirane u fiziološkoj otopini. S-sloj je uklonjen prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6.1. Nakon ispiranja fiziološkom otopinom, određen je broj živih stanica mikroorganizama prije inkubacije u simuliranim uvjetima GIT-a, a ostatak je centrifugiran 5 min pri 4200 o/min. Talog stanica je suspendiran u 3 mL simuliranog želučanog soka te inkubiran pri 37 °C tijekom 2 sata. Tijekom inkubacije, određen je broj živih stanica indirektnom metodom. Nakon 2 sata, stanice su centrifugirane tijekom 5 min pri 4200 o/min, a talog je suspendiran u 3 mL simuliranog soka tankog crijeva te inkubiran pri 37 °C tijekom 4 sata. Broj živih stanica između svakog koraka određen je indirektnom metodom, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.18.

### **3.2.11. Određivanje antimikrobne aktivnosti sojeva BMK turbidimetrijskom metodom**

Turbidimetrijskom metodom je ispitano antimikrobno djelovanje supernatanta odabranih sojeva BMK, sojeva producenata S-proteina i EPS-a, izoliranih iz majčinog mlijeka prema potencijalno patogenim test-mikroorganizmima *E. coli* 3014, *S. Typhimurium* FP1, *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC 19111. Supernatanti kultura su pripremljeni na način

da su odabrani sojevi BMK producenti potencijalnih terapijskih biomolekula, kojima se ispituje antimikrobna aktivnost, prethodno uzgojeni u anaerobnim uvjetima preko noći pri 37 °C, nakon čega je provedeno centrifugiranje tijekom (5 min pri 9000 o/min) i filtriranje kroz filter veličine pora 0,22 μm. U jažice mikrotitarske pločice je dodano 190 μL supernatanta ispitivanih bakterijskih kultura i 10 μL test-mikroorganizama prethodno uzgojenih u BHI bujonu. Antimikrobno djelovanje ispitivanih sojeva BMK tijekom 24 sata uzgoja test-mikroorganizama i BMK pri 37 °C određeno je spektrofotometrijski mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen BHI bujon ili MRS bujon bez dodanog supernatanta BMK čije se antimikrobno djelovanje ispituje) i uzoraka s dodanim supernatantom mjera je inhibicije rasta test-mikroorganizama. Slijepa proba je neinokulirana hranjiva podloga (Beganović i sur., 2011). Postotak (%) inhibicije ispitivanih test-mikroorganizama računa se prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \left( 1 - \frac{OD_{\text{uzorak}}}{OD_{\text{kontrola}}} \right) \cdot 100 \quad [1]$$

### **3.2.12. Ispitivanje antioksidacijskog djelovanja intaktnih stanica sojeva BMK producenata potencijalnih terapijskih biomolekula**

Antioksidacijsko djelovanje intaktnih stanica sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1 ispitano je prema postupku opisanom u Cizeikiene i Jagelaviciute (2021). Kako bi se pripremili uzorci intaktnih stanica prekonoćna kultura sojeva je centrifugirana (4200 o/min, 10 min, 4 °C), talog stanica je ispran te resuspendiran u PBS-u (pH = 7,4). Zatim su intaktne stanice pomiješane s 0,2 mM DPPH u omjeru 1:1 i inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi u mraku. Uzorci su nakon inkubacije centrifugirani (4200 o/min, 10 min, 4 °C) te je supernatantu određena apsorbancija pri 517 nm. Kao kontrola se koristio DPPH u etanolu i PBS (pH = 7,4). Sposobnost uklanjanja DPPH radikala (%) računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\% \text{ uklanjanja DPPH radikala} = \left( 1 - \frac{OD_{\text{uzorak}}}{OD_{\text{kontrola}}} \right) \cdot 100 \quad [2]$$

### **3.2.13. In vitro ispitivanje utjecaja BMK i njihovih terapijskih biomolekula na upalne procese u crijevima**

#### **3.2.13.1. Utjecaj BMK i njihovih terapijskih biomolekula na regeneraciju crijevnih sluznica**

Kako bi se ispitao utjecaj BMK koje proizvode S-proteine i EPS-e, te njihovih potencijalnih biomolekula, na regeneraciju i uspostavu homeostaze crijevnih sluznica u upali,

pratila se ekspresija proteina JAM-A (*engl.* junctional adhesion molecule-A), okludina i ZO-1 (*lat.* zonula occludens-1), na monosloju Caco-2 stanica. Analizirana je razina ekspresije molekula JAM-A, okludina i ZO-1 nakon inkubacije stanica sa živim BMK, njihovim biomolekulama ili supernatantima pod sljedećim tretmanima:

1. nakon uspostave monosloja, stanice su izložene 20-satnom djelovanju živim BMK (MOI = 2), izoliranim biomolekulama (koncentracija 50 µg/mL) ili, u slučaju soja MC1, supernatantima ( $1,6 \cdot 10^4$  CFU/mL)
2. nakon uspostave monosloja, stanice su istovremeno izložene djelovanju lipopolisaharida (*engl.* lipopolysaccharide, LPS) porijeklom iz *E. coli* (1 µg/mL) te živim BMK, izoliranim biomolekulama ili supernatantima kao pod točkom 1
3. nakon uspostave monosloja, stanice su prethodno tretirane s TNF- $\alpha$  12 sati u koncentraciji 10 ng/mL te naknadno izložene 20-satnom djelovanju živim BMK, izoliranim biomolekulama ili supernatantima kao pod točkom 1
4. nakon uspostave monosloja, stanice su prethodno tretirane s TNF- $\alpha$  12 sati (10 ng/mL) i izložene djelovanju LPS-a (1 µg/mL) te naknadno izložene 20-satnom djelovanju živim BMK, izoliranim biomolekulama ili supernatantima kao pod točkom 1
5. nakon uspostave monosloja, stanice su istovremeno izložene 20-satnom djelovanju TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) te živim BMK, izoliranim biomolekulama ili supernatantima kao pod točkom 1
6. nakon uspostave monosloja, stanice su istovremeno izložene 20-satnom djelovanju TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) i LPS-u (1 µg/mL) te živim BMK, izoliranim biomolekulama ili supernatantima kao pod točkom 1.

Kako bi se istražio utjecaj BMK koje proizvode S-proteine i EPS-e odnosno njihovih terapijskih biomolekula na regeneraciju crijevnog epitela, posebno njihov utjecaj na diferencijaciju u sekretorni (goblet) podtip stanica, pratila se ekspresija MUC2 i ZG16 proteina u HT29 stanicama kondicioniranih s metotreksatom (MTX) i 5-fluorouracilom (5FU) za koje je pokazano da promiču diferencijacije epitelnih stanica adenokarcinoma crijeva u goblet stanice. Njihova ekspresija je analizirana na monosloju HT29MTX+5FU nakon 5 dana inkubacije stanica sa živim BMK, izoliranim biomolekulama ili supernatantima pod sljedećim tretmanima:

1. 9. dan nakon uspostave monosloja, stanice su izložene 5-dnevnom djelovanju živim BMK (MOI 0,0002 MC1, a za preostale sojeve 0,002), izoliranim biomolekulama (koncentracija 10 µg/mL) ili supernatantima ( $1,6 \cdot 10^4$  CFU/mL)
2. 9. dan nakon uspostave monosloja, stanice su istovremeno izložene 5-dnevnom djelovanju živim BMK (MOI 0,0002 MC1, a za preostale sojeve 0,002) ili izoliranim biomolekulama (koncentracija 10 µg/mL) uz dodatak TNF-α u koncentraciji 5 ng/mL.

#### *Imunoobilježavanje za analizu fluorescencijskom mikroskopijom*

Za imunoobilježavanje okcludina i ZO-1 korištena su mišja monoklonska antitijela konjugirana s CoraLite® 488 dok je za JAM-A korišteno neobilježeno monoklonsko antitijelo i sekundarno antitijelo konjugirano s AlexaFluor 488 fluorokromom. Za imunoobilježavanje MUC2 i ZG16 korištena su neobilježena poliklonska i monoklonska antitijela kunića te sekundarno antitijelo konjugirano s DyLight 488 fluorokromom. Jezgre stanica obojane su s DAPI. Paralelno za svako antitijelo korišteno je odgovarajuće izotipsko kontrolno antitijelo.

Nakon inkubacije, stanice su fiksirane dodatkom 70 % (v/v) hladnog etanola te permeabilizirane u 0,1 % otopini Triton-X 100 u PBS-u. Nakon ispiranja i blokiranja nespecifičnog vezanja s 4 %-tnim BSA, na stanice su dodana primarna antitijela. U slučaju korištenja neobilježenih antitijela, uslijedio je dodatni korak inkubacije stanica s obilježenim sekundarnim antitijelima. Na kraju je na stanice dodana 150 nM otopina DAPI te je slijedila analiza na uređaju EVOS FLc Cell Imager. Za svaki uzorak, prikupljeno je po 6 slika stanica na različitim pozicijama u jažici koje su obrađene u ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Intenzitet ekspresije proteina je izražen kao koeficijent srednje vrijednosti MFI (*engl.* mean fluorescence intensity), a predstavlja omjer intenziteta specifične fluorescencije nakon vezanja specifičnih antitijela i izotipskih kontrolnih antitijela.

#### ***3.2.13.2. Utjecaj BMK i njihovih terapijskih biomolekula na imunomodulacijsko djelovanje***

Kako bi se ispitalo imunomodulacijsko djelovanje BMK koje proizvode S-proteine i EPS-e odnosno njihovih izoliranih biomolekula na monosloju Caco-2 stanica, pratila se ekspresija proupalnih (IL-1β, IL-6 i IL-8) i protuupalnog (IL-10) citokina. Analizirana je razina ekspresije citokina nakon inkubacije stanica sa živim BMK, s izoliranim S-proteinima ili egzopolisahardima pod različitim tretmanima (opisano u poglavlju 3.2.13.1.). Za analizu su korišteni skupni uzorci nadtaloga medija iz pojedinih jažica (za svaki uvjet po 5 jažica) nakon odmrzavanja, pohranjeni na -80 °C.



### *Analiza koncentracija citokina protočnim citometrom*

Uzorci su analizirani CBA (*engl.* cytometric bead array) metodom na protočnom citometru. CBA je kvantitativna imuno metoda temeljena na korištenju vezujućih i detekcijskih antitijela s detekcijom fluorescentih signala protočnim citometrom, a omogućuje istovremenu i racionalnu detekciju većeg broja analita. Zamrznuti stanični mediji su odmrznuti i pripremljeni za analizu protočnim citometrom prema uputi proizvođača CBA kita za odabrane citokine. Dobiveni podaci fluorescencije analizirani su korištenjem GainData® (arigo's ELISA Calculator, dostupno na poveznici <https://www.arigobio.com/ELISA-calculator>).

### **3.2.14. *In vivo* učinak *L. fermentum* MC1 i njegovih EPS-a na modulaciju crijevne mikrobiote i upalne procese miševa s izazvanom upalnom bolešću crijeva**

#### **3.2.14.1. Priprema probitičke suspenzije soja *L. fermentum* MC1 i potencijalne terapijske biomolekule za kaniliranje miševa**

Prekonoćna kultura soja *L. fermentum* MC1 dobivena propagacijom do 300 mL centrifugirana je 10 min pri 4200 o/min, talog stanica dva puta je ispran fiziološkom otopinom te je pripremljeno 50 mL suspenzije stanica koncentracije 10<sup>9</sup> CFU/mL. Suspenzija egzopolisaharida u koncentraciji od 1 mg/mL pripremljena je resuspendiranjem 50 mg liofiliziranih egzopolisaharida, dobivenih prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.7.1., u 50 mL fiziološke otopine. Životinje su primile 0,5 mL pripremljenih suspenzija pomoću intragastrične kanile tijekom 5 dana u nizu.

#### **3.2.14.2. Pokusne životinje**

U eksperimentu su korištena oba spola visokosrodnih miševa soja C57BL/6, starosti 2-3 mjeseca i tjelesne težine 20 – 30 g, iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Tijekom eksperimenta miševi su držani u kavezima, odvojeni prema spolu i pri standardnim uvjetima koji su uključivali dnevni ritam od 12 sati svjetla i 12 sati mraka te temperaturu od 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka. Miševi su hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, uz dostupnost vode i hrane *ad libitum*. Istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za bioetiku i dobrobit životinja Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (UR. BROJ: 251-58-10617-19-285; datum odobrenja: 12. travnja 2019.), te uz dozvolu Hrvatskog nacionalnog etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe i Ministarstva poljoprivrede RH (UR. BROJ: 525-10/0255-19-5, datum odobrenja 8. kolovoza 2019.). Nadalje, istraživanje je provedeno sukladno etičkim načelima Republike Hrvatske prema Pravilniku o zaštiti životinja koje se

koriste u znanstvene svrhe (Narodne Novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja te Narodne novine br. 102/17). Također se postupalo u skladu s Vodičem za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) # 86-23, 1985).

### 3.2.14.3. Plan pokusa

Prije početka izvođenja pokusa, kao i tijekom izvođenja pokusa, životinje su pojedinačno označene i izvagane te su na temelju toga razvrstane u skupine po 20 životinja s približno sličnom tjelesnom masom ( $\pm 3$  g) koje su bile podvrgnute različitim tretmanima (slika 8):

1. skupina – zdravi miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
2. skupina – zdravi miševi hranjeni potencijalnim probiotičkom sojem *L. fermentum* MC1 i standardnom laboratorijskom hranom
3. skupina – zdravi miševi hranjeni egzopolisaharidima izoliranima iz potencijalnog probiotičkog soja *L. fermentum* MC1 i standardnom laboratorijskom hranom
4. skupina – bolesni miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom
5. skupina – bolesni miševi hranjeni potencijalnim probiotičkom sojem *L. fermentum* MC1 i standardnom laboratorijskom hranom
6. skupina – bolesni miševi hranjeni egzopolisaharidima izoliranima iz potencijalnog probiotičkog soja *L. fermentum* MC1 i standardnom laboratorijskom hranom



**Slika 8.** Eksperimentalni miševi raspoređeni u skupine (*vlastita fotografija*)

Dio životinja je žrtvovan 24 h nakon zadnje primjene eksperimentalnih pripravaka, dok je drugi dio životinja žrtvovan 5 dana nakon zadnje primjene eksperimentalnih pripravaka radi uzimanja krvi (serum). Tijekom tog postupka sve životinje adekvatno su anestetizirane i analgezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije Narketana® (djelatna tvar Ketamin) u dozi od 75 mg/kg i Xylapana® (djelatna tvar Ksilazin) u dozi od 10 mg/kg.

#### **3.2.14.4. Indukcija kolitisa**

Kolitis je induciran oralnom primjenom 3 % (w/v) DSS-a u vodi za piće tijekom 5 dana, nakon čega je primijenjena normalna voda za piće. Životinje su promatrane svakodnevno zbog težine, morbiditeta, konzistencije stolice, piloerekcije te prisutnosti krvi u fecesu i anusu. Indeks aktivnosti bolesti (*engl.* disease activity indeks, DAI) izračunat je dodjeljivanjem dobro utvrđenih i validiranih rezultata za parametre koji su donekle analogni kliničkom prikazu humanog ulceroznog kolitisa (*engl.* ulcerative colitis, UC), prema Lan i sur. (2016). Za izračun su korišteni sljedeći parametri: (a) gubitak težine (0 = nema, 1 = 1 – 3 % gubitak težine, 2 = 3 – 6 % gubitak težine, 3 = 6 – 9 % gubitak težine, i 4 ≥ 9 % gubitka težine), (b) konzistencija stolice/proljeva (0 = normalno, 2 = labava stolica, 4 = vodeni proljev), (c) krvarenje (0 = nema krvarenja, 2 = blago krvarenje, 4 = jako krvarenje). DAI je izračunat kao ukupni rezultat: zbroj mršavljenja, proljeva i krvarenja, što može rezultirati DAI rezultatom u rasponu od 0 (nepromijenjen) do 12 (teški kolitis).

#### **3.2.14.5. Praćenje promjene tjelesne mase životinja**

Mjerenja tjelesnih masa su izvršena pomoću digitalne vage, a procjena toksičnosti praćena je vaganjem životinja tijekom eksperimenta i praćenjem promjene mase na nivou čitavog organizma. Pokazatelj toksičnosti je gubitak mase tijekom perioda eksperimenta, te se gubitak tjelesne mase za svaku pojedinu životinju računa prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ gubitka mase} = \frac{\text{masa prvog dana} - \text{minimalna masa tijekom ispitivanja}}{\text{masa prvog dana}} \cdot 100 \quad [3]$$

Osim promjene mase, pratila se iskoristivost hrane (*engl.* Food efficiency ratio, FER) koja se određuje prema sljedećoj formuli:

$$FER = \frac{\text{dobitak težine (g)}}{\text{dnevni unos hrane (g)}} \quad [4]$$

#### **3.2.14.6. Uzorkovanje krvi**

Ovisno o potrebama za pojedinu analizu, krv je nakon adekvatnog anestetiziranja životinja prikupljena iz abdominalne aorte u vakuumske epruvete s EDTA i bez koagulansa, te

pohranjena na +4 °C tijekom 2 sata do određivanja hematoloških parametara. Na elektronskom brojaču Horiba ABX169 su praćeni sljedeći parametri: broj eritrocita, leukocita i trombocita, hematokrit, hemoglobin, volumen eritrocita i trombocita, koncentracija (MCHC) i sadržaj (MCH) hemoglobina u eritrocitima te distribucija eritrocita. Osim toga, određen je i udio leukocitnih stanica (neutrofili, limfociti, monociti, eozinofili, bazofili).

#### **3.2.14.7. Izolacija DNA iz fecesa miševa i sekvencioniranje**

Uzeti su i uzorci fecesa za metagenomičku analizu prije uzrokovanja kolitisa, nakon uzorkovanja kolitisa, 3. i 6. dan davanja te 5. dan nakon prestanka davanja eksperimentalnih pripravaka bolesnim miševima, odnosno prije hranjenja, 3. i 6. dan hranjenja te 5. dan nakon prestanka hranjenja zdravih miševa eksperimentalnim pripravcima. Uzorak fecesa (100 mg) resuspendiran je u 1 mL destilirane vode. Dobivena suspenzija je centrifugirana 10 min pri 4200 o/min i 4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice su lizirane tijekom 2 h u 200 µL otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Nakon inkubacije, uzorci su uronjeni u kutiju s ledom kako bi se spriječilo njihovo zagrijavanje tijekom sonikacije. Sonikacija je provedena pomoću uređaja Sonopuls mini20 tri puta po 30 s i 15 s pauze između svakog ciklusa, nakon čega su uzorci prebačeni u jažice kasete Maxwell 16 Tissue DNA purification kita, koje su umetnute u Maxwell 16 Research System uređaj za automatsku izolaciju DNA. Nakon završetka ekstrakcije DNA, spektrofotometrijski je izmjerena koncentracija izolirane DNA iz 2 µL uzorka pomoću uređaja BioSpec-nano pri valnoj duljini 0,7 nm, pri čemu je kao slijepa proba korištena otopina u kojoj je resuspendirana DNA. Uzorci su sekvencirani u ovlaštenoj instituciji Molecular Research (SAD) korištenjem platforme Illumina MiSeq s početnicama 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') i 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3').

#### **3.2.14.8. Metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom (engl. quantitative polymerase chain reaction, qPCR)**

##### *Homogenizacija tkiva i izolacija RNA*

Homogenizacija i izolacija RNA iz tkiva kolona napravljena je prema komercijalno dostupnom kitu NucleoSpin®RNA. Smrznuto tkivo (oko 30 mg) smrvljeno je do konzistencije praha u keramičkom tarioniku s tučkom (prethodno ohlađeno tekućim dušikom). Dodano je 400 µL pufera RA1 i 4 µL β-merkaptioetanolu kako bi se denaturirale RNaze te se nakon homogenizacije radila izolacija RNA. Prvo je napravljena filtracija lizata, vezanje RNA za kolonu, digestija DNA, ispiranje membrane i na kraju je otopljena purificirana RNA u 40 µL sterilne mQH<sub>2</sub>O. Čistoća i koncentracija RNA provjerena je uz pomoć spektrofotometra. Svaki

uzorak je, nakon podešavanja koncentracije RNA na 1 µg po reakciji, mjereno dva puta te su praćene koncentracije i vrijednosti na 260/280 i 260/230 koje ukazuju na čistoću uzorka.

#### *Sinteza cDNA reverznom transkripcijom*

Reverzna transkripcija, prepisivanje RNA u cDNA, napravljena je prema komercijalno dostupnom High-Capacity cDNA Reverse Transcription kitu prema protokolu proizvođača. Matična otopina je pripremljena prema protokolu s RNaznim inhibitorom (prilog 1). U reakcijsku smjesu je odpipetirano 20 µL matične otopine i 20 µL RNA. Korišten je uređaj Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler te je pokrenut pri sljedećim uvjetima: 10 min na 25 °C, 120 min na 37 °C i 5 min na 85 °C.

#### *Amplifikacija cDNA upotrebom qPCR metode*

Dobivene cDNA korištene su u metodi kvantitativne lančane reakcije polimerazom (*engl.* quantitative polymerase chain reaction, qPCR), po metodi koja se zasniva na SYBR Green boji koja se nespecifično interkalira u sve dvolančane DNA produkte. Za normalizaciju su korištena dva referentna gena ACTβ (*engl.* actin β) i β2M (*engl.* β2-microglobulin) koji su imali ujednačenu ekspresiju u promatranim grupama uzoraka.

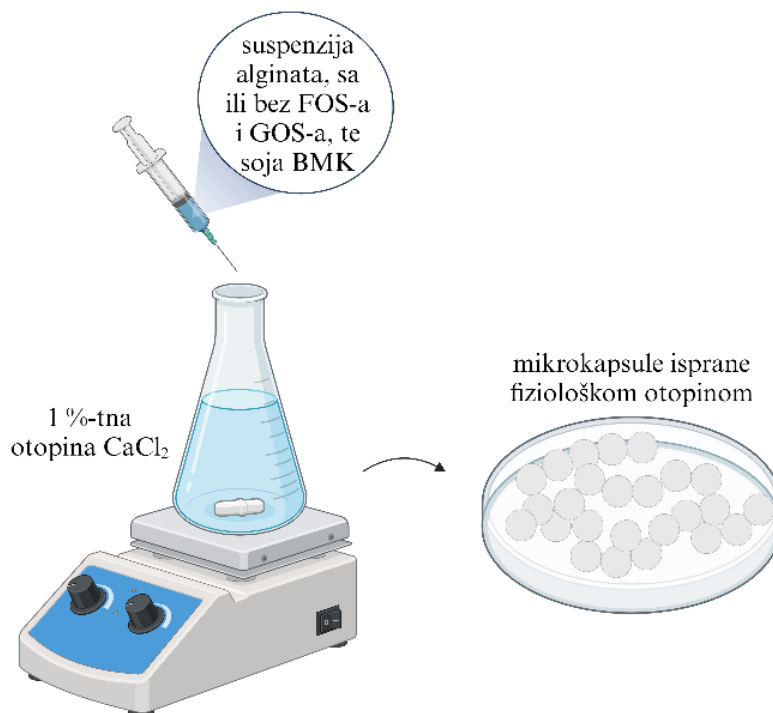
Analizirana je ekspresija sljedećih gena: IL-1β – interleukin 1β, IL-6 – interleukin 6, MCP-1 – monocitni kemotaktički protein 1 (*engl.* monocyte chemoattractant protein-1), IL-1α – interleukin 1α, TLR4 – Toll-u sličan receptor 4 (*engl.* Toll-like receptor 4), TNF-α – čimbenik nekroze tumora α (*engl.* tumor necrosis factor alpha), CD68 antigen, TGF-β – transformirajući čimbenik rasta β (*engl.* transforming growth factor beta), IGF1R – receptor za inzulinu sličan faktor rasta (*engl.* Insulin-like growth factor 1 receptor), GRP94 – glukozom regulirani protein 94 (*engl.* glucose-regulated protein 94), NOX2 – NADPH oksidaza 2 (*engl.* NADPH oxidase 2), CHOP – protein homologan CCAAT-pojačivač-vezujućem proteinu (*engl.* CCAAT enhancer-binding protein homologous protein), AIFM1 – faktor indukcije apoptoze povezan s mitohondrijima (*engl.* apoptosis inducing factor mitochondria associated 1), BCL2 – protein 2 B stanice limfoma (*engl.* B-cell lymphoma protein 2).

Rezultati umnažanja ciljnih gena qPCR metodom analizirani su u računalnom programu REST<sup>®</sup> (*engl.* Relative Expression Software Tool), ( $\Delta\Delta C_t$  metoda). Vrijednosti su normalizirane preko referentnih gena β-aktin (Actβ) i β2-mikroglobulin (β2m). Statistička značajnost je određena na razini  $p < 0,05$ . Relativna ekspresija gena (R) izračunata je pomoću jednadžbe:

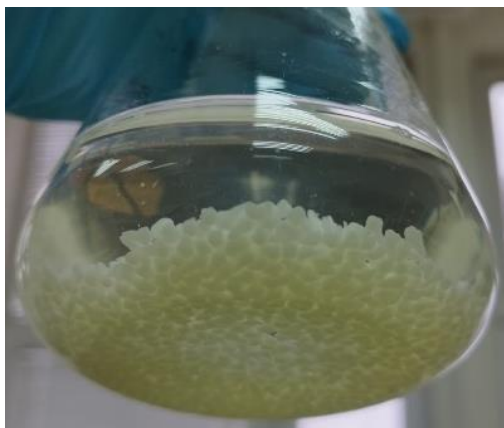
$$R = \frac{(E_{ciljni\ gen})^{\Delta C_t\ ciljni\ gen\ (A\ kontrola-A\ uzorak)}}{(E_{ref.gen})^{\Delta C_t\ ref.gen\ (A\ kontrola-A\ uzorak)}} [5]$$

### 3.2.15. Mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata S-proteina i egzopolisaharida, u alginatu

Prekonoćne kulture sojeva BMK uzgojene su propagacijom do 300 mL MRS bujona pri 37 °C u anaerobnim uvjetima. Stanice su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min, a zatim isprane dva puta s 15 mL fiziološke otopine. Talog stanica je, nakon određivanja početnog broja indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.18., resuspendiran u istom volumenu 2 %-tne (w/v) otopine natrijeva alginata. Smjesa bakterijskih stanica i alginata je, pomoću šprice i igle (23 G), postepeno ispuštena u 1 %-tnu otopinu kalcijeva klorida uz miješanje na magnetnoj mješalici, prilikom čega dolazi do formiranja mikro kapsula (slika 9). Kuglice su ostavljene 1 sat na magnetskoj mješalici da očvrstu (slika 10), nakon čega je uslijedilo ispiranje dva puta s fiziološkom otopinom i određivanje broja mikroinkapsuliranih stanica nakon oslobađanja iz mikro kapsula pomoću 2 %-tnog (w/v) Na-citrata. Broj stanica je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.18.



**Slika 9.** Shematski prikaz mikroinkapsulacije metodom ekstruzije (slika napravljena pomoću BioRender.com)



**Slika 10.** Soj *L. brevis* MB1 mikroinkapsuliran u alginatu nakon ispuštanja u 1 %-tnu otopinu  $\text{CaCl}_2$  (vlastita fotografija)

Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (*engl.* Encapsulation Yield, EY), odnosno broj živih stanica prije i poslije mikroinkapsulacije izračunat je prema dolje navedenoj formuli, gdje je  $N$  broj živih mikroinkapsuliranih stanica, a  $N_0$  broj slobodnih stanica dodanih u polimerni matriks (alginat):

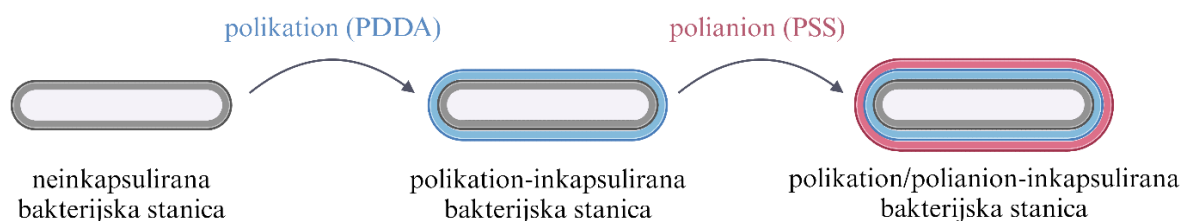
$$EY = \frac{N}{N_0} \cdot 100 [6]$$

#### **3.2.15.1. Mikroinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata S-proteina i egzopolisaharida, u alginatu uz dodatak prebiotika**

U svrhu što duljeg preživljavanja mikroinkapsuliranih sojeva BMK, mikroinkapsulacija stanica u 2 %-tnom alginatu provedena je na način kako je opisano u poglavlju 3.2.15., ali uz dodatak prebiotičkih supstrata fruktooligosaharida (FOS) i galaktooligosaharida (GOS) u konačnoj koncentraciji od 5 % (w/v). Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (EY) uz dodatak prebiotika izračunat je prema formuli navedenoj u poglavlju 3.2.15.

#### **3.2.16. Nanoinkapsulacija odabranih probiotičkih sojeva, producenata S-proteina i egzopolisaharida, „layer by layer“ metodom**

Nanoinkapsulacija metodom „sloj po sloj“ (*engl.* layer by layer, Lbl) provedena je prema Franz i sur. (2010). Princip metode temelji se na stvaranju slojeva različitih naboja na površini stanične stijenke bakterije. Kao kationski polielektrolit korištena je otopina poli (dialil-dimetil-amonij klorid) (PDDA), dok je kao anionski polielektrolit korištena otopina natrijev polistiren sulfonat (PSS) (slika 11).



**Slika 11.** Shematski prikaz metode nanoinkapsulacije „sloj po sloj“ (*engl.* Layer-by-Layer, LbL) (slika napravljena pomoću BioRender.com)

Prekonoćno uzgojene kulture odabranih sojeva BMK uzgojene su propagacijom u MRS bujonu do volumena od 300 mL pri 37 °C u anaerobnim uvjetima. Stanice su centrifugirane 10 minuta pri 4200 o/min, a zatim isprane dva puta s 25 mL sterilne deionizirane vode. Nakon ispiranja stanica, suspenzija pojedinih sojeva se raspodijelila u dva dijela – kontrola (stanice sojeva BMK koje neće biti podvrgnute procesu nanoinkapsulacije, tzv. slobodne stanice) i stanice sojeva BMK koje će se nanoinkapsulirati Lbl metodom. Dio suspenzija koji se inkapsulira se centrifugira 5 min na 4200 o/min, talog stanica se resuspendira u 15 mL otopine polimera pozitivnog naboja (PDDA; 2 mg/mL), budući da je površina stanica negativno nabijena, te inkubira 10 min. Nakon inkubacije, suspenzije se centrifugiraju 5 min na 4200 o/min, a talozi stanica se isperu dva puta sa sterilnom destiliranom vodom. Nakon ispiranja, talozi stanica se resuspendiraju u 15 mL otopine polimera negativnog naboja (PSS; 2 mg/mL) te inkubiraju 10 min. Nakon inkubacije, suspenzija se centrifugira 5 min na 4200 o/min i talog bakterijskih stanica ispere dva puta s deioniziranom vodom, čime se dobiju stanice sojeva BMK s jednim slojem polielektrolita. Kako bi se dobile nanokapsule s tri sloja, ovaj postupak je ponovljen još dva puta.

### 3.2.16.1. Mjerenje zeta potencijala

Kako bi se potvrdilo formiranje nanokapsula tzv. „layer by layer“ metodom provedeno je mjerenje zeta potencijala na uređaju Zetasizer Ultra. Uzorci za mjerenje zeta potencijala uzeti su prije prvog koraka nanoinkapsulacije i nakon svakog od sljedećih koraka (po soju 7 uzoraka). U tu svrhu, 20 µL uzorka je pomiješano s 2 mL destilirane vode te prebačeno u kivetu.

### 3.2.17. Preživljavanje mikro- i nanokapsula sojeva BMK, producenata S-proteina i EPS-a, u nepovoljnim uvjetima te tijekom dugotrajnog skladištenja

Mikroinkapsulirani probiotički sojevi u alginatu te alginatu uz dodatak prebiotika, prema postupcima opisanima u poglavljima 3.2.15. i 3.2.15.1., te nanoinkapsulirani probiotički sojevi, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.16., liofilizirani su tako da je po 1 gram mikroinkapsuliranih stanica sojeva BMK, odnosno 1 mL nanoinkapsuliranih stanica sojeva



BMK, prebačeno u penicilinke te je dodano obrano mlijeko koje služi kao lioprotektor. Uzorci su zatim zamrznuti na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i liofilizirani u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus. Kako bi se ispitalo preživljenje nakon liofilizacije, liofilizirane mikrokapsule su tretirane s 2 %-tnim (w/v) natrijevim citratom kako bi se oslobodile stanice, dok su nanoinkapsulirane stanice resuspendirane u 1 mL sterilne vode, a broj živih stanica nakon liofilizacije je određen indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.18.

Ispitano je preživljavanje liofiliziranih mikroinkapsuliranih i nanoinkapsuliranih stanica sojeva BMK u simuliranim uvjetima GIT-a prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.10. Broj živih stanica, prije i nakon izlaganja simuliranom želučanom soku te nakon izlaganja simuliranim uvjetima GIT-a (želučani sok i sok tankog crijeva), određen je indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.18., prije i nakon izlaganja simuliranom želučanom soku te nakon izlaganja simuliranim uvjetima GIT-a (želučani sok i sok tankog crijeva), s prethodnim tretmanom mikrokapsula s 2 %-tnim (w/v) natrijevim citratom.

Kako bi se ispitaio utjecaj inkapsulacije na dugotrajno skladištenje, pratilo se preživljavanje liofiliziranih mikroinkapsuliranih i nanoinkapsuliranih stanica tijekom mjesec dana skladištenja na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Broj živih stanica određen je indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.18., s prethodnim tretmanom mikrokapsula s 2 %-tnim (w/v) natrijevim citratom.

### **3.2.18. 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 ( $10\text{ }\mu\text{L}$ ) u dvije paralele. Nakon 48 h inkubacije pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica (*engl.* colony-forming units, CFU) po mililitru uzorka.

Za određivanje broja poraslih bakterijskih stanica *E. coli* 3014 prije i nakon adhezije na Caco-2 stanice korištena je selektivna podloga Rapid agar, a za određivanje broja poraslih bakterijskih stanica *S. enterica* serotip Typhimurium FP1 prije i nakon adhezije na Caco-2 stanice korištena je selektivna podloga XLD agar.

### **3.2.19. Statistička analiza i prikaz rezultata**

Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri nezavisna uzorka  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistička značajnost je procijenjena jednosmjernom analizom varijance (*engl.* One-way analysis of variance, One-way ANOVA), a

statističke razlike između skupina će se smatrati značajnim ako je  $p < 0,05$ . Analiza  $\alpha$ -raznolikosti mikrobiote provedena je pomoću softvera PAleontological STatistics (PAST) v. 4.13 (Hammer i sur., 2001). Svi grafički prikazi rezultata pripremljeni su korištenjem GraphPad Prism v.9.4.1 softvera (GraphPad Software, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Karakterizacija potencijalnih terapijskih biomolekula

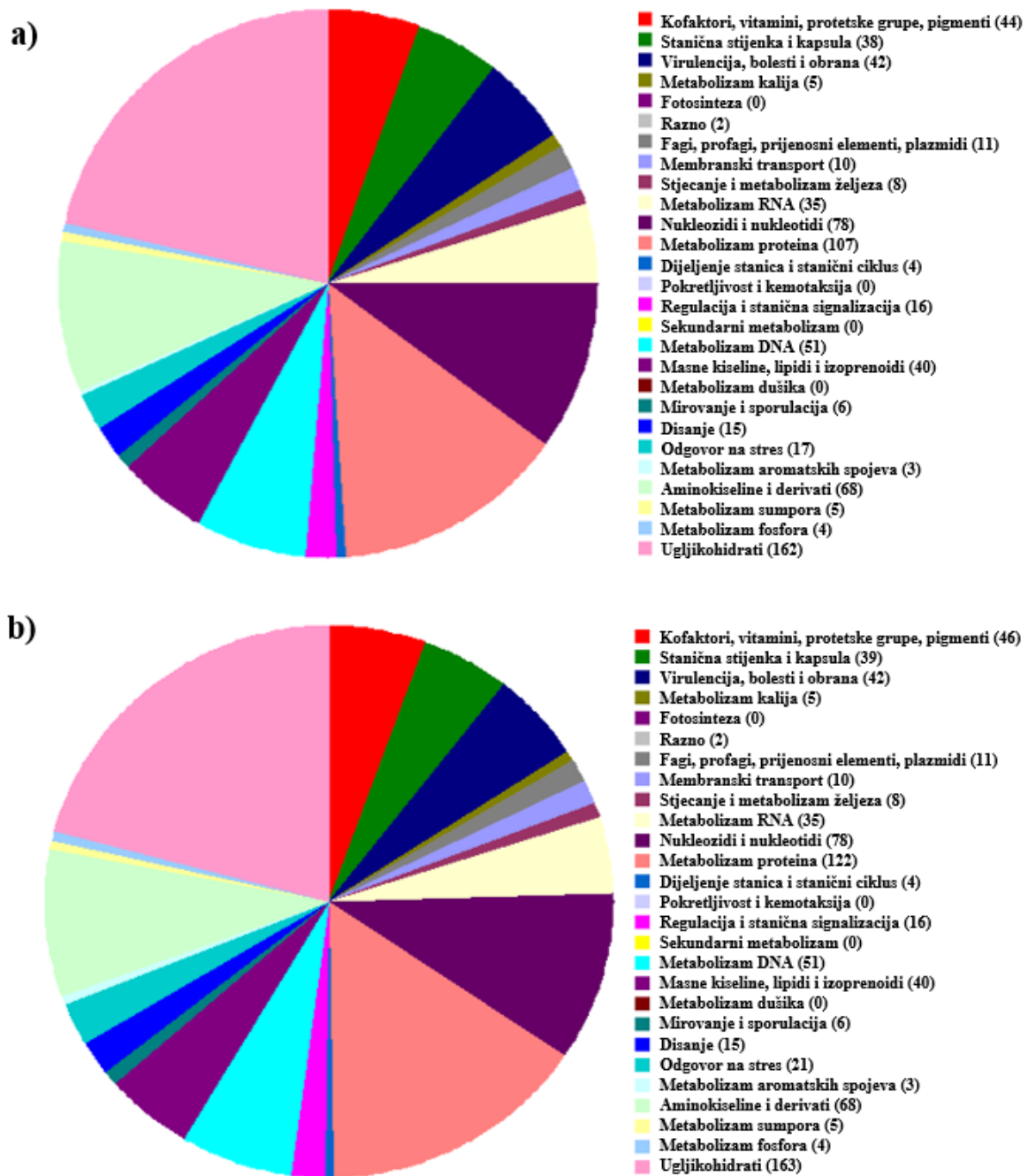
U sklopu projekta “Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika” su iz uzoraka majčinog mlijeka izolirani sojevi BMK koje imaju potencijalnu sposobnost proizvodnje terapijskih biomolekula kao što su S-proteini i egzopolisaharidi (Banić i sur., 2022). Naime, na temelju ispitivanja proteinskog profila sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka, detektirana su 4 soja s karakterističnom proteinskom vrpcom veličine oko 50 kDa na gelu nakon SDS-PAGE analize, dok je soj producent egzopolisaharida detektiran ispitivanjem “ropy” fenotipa kojeg karakterizira pojava dugih filamentoznih niti nakon doticanja kolonije s mikrobiološkom ušicom. Navedene biomolekule imaju brojne pozitivne uloge za soj producent, međutim njihova proizvodnja rijetka je kod BMK. Stoga je cilj ove doktorske dizertacije bio dokazati prisutnost S-proteina i proizvodnju egzopolisaharida, okarakterizirati ih te ispitati njihovu ulogu kao potencijalnih terapijskih biomolekula sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka u okviru probiotičkog koncepta.

### 4.1.1. Karakterizacija S-proteina izoliranih iz *L. brevis* i njihova funkcionalna uloga

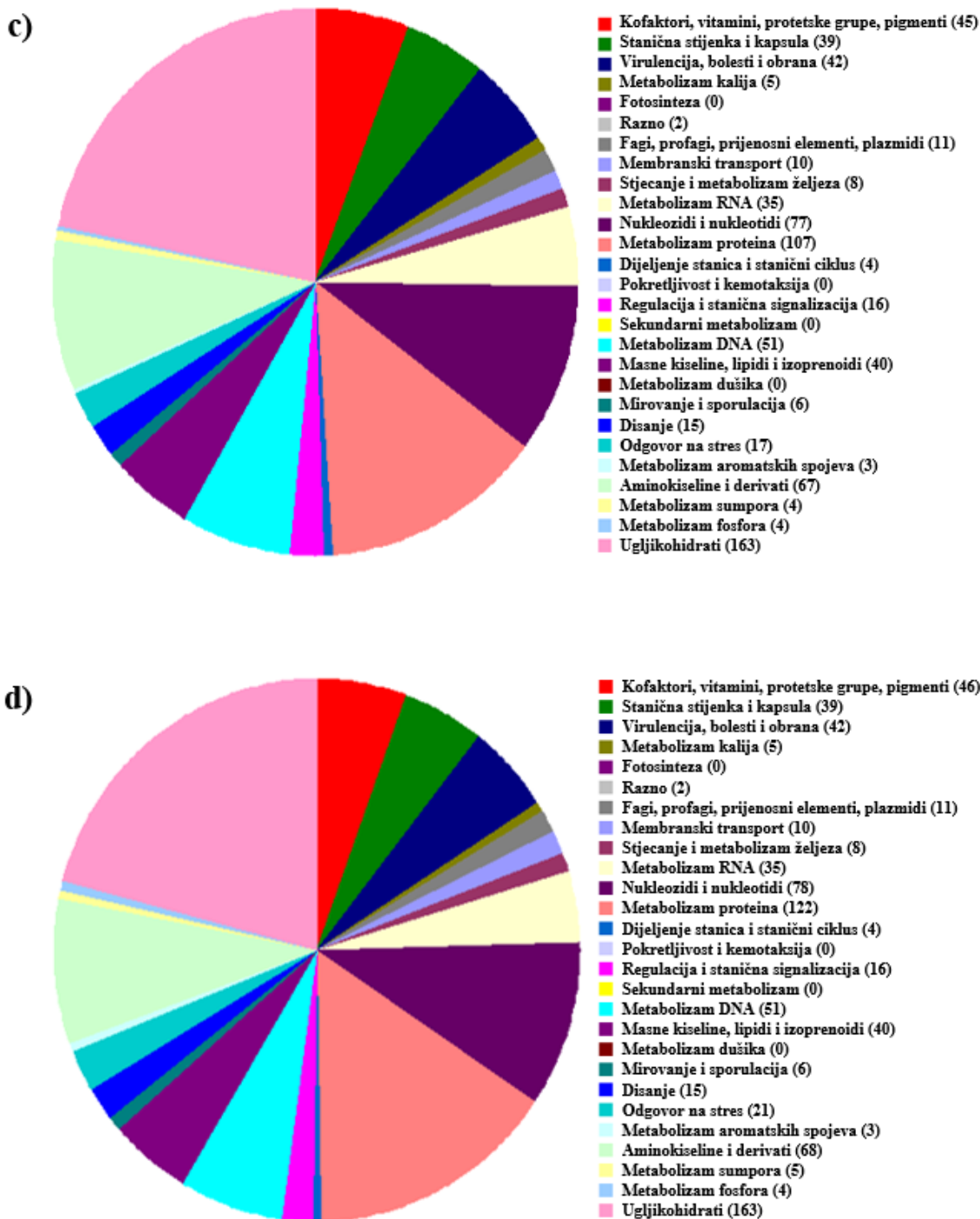
#### 4.1.1.1. 16S rRNA i sekvencioniranje čitavog genoma sojeva producenata S-proteina

Za identifikaciju bakterija na razini vrste se koriste molekularne metode poput sekvenciranja 16S rRNA gena korištenjem PCR reakcija (Johnson i sur., 2019). Stoga je provedena amplifikacija 16S rRNA sojeva BMK, izoliranih iz majčinog mlijeka, sa specifičnim svojstvom proizvodnje S-proteina pomoću univerzalnih UNI16SF i UNI16SR početnica te su dobiveni PCR produkti pročišćeni i sekvencirani Sangerovom metodom. Sva 4 soja producenta S-proteina su 16S rRNA sekvencioniranjem identificirana kao pripadnici vrste *Levilactobacillus brevis* (Banić i sur., 2022). Budući da je postotak sličnosti bio niži od 98,7 % (Stackebrandt i Ebers, 2006), provedena je identifikacija odabranih sojeva producenata S-proteina sekvenciranjem čitavih genoma (*engl.* Whole Genome Sequencing, WGS) u IGA Technology servisu te su dobivene sekvence pohranjene u NCBI bazi podataka (BioProject PRJNA388578) pod pristupnim brojevima SAMN22155538, SAMN22155539, SAMN22155540 i SAMN221555341 (Banić i sur., 2022). Anotacija, distribucija i kategorizacija gena svih analiziranih sojeva provedena je primjenom RAST (*engl.* Rapid Annotations using Subsystems Technology) servera, na kojem su pohranjeni i dostupni svi podaci o sekvenciranim genomima sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 koji eksprimiraju površinske S-proteine (slika 12). Anotacija genoma RAST serverom otkrila je da geni povezani sa staničnom stijenkom i kapsulom čine jednu od najzastupljenijih skupina

gena sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20, što je u skladu s očekivanjem budući da S-proteini čine otprilike 10 – 20 % ukupnih staničnih proteina bakterije producenta (Li i sur., 2020).



**Slika 12.** Funkcionalna anotacija gena sojeva *L. brevis* MB1 (a), MB2 (b), MB13 (c) i MB20 (d) provedena pomoću RAST servera



**Slika 12.** Funkcionalna anotacija gena sojeva *L. brevis* MB1 (a), MB2 (b), MB13 (c) i MB20 (d) provedena pomoću RAST servera – nastavak

Usporedba genomskih podataka nakon WGS-a sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20, dobivenih pomoću RAST servera, prikazana je u tablici 5. Može se vidjeti da nema velikih odskakanja u istaknutim vrijednostima između pojedinih sojeva *L. brevis*, a dobivene genomske karakteristike su u skladu s do sada objavljenim genomskim sekvencama *L. brevis* sojeva izoliranih iz različitih mikrostaništa (Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018; Kant i sur., 2016; Sun i sur., 2015).

**Tablica 5.** Komparativna genomska analiza sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20, sojeva producenata S-proteina, pomoću RAST servera

Podaci o genomu	SOJ			
	MB1	MB2	MB13	MB20
<b>Duljina genoma (pb)</b>	2,452,512	2,462,442	2,443,961	2,462,783
<b>% GC</b>	45,9	45,9	46,0	45,9
<b>N50</b>	67352	67325	67352	67352
<b>L50</b>	12	12	12	12
<b>Broj kontiga</b>	67	68	66	69
<b>Broj genskih podsustava</b>	214	216	214	216
<b>Broj kodirajućih sekvenci</b>	2490	2500	2476	2507
<b>Broj RNA molekula</b>	45	62	45	52

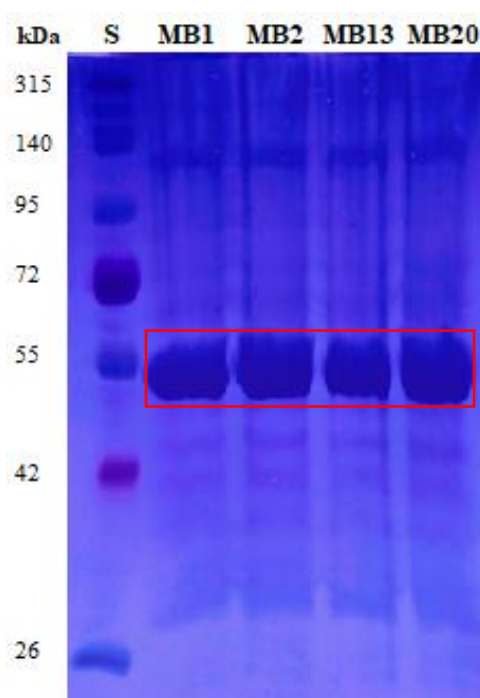
Iz dobivenih rezultata (slika 12, tablica 5) može se uočiti visok stupanj preklapanja između ispitivanih genoma, što je bilo i očekivano budući da pripadaju istoj vrsti te proizvode S-proteine. Nadalje, pretraživanjem PATRIC baze podataka detektirani su površinski proteini i njihovi prekursori kod sva 4 *L. brevis* soja (tablica 6).

**Tablica 6.** Geni sekvenciranih *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 sojeva vezani uz biosintezu površinskih proteina, otkriveni pretraživanjem PATRIC baze podataka

Bakterijski soj	Pristupni broj	Lokus (pb)	Duljina (aa)	Identifikacija
<i>L. brevis</i> MB1	1580.502.con.0006	27465-29612	715	Površinski protein
	1580.502.con.0010	5406-9965	1519	Prekursor površinskog proteina
	1580.502.con.0037	18318-19088	256	Površinski protein
<i>L. brevis</i> MB2	1580.503.con.0006	57758-59905	715	Površinski protein
	1580.503.con.0010	5406-9965	1519	Prekursor površinskog proteina
	1580.503.con.0037	2094-2864	256	Površinski protein
<i>L. brevis</i> MB13	1580.505.con.0006	27465-29612	715	Površinski protein
	1580.505.con.0010	60577-65136	1519	Prekursor površinskog proteina
	1580.505.con.0037	2096-2866	256	Površinski protein
<i>L. brevis</i> MB20	1580.506.con.0006	57758-59905	715	Površinski protein
	1580.506.con.0010	60578-65137	1519	Prekursor površinskog proteina
	1580.506.con.0037	2096-2866	256	Površinski protein

#### 4.1.1.2. Proteomička karakterizacija S-proteina sojeva *L. brevis* LC-MS analizom i predikcija tercijarne strukture

Vrpce veličine oko 50 kDa koje odgovaraju S-proteinima (Hynönen i Palva, 2013), dobivene nakon elektroforetskog razdvajanja površinskih proteina ispitivanih sojeva (slika 13), su izrezane i tripsinizirane, a dobiveni triptički peptidi su podvrgnuti LC-MS analizi. Rezultati LC-MS analize uspoređeni su s proteinima pohranjenim u Mascot bazi podataka te je otkrivena homologija izoliranih proteina sa S-proteinom soja *Levilacobacillus brevis* (pristupni broj WP\_097547033.1), čime su S-proteini detektirani i identificirani kod ispitivanih sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka (Banić i sur., 2022).

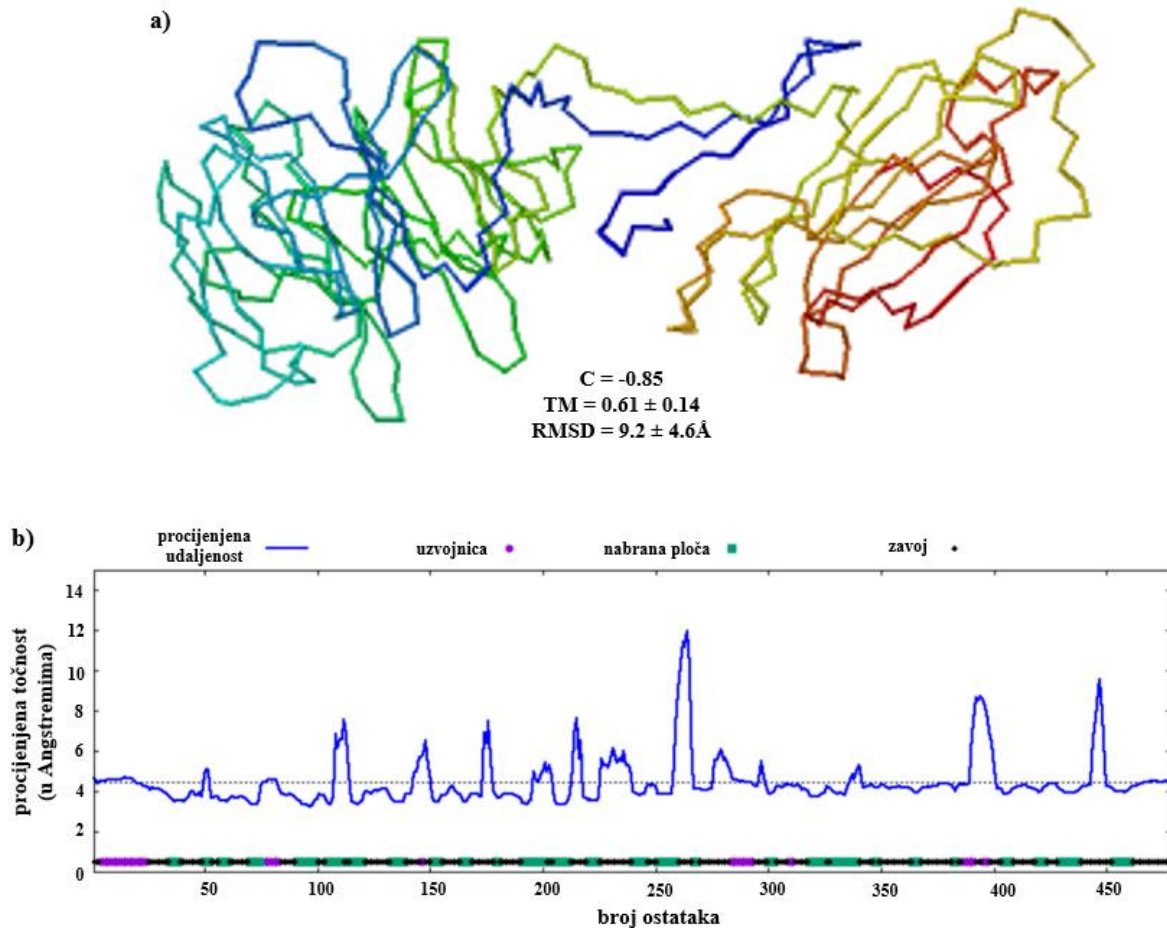


**Slika 13.** SDS-PAGE površinskih proteina sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka. Proteinske vrpce karakteristične za S-proteine označene su crvenim pravokutnikom

Tercijarna struktura S-proteina *L. brevis* sojeva izoliranih iz mjačinog mlijeka pretpostavljena je homolognim modeliranjem pomoću I-TASSER servera (slika 14a). Pretpostavljena ukupna točnost strukture izražena je kao C vrijednost koje se kreće u rasponu od -5 do 2, a veća vrijednost označava model s visokom poudzanosti. TM vrijednost je skala za mjerenje strukturne sličnosti između dviju struktura, dok RMSC predstavlja prosječnu udaljenost svih parova ostataka u dvije strukture. TM vrijednost veća od 0,5 ukazuje na model ispravne topologije, a visoka RMSD vrijednost ukazuje na lokalnu pogrešku (Yang i sur., 2015). Stoga, C = -0,85, TM =  $0.61 \pm 0.14$  i RMSD =  $9.2 \pm 4.6$  Å vrijednosti ukazuju na visoku pouzdanost modela. Lokalna točnost, definirana kao odstupanje udaljenosti (izražena u



Angstromima) između položaja ostataka u modelu i izvornoj strukturi određena ResQ algoritmom (Yang i sur., 2016) prikazana je na slici 14b. Banić i sur. (2018) su istom metodom ustanovili da soj *L. brevis* SF9B, izoliran iz kiselog kupusa, proizvodi S-proteine slične onima pronađenima kod soja *L. brevis* ATCC 14869, molekulske mase 50,9 kDa.

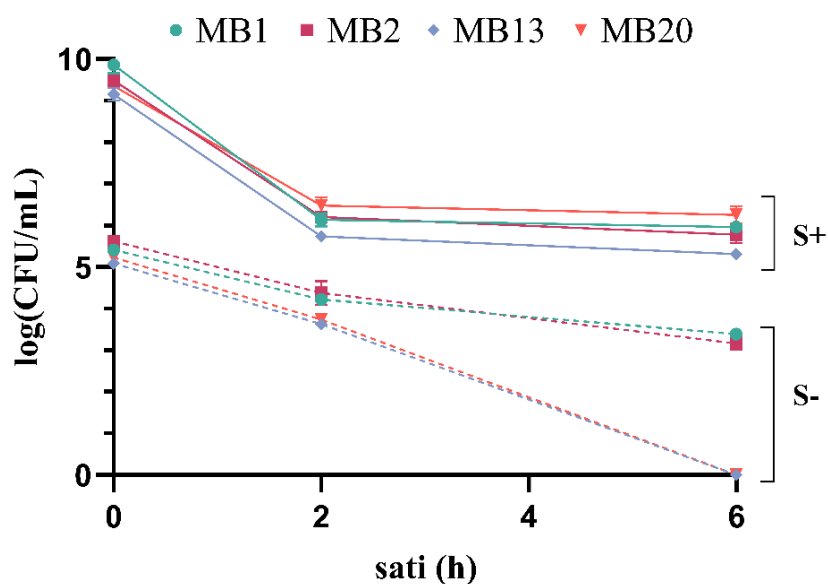


**Slika 14.** Tercijarna struktura S-proteina *L. brevis* sojeva a) pretpostavljena homolognim modeliranjem pomoću I-TASSER servera te b) procijenjena točnost tercijarne strukture određena ResQ algoritmom

#### 4.1.1.3. Uloga S-proteina ispitivanih *L. brevis* sojeva u preživljavanju simuliranih uvjeta GIT-a

Adhezija bakterijskih stanica na mukus i epitelnu inestinalnu površinu nužan je preduvjet kolonizaciji GIT-a domaćina, što stanici osigurava kompetitivnu prednost i stupanje u čvrste interakcije, a posljedično rezultira stimulacijom imunološkog sustava domaćina (Monteagudo-Mera i sur., 2019; Bermudez-Brito i sur., 2012). Poželjna karakteristika probiotičkih bakterija je ekspresija S-proteina na površini stanica koji štite stanicu od stresnih uvjeta mikrookoliša, poput onih u GIT-u domaćina, što predstavlja dodatnu kompetitivnu prednost u odnosu na stanice koje ih ne proizvode. Stoga je ispitana zaštitna uloga S-proteina

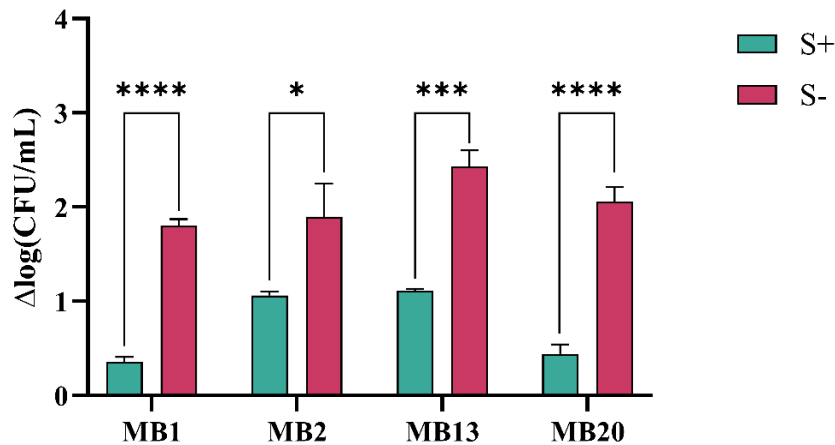
kod sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, s dokazanom ekspresijom površinskih proteina na molekularnoj i genomskoj razini, kao i kod istih sojeva kojima je uklonjen S-sloj, na sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima GIT-a (slika 15). Uočena je pozitivna uloga S-proteina u preživljavanju simuliranih uvjeta GIT-a budući da je broj živih stanica (CFU/mL) bio značajno veći kod sojeva koji na svojoj površini posjeduju S-proteine (S+) nego u istim sojevima tretiranim GHCl-om kako bi se uklonio S-sloj (S-). S-proteini sojeva *L. brevis* MB13 i MB20 imali su najveći utjecaj na preživljavanje u GIT-u, jer sojevi bez S-sloja uopće nisu preživjeli spomenute štetne uvjete (Čuljak i sur., 2024b). Ovi rezultati su u skladu s onima drugih istraživača, poput Angelescu i sur. (2024) koji su pokazali da stanice *L. helveticus* 34.9 tretirane s 5M litijevim kloridom, kako bi se uklonio S-sloj, imaju značajno lošiju sposobnost preživljavanja simuliranih uvjeta GIT-a u odnosu na netretirane stanice, štoviše, vijabilnost nakon uklanjanja S-sloja i tertmana simuliranim uvjetima tankog crijeva je iznosila 0. Slično, soj *L. brevis* D6, proizvođač S-proteina, pokazao je bolju sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima GIT-a nego *L. plantarum* D13 koji ne posjeduje S-sloj (Uroić i sur., 2016), te je  $\Delta\log(\text{CFU/mL})$  soja *L. brevis* SF9B sa S-slojem bio značajno niži nego kod istog soja, ali kojemu je uklonjen S-sloj (Banić i sur., 2018).



**Slika 15.** Preživljavanje stanica sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20, sa (S+) ili bez (S-) proteina S-sloja, u simuliranim uvjetima GIT-a nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku (t = 2 h) i nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva (t = 4 h)

#### **4.1.1.4. Uloga S-proteina ispitivanih *L. brevis* sojeva u adheziji na Caco-2 staničnu liniju**

Sposobnost adhezije na intestinalnu površinu domaćina jedan je od glavnih kriterija prilikom odabira potencijalnih probiotičkih bakterija, a rezultira kolonizacijom i posljedičnom stimulacijom imunološkog sustava, kao i stimulacijom crijevne barijere i metaboličkih funkcija. Dodatno, probiotičke bakterije imaju potencijalnu zaštitnu ulogu protiv enteropatogena kroz različite mehanizme koji uključuju proizvodnju antimikrobnih spojeva, natjecanje za mjesta vezanja te posljedično smanjenje adhezije patogenih sojeva (Monteagudo-Mera i sur., 2019). Važnu ulogu u adheziji bakterijskih stanica na različite površine ima stanična stijenka, a poznato je da se stanična stijenka BMK, koje su Gram-pozitivne bakterije, sastoji od debelog sloja peptidoglikana na kojem mogu biti vezane teihonske kiseline i proteini. Jedni od tih proteina su S-proteini koji oblažu stanicu bakterije producenta, za koje se smatra da imaju esencijalnu ulogu u adheziji probiotičkih bakterija na crijevni epitel budući da dolazi do smanjenja adhezije nakon uklanjanja S-proteina. Stoga, ispitana je sposobnost adhezije sojeva BMK koji posjeduju S-sloj, kao i sojeva kod kojih je S-sloj uklonjen kemijskim tretmanom, na Caco-2 staničnu liniju koja je korištena kao *in vitro* model predviđanja sposobnosti adhezije sojeva BMK na crijevne epitelne stanice (slika 16). Rezultati su pokazali pozitivnu ulogu proteina S-sloja u sposobnosti prianjanja sojeva na Caco-2 staničnu liniju budući da su vrijednosti  $\Delta\log(\text{CFU}/\text{mL})$  svih testiranih sojeva *L. brevis* bile značajno više kada su stanice tretirane s  $\text{GHCl}$ -om, što znači da se manje stanica sojeva *L. brevis* bez S-sloja moglo vezati za staničnu liniju Caco-2 u usporedbi s istim sojevima koji ekspimiraju S-proteine na svojoj površini (Čuljak i sur., 2024b). Taj je učinak posebno izražen kod sojeva *L. brevis* MB1 i MB20, jer je razlika između S+ i S- sojeva bila najveća ( $p < 0,0001$ ). Slične rezultate su dobili Klotz i sur. (2020) koji su pokazali da su delecijски mutanti S-sloja *Lactobacillus acidophilus* NCFM pokazali smanjenu sposobnost vezanja na Caco-2 staničnu liniju, kao i adhezije na proteine ECM-a i mucin *in vitro*. Već spomenuti *L. helveticus* 34.9 je također pokazao smanjenu sposobnost adhezije na HT-29 stanice (Angelescu i sur., 2024). Dobiveni rezultati prema kojima S-proteini doprinose kompetitivnoj ekskluziji patogena u skladu su s rezultatima koje su dobili Banić i sur. (2018), gdje je uklanjanje S-sloja soja *L. brevis* SF9B, izoliranog iz kiselog kupusa, negativno utjecalo na adheziju soja producenta na Caco-2 staničnu liniju.



**Slika 16.** Adhezija sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB2, sa (S+) ili bez (S-) proteina S-sloja, na Caco-2 staničnu liniju

\*Statistički značajno različito (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

#### 4.1.1.5. Uloga S-proteina ispitivanih *L. brevis* sojeva u kompetitivnoj ekskluziji potencijalno patogenih bakterija

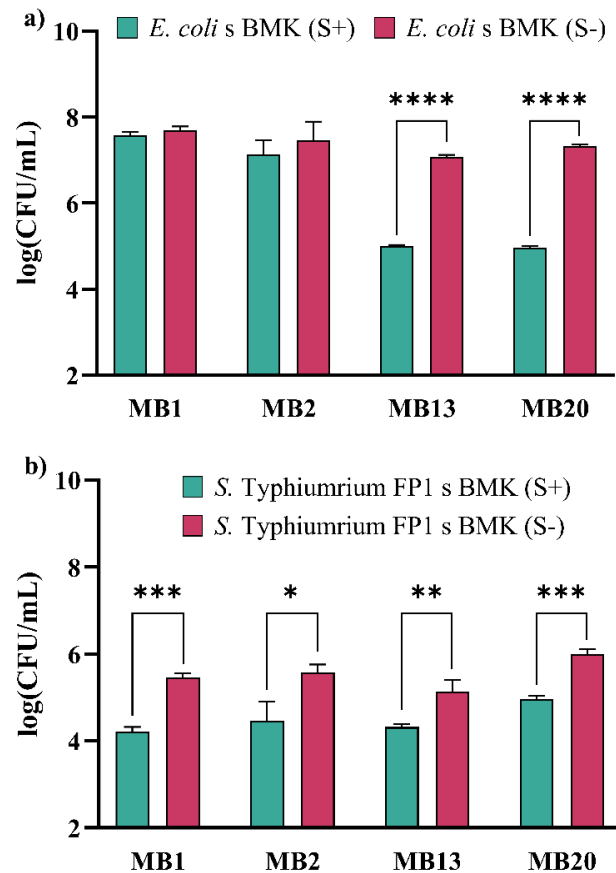
BMK su autohtone u tankom i debelom crijevu ljudi i životinja, a imaju niz probiotičkih svojstava, kao što su vezanje na receptore i fizičko isključivanje patogena, proizvodnja antimikrobnih tvari, jačanje barijere crijevne sluznice i modulacija imunološkog sustava (Mathipa i Thantsha, 2017). Osim sprječavanja vezanja patogena na crijevni epitel, kako bi stekli konkurentsku prednost, probiotici mogu modificirati crijevni okoliš tako što proizvode inhibitorne spojeve, snižavaju razinu pH i natječu se za hranjive tvari. Poznato je da se bakterije iz roda *Lactobacillus* često koriste kao probiotici, a pogotovo su od interesa one vrste koje na površini stanica imaju eksprimirane S-proteine. Brojna istraživanja su pokazala da S-proteini povećavaju sposobnost bakterije producenta da se veže na crijevni epitel i time sprječava vezanje drugih bakterija, među kojima mogu biti i patogene, budući da imaju slične vrste adhezina na svojim površinama koji stupaju u interakciju sa specifičnim receptorima na staničnoj površini domaćina.

Pojam kompetitivne ekskluzije u upotrebi je još od 1969., a definira se kao postupak kojim se jedna bakterijska vrsta natječe za adheziju na receptore u GIT-u s drugom bakterijskom vrstom, što se očituje kroz sposobnost vezanja na površinu sluznice domaćina, sekreciju različitih metabolita te kompeticiju za raspoložive hranjive tvari (van Zyl i sur., 2020). Probiotici koji imaju sposobnost adhezije štite crijeva od crijevnih infekcija sprječavajući vezanje patogena te su rezultati *in vitro* istraživanja pokazali učinak probiotičkih BMK u kompetitivnoj ekskluziji patogena. Dokazano je da *Lactobacillus rhamnosus* GG može predstavljati uspješno rješenje problemu infekcije vankomicin-rezistentnim enterokokima

(engl. vancomycin-resistant enterococci, VRE) budući da ima sposobnost ekskluzije *Enterococcus faecium* koji lako može steći novu otpornost na antibiotike, uspješan je kolonizator ljudskog crijevnog trakta (Tytgat i sur., 2016). Također, Ayala i sur. (2019) su dokazali da BMK izolirane iz fecesa goveda imaju sposobnost kompetitivne ekskluzije patogena prisutnih u hrani poput *Salmonella* Montevideo, *Escherichia coli* O157:H7 i *Listeria monocytogenes* N1-002. Postoje čak i istraživanja koja su pokazala pozitivnu ulogu ekstrakata proteina S-sloja u prevenciji vezanja patogena, a time i kolonizacije GIT-a (Zhang i sur., 2017).

Stoga, provedeno je *in vitro* ispitivanje utjecaja S-proteina na kompetitivnu ekskluziju potencijalno patogenih bakterija *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1 s odabranim sojevima BMK, producentima S-proteina. Kao model crijevne epitelne barijere korištene su Caco-2 stanice humanog crijevnog epitela, izolirane iz humanog kolorektalnog adenokarcinoma, koje imaju sposobnost spontano diferencirati u monosloj stanica koje imaju slična svojstva kao i enterociti prisutni u tankom crijevu (Lea, 2015). Usporedbom sposobnosti adhezija potencijalno patogenih bakterija na Caco-2 epitelne stanice s predinkubiranim BMK koje na svojoj površini imaju S-proteine i nakon tretmana GHCl-om, kojim se uklonio sloj S-proteina, ispitano je imaju li S-proteini, prisutni na površini bakterijske stanice producenta, ulogu u kompetitivnoj ekskluziji ispitivanih potencijalno patogenih bakterija (slika 17). Iz rezultata se vidi kako su samo S-proteini sojeva MB13 i MB20 imali ulogu u kompetitivnoj ekskluziji *E. coli* 3014 (slika 17a) budući da je uočeno statistički značajno smanjenje log(CFU/mL) vrijednosti kada su S-proteini prisutni na površini stanice producenta ( $p < 0,0001$ ). To znači da se više *E. coli* vezalo na Caco-2 stanice kada je BMK uklonjen S-sloj. Na slici 17b je prikazana kompetitivna ekskluzija potencijalno patogene bakterije *S. enterica* FP1 sojevima *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i M20 sa S-proteinima (S+) i nakon što su S-proteini uklonjeni (S-) te se iz rezultata može vidjeti kako S-proteini sva 4 ispitana soja imaju ulogu u kompetitivnoj ekskluziji *S. enterica* FP1 budući da je nakon uklanjanja S-sloja uočeno značajno povećanje log(CFU/mL) vrijednosti u odnosu na sojeve kojima S-proteini nisu uklonjeni. Utjecaj S-proteina je posebno izražen kod sojeva MB1 i MB20 budući da je najveća statistička razlika bila zabilježena između divljeg tipa i soja s uklonjenim S-slojem ( $p < 0,001$ ). Ovime je dokazana pozitivna uloga S-proteina u kompetitivnoj ekskluziji potencijalno patogenih bakterija sa sojevima BMK izoliranih iz majčinog mlijeka, koji na svojoj površini posjeduju S-proteine, budući da je uspješnost adhezije patogenih bakterija na Caco-2 staničnu liniju smanjena nakon uklanjanja S-proteina. Dobiveni

rezultati podupiru činjenicu da S-proteini doprinose uspješnijoj adheziji stanica producenata na Caco-2 stanice, a time i kompetitivnoj ekskluziji potencijalno patogenih bakterija.



**Slika 17.** Kompetitivna ekskluzija potencijalno patogenih bakterija a) *Escherichia coli* 3014 i b) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 sojevima *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i M20, sa (S+) ili bez (S-) proteina S-sloja

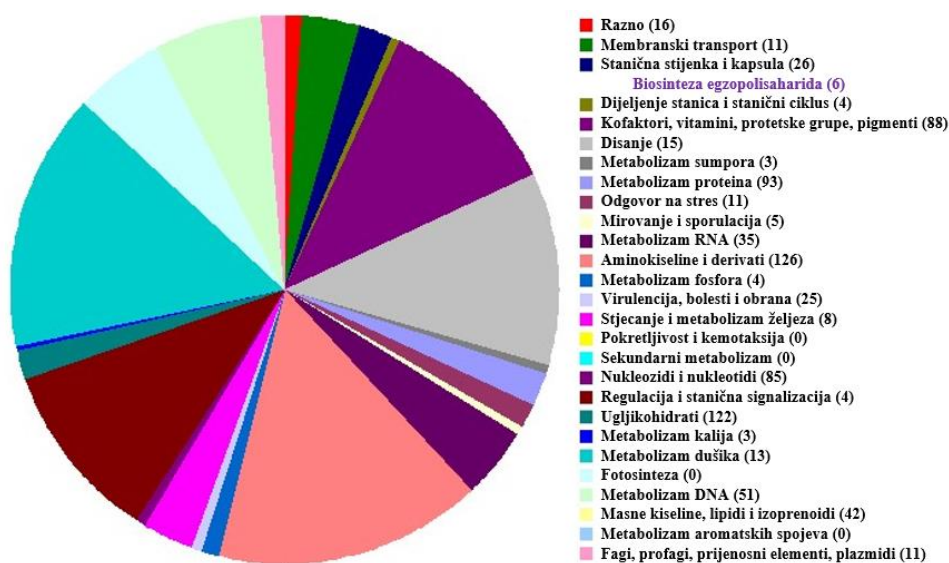
\*Statistički značajno različito (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

#### 4.1.2. Karakterizacija egzopolisaharida iz *L. fermentum* i njihova funkcionalna uloga

##### 4.1.2.1. 16S rRNA i sekvencioniranje čitavog genoma soja producenta egzopolisaharida

Iz uzoraka majčinog mlijeka izoliran je soj *Limosilactobacillus fermentum* MC1, producent EPS-a, kod kojeg je utvrđen karakterističan “ropy” fenotip prilikom uzgoja na krutoj hranjivoj podlozi obogaćenoj izvorom ugljika (Banić i sur., 2022). Kao što je propisano prema Pravilniku o evaluaciji probiotika u hrani (FAO/WHO, 2002), svaki soj koji je potencijalni kandidat za uporabu kao probiotik mora proći postupke identifikacije, nakon čega slijedi i procjena sigurnosti, pri čemu se trebaju primjeniti najnovije metodologije, kombinirajući fenotipske i genetske testove. Sekvencioniranje 16S rRNA gena provedeno je u servisu Macrogen te su rezultati pokazali da soj MC1 pripada vrsti *Limosilactobacillus fermentum* s postotkom sličnosti od 98 % (Banić i sur., 2022). Budući da postotak sličnosti nije bio zadovoljavajuć,

provedena je i identifikacija odabranog soja BMK, producenta egzopolisaharida, sekvenciranjem čitavog genoma u IGA Technology servisu koje je potvrdilo prethodnu identifikaciju. Dobivena sekvenca soja *L. fermentum* MC1 pohranjena je u NCBI bazi podataka (BioProject PRJNA388578) pod pristupnim brojem SAMN22155537 (Banić i sur., 2022). Dobiveni rezultat u skladu je s podacima dostupnima u literaturi prema kojima producenti EPS-a koje proizvode BMK često pripadaju rodu *Lactobacillus* (Nguyen i sur., 2020), među koji se ubraja vrsta *Limosilactobacillus fermentum* (Mishra i sur., 2023; D'ambrosio i sur., 2022; Butorac i sur., 2021). Funkcionalna anotacija DNA sekvenci odabranog soja provedena je primjenom RAST servera, na kojem su pohranjeni i dostupni svi podaci o sekvenciranom genomu soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1, te je na slici 18 istaknut podsustav uključen u biosintezu EPS-a. U tablici 7 su prikazani genomske podaci soja producenta EPS-a *L. fermentum* MC1 iz koje je vidljivo da sadrži 1,991,595 pb raspoređenih u 75 kontiga, a udio G+C parova baza iznosi 52,1 %. Dobiveni rezultati odgovaraju prosječnoj veličini genoma BMK (1,3 – 3,3 Mb) i udjelu G+C parova baza (33 – 51 %) kod *Limosilactobacillus fermentum* vrsta, koji je viši nego kod drugih vrsta BMK (Zhang i Zhang, 2014). Također, broj kodirajućih sekvenci (2049) odgovara prosječnom broju kodirajućih sekvenci (1700 – 3000) kod *Lactobacillus* vrsta (Verce i sur., 2020). Veličina genoma, sadržaj G+C parova baza i broj kodirajućih sekvenci dobiveni za soj MC1 slični su ranije opisanom soju *L. fermentum* D12, a s druge strane, broj kontiga soja kod MC1 je bio veći te broj RNA molekula manji u usporedbi s podacima dobivenim za soj D12 (Čuljak i sur., 2024a).



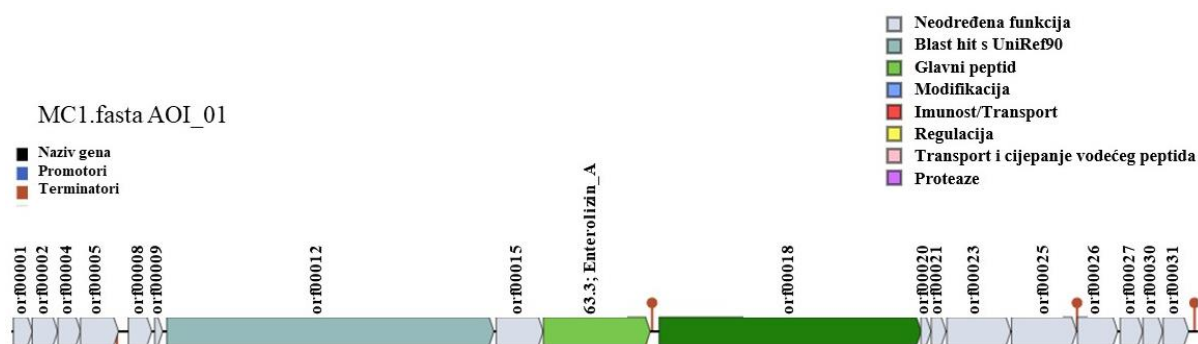
**Slika 18.** Funkcionalna anotacija genoma soja *L. fermentum* MC1 provedena pomoću RAST servera

Ljubičasto je istaknut podsustav genoma koji se odnosi na biosintezu EPS-a

**Tablica 7.** Karakterizacija genoma soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 primjenom RAST servera

PODACI O GENOMU	<i>L. fermentum</i> MC1
Duljina genoma (pb)	1,991,595
% GC	52,1
N50	35468
L50	18
Broj kontiga	75
Broj genskih podsustava	218
Broj kodirajućih sekvenci	2049
Broj RNA molekula	40

Također, pretraga BAGEL 4 baze podataka je u genomu soja MC1 otkrila prisutnost gena za biosintezu enterolizina A (slika 19), bakteriocina klase III koje obično proizvode neki sojevi *Enterococcus faecalis* koji je termolabilni protein sa širokim inhibitornim spektrom zahvaljujući svojoj sposobnosti razgradnje staničnih stijenki osjetljivih bakterija (Almeida-Santos i sur., 2021). Novija literatura podupire naše nalaze, budući da je proizvodnja enterolizina A zabilježena u drugim sojevima BMK, uključujući *L. fermentum* (dos Santos i sur., 2021; Falasconi i sur., 2020).



**Slika 19.** Klaster gena koji sudjeluju u biosintezi enterolizina A soja *L. fermentum* MC1

#### 4.1.2.2. Geni odgovorni za biosintezu egzopolisaharida kod *L. fermentum* MC1

Biosintetski putevi egzopolisaharida vrlo su složeni, a uključuju enzime koji su izravno uključeni u sintezu EPS-a i enzime uključene u biosintezu polisaharida i lipopolisaharida stanične stijenke. Geni uključeni u različite puteve biosinteze kodiraju za različite vrste enzima, a većina tih gena je grupirana na genomu ili velikim plazmidima te njihove funkcije nisu u potpunosti razjašnjene (Sun i Zhang, 2021). Genetski elementi potrebni za proizvodnju EPS-a uključuju gene koji kodiraju regulaciju, određivanje duljine lanca, biosintezu ponavljajućih jedinica te polimerizaciju i eksport (Korczi i Varga, 2021).



Kao što je već rečeno, BMK najčešće sintetiziraju EPS-e Wzx/Wzy-ovisnim putem, pa tako i *L. fermentum* MC1. Naime, nakon sekvencioniranja čitavog genoma i detaljnog pretraživanja gena, detektirani su geni koji su uključeni u biosintezu EPS-a (tablica 8).

**Tablica 8.** Geni *L. fermentum* MC1 uključeni u proizvodnju egzopolisaharida Wzx/Wzy-ovisnim putem

Gen	Funkcija
<b>AKTIVACIJA PREKURSORA</b>	
<i>pgm</i>	fosfoglukomutaza (EC 5.4.2.2)
<i>galT</i>	galaktoza-1-fosfat uridiltransferaza (EC 2.7.7.10)
<i>galE</i>	UDP-glukoza 4-epimeraza (EC 5.1.3.2)
<i>galU</i>	UTP-glukoza-1-fosfat uridiltransferaza (EC 2.7.7.9)
<i>glf</i>	UDP-galaktopiranoza mutaza (EC 5.4.99.9)
<i>rfbB</i>	dTDP-glukoza 4,6-dehidrataza (EC 4.2.1.46)
<b>BIOSINTEZA EGZOPOLISAHARIDA</b>	
<i>epsA</i>	transkripcijski atenuator, protein iz LCP obitelji
<i>epsB</i>	Protein-tirozin fosfataza ovisna o manganu (EC 3.1.3.48)
<i>epsC</i>	Tirozin-protein kinaza transmembranski modulator EpsC
<i>epsD</i>	Tirozin-protein kinaza EpsD (EC 2.7.10.2)
<i>epsE</i>	Undekaprenil-fosfat galaktozafosfotransferaza (EC 2.7.8.6)
<i>epsF</i>	glikoziltransferaza (EC 2.4.1.-)
<i>epsIIG</i>	pretpostavljena glikoziltransferaza
<i>gt</i>	glikoziltransferaza
<i>at</i>	membranski protein, pretpostavljena acetiltransferaza
<b>TRANSPORT I POLIMERIZACIJA</b>	
<i>wzx</i>	membranski protein, flipaza
<i>wzy</i>	Polimeraza

Osam gena uključenih u PTS, koji istovremeno transportira i fosforilira monosaharide ili oligosaharide, pronađeno je u genomu soja MC1 (rezultati nisu prikazani). Detektirani su odgovarajući geni za aktivaciju podjedinica šećera, fosfoglukomutaze (*pgm*) i galaktoza-1-fosfat uridiltransferaze (*galT*), koji posreduju prijelaz glukoza-6-fosfata i galaktoza-1-fosfata u glukoza-1-fosfat. Glukoza-1-fosfat se zatim pretvara u UDP-glukoza i UDP-galaktozu pomoću UDP-glukoza-4-epimeraze (*galE*) i dTDP-glukoza-4,6-dehidrataze (*rfbB*). Potom se pojedinačne ponavljajuće jedinice sastavljaju djelovanjem glikoziltransferaza i translociraju na izvanstaničnu površinu pomoću flipaze (Wzx) i polimeriziraju djelovanjem polimerizacijskog proteina (Wzy) kako bi se formirali EPS-i. Osim gena uključenih u aktivaciju prekursora te transport i polimerizaciju, drugi geni uključeni u biosintezu i regulaciju EPS-a otkriveni su u genomu soja MC1. To uključuje gene koji kodiraju transkripcijski regulator (*EpsA*), protein-

tirozin fosfatazu ovisnu o manganu (EpsB), transmembranski modulator tirozin-protein kinaze (EpsC), tirozin-protein kinazu (EpsD), početnu undekaprenil-fosfat galaktozofosfottransferazu (EpsE), glikoziltransferazu biosinteze egzopolisaharida (EpsF), pretpostavljenu glikoziltransferazu (EpsIIG), glikoziltransferazu (gt) i acetiltransferazu (at).

#### ***4.1.2.3. Izolacija i strukturna karakterizacija egzopolisaharida kojeg proizvodi *L. fermentum* MC1***

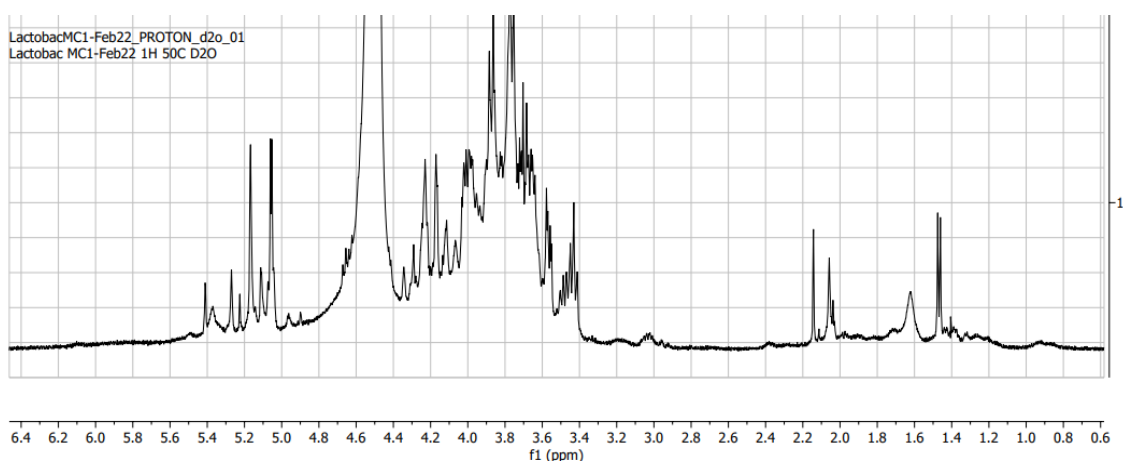
EPS-i *Lactobacillus* sojeva razlikuju se po kemijskom sastavu i strukturi, što izravno utječe na njihovu zaštitnu ulogu stanice producenta u nepovoljnim okolišnim uvjetima, adhezijskim svojstvima i interakcijama sa specifičnim receptorima obrambenog sustava domaćina, što je do sada vrlo malo istraženo kod sojeva BMK koje proizvode EPS-e (Castro-Bravo i sur., 2018). Zbog brojnih pozitivnih zdravstvenih djelovanja EPS-a zabilježenih u literaturi, smatra se da bi se sojevi producenti EPS-a mogli primjeniti kao probiotici, ali je prethodno potrebno provesti njihovu karakterizaciju, što uključuje i određivanje strukture EPS-a koja je vrlo kompleksna. Nuklearna magnetska rezonancija (*engl.* nuclear magnetic resonance, NMR) je važna tehnika u identifikaciji i određivanju struktura različitih molekula (Yao i sur., 2021), a temelji se na magnetskim svojstvima jezgre koja ima neparan broj protona odnosno neutrona ili neparan broj protona i neutrona (maseni broj), koje posjeduju nuklearni spin koji generira slabo magnetsko polje. Ukoliko se jezgre izlože djelovanju jačeg vanjskog magnetskog polja, kojeg stvara NMR uređaj, dolazi do izvrtnja nuklearnog spina pri čemu se emitira elektromagnetski signal kojeg bilježi NMR spektrometar.

Osim određivanja strukture EPS-a, veliki problem predstavljaju i niski prinosi EPS-a. Rast i metabolizam mikroorganizama različit je u različitim izvorima i uvjetima okoliša te je dokazano da prinos EPS-a ovisi o brojnim čimbenicima kao što su soj producent, uvjeti uzgoja soja producenta i okolišni uvjeti (Zhang i sur., 2020). Količina EPS-a koje proizvode BMK razlikuje se od vrste do vrste te su one značajno manje od količine koju proizvode drugi industrijski važni mikroorganizmi (Jurášková i sur., 2022), a optimizacijom uzgoja soja producenta i metoda izolacije se taj prinos može značajno povećati. Tako su Wang i sur. (2017) uspjeli optimirati sintezu EPS-a iz *L. plantarum* KX041 na prinos od 599,52 mg/L, što je približno tri puta više od prinosa prije optimiranja uvjeta uzgoja.

EPS je iz soja MC1 izoliran na različite načine, međutim, u svrhu određivanja strukture, korišteni su EPS-i izolirani s površine stanica soja MC1 uzgojenih na MRS agar pločama koje su tretirane 20 % TCA budući da je dobiveni EPS bio najvećeg stupnja čistoće. Naime, kod

uzgoja soja MC1 u tekućoj hranjivoj podlozi prinos EPS-a je bio veći, ali je NMR pokazao prisutnost kontaminacija koje su prisutne u tekućem hranjivom mediju, što ometa određivanju strukture EPS-a (Wang i sur., 2021). S primarnim ciljem određivanja strukture EPS-a, soj producent MC1 je uzgojen na krutim hranjivim podlogama, čime je dobiven znatno manji prinos, ali je postignut veći stupanj purifikacije jer je izbjegnuta interferencija EPS-a s otopljenim sastojcima hranjive podloge prilikom njihove izolacije i pročišćavanja.

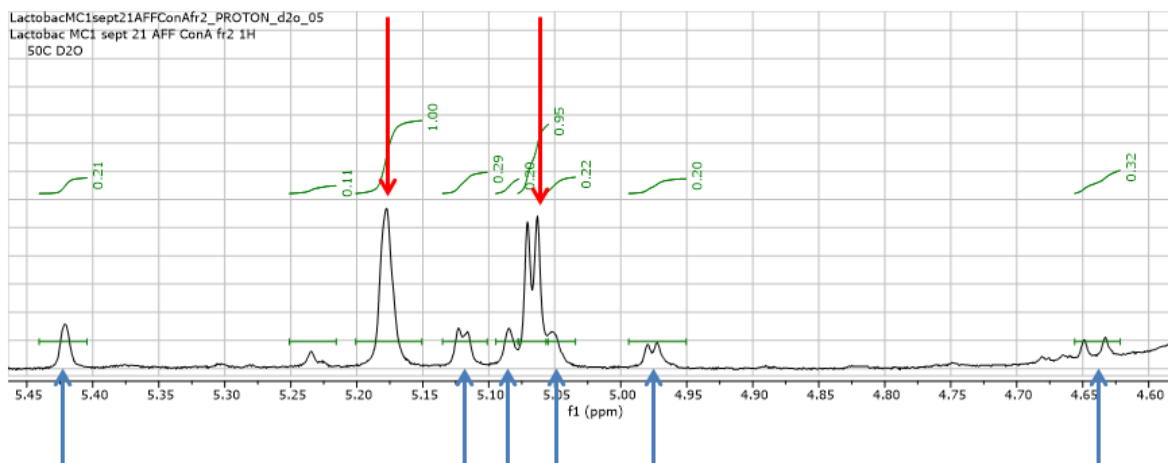
EPS dobiven izolacijom iz soja MC1 uzgojenog na MRS agar pločama i tretmanom stanica s 20 % TCA analiziran je primjenom  $^1\text{H}$  NMR metode te je dobiveni spektar prikazan na slici 20. Iz dobivenog  $^1\text{H}$  NMR spektra može se vidjeti da je uzorak sadržavao kontaminacije koje su prisutne u hranjivoj podlozi na kojoj je soj producent uzgojen.



**Slika 20.**  $^1\text{H}$  NMR spektar egzopolisaharida izoliranih iz soja *L. fermentum* MC1

Stoga je bilo potrebno pročistiti uzorak, a jedna od metoda koja se koristila bila je kromatografija na temelju isključenja veličine čestica (*engl.* Size Exclusion Chromatography, SEC). SEC je metoda koja se koristi za razdvajanje molekula na osnovu njihove veličine te su u tu svrhu korištene dvije kolone; Sephacryl S-300 HR i Sephacryl S-400 HR.  $^1\text{H}$  NMR spektri frakcija prikupljenih nakon SEC-a na kolonama Sephacryl S-300 HR (prilog 3) i Sephacryl S-400 HR (prilog 4) su i dalje sadržavali kontaminacije, zbog čega je provedena purifikacija uzorka afinitetnom kromatografijom ConA Sepharose 4B u svrhu razdvajanja molekula na osnovu njihovog afiniteta prema proteinu konkanavalin A. Konkanavalin A (ConA) pripada skupini lektinskih proteina koji, u prisutnosti  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ , veže molekule koje sadrže  $\alpha$ -D-manopiranozil,  $\alpha$ -D-glukopiranozil i sterički srodne ostatke (Chen i sur., 2009). Imobilizirani Con A se intenzivno koristi za izolaciju te strukturnu karakterizaciju i imobilizaciju glikoproteina i drugih biološki važnih glikokonjugata koji sadrže glukozu i manozu (Franco Fraguas i sur., 2004).  $^1\text{H}$  NMR spektar frakcije prikupljene nakon afinitetne kromatografije

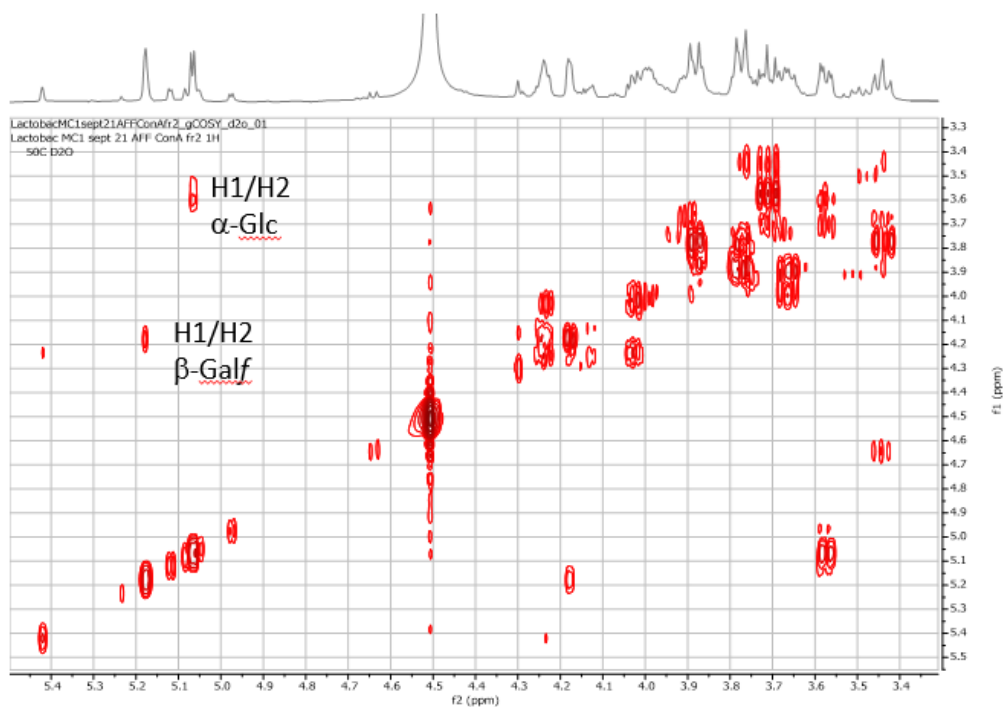
pokazao se najboljim budući da nije sadržavao kontaminacije te su pikovi bili najoštriji (slika 21). Također, iz prikazanog spektra se može zaključiti da se EPS kojeg proizvodi soj *L. fermentum* MC1 sastoji od 2 različita polisaharida (označeni crvenim i plavim strelicama) u omjeru 1:0.2.



**Slika 21.** Anomerička regija  $^1\text{H}$  NMR spektra uzorka EPS-a, izoliranog iz soja *L. fermentum* MC1, pročišćenog afinitetnom kromatografijom na ConA Sepharose 4B koloni

U svrhu određivanja točne strukture dva polisaharida, osim  $^1\text{H}$  NMR spektroskopije, korištene su i tehnike dvodimenzionalne (2D) NMR spektroskopije – HSQC (*engl.* Heteronuclear Single Quantum Coherence), COSY (*engl.* Correlated Spectroscopy), TOCSY (*engl.* Total Correlation Spectroscopy), NOESY (*engl.* Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) i HMBC (*engl.* Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

COSY spektar daje informaciju o povezanosti susjednih protona. Stoga, krenuvši od kemijskog pomaka H1 atoma (proton vezan na C1 atom šećera) moguće je odrediti kemijski pomak H2 atoma (proton vezan na C2 atom šećera) te jednako tako nastaviti za ostale protone u prstenu ugljikohidrata. Na slici 22 prikazan je COSY spektar kojim se mogu sa sigurnošću tvrditi kemijski pomaci (ppm) samo za H1 i H2 protone dva glavna šećera, budući da je kod drugih protona, u regiji prstena, došlo do preklapanja signala.



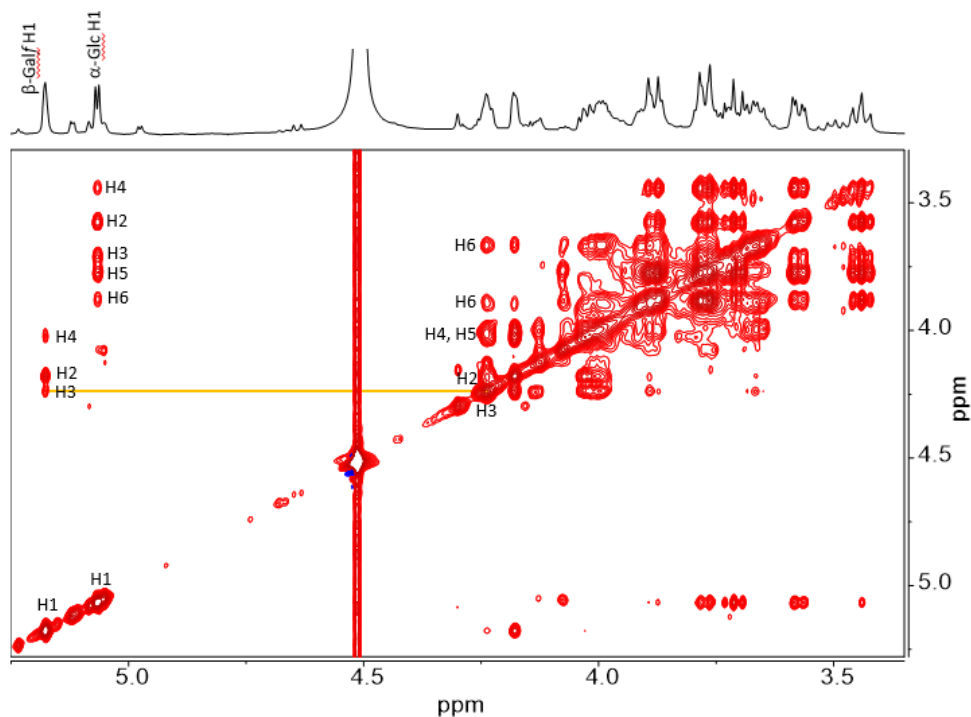
**Slika 22.** COSY spektar EPS-a izoliranog iz soja *L. fermentum* MC1

U svrhu analize interakcija između protona i ugljika s kojima su kovalentno vezani, provedena je HSQC 2D NMR spektroskopija. Dobiveni HSQC spektar (slika 23) daje informaciju o anomeričkoj regiji glavnog polisaharida. Iz dobivenog spektra mogu se odrediti kemijski pomaci C1 atoma glavnog polisaharida, iz kojih se može zaključiti da jedan od signala pripada  $\alpha$  vezanoj glukozu u formi piranoze,  $\alpha$ -Glc (5,07 ppm za H1 i 98,91 ppm za C1), a drugi  $\beta$  vezanoj galaktozi u formi furanoze,  $\beta$ -Galf (5,18 ppm za H1 i 107,11 ppm za C1).



**Slika 23.** Anomerička regija EPS-a, izoliranog iz soja *L. fermentum* MC1, na HSQC spektru

TOCSY spektar (slika 24) daje informaciju o svim protonima prisutnima u molekuli – pikovi koji pripadaju protonima jednog monosaharida poredani su u jedan niz, čime se olakšava povezivanje ostalih protona.



**Slika 24.** TOCSY spektar EPS-a izoliranog iz soja *L. fermentum* MC1

Jednom kada su određeni kemijski pomaci svih protona za svaku šećernu podjedinicu glavnog polisaharida, iz dobivenog HSQC spektra regije prstena (slika 25) se mogu dodijeliti odgovarajući kemijski pomaci ugljikovih atoma.



**Slika 25.** Regija prstena EPS-a, izoliranog iz soja *L. fermentum* MC1, na HSQC spektru

Na kraju, očitavanjem rezultata dobivenih na 2D NMR spektrima (slike 22 – 25) određeni su kemijski pomaci svih  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  atoma prisutnih u glavnom polisaharidu EPS-a izoliranog iz soja *L. fermentum* MC1 (tablica 9).

**Tablica 9.** Dodijeljeni  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  kemijski pomaci EPS-a izoliranog iz *Limosilactobacillus fermentum* MC1 snimljeni pri 500 MHz i 50 °C

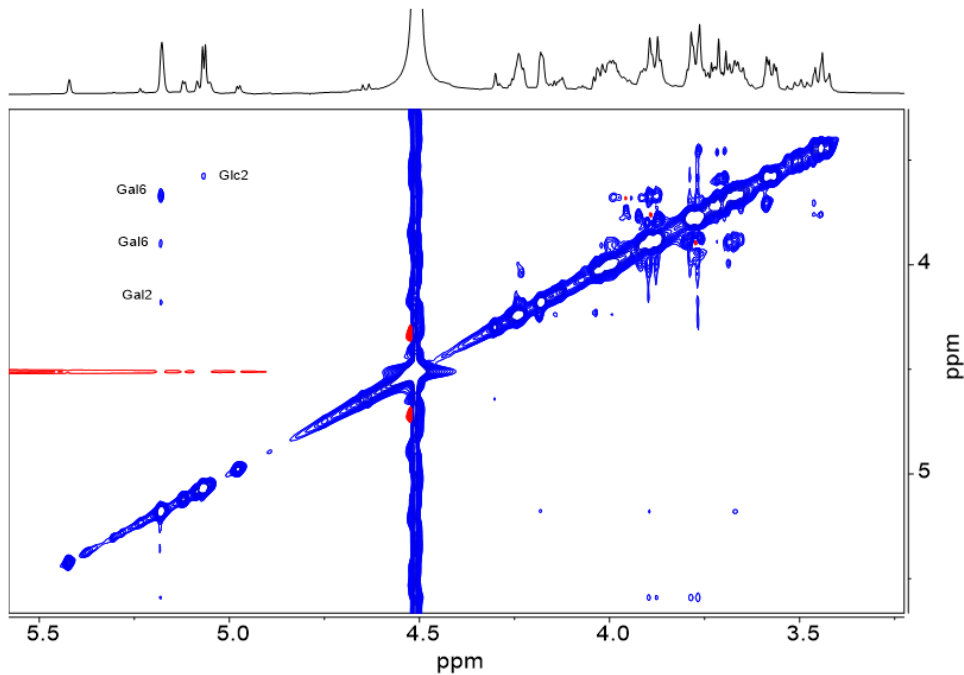
Ostatak	Jezgra	Kemijski pomaci (ppm) <sup>a</sup>					
		1	2	3	4	5	6
(A) →2,6)-β-D-Galf-(1→	$^1\text{H}$	5,18	4,18	4,24	4,02	3,99	3,89 – 3,67
	$^{13}\text{C}$	107,1	87,5	76,2	83,4	70,3	70,1
(B) α-D-Glcp-(1→	$^1\text{H}$	5,07	3,57	3,71	3,44	3,76	3,88 – 3,78
	$^{13}\text{C}$	98,9	72,00	73,7	70,5	73,3	61,5

Sive ćelije označavaju kemijske pomake ugljikovih atoma uključenih u glikozidne veze

<sup>a</sup>Kemijski pomaci prikazani u odnosu na aceton (2,225 ppm za  $^1\text{H}$  i 31,07 ppm za  $^{13}\text{C}$ )

Međutim, budući da još uvijek nije određen redoslijed monosaharida u glavnom polisaharidu provedene su još i NOESY i HMBC analize. NOESY pikovi nastaju zbog para protona koji nisu direktno povezani kemijskim vezama nego su u interakciji u prostoru uz uvjet da se nalaze na vrlo maloj udaljenosti jedan od drugoga. Ti protoni mogu pripadati istom šećernom ostatku ili mogu pripadati različitim ostacima koji, ako su međusobno povezani su

prostorno u blizini. Na ovaj način, protoni koji pripadaju susjednim monosaharidima mogu biti detektirani i dati više informacija o redosljedu monosaharida u polimeru odnosno o pozicijama glikozidnih veza između dva šećera. Na slici 26 vidljivi su pikovi između H1 i H6 galaktoze, upućujući na vezu Gal1-6Gal, dok je kod glukoze vidljiv samo pik s H2, ali unutar svog ostatka, što ne daje informaciju o njegovoj povezanosti s galaktozom.



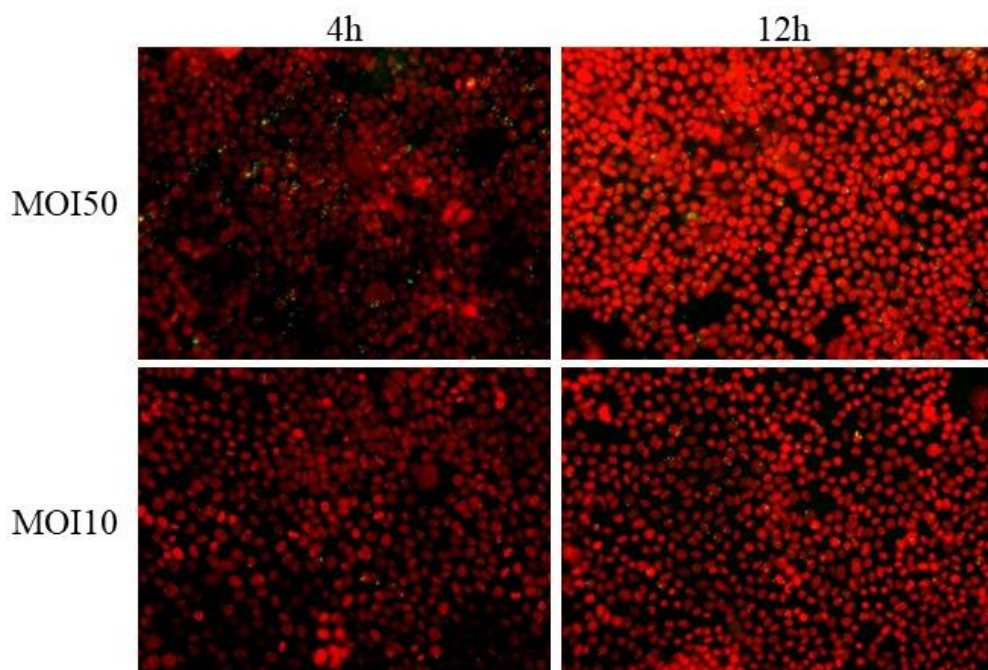
**Slika 26.** NOESY spektar EPS-a izoliranog iz soja *L. fermentum* MC1

HMBC spektar (slika 27) daje informaciju o vezama između ugljika i protona koji su razdvojeni s dvije ili tri veze te se iz pikova može zaključiti da se radi o vezama Gal1-6Gal i Glc1-2Gal.



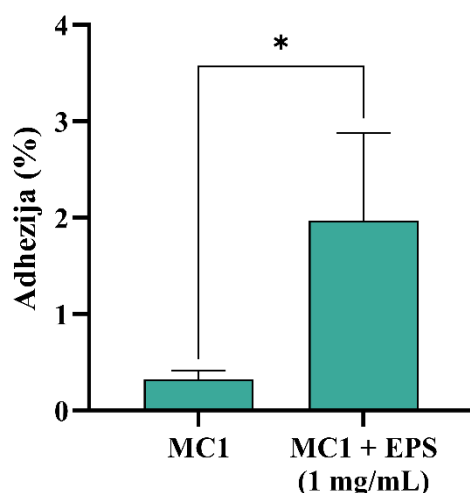


Sposobnost soja *L. fermentum* MC1 da se veže na Caco-2 stanice ispitana je vizualizacijom pomoću fluorescencijskog mikroskopa (slika 29). Sposobnost *L. fermentum* MC1 da se veže na Caco-2 stanice potvrđena je pri MOI10 i MOI50 nakon 4 i 12 sati inkubacije bojanjem različitim fluorescencijskim bojama – bakterijske stanice *L. fermentum* MC1 bojane su zelenom (ViaFluor 488), a jezgra Caco-2 stanica crvenom (DAPI) bojom.



**Slika 29.** Vizualizacija adhezije sojeva *Limosilactobacillus fermentum* MC1 (zeleno) na Caco-2 staničnu liniju (crveno) pri MOI 10 i 50 nakon 4 i 12 sati inkubacije analizirano pomoću fluorescentnog mikroskopa pri povećanju od 20x (slike prikazuju preklapanje monosloja Caco-2 stanica i adheziranih bakterijskih stanica)

Također, nakon potvrđivanja adhezije *L. fermentum* MC1 na Caco-2 stanice, ispitana je uloga i samih EPS-a *in vitro*. Kako bi se ispitala uloga EPS-a u sposobnosti adhezije stanice producenata soja MC1 na Caco-2 stanice, provela se usporedba adhezije u slučaju kada su Caco-2 stanice inkubirane sa sojem producentom te sa sojem producentom uz dodatak EPS-a u koncentraciji od 1 mg/mL. Iz rezultata se može vidjeti da EPS-i izolirani iz soja *L. fermentum* MC1 doprinose sposobnosti adhezije soja producenta budući da se veći broj stanica soja producenta vezao na Caco-2 stanice u slučaju kada su dodani EPS-i (slika 30).

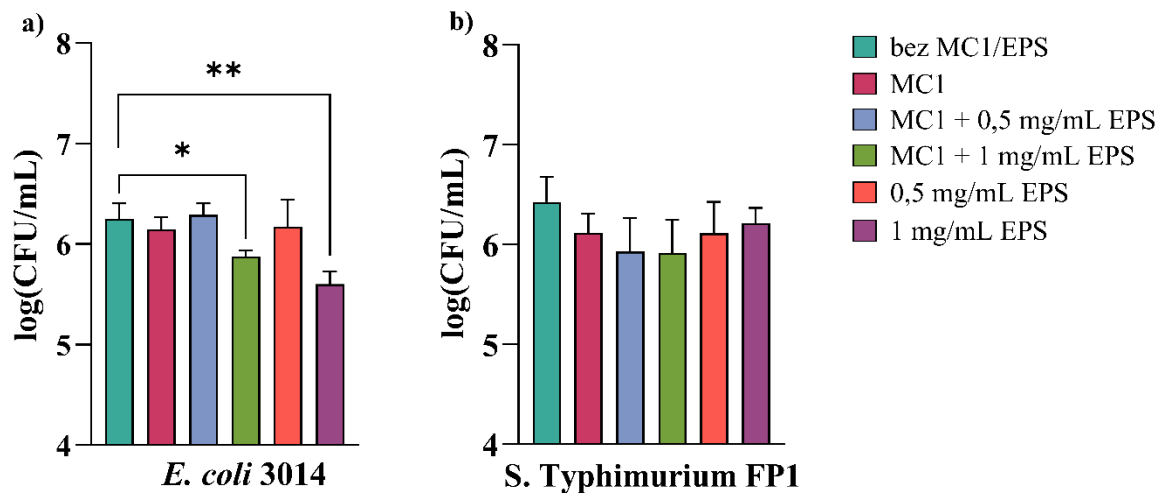


**Slika 30.** Adhezija soja *L. fermentum* MC1, sa i bez dodatka EPS-a u koncentraciji od 1 mg/mL, na Caco-2 staničnu liniju

\*Statistički značajno različito (\* $p < 0,05$ )

#### 4.1.2.5. Uloga EPS-a iz *L. fermentum* MC1 u kompetitivnoj ekskluziji patogenih bakterija

Kompetitivna ekskluzija je jedan od preduvjeta da se određeni soj prihvati kao probiotik. Osim već do sada opisanih S-proteina, ulogu u adheziji i kompetitivnoj ekskluziji mogu imati i EPS-i, također prisutni na površini stanice producenta. Stoga je provedeno ispitivanje utjecaja EPS-a koje proizvodi soj *L. fermentum* MC1 na kompetitivnu ekskluziju potencijalno patogenih bakterija *E. coli* 3014 i *S. Typhimurium* FP1. U tu svrhu, Caco-2 stanična linija prethodno je inkubirana s 0,5 i 1 mg/mL EPS-a, sa ili bez dodatka stanica soja *L. fermentum* MC1, te samo sa stanicama soja *L. fermentum* MC1, nakon čega je uslijedila inkubacija s *E. coli* 3014 ili *S. Typhimurium* FP1 (slika 31). Utvrđeno je da je kompetitivna ekskluzija *E. coli* 3014 bila najizraženija uz dodatak EPS-a u koncentraciji od 1 mg/mL, sa ili bez MC1 stanica, u usporedbi s adheriranom *E. coli* 3014 u kontroli (bez inkubacije MC1/EPS) te inkubaciji s MC1, MC1+0,5 mg/mL EPS ili 0,5 mg/mL EPS, dok nije uočena statistički značajna razlika u kompetitivnoj ekskluziji *S. Typhimurium* FP1 (Čuljak i sur., 2024a). Dobiveni rezultati kompetitivne ekskluzije *E. coli* 3014 slični su onima Liu i sur. (2017), koji su utvrdili da 1 mg/mL EPS-a izoliranog iz *Lactobacillus plantarum* WLPL04 može značajno inhibirati adheziju bakterije *Escherichia coli* O157:H7 na stanice HT-29.



**Slika 31.** Kompetitivna ekskluzija potencijalno patogenih bakterija a) *Escherichia coli* 3014 i b) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1 sojem *Limosilactobacillus fermentum* MC1, sa i bez dodatka EPS-a u koncentracijama od 0,5 i 1 mg/mL

\*Statistički značajno u odnosu na kontrolu (bez MC1/EPS) (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

## 4.2. Određivanje antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja sojeva producenata S-proteina i egzopolisaharida

### 4.2.1. Određivanje antimikrobnog djelovanja sojeva BMK turbidimetrijskom metodom

Jedno od najvažnijih svojstava probiotičkih bakterija je njihovo antimikrobno djelovanje protiv mnogih vrsta mikroorganizama koje bi moglo biti korisno kako bi se izbjegla stalna primjena antibiotika i kontrolirala brzina razmnožavanja potencijalno patogenih bakterija (Rabetafika i sur., 2023). Od različitih metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja, u ovom radu je korištena turbidimetrijska metoda kojom se ispitala sposobnost metabolita koje proizvode BMK da inhibiraju rast ispitivanih patogenih bakterija (tablica 10). Od ispitivanih sojeva BMK, sojevi MB1 i MB2 su pokazali najbolje antimikrobno djelovanje prema *S. aureus* 3048 i *L. monocytogenes* ATCC 19111, soj MB13 prema *E. coli* 3014, *S. Typhimurium* FP1 i *S. aureus* 3048, dok je soj MB20 pokazao najslabije antimikrobno djelovanje prema *E. coli* 3014 i *S. Typhimurium* FP1. Što se tiče soja MC1, on je pokazao najlošije antimikrobno djelovanje prema *S. aureus* 3048 u odnosu na ostale ispitivane sojeve BMK. Dobiveni rezultati upućuju na snažno antimikrobno djelovanje ispitivanih BMK prema potencijalno patogenim test-mikroorganizmima koje može biti posljedica proizvodnje različitih metabolita, a u slučaju MC1 i bakteriocina (slika 19). Istom metodom su Divyashree i sur. (2021) dokazali snažno antimikrobno djelovanje supernatanata *Lactobacillus casei* MYSRD 108 i *Lactobacillus plantarum* MYSRD 71 prema 5 odabranih enteropatogena. Ovi rezultati idu u prilog primjeni ispitivanih sojeva u svrhu inhibicije patogenih mikroorganizama, pa čak i potencijalnoj zamjeni

antibiotika probioticima ili postbioticima u borbi protiv antimikrobne rezistencije. Također, iako pojedini sojevi pripadaju istoj vrsti, njihova djelovanja se razlikuju te se moraju zasebno ispitati prije njihove potencijalne primjene.

**Tablica 10.** Inhibicija rasta potencijalno patogenih test-mikroorganizama djelovanjem supernatanata sojeva producenata S-proteina *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te producenta EPS-a *Limosilactobacillus fermentum* MC1, ispitano turbidimetrijskom metodom te izraženo kao postotak (%) inhibicije

Test- mikroorganizam	% inhibicije				
	MB1	MB2	MB13	MB20	MC1
<b>3014</b>	91,98 ± 1,57 <sup>b</sup>	91,58 ± 1,31 <sup>b</sup>	95,90 ± 1,29 <sup>a</sup>	75,58 ± 3,30 <sup>c</sup>	89,01 ± 2,96 <sup>b</sup>
<b>FP1</b>	89,95 ± 0,93 <sup>b</sup>	90,28 ± 1,24 <sup>b</sup>	94,57 ± 0,57 <sup>a</sup>	67,48 ± 6,15 <sup>d</sup>	85,60 ± 2,96 <sup>c</sup>
<b>3048</b>	95,92 ± 0,35 <sup>a</sup>	95,69 ± 0,07 <sup>a</sup>	96,22 ± 0,24 <sup>a</sup>	90,13 ± 0,64 <sup>b</sup>	86,05 ± 1,67 <sup>c</sup>
<b>19111</b>	92,50 ± 1,90 <sup>a</sup>	93,44 ± 1,15 <sup>a</sup>	70,19 ± 8,11 <sup>c</sup>	86,65 ± 2,32 <sup>b</sup>	88,40 ± 0,42 <sup>b</sup>

Test-mikroorganizmi: 3014 – *Escherichia coli* 3014; FP1 – *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1; 3048 – *Staphylococcus aureus* 3048; 19111 – *Listeria monocytogenes* ATCC 19111

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između podataka u istom retku ( $p < 0,05$ )

#### 4.2.2. Antioksidacijsko djelovanje sojeva BMK

Reaktivne kisikove vrste (*engl.* reactive oxygen species, ROS) su slobodni radikali izvedeni iz molekularnog kisika i nekoliko drugih kemijski reaktivnih molekula koje nastaju tijekom postupne redukcije molekularnog kisika, a unutar ljudskog tijela funkcioniraju kao regulatori i posrednici kako bi osigurali ispravno funkcioniranje stanica (Sies i sur., 2022). Uloga ROS-a u brojnim biološkim procesima ovisi o njihovoj koncentraciji, a prekomjerna proizvodnja može izazvati oštećenje proteina, nukleinskih kiselina ili lipida reakcijama slobodnih radikala, te se u slučaju prekomjerne proizvodnje ROS-a aktiviraju zaštitni antioksidativni mehanizmi. Oksidativni stres nastaje ako ovi mehanizmi rade neispravno ili neučinkovito, što rezultira neravnotežom između razine antioksidansa i oksidansa, gdje prevladava oksidacija. Ova neravnoteža utječe na ljudsko zdravlje i može doprinijeti starenju ili kroničnim bolestima kao što su dijabetes, ateroskleroza, IBD i oštećenje srca, mozga ili transplantiranih organa, a povišeni oksidativni stres može u konačnici rezultirati apoptozom ili nekrozom stanica (Hoffmann i sur., 2021). Stoga su od velikog interesa mogući mehanizmi i nove metode redukcije oksidativnog stresa, a pokazalo se da različite BMK imaju antioksidacijska svojstva kojima se održava oksidacijsko-redukcijska ravnoteža, ali mehanizam djelovanja još uvijek nije razjašnjen (Kim i sur., 2022; Hoffmann i sur., 2021). Probiotici mogu izravno neutralizirati oksidanse ekspresijom antioksidativnih enzima, mogu proizvesti različite metabolite s antioksidativnim djelovanjem (butirat, glutation i folata), a mogu i inhibirati

crijevne patogene i ukloniti lipide koji su uključeni u oksidativno oštećenje (Hoffmann i sur., 2021).

Stoga je ispitano antioksidacijsko djelovanje sojeva producenata S-proteina *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1 metodom hvatanja radikala DPPH-a. Ova metoda se temelji na činjenici da se DPPH u prisutnosti antioksidansa reducira što dovodi do obezbojenja otopine iz ljubičaste, koje se prati mjerenjem apsorbancije (Wołosiak i sur., 2022). Dobiveni rezultati ukazuju na jako antioksidacijsko djelovanje ispitivanih sojeva BMK budući da su svi pokazali visoku sposobnost uklanjanja DPPH radikala (tablica 11). Iako su svi sojevi pokazali snažno antioksidacijsko djelovanje (> 45 %), najviše se istaknuo soj *L. brevis* MB2 što se očitovalo najvećim postotkom uklanjanja DPPH radikala ( $59,67 \pm 2,63$  %). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživača koji su također utvrdili antioksidacijsku aktivnost različitih sojeva BMK određivanjem uklanjanja DPPH radikala (Kim i sur., 2022; Shori i sur., 2022; Yang i sur., 2020).

**Tablica 11.** Antioksidacijska aktivnost sojeva BMK izražena kao postotak (%) uklanjanja DPPH radikala

soj BMK	% uklanjanja DPPH radikala
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB1	$53,17 \pm 2,83^{ab}$
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB2	$59,67 \pm 2,63^a$
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB3	$53,16 \pm 3,78^{ab}$
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB20	$53,65 \pm 2,71^{ab}$
<i>Limosilactobacillus fermentum</i> MC1	$49,28 \pm 3,99^b$

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između podataka stupcu ( $p < 0,05$ )

### 4.3. *In vitro* ispitivanje regeneracijskog i imunomodulacijskog djelovanja S-proteina i egzopolisaharida te sojeva producenata na staničnoj kulturi humanih kolonocita

#### 4.3.1. Regeneracija crijevne sluznice staničnih kultura humanih kolonocita

Crijevni epitel održava ravnotežu između selektivnog aktivnog i pasivnog transporta iona, nutrijenata, vode i otpada te istodobnog formiranja barijere koja štiti od ulaska različitih patogena, a ključnu ulogu u održavanju ove ravnoteže ima apikalni spoj koji se naziva čvrsti spoj (*engl.* tight junction, TJ) (Suárez i sur., 2021; Buckley i Turner, 2018). Međustanični TJ funkcionira kao polupropusna membrana za reguliranje pasivnog transporta luminalne tekućine i molekula između epitelnih stanica, a njegov sastav je složen budući da se sastoji od transmembranskih proteina uključujući kladine, okladine i spojne adhezijske molekule (*engl.*

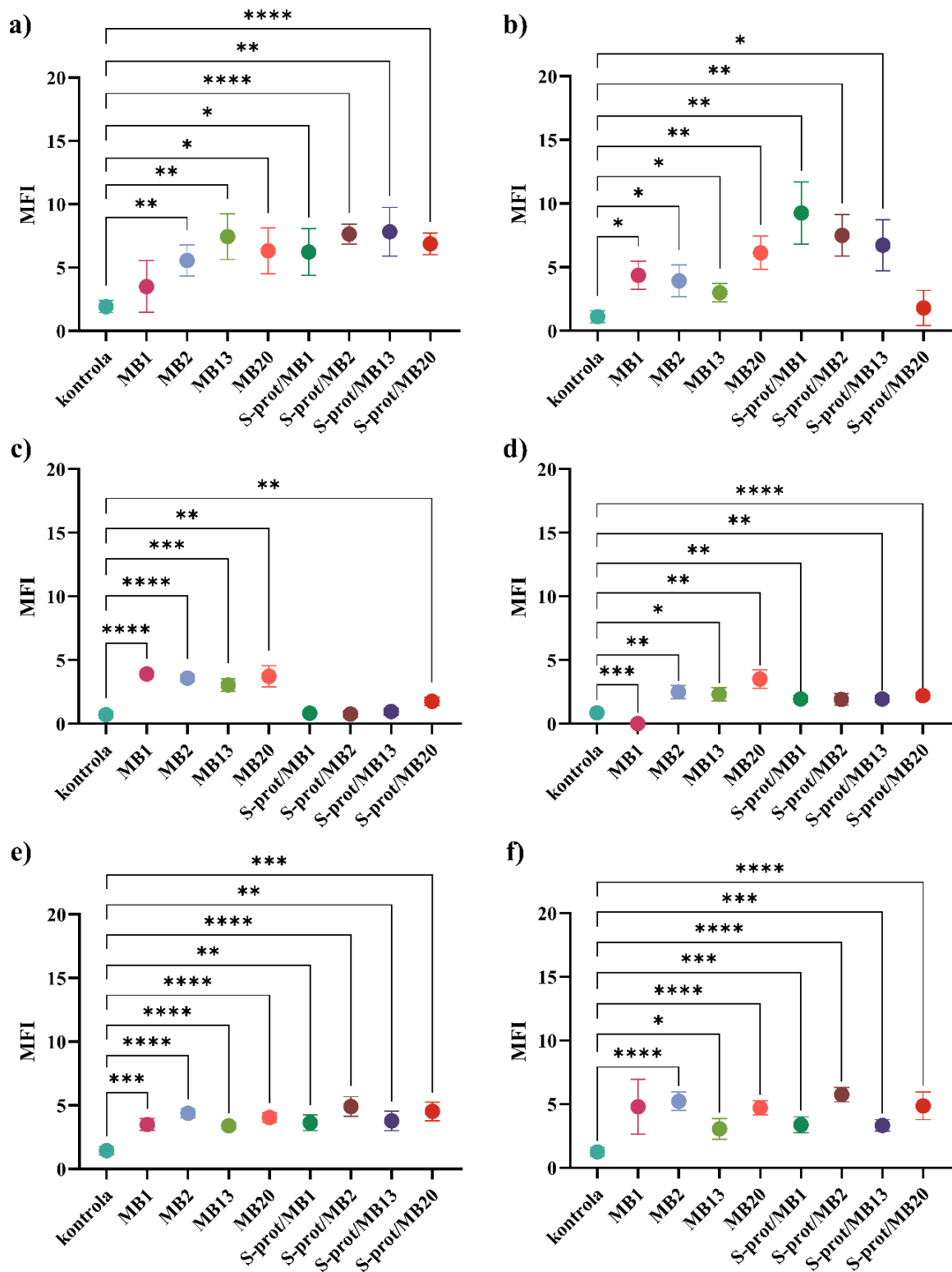
junctional adhesion molecule, JAM) te perifernih membranskih proteina kao što su *zonula occludens* (ZO) (Otani i Furuse, 2020). Njihova disfunkcija može dovesti do narušavanja cjelovitosti crijevne barijere, čime se omogućava prolazak patogena i aktivacija upalnog procesa (Landy i sur., 2016). Sekretorni mucin MUC2 je glavna komponenta crijevne barijere, a pokriva crijevne epitelne stanice stvarajući crijevni mukozni sloj koji poboljšava apsorpciju hrane, osigurava mjesta za pričvršćivanje crijevnim simbiotskim bakterijama i ograničava kolonizaciju patogena (Gou i sur., 2022). Još jedna važna komponenta epitela je i protein ZG16 (*engl.* zymogen granule protein 16) zastupljen u debelom crijevu, koji se isprepliće s polimernom mrežom mucina, a ima protuupalnu i antitumorsku svrhu tako što sprječava vezanje bakterija na epitel debelog crijeva čime se sprječava lokalna upala (Meng i sur., 2018). Istraživanja su pokazala da probiotici povećavaju ekspresiju gena koji kodiraju za spomenute TJ proteine i reguliraju ekspresiju mucina utječući tako na stvaranje mukoznog sloja i održavanje cjelovitosti crijevne epitelne barijere (Gou i sur., 2022; Di Tommaso i sur., 2021; Fu i sur., 2019; Zhou i sur., 2018). Osim cjelovitih stanica BMK, i pojedini njihovi metaboliti mogu imati pozitivan učinak na očuvanje crijevne barijere (Gou i sur., 2022).

Stoga je ispitana uloga S-proteina sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te EPS-a soja *L. fermentum* MC1, kao i sojeva *producenata*, na proces regeneracije humane stanične kulture s izazvanim upalnim procesom praćenjem ekspresije TJ proteina (JAM-A, okcludina, ZO-1) te MUC2 i ZG16 primjenom fluorescentne mikroskopije. Ekspresija JAM-A, okcludina, ZO-1 pratila se na Caco-2 stanicama nakon uspostave monosloja u mediju, mediju s dodatkom LPS-a, mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  i mediju s dodatkom LPS-a nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  te nakon uspostave monosloja, ali kada su stanice istovremeno bile izložene djelovanju TNF- $\alpha$  i BMK/biomolekulama ili TNF- $\alpha$ , LPS-u i BMK/biomolekulama. Ekspresija MUC2 i ZG16 pratila se na HT29MTX+5FU stanicama inkubiranim u mediju te u mediju s dodatkom TNF- $\alpha$ .

Na slici 32 su prikazani rezultati ekspresije JAM-A u Caco-2 stanicama ovisno o izlaganju samo S-proteinima ili čitavim stanicama producentima i tretmanu. Uočeno je statistički značajno povećanje JAM-A u mediju (slika 32a) nakon tretmana sojevima MB2 ( $p < 0,01$ ), MB13 ( $p < 0,01$ ) i MB20 ( $p < 0,05$ ) te S-proteinima sojeva MB1 ( $p < 0,05$ ), MB2 ( $p < 0,0001$ ), MB13 ( $p < 0,01$ ) i MB20 ( $p < 0,0001$ ). Kod tretmana Caco-2 stanica LPS-om (slika 32b), došlo je do statistički značajnog povećanja ekspresije JAM-A nakon tretmana sojevima MB1 ( $p < 0,05$ ), MB2 ( $p < 0,05$ ), MB13 ( $p < 0,05$ ) i MB20 ( $p < 0,01$ ) te S-proteinima sojeva MB1 ( $p < 0,01$ ), MB2 ( $p < 0,01$ ) i MB13 ( $p < 0,05$ ). Nakon predtretmana Caco-2 stanica s TNF- $\alpha$  (slika 32c), razina JAM-A je statistički značajno porasla nakon dodatka svih ispitivanih sojeva

producerska S-proteina ( $p < 0,0001$  za MB1 i MB2,  $p < 0,001$  za MB13 te  $p < 0,01$  za MB20), dok su od S-proteina jedino oni izolirani iz soja MB20 značajno povećali razinu ekspresije ( $p < 0,01$ ). Tretman Caco-2 stanica LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  (slika 32d) značajno je povećao ekspresiju JAM-A nakon tretmana sojevima MB2 ( $p < 0,01$ ), MB13 ( $p < 0,05$ ) i MB20 ( $p < 0,01$ ) te S-proteinima sojeva MB1 ( $p < 0,01$ ), MB13 ( $p < 0,01$ ) i MB20 ( $p < 0,0001$ ), dok je nakon tretmana sojem MB1 došlo do smanjenja ekspresije ( $p < 0,001$ ). S druge strane, istovremeni dodatak svih ispitivanih S-proteina ili čitavih stanica producerska i TNF- $\alpha$  (slika 32e) uzrokovao je statistički značajan porast ekspresije JAM-A, a najviše se istaknuo soj MB2 i njegov S-protein ( $p < 0,0001$ ). Istovremeni dodatak svih ispitivanih S-proteina ili čitavih stanica producerska (osim soja MB1), TNF- $\alpha$  i LPS-a (slika 32f) uzrokovao je statistički značajan porast ekspresije JAM-A, a najviše su se istaknuli soj MB2 i njegovi S-proteini ( $p < 0,0001$ ). Rezultati povećanja ekspresije JAM-A ukazuju na pozitivnu ulogu S-proteina i čitavih stanica producerska u održavanju cjelovitosti čvrstih spojeva, koji sudjeluju u obrani stanica od patogena. Ovi rezultati u suglasju su s istraživanjem koje su proveli Yin i sur. (2018) prema kojima *L. plantarum* CGMCC 1258, koji posjeduje SLP domene, može obnoviti oštećenja čvrstih spojeva povećanjem ekspresije proteina poput JAM-1, okcludina i kladin-1, koji omogućavaju transport iona i malih molekula kroz crijevnu barijeru, ali sprječavaju prolaz velikih toksičnih molekula i mikroorganizama.

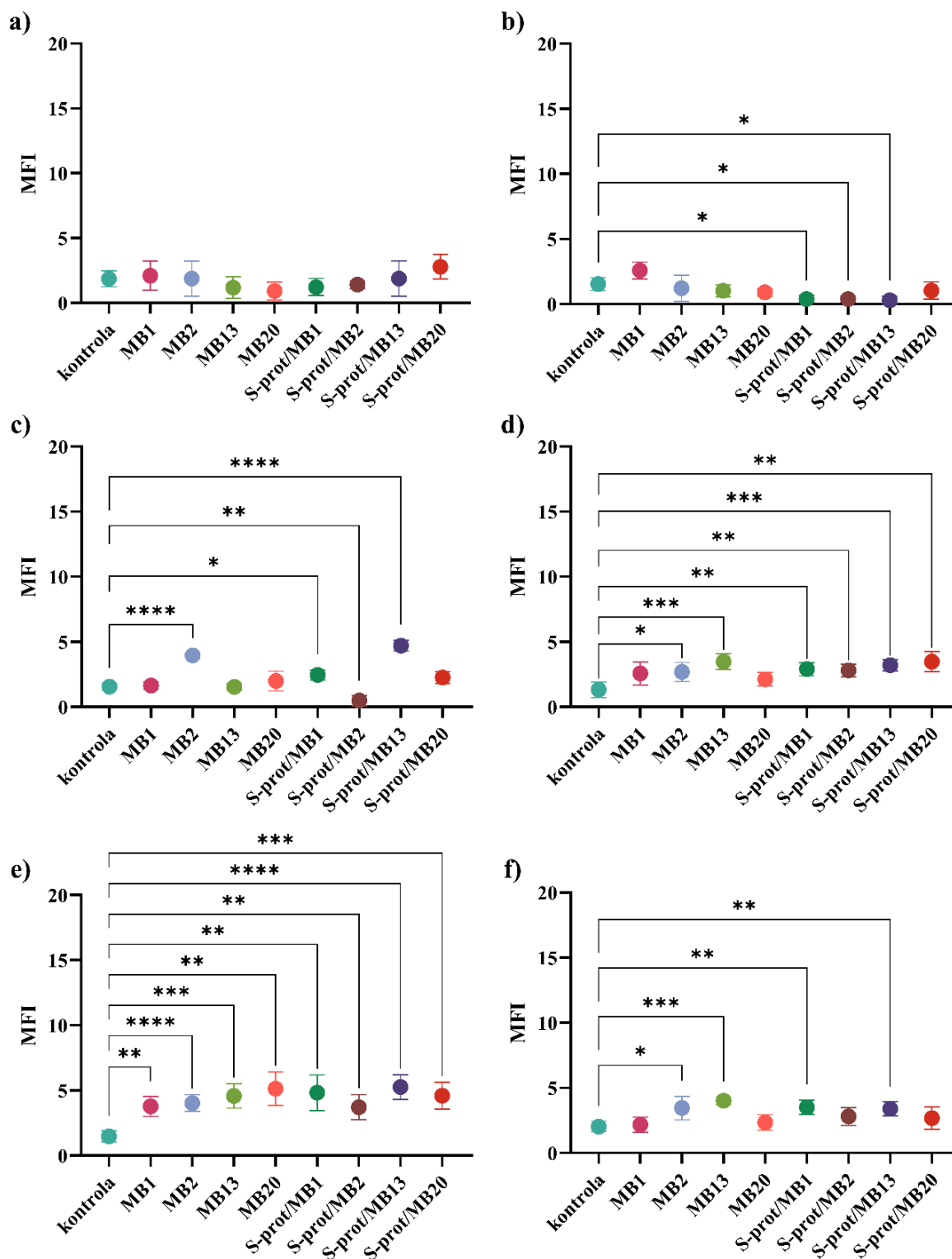




**Slika 32.** Ekspresija JAM-A u Caco-2 stanicama nakon uspostave monosloja u a) mediju, b) mediju s dodatkom LPS-a, c) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  i d) mediju s dodatkom LPS-a nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  te nakon uspostave monosloja, ali kada su Caco-2 stanice istovremeno bile izložene djelovanju e) TNF- $\alpha$  ili f) TNF- $\alpha$  i LPS-u te BMK/S-proteinima MFI (engl. mean fluorescence intensity), kontrola (ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama)

\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Na slici 33 su prikazani rezultati ekspresije okcludina u Caco-2 stanicama ovisno o izlaganju samo S-proteinima ili čitavim stanicama producentima te tretmanu. Dodatak BMK/S-proteina nije značajno promijenio ekspresiju okcludina u samom mediju u odnosu na kontrolu (slika 33a). Kod tretmana Caco-2 stanica LPS-om (slika 33b), dodatak S-proteina iz sojeva MB1, MB2 i MB13 značajno je smanjio ekspresiju okcludina ( $p < 0,05$ ). Nakon tretmana Caco-2 stanica s TNF- $\alpha$  (slika 33c) razina okcludina je statistički značajno porasla nakon dodatka soja MB2 ( $p < 0,0001$ ) te S-proteina sojeva MB1 ( $p < 0,05$ ) i MB13 ( $p < 0,0001$ ), dok je nakon dodatka S-proteina iz soja MB2 značajno pala ( $p < 0,01$ ). Inkubacija Caco-2 u mediju s LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  (slika 33d) nije uzrokovala statistički značajno povećanje ekspresije okcludina samo nakon tretmana sa sojevima MB1 i MB20. Dodatak svih ispitivanih BMK/biomolekula značajno je povećao ekspresiju okcludina u Caco-2 stanicama nakon istovremenog dodatka TNF- $\alpha$  (slika 33e), a najviše su se istaknuli soj MB2 te S-proteini iz soja MB13 ( $p < 0,0001$ ). Istovremeni tretman Caco-2 stanica, BMK/biomolekula, TNF- $\alpha$  i LPS-a (slika 33f) uzrokovao je statistički značajan porast ekspresije okcludina nakon dodatka sojeva MB2 ( $p < 0,05$ ) i MB13 ( $p < 0,001$ ) te S-proteina iz sojeva MB1 ( $p < 0,01$ ) i MB13 ( $p < 0,01$ ). Rezultati povećanja ekspresije okcludina ukazuju na pozitivnu ulogu S-proteina i čitavih stanica producenata u održavanju cjelovitosti TJ, što je u skladu s rezultatima drugih autora koji su dokazali da proteini S-sloja laktobacila pozitivno moduliraju ekspresiju okcludina, ali i drugih TJ proteina (Bendinelli i sur., 2023).

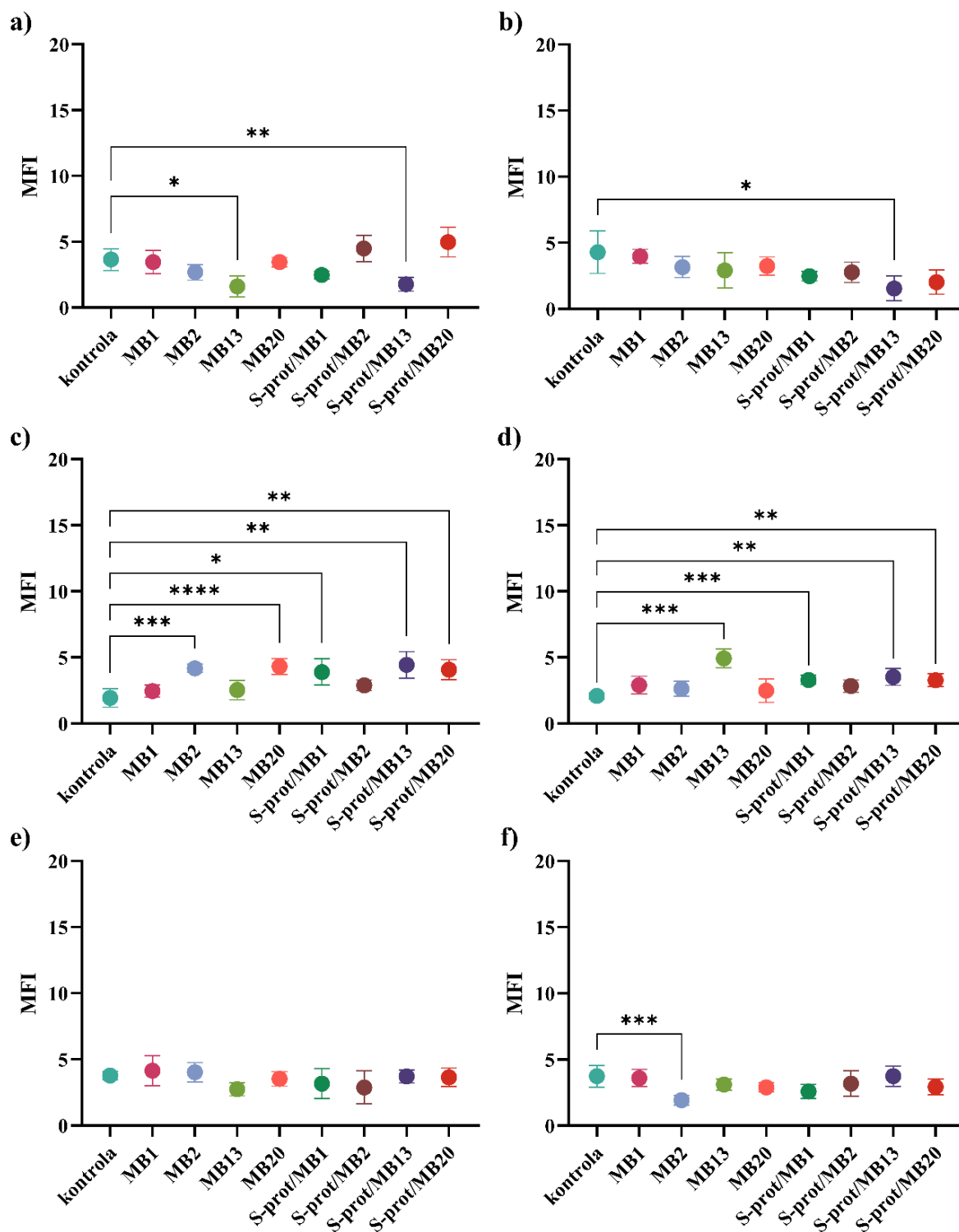


**Slika 33.** Ekspresija okludina u Caco-2 stanicama nakon uspostave monosloja u a) mediju, b) mediju s dodatkom LPS-a, c) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  i d) mediju s dodatkom LPS-a nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  te nakon uspostave monosloja, ali kada su Caco-2 stanice istovremeno bile izložene djelovanju e) TNF- $\alpha$  ili f) TNF- $\alpha$  i LPS-u te BMK/S-proteinima

MFI (*engl.* mean fluorescence intensity), kontrola (ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama)

\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

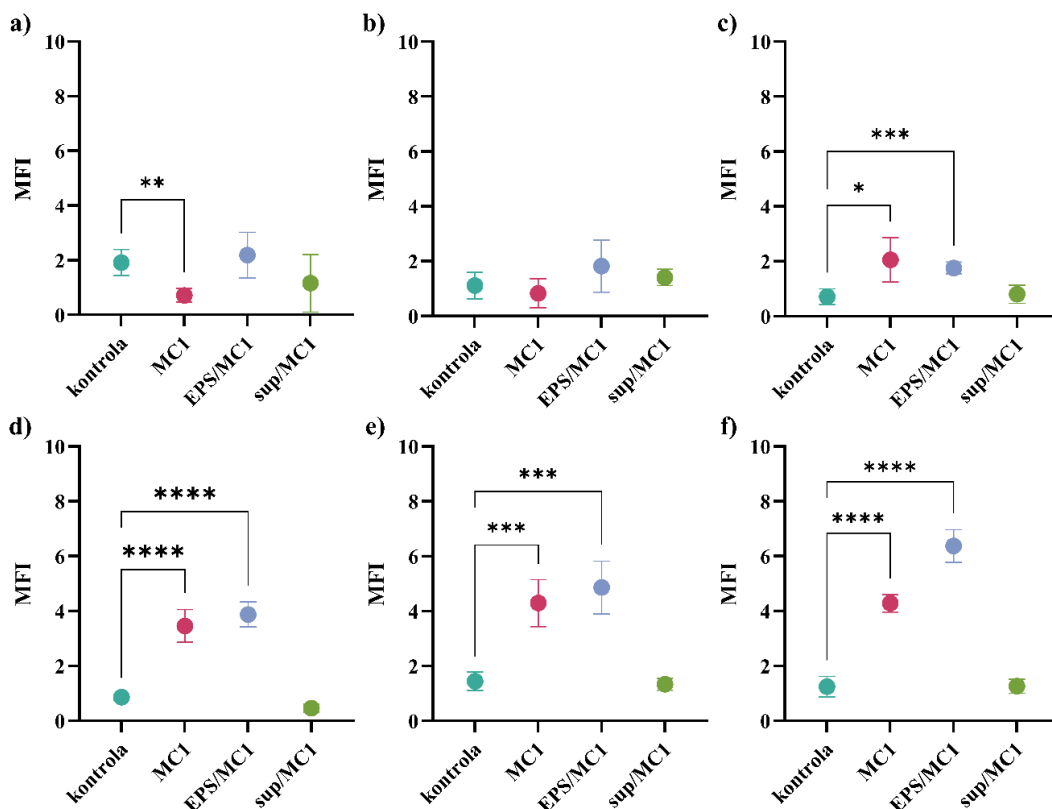
Na slici 34 su prikazani rezultati ekspresije ZO-1 u Caco-2 stanicama ovisno o izlaganju samo S-proteinima ili čitavim stanicama producentima. Inkubacija Caco-2 stanica u mediju te naknadni dodatak BMK/S-proteina (slika 34a) uzrokovao je statistički značajan pad ekspresije ZO-1 nakon dodatka soja MB13 ( $p < 0,05$ ) i njegovih S-proteina ( $p < 0,01$ ). Dodatak S-proteina soja MB13 ( $p < 0,05$ ) značajno je smanjio ekspresiju ZO-1 nakon tretmana Caco-2 stanica LPS-om (slika 34b). Inkubacija Caco-2 stanica u mediju nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  (slika 34c) značajno je povećala ekspresiju ZO-1 nakon dodatka sojeva MB2 ( $p < 0,001$ ) i MB20 ( $p < 0,0001$ ) te S-proteina sojeva MB1 ( $p < 0,05$ ), MB13 ( $p < 0,01$ ) i MB20 ( $p < 0,01$ ). Inkubacija Caco-2 stanica u mediju s LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  (slika 34d) imala je pozitivan učinak na ekspresiju ZO-1 budući da je uočen statistički značajan porast nakon dodatka soja MB13 ( $p < 0,001$ ) te S-proteina sojeva MB1 ( $p < 0,001$ ), MB13 ( $p < 0,01$ ) i MB20 ( $p < 0,01$ ). Dodatak BMK/S-proteina nije značajno promijenio ekspresiju ZO-1 nakon istovremenog tretmana Caco-2 stanica s BMK/S-proteinima i TNF- $\alpha$  (slika 34e). S druge strane, istovremeni tretman Caco-2 stanica s BMK/S-proteinima te TNF- $\alpha$  i LPS-om (slika 34f) značajno je smanjio ekspresiju ZO-1 nakon tretmana sojem MB2 ( $p < 0,001$ ). Kao i kod ostalih ispitivanih proteina čvrstih spojeva koji stabiliziraju čvrsti spoj i pospješuju funkciju crijevne barijere, pozitivnim rezultatom se smatra povećanje njihove ekspresije. Međutim, u slučaju ekspresije ZO-1, zabilježeno je statističko povećanje nakon dodatka određenih BMK/S-proteina samo u slučaju kada su Caco-2 stanice, prethodno tretirane s TNF- $\alpha$ , bile inkubirane u mediju ili mediju uz dodatak LPS-a.



**Slika 34.** Ekspresija ZO-1 u Caco-2 stanicama nakon uspostave monosloja u a) mediju, b) mediju s dodatkom LPS-a, c) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  i d) mediju s dodatkom LPS-a nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  te nakon uspostave monosloja, ali kada su Caco-2 stanice istovremeno bile izložene djelovanju e) TNF- $\alpha$  ili f) TNF- $\alpha$  i LPS-u te BMK/S-proteinima MFI (*engl.* mean fluorescence intensity), kontrola (ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama)

\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Osim sojeva producenata S-proteina i njihovih biomolekula, ispitaio se i utjecaj tretmana sojem *L. fermentum* MC1 i njegovim EPS-ima na ekspresiju JAM-A, okcludina i ZO-1 u Caco-2 stanicama izloženim različitim tretmanima. Također, ispitano je i djelovanje samog supernatanta soja MC1 budući da, osim što su EPS-i vezani na površinu stanice, soj MC1 ima sposobnost otpuštanja EPS-a u supernatant. Uočeno je statistički značajno smanjenje ekspresije JAM-A u mediju (slika 35a) nakon tretmana sojem MC1 ( $p < 0,01$ ). Kod tretmana Caco-2 stanica LPS-om (slika 35b), nije došlo do statistički značajne promjene u ekspresiji JAM-A. Nakon tretmana Caco-2 stanica s TNF- $\alpha$  (slika 35c) razina JAM-A je statistički značajno porasla nakon dodatka soja MC1 ( $p < 0,05$ ) i njegovih EPS-a ( $p < 0,001$ ). Tretman Caco-2 stanica LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  (slika 35d) značajno je povećao ekspresiju JAM-A nakon tretmana sojem MC1 i njegovim EPS-ima ( $p < 0,0001$ ). Istovremeni dodatak soja MC1 ili njegovih EPS-a i TNF- $\alpha$  (slika 35e,  $p < 0,001$ ) te TNF- $\alpha$  i LPS-a (slika 35f,  $p < 0,0001$ ) uzrokovao je statistički značajan porast ekspresije JAM-A.

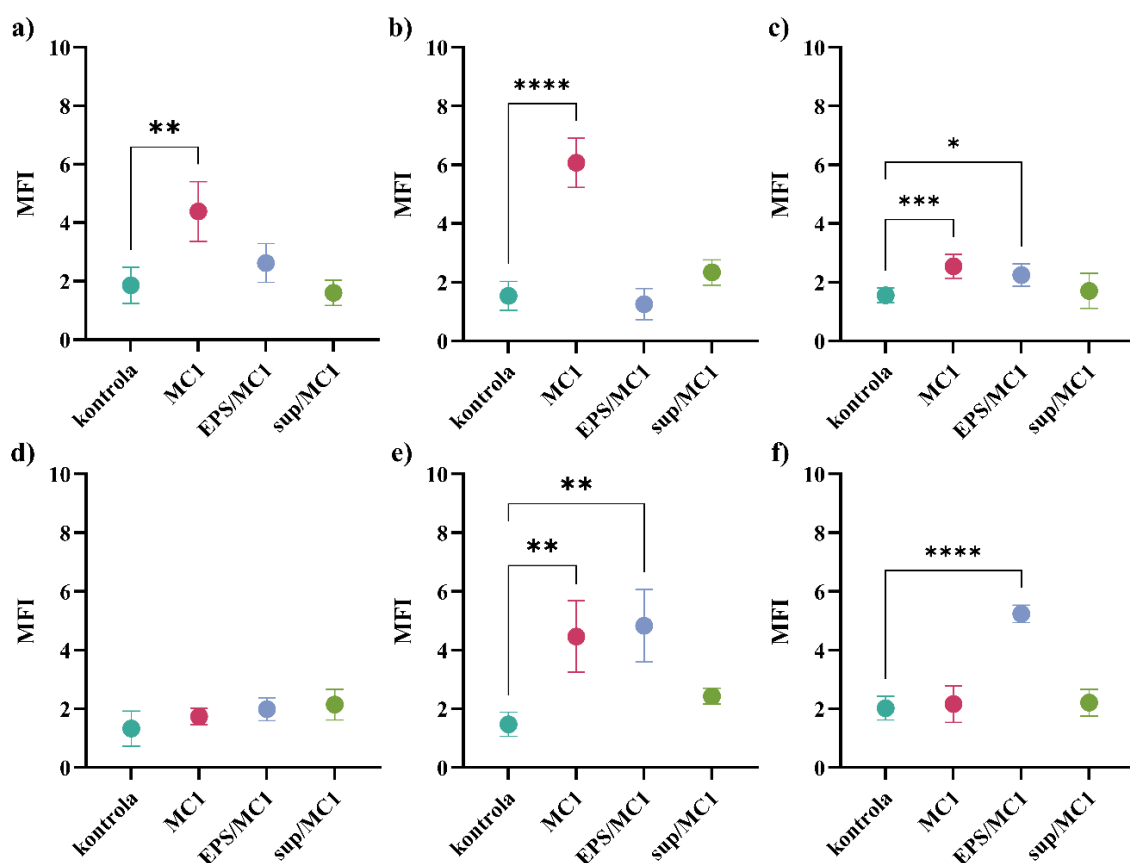


**Slika 35.** Ekspresija JAM-A u Caco-2 stanicama nakon uspostave monosloja u a) mediju, b) mediju s dodatkom LPS-a, c) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  i d) mediju s dodatkom LPS-a nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  te nakon uspostave monosloja, ali kada su Caco-2 stanice istovremeno bile izložene djelovanju e) TNF- $\alpha$  ili f) TNF- $\alpha$  i LPS-u te bakterijama/EPS-ima/supernatantu soja MC1

MFI (*engl.* mean fluorescence intensity), kontrola (ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama)

\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Što se tiče okludina, uočeno je statistički značajno povećanje njegove ekspresije u Caco-2 stanicama u mediju (slika 36a) nakon tretmana sojem MC1 ( $p < 0,01$ ). Isti učinak uočen je kod tretmana Caco-2 stanica LPS-om (slika 36b,  $p < 0,0001$ ). Nakon tretmana Caco-2 stanica s TNF- $\alpha$  (slika 36c) razina JAM-A je statistički značajno porasla nakon dodatka soja MC1 ( $p < 0,001$ ), ali i njegovih EPS-a ( $p < 0,05$ ). Tretman Caco-2 stanica LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  (slika 36d) nije uzrokovao statistički značajnu promjenu u ekspresiji okludina. Dodatak soja MC1 ( $p < 0,01$ ) i njegovih EPS-a ( $p < 0,01$ ) značajno je povećao ekspresiju okludina u Caco-2 stanicama nakon istovremenog dodatka TNF- $\alpha$  (slika 36e). S druge strane, istovremeni dodatak EPS-a te TNF- $\alpha$  i LPS-a (slika 36f) uzrokovao je statistički značajan porast ekspresije okludina ( $p < 0,0001$ ).

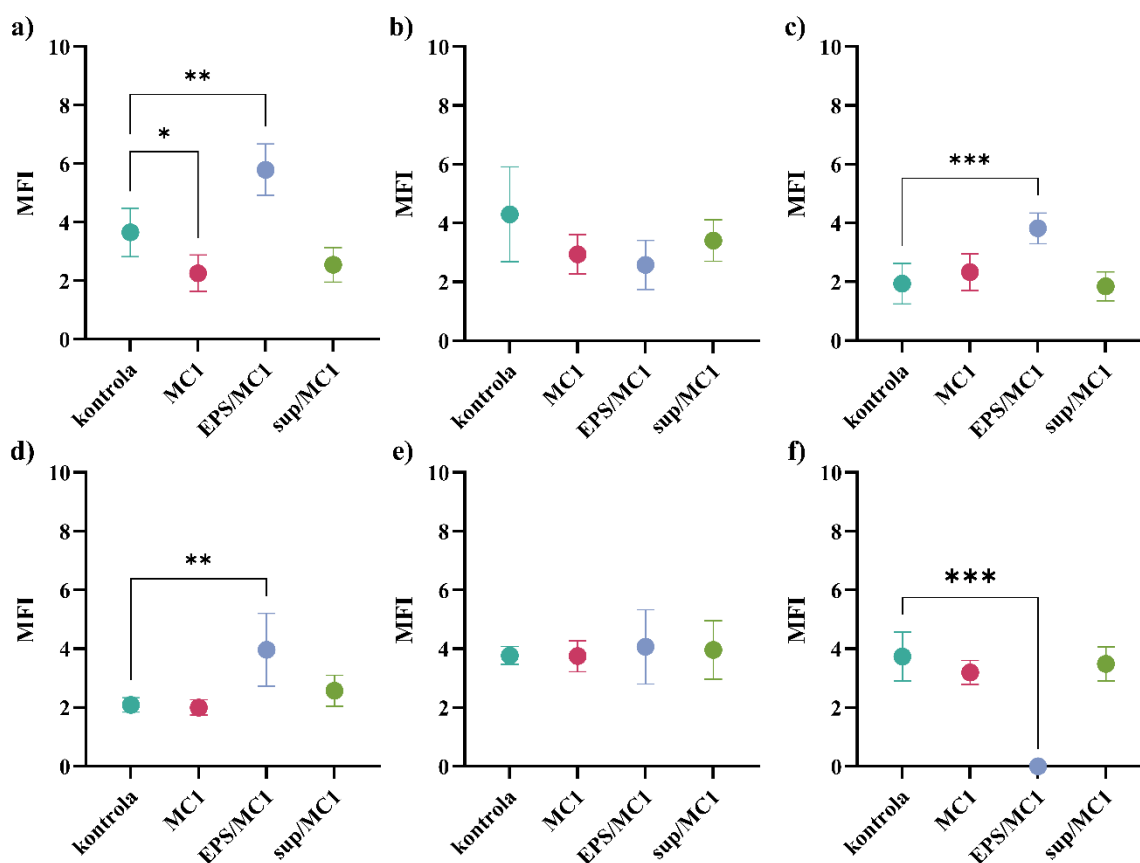


**Slika 36.** Ekspresija okludina u Caco-2 stanicama nakon uspostave monosloja u a) mediju, b) mediju s dodatkom LPS-a, c) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  i d) mediju s dodatkom LPS-a nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  te nakon uspostave monosloja, ali kada su Caco-2 stanice istovremeno bile izložene djelovanju e) TNF- $\alpha$  ili f) TNF- $\alpha$  i LPS-u te bakterijama/EPS-ima/supernatantu soja MC1

MFI (*engl.* mean fluorescence intensity), kontrola (ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama)

\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Što se tiče ZO-1, uočeno je statistički značajno smanjenje njegove ekspresije u mediju (slika 37a) nakon tretmana sojem MC1 ( $p < 0,05$ ) te statistički značajno povećanje njegove ekspresije nakon tretmana EPS-ima ( $p < 0,01$ ). Tretmana Caco-2 stanica LPS-om (slika 37b) nije uzrokovao statistički značajnu promjenu u ekspresiji ZO-1. Nakon tretmana Caco-2 stanica s TNF- $\alpha$  (slika 37c,  $p < 0,001$ ) te s TNF- $\alpha$  i LPS-om (slika 37d,  $p < 0,01$ ) razina ZO-1 je statistički značajno porasla nakon dodatka EPS-a. Tretman Caco-2 stanica LPS-om nakon predtretmana s (slika 37d) nije uzrokovao statistički značajnu promjenu u ekspresiji okcludina. Istovremeni dodatak MC1/EPS-a/supernatanta nije imao utjecaj na ekspresiju ZO-1 u Caco-2 stanicama nakon istovremenog dodatka TNF- $\alpha$  (slika 37e). S druge strane, istovremeni dodatak EPS-a te TNF- $\alpha$  i LPS-a (slika 37f) uzrokovao je statistički značajan pad ekspresije ZO-1 ( $p < 0,001$ ).



**Slika 37.** Ekspresija ZO-1 u Caco-2 stanicama nakon uspostave monosloja u a) mediju, b) mediju s dodatkom LPS-a, c) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  i d) mediju s dodatkom LPS-a nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  te nakon uspostave monosloja, ali kada su Caco-2 stanice istovremeno bile izložene djelovanju e) TNF- $\alpha$  ili f) TNF- $\alpha$  i LPS-u te bakterijama/EPS-ima/supernatantu soja MC1

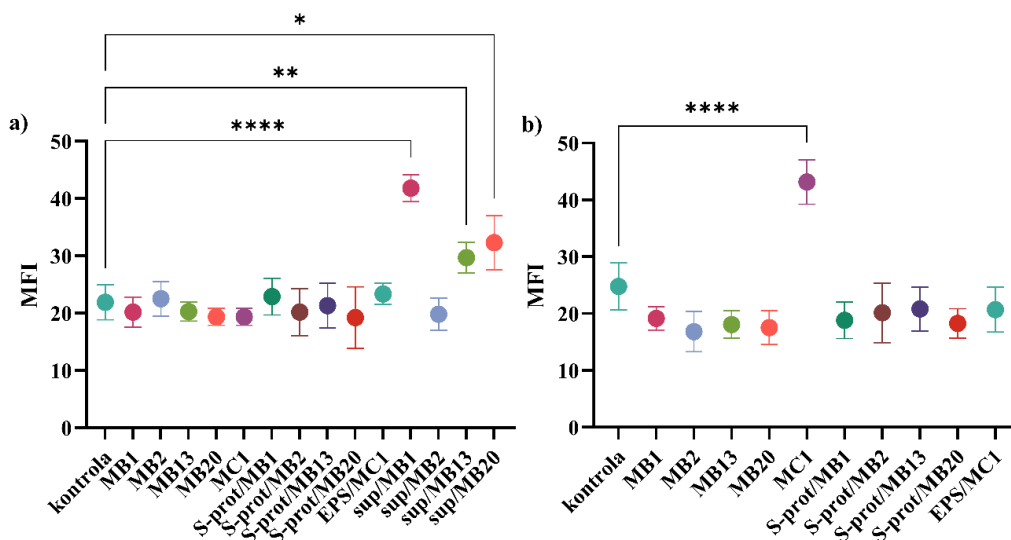
MFI (*engl.* mean fluorescence intensity), kontrola (ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama)

\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )



Zaključno, iz rezultata se može vidjeti da supernatant soja MC1 nije imao učinak na promjenu ekspresije ispitivanih proteina, dok su sam soj *L. fermentum* MC1 i njegovi EPS-i imali utjecaj. Mogući razlog je taj što se EPS-i koje proizvodi soj MC1 ispuštaju u supernatant u vrlo malim količinama (600 mg/L EPS-a proizvede  $10^9$  CFU/mL bakterija) koje nisu dovoljne da potaknu imunološku reakciju. S druge strane, soj MC1 i njegovi EPS-i imaju različiti utjecaj na ekspresiju ispitivanih proteina, koji može biti posljedica samih EPS-a, ali i drugih površinskih molekula.

Osim JAM-A, okcludina i ZO-1, praćena je ekspresija MUC2 i ZG16 u HT29MTX+5FU stanicama u mediju te mediju s TNF- $\alpha$ . Budući da dodatak ispitivanih BMK/biomolekula nakon inkubacije HT29MTX+5FU stanica u mediju (slika 38a) nije doveo do statistički značajne promjene u ekspresiji mucina, ispitan je i dodatak supernatanta istih sojeva producenata te je uočeno povećanje ekspresije MUC2 nakon dodatka supernatanta sojeva MB1 ( $p < 0,0001$ ), MB13 ( $p < 0,01$ ) i MB20 ( $p < 0,05$ ). S druge strane, nakon inkubacije HT29MTX+5FU stanica u mediju s TNF- $\alpha$  (slika 38b) uočen je statistički značajan porast ekspresije mucina samo nakon dodatka soja MC1 ( $p < 0,0001$ ). Iz rezultata se može zaključiti da soj MC1 ima pozitivnu ulogu u održavanju homeostaze *in vitro* budući da je dokazano da smanjene razine MUC2 mogu biti povezane s raznim bolestima crijeva (Liu i sur., 2020). Slične rezultate su dobili i Wang i sur. (2020) koji su dokazali da je soj *L. reuteri* I5007 obnovio broj vrčastih stanica i popravio oštećena tkiva stimulirajući ekspresiju gena mucina MUC2.

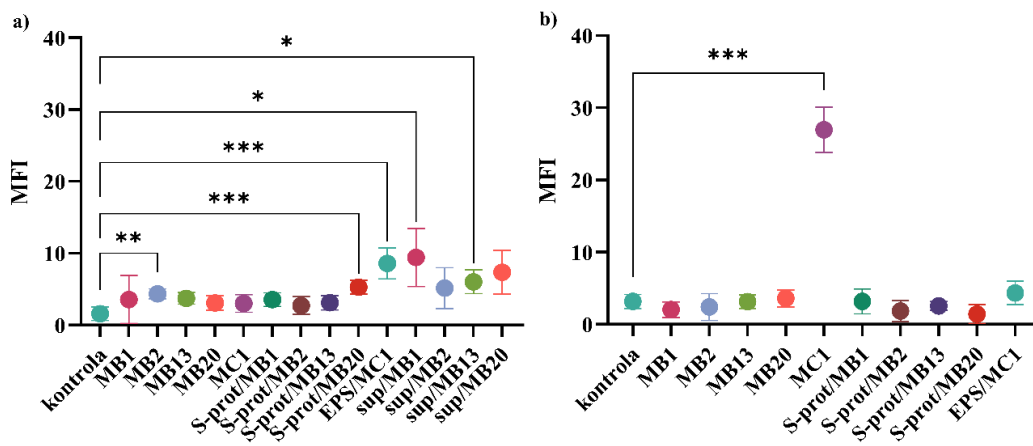


**Slika 38.** Ekspresija mucina u HT29MTX+5FU stanicama nakon uspostave monosloja u a) mediju i b) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  te naknadnim izlaganjem BMK producentima S-proteina ili EPS-a, njihovim biomolekulama ili supernatantima

MFI (*engl.* mean fluorescence intensity), kontrola (ekspresija kada HT29MTX+5FU stanice nisu izložene BMK/biomolekulama)

\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Nakon inkubacije HT29MTX+5FU stanica u mediju (slika 39a), dodatak soja MB2 ( $p < 0,01$ ), S-proteina soja MB20 ( $p < 0,001$ ), EPS-a iz soja MC1 ( $p < 0,0001$ ) te supernatanata sojeva MB1 ( $p < 0,05$ ) i MB13 ( $p < 0,05$ ) uzrokovao je povećanje ekspresije ZG16. S druge strane, inkubacija HT29MTX+5FU stanica u mediju s TNF- $\alpha$  (slika 39b) dovela je do statistički značajnog porasta u ekspresiji ZG16 samo nakon dodatka soja MC1 ( $p < 0,001$ ). Dobiveni rezultati povećanja ekspresije ZG16 *in vitro* ukazuju na pozitivnu ulogu u održavanju homeostaze budući da se pokazalo da je smanjena ekspresija proteina ZG16 povezana s UC i rakom debelog crijeva (Javitt i sur., 2021). Štoviše, smatra se da bi ZG16 mogao biti potencijalna meta za imunoterapiju tumora budući da je prekomjerna ekspresija ZG16 u staničnim linijama raka debelog crijeva (stanične linije SW480 i HCT116) rezultirala značajnom inhibicijom proliferacije stanica raka debelog crijeva (Song i sur., 2023).



**Slika 39.** Ekspresija ZG16 u HT29MTX+5FU stanicama nakon uspostave monosloja u a) mediju i b) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  te naknadnim izlaganjem BMK producentima S-proteina ili EPS-a, njihovim biomolekulama ili supernatantima  
MFI (*engl.* mean fluorescence intensity), kontrola (ekspresija kada HT29MTX+5FU stanice nisu izložene BMK/biomolekulama)

\*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Zaključno, iz rezultata se može vidjeti da različite BMK i njihove biomolekule imaju različiti učinak na ekspresiju pojedinih proteina, ovisno o uvjetima u kojima su stanice bile inkubirane. EPS izoliran iz soja *L. fermentum* MC1 sveukupno je pokazao najbolje regeneracijsko djelovanje budući da je u najviše ispitivanih slučajeva statistički značajno povećao ekspresiju ispitivanih proteina. Od sojeva se istaknuo *L. brevis* MB2, iako je u slučaju ekspresije ZO-1 uzrokovao statistički značajno smanjenje u Caco-2 stanicama istovremeno inkubiranim s TNF- $\alpha$  i LPS-om. Ovi rezultati potvrđuju hipotezu da su S-proteini specifični za bakterijski soj te da se određeno svojstvo S-proteina, ustanovljeno za jedan bakterijski soj, ne može pripisati drugom bakterijskom soju (Banić i sur., 2018), a isto vrijedi i za EPS-e i njihove producente.

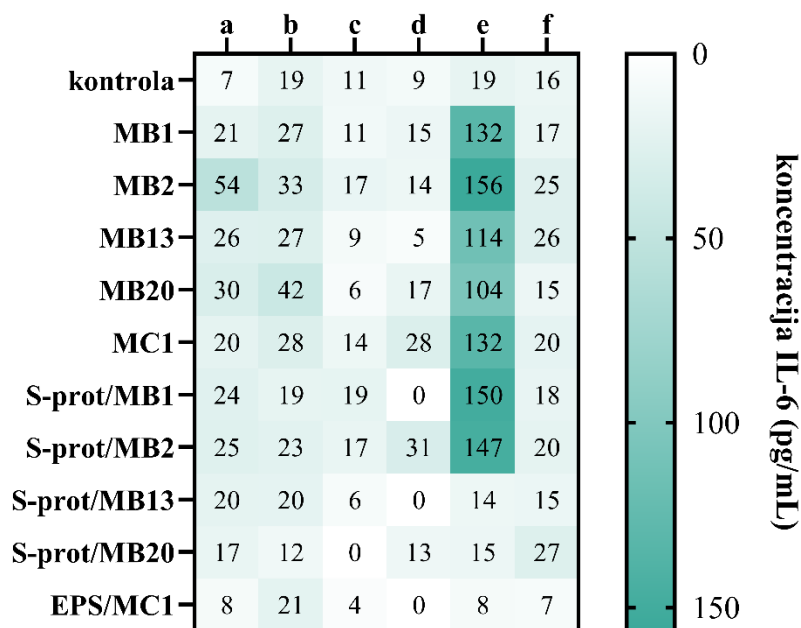
### 4.3.2. Imunomodulacijsko djelovanje

Kao što je već rečeno, kod upalnih bolesti crijeva epitelna barijera popušta i postaje nefunkcionalna, odnosno dolazi do poremećaja selektivne permeabilnosti i cjelovitosti, što omogućava prolaz patogena i aktivaciju upalnog procesa, kojeg karakterizira smanjena ekspresija proteina koji sudjeluju u TJ te povećana infiltracija leukocita i proizvodnja proupalnih citokina kao što su interferon gama (IFN- $\gamma$ ), faktor nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) i interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ). Dokazano je da upalni procesi u crijevima uzrokuju povećanu razinu ekspresije proupalnih citokina te da dolazi do povišenja crijevne epitelne permeabilnosti (Landy i sur., 2016). Međutim, pokazalo se da pojedini sojevi BMK mogu modulirati razinu ekspresije proupalnih citokina, ali mehanizam koji dovodi do tog djelovanja nije još u potpunosti razjašnjen (Prado Acosta i sur., 2021). Zanimljivi su i sojevi producenti S-proteina, za koje se pokazalo da imaju ulogu u preživljavanju stanice producenta u nepovoljnim okolišnim uvjetima te u adheziji na crijevni epitel, te su kao takvi dobri potencijalni kandidati za primjenu kao probiotici. Također, od interesa su i producenti EPS-a te same biomolekule budući da se pokazalo da, osim već navedenih pozitivnih zdravstvenih učinaka na zdravlje domaćina, EPS-i imaju i imunomodulacijsko djelovanje koje ovisi o njihovoj strukturi i sastavu (Zhang i sur., 2023).

Stoga je ispitano imunomodulacijsko djelovanje sojeva koji ekspimiraju S-proteine na površini stanica i soja producenta EPS-a te njihovih biomolekula na Caco-2 staničnoj kulturi nakon izazivanja upalnog procesa djelovanjem TNF- $\alpha$  i LPS-a, kroz određivanje proizvodnje proupalnih citokina IL-6, IL-8 i IL-1 $\beta$  te protuupalnog citokina IL-10. Pozitivnim učinkom se smatra smanjenje koncentracije proupalnih citokina, a povećanje protuupalnog citokina. Naime, u jednoj od prijašnjih istraživanja, primjena *L. fermentum* CQPC04 značajno je inhibirala proizvodnju proupalnih citokina (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12) i pospješila oslobađanje protuupalnog citokina IL-10 u serumu ublažavajući oštećenje debelog crijeva (Zhou i sur., 2019a).

Na slici 40 su prikazani rezultati ekspresije proupalnog citokina IL-6. Može se vidjeti da njegova koncentracija raste nakon dodatka gotovo svih BMK/biomolekula nakon inkubacije Caco-2 stanica samo u mediju, s time da je najveći porast zabilježen kod inkubacije sojem MB2 (slika 40a). Kod inkubacije Caco-2 stanica u mediju uz dodatak LPS-a, nije uočena značajnija promjena koncentracije IL-6 nakon dodatka sojeva BMK ili njihovih biomolekula (slika 40b). Slični su rezultati dobiveni i kod inkubacije Caco-2 stanica u mediju s TNF- $\alpha$  (slika 40c), uz izuzetak S-proteina soja MB20 koji je smanjio ekspresiju na 0. Također, slični su rezultati

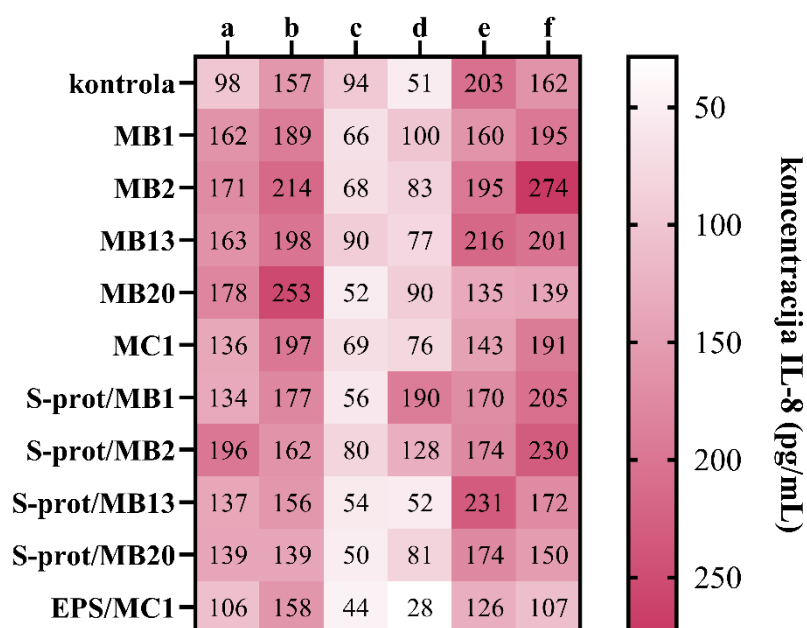
dobiveni nakon inkubacije Caco-2 stanica u mediju s LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  (slika 40d), uz izuzetak S-proteina sojeva MB1 i MB13 te EPS-a soja MC1 koji su smanjili ekspresiju na 0. S druge strane, istovremeni dodatak BMK/biomolekula te Caco-2 stanica tretiranih s TNF- $\alpha$  uzrokovao je povećanje koncentracije IL-6 nakon dodatka svih ispitivanih sojeva BMK te S-proteina iz sojeva MB1 i MB2 (slika 40e). Razina koncentracije IL-6 slična je nakon dodatka svih BMK i njihovih biomolekula nakon istovremene inkubacije Caco-2 stanica u mediju s TNF- $\alpha$  i LPS-om (slika 40f).



**Slika 40.** Utjecaj BMK i njihovih biomolekula na proizvodnju IL-6 u Caco-2 stanicama nakon uspostave monosloja u (a) mediju, (b) mediju s dodatkom LPS-a, (c) mediju s dodatkom TNF- $\alpha$  i (d) mediju s dodatkom LPS-a nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  te nakon uspostave monosloja, ali kada su Caco-2 stanice istovremeno bile izložene (e) djelovanju TNF- $\alpha$  i BMK/biomolekulama ili (f) TNF- $\alpha$ , LPS-u i BMK/biomolekulama kontrola – ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama

Slika 41 prikazuje rezultate ekspresije proupalnog citokina IL-8 u Caco-2 stanicama ovisno o različitim tretmanima. Može se vidjeti da njegova koncentracija raste nakon dodatka gotovo svih BMK/biomolekula nakon inkubacije Caco-2 stanica samo u mediju, osim kod dodatka EPS-a iz soja MC1 gdje nema promjene (slika 41a). Koncentracija IL-8 nakon inkubacije Caco-2 stanica u mediju uz dodatak LPS-a ne mijenja se značajno nakon dodatka BMK/biomolekula osim kod soja MB20 gdje je došlo do porasta koncentracije (slika 41b). Dodatak gotovo svih ispitivanih BMK/biomolekula uzrokovao je neznatan pad koncentracije IL-8 u Caco-2 stanica inkubiranih u mediju s TNF- $\alpha$ , pri čemu se najviše istaknuo EPS izoliran iz soja MC1 (slika 41c). Velika promjena nije uočena niti nakon inkubacije Caco-2 stanica u

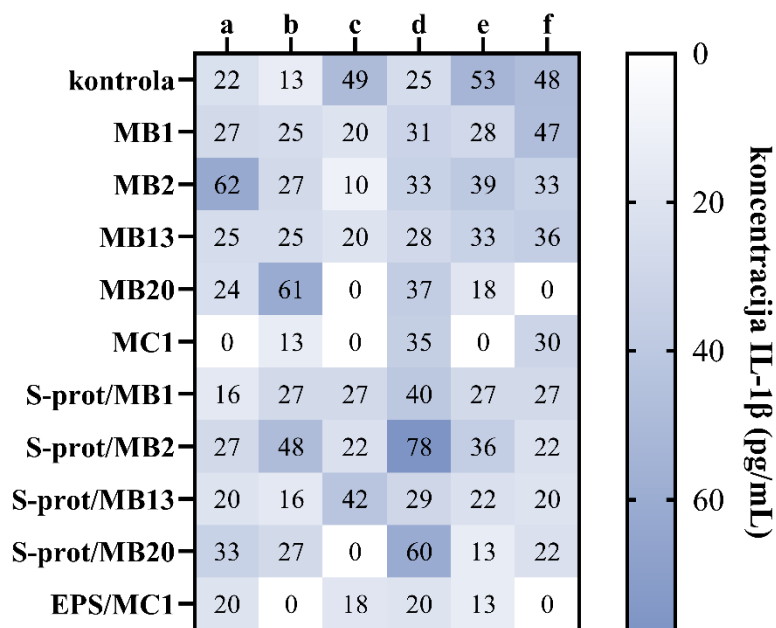
mediju s LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$ , osim nakon dodatka S-proteina iz soja MB1 te S-proteina iz sojeva MB1 i MB2 gdje je došlo do povećanja koncentracije IL-8, dok je nakon dodatka EPS-a iz soja MC1 došlo do pada koncentracije (slika 41d). Istovremeni dodatak gotovo svih ispitivanih BMK/biomolekula te Caco-2 stanica tretiranih s TNF- $\alpha$  uzrokovao je neznatan pad koncentracije IL-8, s time da se EPS iz soja MC1 najviše istaknuo (slika 41e). Razina koncentracije IL-8 raste nakon dodatka soja MB2 i njegovog S-proteina, a pada nakon dodatka EPS-a izoliranog iz soja MC1 (slika 41f), nakon istovremene inkubacije Caco-2 stanica u mediju s TNF- $\alpha$  i LPS-om.



**Slika 41.** Utjecaj BMK i njihovih biomolekula na proizvodnju IL-8 nakon inkubacije Caco-2 stanica u (a) mediju, (b) mediju s LPS-om, (c) mediju nakon predtretmana s TNF- $\alpha$ , (d) mediju s LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$ , te nakon istovremenog tretmana Caco-2 stanica s BMK/biomolekulama inkubiranim u (e) TNF- $\alpha$  i (f) TNF- $\alpha$  i LPS-u kontrola – ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama

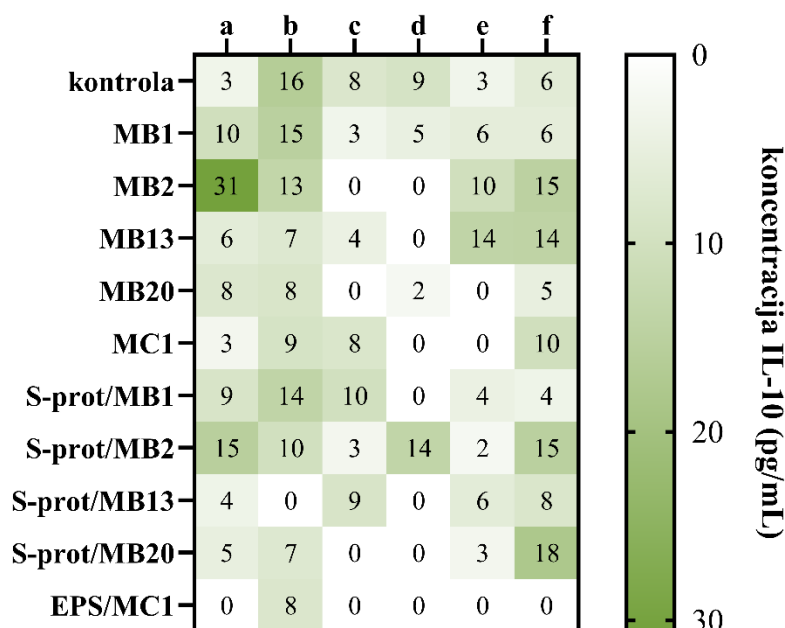
Slika 42 prikazuje rezultate ekspresije proupalnog citokina IL-1 $\beta$ . Može se vidjeti da se njegova koncentracija povećava nakon dodatka soja MB2, a smanjuje nakon dodatka soja MC1 u odnosu na kontrolu (slika 42a), nakon inkubacije Caco-2 stanica samo u mediju. Nakon inkubacije Caco-2 stanica u mediju uz dodatak LPS-a te naknadnog dodatka soja zabilježen je porast koncentracije proupalnog citokina IL-1 $\beta$ , dok je dodatak EPS-a iz soja MC1 smanjio koncentraciju na 0 (slika 42b). Inkubacija Caco-2 stanica u mediju s TNF- $\alpha$  nakon dodatka svih ispitivanih BMK/biomolekula smanjila je koncentraciju IL-1 $\beta$  u odnosu na kontrolu, s time da je dodatak sojeva MB20 i MC1 te S-proteina soja MB20 smanjio na 0 (slika 42c). Koncentracija IL-1 $\beta$  nakon inkubacije Caco-2 stanica u mediju s LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$  ne

mijenja se značajno nakon dodatka BMK/biomolekula osim kod S-proteina sojeva MB2 i MB20 gdje je došlo do porasta koncentracije (slika 42d). Istovremeni dodatak BMK/biomolekula te Caco-2 stanica tretiranih s TNF- $\alpha$  uzrokovao je smanjenje koncentracije IL-1 $\beta$  u odnosu na kontrolu, s time da je najveći pad zabilježen kod soja MC1 (slika 42e). Zabilježen je pad koncentracije IL-1 $\beta$  na 0 nakon dodatka soja MB20 i EPS-a soja MC1 (slika 42f), nakon istovremene inkubacije Caco-2 stanica u mediju s TNF- $\alpha$  i LPS-om.



**Slika 42.** Utjecaj BMK i njihovih biomolekula na proizvodnju IL-1 $\beta$  nakon inkubacije Caco-2 stanica u (a) mediju, (b) mediju s LPS-om, (c) mediju nakon predtretmana s TNF- $\alpha$ , (d) mediju s LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$ , te nakon istovremenog tretmana Caco-2 stanica s BMK/biomolekulama inkubiranim u (e) TNF- $\alpha$  i (f) TNF- $\alpha$  i LPS-u kontrola – ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama

Slika 43 prikazuje rezultate ekspresije protupalnog citokina IL-10 u Caco-2 stanicama ovisno o tretmanima. Može se vidjeti da je njegova koncentracija kod kontrole vrlo niska, dok je u većini slučajeva dodatak BMK/biomolekula uzrokovao povećanje koncentracije IL-10 u Caco-2 stanicama inkubiranim samo u mediju, s time da je najbolji učinak zabilježen nakon dodatka soja MB2 (slika 43a). U ostalim slučajevima (slika 43b-43f) nije uočena velika promjena u koncentraciji protuupalnog citokina IL-10.



**Slika 43.** Utjecaj BMK i njihovih biomolekula na proizvodnju IL-10 nakon inkubacije Caco-2 stanica u (a) mediju, (b) mediju s LPS-om, (c) mediju nakon predtretmana s TNF- $\alpha$ , (d) mediju s LPS-om nakon predtretmana s TNF- $\alpha$ , te nakon istovremenog tretmana Caco-2 stanica s BMK/biomolekulama inkubiranim u (e) TNF- $\alpha$  i (f) TNF- $\alpha$  i LPS-u kontrola – ekspresija kada Caco-2 stanice nisu izložene BMK/biomolekulama

Ovim eksperimentima je dokazano imunomodulacijsko djelovanje sojeva BMK i njihovih biomolekula, prvenstveno kroz modulaciju koncentracije proupalnih citokina. Dobiveni rezultati potvrđuju potencijalna probiotička svojstva ovih sojeva i njihovih biomolekula, a osobito se ističu soj *L. fermentum* MC1 te njegov EPS koji smanjuju ekspresiju ispitivanih proupalnih citokina.

#### 4.4. *In vivo* ispitivanje učinka soja *L. fermentum* MC1 i njegovog egzopolisaharida u modulaciji fekalnog mikrobioma i imunomodulaciji

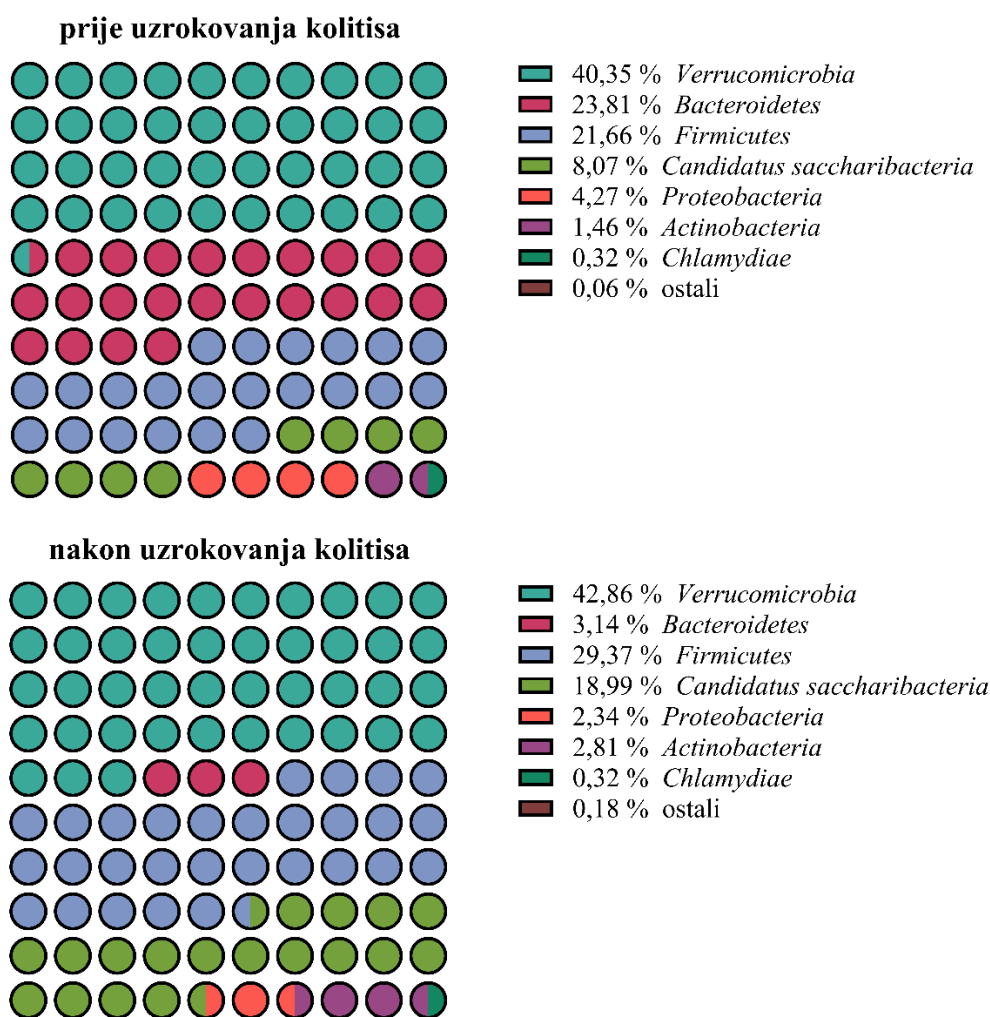
##### 4.4.1. Utjecaj na fekalnu mikrobiotu eksperimentalnih miševa

Među mikroorganizmima prisutnim u probavnom sustavu su oni s pozitivnim i oni s negativnim djelovanjem na čovjeka. Blagotvorni učinci mikroorganizama uključuju sprječavanje kolonizacije bakterija koje uzrokuju bolesti i sintetiziranje esencijalnih hranjivih tvari i vitamina (Martyniak i sur., 2021). S druge strane, crijevni mikrobiom se lako mijenja zbog promjene prehrane ili bolesti te može doći do crijevne disbioze, koja se očituje promjenom u sastavu crijevne mikrobiote, a koja je povezana s mnogim bolestima kao što su IBD, koji obuhvaća UC i Crohnovu bolest, i sindrom iritabilnog crijeva. UC je karakteriziran kroničnom, nespecifičnom upalom koja zahvaća kolorektalnu sluznicu te ima složenu, multifaktorijsku etiopatogenezu, uključujući genske čimbenike domaćina, okoliš i mikrobne čimbenike, koji

nisu u potpunosti razjašnjeni (Nishida i sur., 2018). Sve je više dokaza da poremećaji crijevne mikrobiote igraju važnu ulogu u patogenezi UC-a (Guo i sur., 2020). Veza između sastava crijevne mikrobiote i razvoja bolesti opsežno je proučavana, te su istraživanja dovela do razvoja mikrobnih i drugih strategija za promjenu njenog sastava, kao što je manipulacija prebiotcima, probiotcima, sinbiotcima, paraprobiotcima/postbiotcima i ekvivalentnim sintetskim proizvodima koji pozitivno utječu na imunski odgovor i upalu (Butorac i sur., 2023). Zbog toga je jedan od ciljeva doktorskog rada bio i ispitati ulogu probiotika, ali i egzopolisaharida kao potencijalne terapijske biomolekule, u održavanju homeostaze, te je u tu svrhu provedeno ispitivanje njihovih učinaka na sastav fekalne mikrobiote zdravih i bolesnih miševa *in vivo*. Najčešće se za mišji model kolitisa za izazivanje bolesti koristi DSS, kemijski kolitogen s antikoagulantnim svojstvima. DSS je vodotopiv, negativno nabijen polisaharid s vrlo promjenjivom molekulskom masom. Mehanizam kojim DSS izaziva upalu crijeva nije u potpunosti jasan, ali je vjerojatno rezultat oštećenja epitelnog monosloja koji oblaže debelo crijevo. DSS model kolitisa vrlo je popularan u istraživanju IBD-a zbog svog brzog djelovanja, jednostavnosti primjene, ponovljivosti i mogućnosti kontrole, a različiti modeli upale crijeva mogu se postići modificiranjem koncentracije DSS-a i učestalosti njegove primjene (Chassaing i sur., 2014). Stoga je provedeno *in vivo* ispitivanje učinka hranjenja potencijalnim probiotičkim sojem *Limosilactobacillus fermentum* MC1, te njegovim egzopolisaharidom, na fekalnu mikrobiotu zdravih i bolesnih miševa, u odnosu na miševe hranjene standardnom laboratorijskom hranom (kontrolni uzorak).

Na slici 44 su prikazane relativne zastupljenosti pojedinih bakterijskih koljena u uzorcima fecesa miševa prije i nakon izazivanja kolitisa. *Verrucomicrobia* (40,35 %), *Bacteroidetes* (23,81 %) i *Firmicutes* (21,66 %) su koljena s najvećom relativnom zastupljenošću u fecesima zdravih miševa (prije izazivanja kolitisa). Nakon izazivanja kolitisa je uočen značajan porast relativne zastupljenosti koljena *Candidatus saccharibacteria* s 8,07 na 18,99 % ( $p < 0,01$ ), čiji su predstavnici bakterije povezane s upalnim procesima i bolestima usne šupljine (Bor i sur., 2019; Lin i sur., 2016). Osim toga, može se vidjeti da je nakon izazivanja kolitisa kod miševa došlo do značajnog pada relativne zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* s 23,81 na 3,14 % ( $p < 0,0001$ ), među kojima su obično najzastupljenije bakterije iz roda *Bacteroides*, a ova pojava je uočena kod upalnih bolesti crijeva (Guo i sur., 2020). Zaključno, došlo je do promjena u relativnim zastupljenostima pojedinih bakterijskih koljena, što je bilo očekivano budući da je sastav crijevne mikrobiote uobičajeno promijenjen kod kolitisa (Sartor i Wu, 2017).

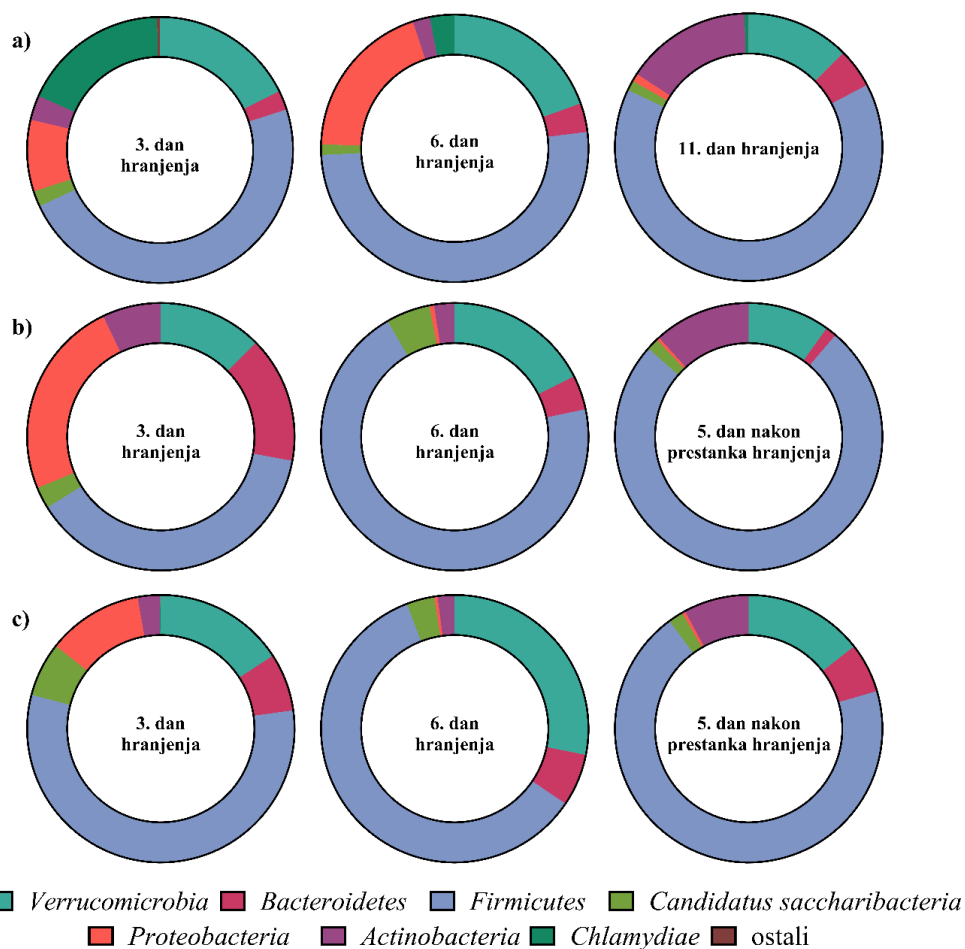




**Slika 44.** Relativna zastupljenost (%) bakterija na razini koljena u fecesima miševa prije i nakon izazivanja DSS-induciranog kolitisa

Nakon izazivanja kolitisa i hranjenja miševa standardnom laboratorijskom hranom (slika 45a), uočeno je statistički značajno smanjenje relativne zastupljenosti koljena *Verrucomicrobia* u svim vremenskim točkama provjere ( $p < 0,01$  za 3. dan,  $p < 0,01$  za 6. dan i  $p < 0,001$  za 11. dan nakon izazivanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja kolitisa), te statistički značajan porast relativne zastupljenosti koljena *Chlamydiae* 3. dan ( $p < 0,05$ ), kao i koljena *Proteobacteria* 6. dan ( $p < 0,01$ ), nakon izazivanja kolitisa. Dobiveni rezultati ukazuju na to da hranjenje miševa standardnom laboratorijskom hranom nakon izazivanja kolitisa ne poboljšava sastav crijevne mikrobiote budući da je uočen pad relativne zastupljenosti koljena *Verrucomicrobia*, uobičajeno zastupljenog u velikom udjelu u mikrobioti zdravih ljudi (Rinninella i sur., 2019), te porast *Chlamydiae* i *Proteobacteria* koji negativno utječu na zdravlje domaćina tako što izazivaju različite gastrointestinalne i metaboličke poremećaje i bolesti (de Vos i sur., 2022; Sixt, 2021). Nakon izazivanja kolitisa i hranjenja miševa s potencijalnim probiotičkim sojem *L. fermentum* MC1 (slika 45b), uočeno je statistički značajno

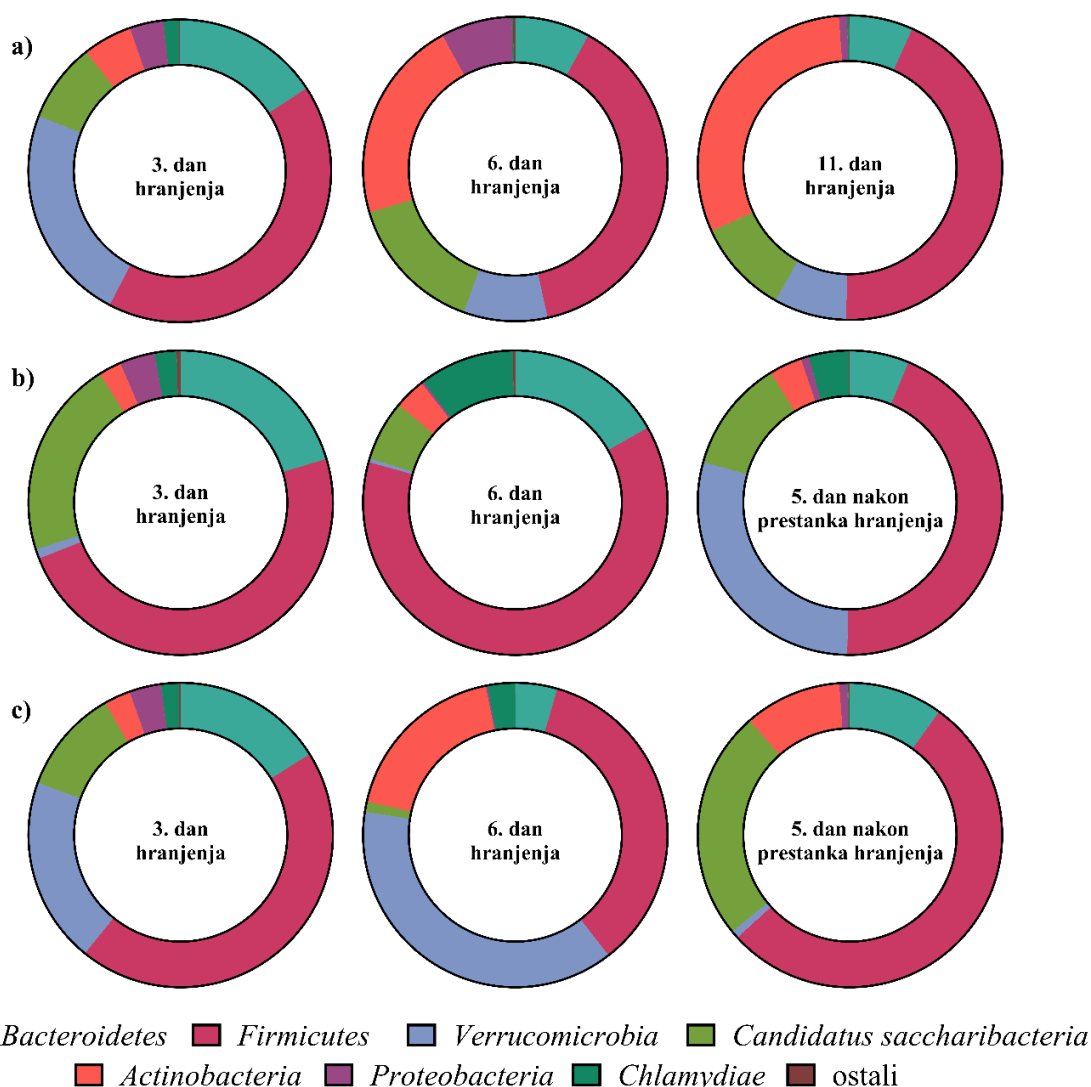
smanjenje relativne zastupljenosti koljena *Candidatus saccharibacteria* ( $p < 0,0001$ ) i *Chlamydiae* u svim vremenskim točkama provjere ( $p < 0,01$ ) u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa. S druge strane, uočen je statistički značajan porast relativne zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* 3. dan nakon početka hranjenja ( $p < 0,005$ ), *Actinobacteria* 5. dan nakon prestanka hranjenja ( $p < 0,05$ ) te *Firmicutes* 6. dan nakon početka ( $p < 0,001$ ) i 5. dan nakon prestanka ( $p < 0,001$ ) hranjenja sa sojem *L. fermentum* MC1. Dobiveni rezultati idu u korist pretpostavci da se soj producent egzopolisaharida *L. fermentum* MC1, izoliran iz majčinog mlijeka, može koristiti kao probiotik, budući da je njegova primjena kod miševa uzrokovala promjenu sastava mikrobiote fecesa miševa s izazvanim kolitisom, tako što se povećala relativna zastupljenost koljena koji sudjeluju u održavanju homeostaze, a smanjila relativna zastupljenost onih bakterijskih koljena čija je zastupljenost povećana kod raznih bolesti. Nakon induciranja kolitisa i hranjenja miševa izoliranim egzopolisaharidom, kojeg proizvodi soj *L. fermentum* MC1 (slika 45c), uočeno je statistički značajno povećanje relativne zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* nakon 6. dana hranjenja ( $p < 0,05$ ), *Firmicutes* u svim vremenskim točkama provjere ( $p < 0,001$  za 3. dan hranjenja,  $p < 0,005$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,001$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja EPS-ima) i *Actinobacteria* 5. dan nakon prestanka hranjenja ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na njihovu zastupljenost prije primjene EPS-a. S druge strane, uočeno je statistički značajno smanjenje relativne zastupljenosti koljena *Candidatus saccharibacteria* i *Chlamydiae* u svim vremenskim točkama provjere ( $p < 0,001$  za 3. dan hranjenja,  $p < 0,001$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,001$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja, odnosno  $p < 0,002$  za 3. dan hranjenja,  $p < 0,002$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,002$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja) te *Proteobacteria* 6. dan nakon početka ( $p < 0,01$ ) i 5. dan nakon prestanka ( $p < 0,01$ ) hranjenja u odnosu na zastupljenost nakon izazivanja kolitisa. Ovi pozitivni rezultati potvrđuju mogućnost uporabe egzopolisaharida kao prebiotika te ukazuju na njegovu pozitivnu ulogu na zdravlje domaćina. Eksperimentalni rezultati utjecaja hranjenja miševa s induciranim kolitisom sa sojem *Lactiplantibacillus plantarum* D13 na njihovu crijevnu mikrobiotu, pokazuju statistički značajan porast relativne zastupljenosti koljena *Firmicutes* te smanjenje udjela bakterijskog koljena *Candidatus saccharibacteria* u odnosu na sastav crijevne mikrobiote prije hranjenja ovim potencijalnim probiotičkim sojem producentom bakteriocina (Butorac i sur., 2023). Dobiveni rezultati ukazuju na njegov pozitivan učinak na modulaciju fekalne mikrobiote, koji se razlikuje od pozitivnog učinka postignutim sa sojem MC1, producentom egzopolisaharida, te samim egzopolisaharidima.



**Slika 45.** Relativna zastupljenost (%) bakterija na razini koljena u fecesima miševa s izazvanim kolitisom a) 3., 6., i 11. dan hranjenja standardnom laboratorijskom hranom (kontrola), te 3. i 6. dan hranjenja i 5. dan nakon prestanka hranjenja sa b) sojem *L. fermentum* MC1 i c) EPS-ima iz *L. fermentum* MC1

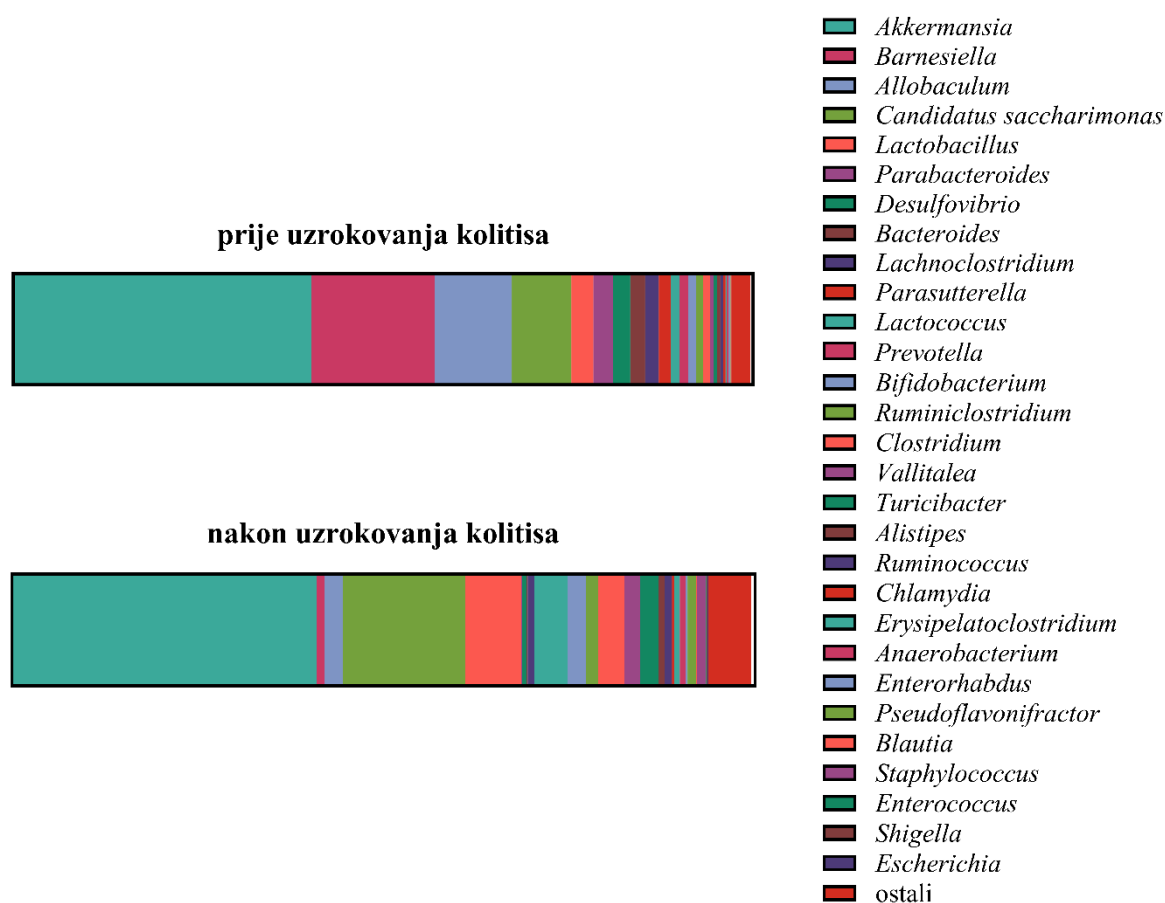
Provedena je i usporedba rezultata *in vivo* ispitivanja učinka hranjenja potencijalnim probiotičkim sojem *Limosilactobacillus fermentum* MC1 ili s njegovim egzopolisaharidom na sastav fekalne mikrobiote zdravih miševa, u odnosu na miševe hranjene standardnom laboratorijskom hranom (kontrolni uzorak). Iz slike 46a se može vidjeti da koljena *Bacteroidetes* i *Firmicutes* čine većinu mikrobiote fecesa zdravih miševa, što je u skladu s očekivanjima budući da se pokazalo da oni dominiraju crijevnom mikrobiotom zdravih ljudi (Nishida i sur., 2018). Osim toga, kod zdravih miševa hranjenih standardnom laboratorijskom hranom uočen je značajan pad relativne zastupljenosti koljena *Bacteroidetes* u svim vremenskim točkama provjere ( $p < 0,01$  za 3. dan,  $p < 0,001$  za 6. dan te  $p < 0,001$  za 11. dan hranjenja) u odnosu na početak hranjenja. Kod hranjenja zdravih miševa potencijalnim probiotičkim sojem *L. fermentum* MC1 (slika 46b), uočen je značajan porast relativne zastupljenosti koljena *Firmicutes* u svim vremenskim točkama provjere ( $p < 0,05$  za 3. dan

hranjenja,  $p < 0,001$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,05$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja) te koljena *Verrucomicrobia* 5. dan nakon prestanka hranjenja ( $p < 0,05$ ) u odnosu na prije početka hranjenja. S druge strane, uočen je značajan pad relativne zastupljenosti koljena *Candidatus saccharibacteria* nakon 6. dana hranjenja ( $p < 0,01$ ). Kod hranjenja zdravih miševa egzopolisaharidom kojeg proizvodi potencijalni probiotički soj *L. fermentum* MC1 (slika 46c), uočen je značajan porast relativne zastupljenosti koljena *Firmicutes* ( $p < 0,05$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,001$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja), *Verrucomicrobia* ( $p < 0,01$ ) i *Actinobacteria* ( $p < 0,01$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,05$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja) u odnosu na prije početka hranjenja. S druge strane, uočen je značajan pad relativne zastupljenosti koljena *Candidatus saccharibacteria* nakon 6. dana hranjenja ( $p < 0,0001$ ).



**Slika 46.** Relativna zastupljenost (%) bakterija na razini koljena u fecesima zdravih miševa a) 3., 6., i 11. dan hranjenja standardnom laboratorijskom hranom (kontrola), te 3. i 6. dan hranjenja i 5. dan nakon prestanka hranjenja sa b) sojem *L. fermentum* MC1 i c) EPS-ima iz *L. fermentum* MC1

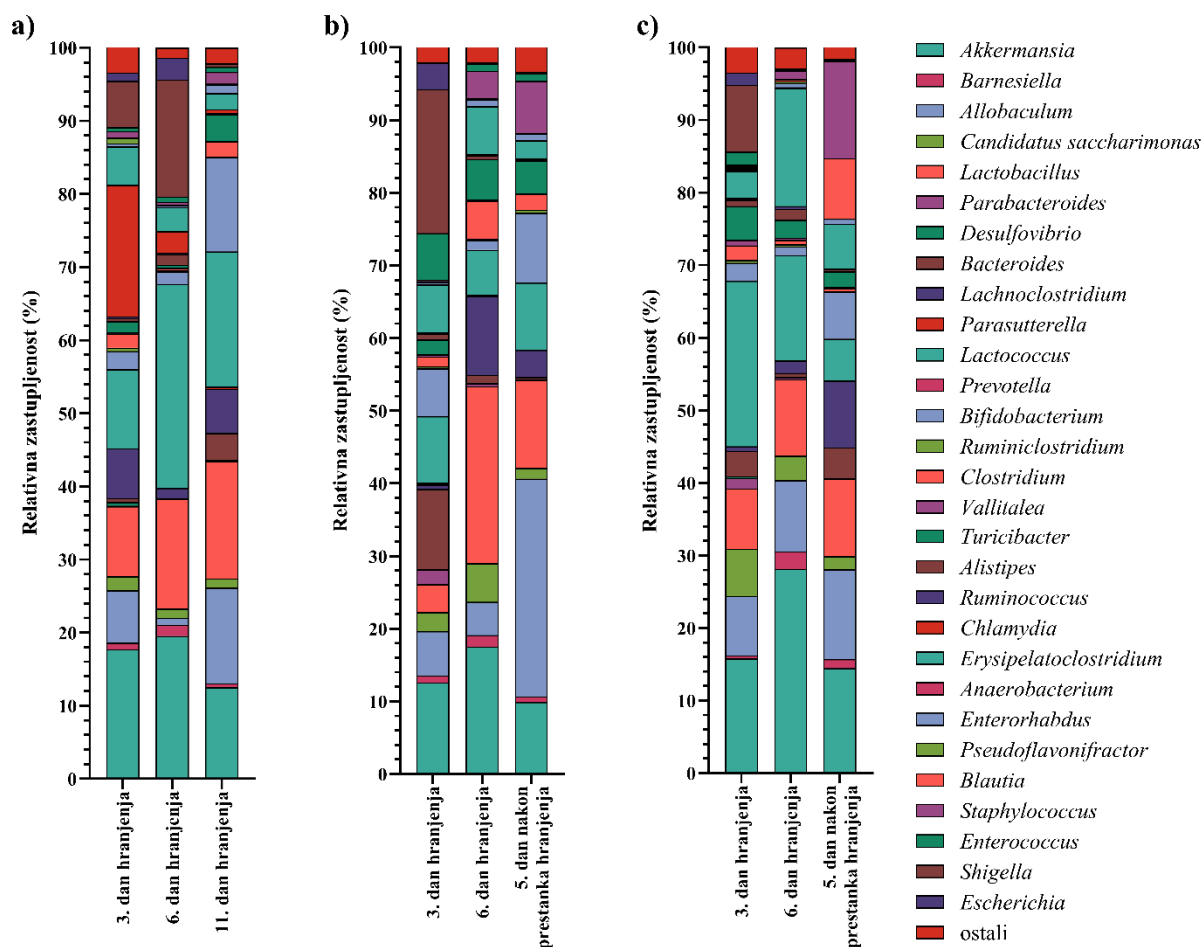
Što se tiče relativne zastupljenosti na razini roda, u obzir su uzeti samo oni s relativnom zastupljenosti većom od 1 % (29 rodova) bar u jednoj vremenskoj točki provjere, dok su ostali ubrojani u kategoriju “ostali” (106 rodova). Na slici 47 su prikazane relativne zastupljenosti rodova zabilježenih u uzorcima fecesima miševa prije i nakon izazivanja kolitisa. Uočeno je značajno smanjenje relativne zastupljenosti rodova *Barnesiella* ( $p < 0,0001$ ), *Allobaculum* ( $p < 0,01$ ), *Bacteroides* ( $p < 0,0001$ ), *Prevotella* ( $p < 0,0001$ ), *Turicibacter* ( $p < 0,01$ ) i *Parasutterella* ( $p < 0,0001$ ), koji su uobičajeno nastanjeni u GIT-u te za koje se smatra da imaju pozitivan utjecaj na zdravlje domaćina (Lynch i sur., 2023; Melamed i sur., 2022; Tett i sur., 2021; Wang i sur., 2021; Zhu i sur., 2021; Ju i sur., 2019), te značajan porast rodova *Staphylococcus* ( $p < 0,01$ ), *Shigella* ( $p < 0,001$ ) i *Clostridium* ( $p < 0,01$ ), koji su povezani s brojnim bolestima (Banzragh i sur., 2023; Halimeh i sur., 2021; Smits i sur., 2016).



**Slika 47.** Relativna zastupljenost (%) bakterija na razini roda u fecesima miševa prije i nakon izazivanja DSS-induciranog kolitisa

Hranjenje bolesnih miševa standardnom laboratorijskom hranom (slika 48a) dovelo je do smanjenja relativne zastupljenosti rodova *Akkermansia* ( $p < 0,05$  za 3. dan,  $p < 0,05$  za 6. dan i  $p < 0,01$  za 11. dan nakon uzrokovanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja kolitisa), *Allobaculum* ( $p < 0,05$  za 6. dan nakon uzrokovanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja

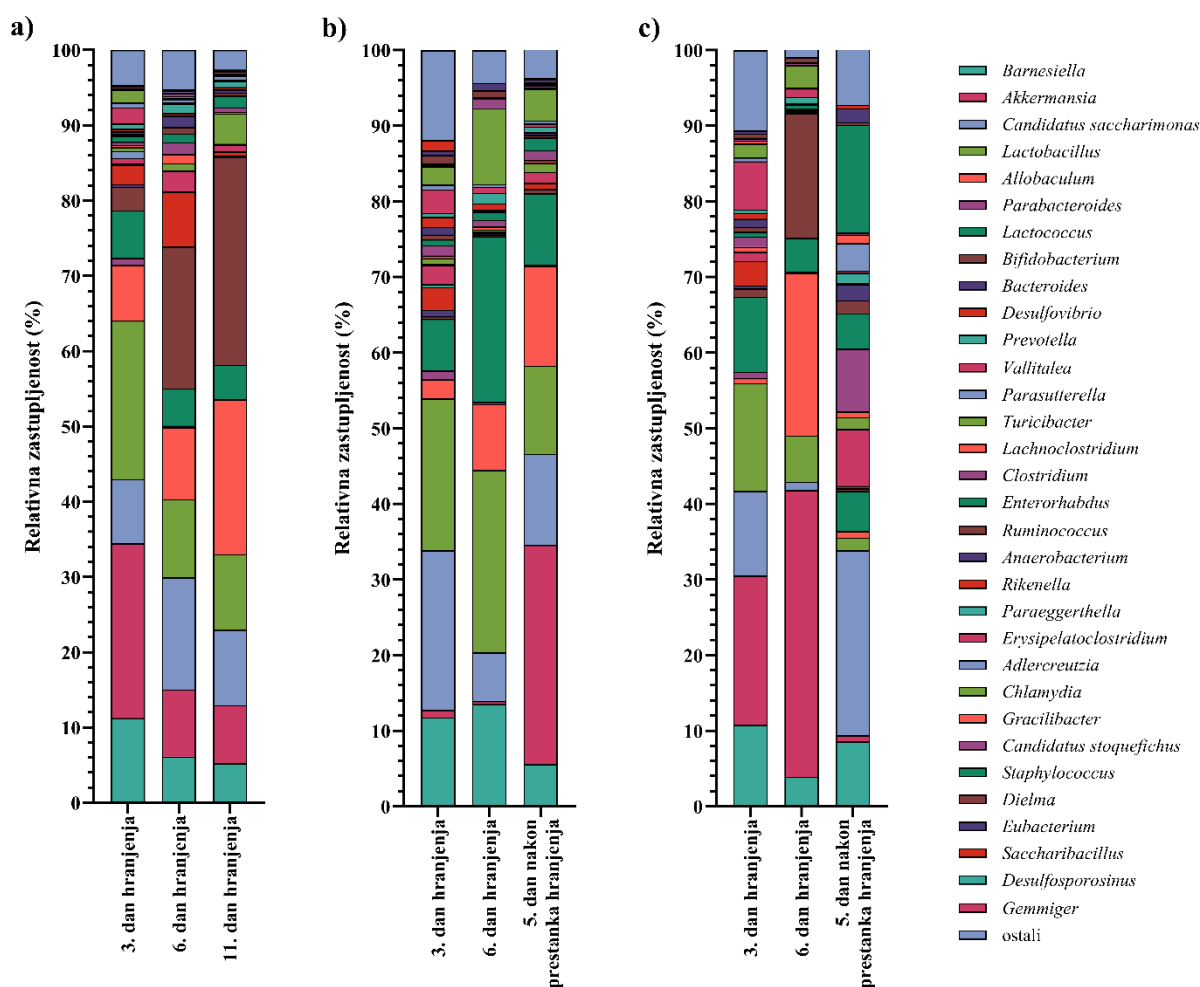
kolitisa), *Turicibacter* ( $p < 0,01$  za 6. dan nakon uzrokovanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja kolitisa), *Alistipes* ( $p < 0,05$  za 11. dan nakon uzrokovanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja kolitisa), *Blautia* ( $p < 0,05$  za 6. dan nakon uzrokovanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja kolitisa) i *Ruminococcus* ( $p < 0,01$  za 3. dan,  $p < 0,01$  za 6. dan i  $p < 0,001$  za 11. dan nakon izazivanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja kolitisa) te porasta *Chlamydiae* ( $p < 0,05$  za 3. dan nakon uzrokovanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja kolitisa) i *Shigella* ( $p < 0,01$  za 6. dan i  $p < 0,05$  za 11. dan nakon uzrokovanja kolitisa u odnosu na prvi dan uzrokovanja kolitisa). Hranjenje bolesnih miševa sojem *L. fermentum* MC1 dovelo je do promjene relativne zastupljenosti rodova prisutnih u uzorcima fecesa miševa (slika 48b). Uočen je značajan porast relativne zastupljenosti rodova *Allobaculum* ( $p < 0,0001$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa), *Lactobacillus* ( $p < 0,0001$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,05$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa), *Bacteroides* ( $p < 0,01$  za 3. dan hranjenja i  $p < 0,05$  za 6. dan hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa), *Lactococcus* ( $p < 0,05$  za 3. dan hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa) i *Turicibacter* ( $p < 0,01$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,01$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa) te pad relativne zastupljenosti rodova *Desulfovibrio* ( $p < 0,05$  za sve ispitivane vremenske točke), *Chlamydia* ( $p < 0,01$  za sve ispitivane vremenske točke), *Candidatus saccharibacteria* ( $p < 0,01$  za 3. dan hranjenja,  $p < 0,05$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,01$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa) i *Staphylococcus* ( $p < 0,01$  za 3. dan hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa). Hranjenje bolesnih miševa egzopolisaharidom dovelo je do promjene relativne zastupljenosti rodova prisutnih u uzorcima fecesa miševa (slika 48c). Uočen je značajan porast relativne zastupljenosti rodova *Allobaculum* ( $p < 0,001$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,0001$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa), *Bifidobacterium* ( $p < 0,01$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa), *Alistipes* ( $p < 0,05$  za 6. dan hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa) i *Lactococcus* ( $p < 0,01$  za 3. dan i  $p < 0,0001$  za 6. dan hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa) te pad relativne zastupljenosti rodova *Desulfovibrio* ( $p < 0,05$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,05$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa), *Candidatus saccharibacteria* ( $p < 0,05$  za 3. dan hranjenja,  $p < 0,01$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,01$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa), *Staphylococcus* ( $p < 0,01$  za 3. dan hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa) i *Chlamydia* ( $p < 0,01$  za sve ispitivane vremenske točke).



**Slika 48.** Relativna zastupljenost (%) bakterija na razini roda u fecesima miševa s izazvanim kolitisom a) 3., 6., i 11. dan hranjenja standardnom laboratorijskom hranom (kontrola), te 3. i 6. dan hranjenja i 5. dan nakon prestanka hranjenja sa b) sojem *L. fermentum* MC1 i c) EPS-ima iz *L. fermentum* MC1

Što se tiče relativne zastupljenosti rodova zdravih miševa hranjenih standardnom mišjom hranom te sojem *L. fermentum* MC1 ili egzopolisaharidom, u obzir su uzeti samo oni s relativnom zastupljenosti većom od 1 % (30 rodova) bar u jednoj točki provjere, dok su ostali ubrojani u kategoriju “ostali” (103 roda). Kod hranjenja zdravih miševa standardnom hranom (slika 49a), uočen je značajan pad relativne zastupljenosti rodova *Barnesiella* ( $p < 0,05$  za 3. dan,  $p < 0,01$  za 6. dan te  $p < 0,001$  za 11. dan hranjenja), *Prevotella* ( $p < 0,05$  za sve ispitivane vremenske točke) i *Parasutterella* ( $p < 0,05$  za 6. dan te  $p < 0,05$  za 11. dan hranjenja). Kod hranjenja zdravih miševa sojem *L. fermentum* MC1 (slika 49b), uočen je značajan porast relativne zastupljenosti rodova *Akkermansia* ( $p < 0,05$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja), *Lactobacillus* ( $p < 0,01$  za 3. dan i  $p < 0,01$  za 6. dan hranjenja), *Lactococcus* ( $p < 0,01$  za 6. dan hranjenja) te *Eubacterium* ( $p < 0,05$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,01$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja) u odnosu na prije početka hranjenja. Kod hranjenja zdravih miševa egzopolisaharidom (slika 49c), uočen je porast relativne zastupljenosti rodova *Akkermansia* ( $p$

< 0,01 za 6. dan hranjenja), *Allobaculum* ( $p < 0,01$  za 6. dan hranjenja), *Bifidobacterium* ( $p < 0,01$  za 6. dan hranjenja), *Ruminococcus* ( $p < 0,001$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja) te *Eubacterium* ( $p < 0,01$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja) u odnosu na prije početka hranjenja, dok je uočen pad relativne zastupljenosti roda *Bacteroides* ( $p < 0,01$  za 3. dan hranjenja,  $p < 0,001$  za 6. dan hranjenja te  $p < 0,001$  za 5. dan nakon prestanka hranjenja u odnosu na nakon uzrokovanja kolitisa).

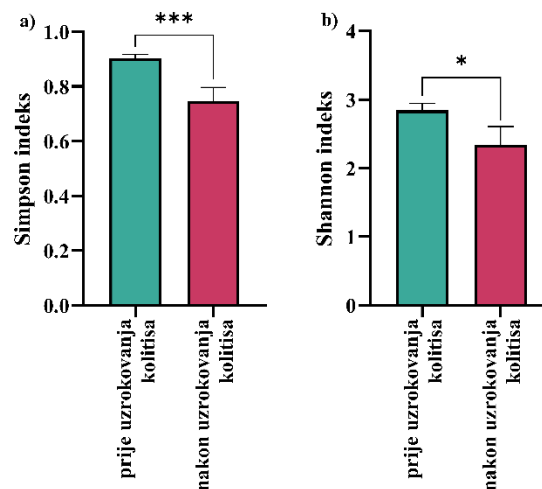


**Slika 49.** Relativna zastupljenost (%) bakterija na razini roda u fecesima zdravih miševa a) 3., 6., i 11. dan hranjenja standardnom laboratorijskom hranom (kontrola), te 3. i 6. dan hranjenja i 5. dan nakon prestanka hranjenja sa b) sojem *L. fermentum* MC1 i c) EPS-ima iz *L. fermentum* MC1

Poznato je da mikrobiota ima važnu ulogu u održavanju homeostaze kod ljudi i životinja, ali veća raznolikost bakterijskih vrsta ne mora nužno biti poželjnija (Reese i Dunn, 2018). Primjenom PAST softvera je određena  $\alpha$ -raznolikost u uzorcima fecesa prije i nakon izazivanja kolitisa (slika 50) kako bi se procijenila mikrobna raznolikost na temelju odnosa između bogatstva (broj taksonomskih skupina) i ujednačenosti (raspodjela obilja skupina).



Stoga, procijenjena je mikrobna raznolikost uzoraka fecesa bolesnih i zdravih miševa hranjenih *L. fermentum* MC1 i njegovim EPS-ima iz promatranih OTU-a izraženih Simpsonovim (slika 50a) i Shannonovim indeksom (slika 50b). Iz rezultata se može vidjeti da je tretman DSS-om uzrokovao značajno smanjenje  $\alpha$ -raznolikosti izraženu i kao Simpson indeks ( $p < 0,001$ ) i kao Shannon indeks ( $p < 0,05$ ). Razlike u korištenim indeksima su te što je kod Simpson indeksa veći naglasak na ujednačenosti, dok je kod Shannon indeksa veći na bogatstvu. Budući da ove vrijednosti indeksa izravno odražavaju mikrobnu raznolikost (Butorac i sur., 2023), rezultati upućuju na značajan gubitak mikrobnog bogatstva u skupini miševa s DSS-induciranim kolitisom uslijed pojave crijevne disbioze što je u skladu s istraživanjima drugih autora koji su kolitis kod miševa uzrokovali istim kemijskim tretmanom (Zhang i sur., 2019; Munyaka i sur., 2016). Također, manja raznolikost u ovom slučaju se poklapa s teorijom Kers i Saccenti (2022) koji su ustanovili da je manja raznolikost povezana sa slabije razvijenim imunološkim sustavom te pojavom bolesti. Slične rezultate su dobili i Butorac i sur. (2023) koji su dokazali da je  $\alpha$ -raznolikost u obliku Simpsonovog i Shannonovog indeksa značajno povećana u modelu zdravih miševa u usporedbi s miševima s DSS-induciranim kolitisom, što se može povezati s gubitkom bogatstva bakterijskih vrsta uzrokovano tretmanom s DSS-om.

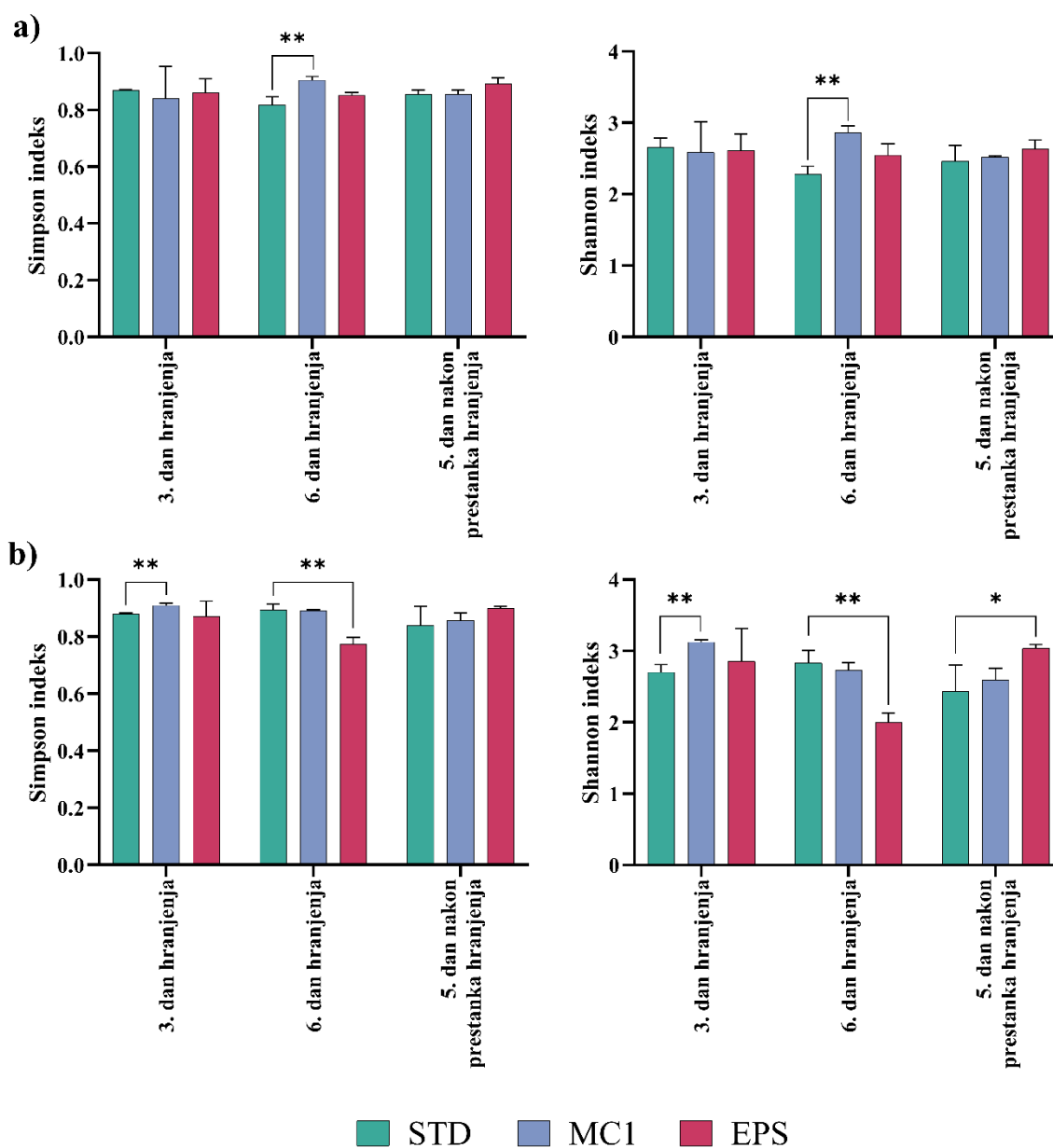


**Slika 50.**  $\alpha$ -raznolikost prije i nakon uzrokovanja kolitisa prikazana a) “Simpson” i b) “Shannon” metrikom

\*Statistički značajno različito (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

Osim toga, određena je i  $\alpha$ -raznolikost u uzorcima fecesa uzetih u različitim vremenskim točkama zdravih i bolesnih miševa ovisno o tretmanu (slika 51). Što se tiče miševa s izazvanim kolitisom (slika 51a), 6. dan hranjenja sojem *L. fermentum* MC1 uzrokovao je statistički značajno povećanje mikrobne raznolikosti u uzorcima fecesa, što se očitivalo povećanjem Simpson ( $p < 0,01$ ) i Shannon ( $p < 0,01$ ) indeksa u odnosu na miševe hranjene standardnom

laboratorijskim hranom. Što se tiče zdravih miševa (slika 51b), 3. dan hranjenja sojem *L. fermentum* MC1 uzrokovao je statistički značajno povećanje Simpson ( $p < 0,01$ ) i Shannon ( $p < 0,01$ ) indeksa u odnosu na miševe hranjene standardnom laboratorijskim hranom, dok je 5. dan nakon prestanka hranjenja EPS-ima iz soja MC1 povećao samo Shannon indeks ( $p < 0,05$ ). S druge strane, 6. dan hranjenja EPS-ima iz soja MC1 uzrokovao je statistički značajno smanjenje mikrobne raznolikosti u uzorcima fecesa, što se očitivalo smanjenjem Simpson ( $p < 0,01$ ) i Shannon ( $p < 0,01$ ) indeksa u odnosu na miševe hranjene standardnom laboratorijskim hranom.



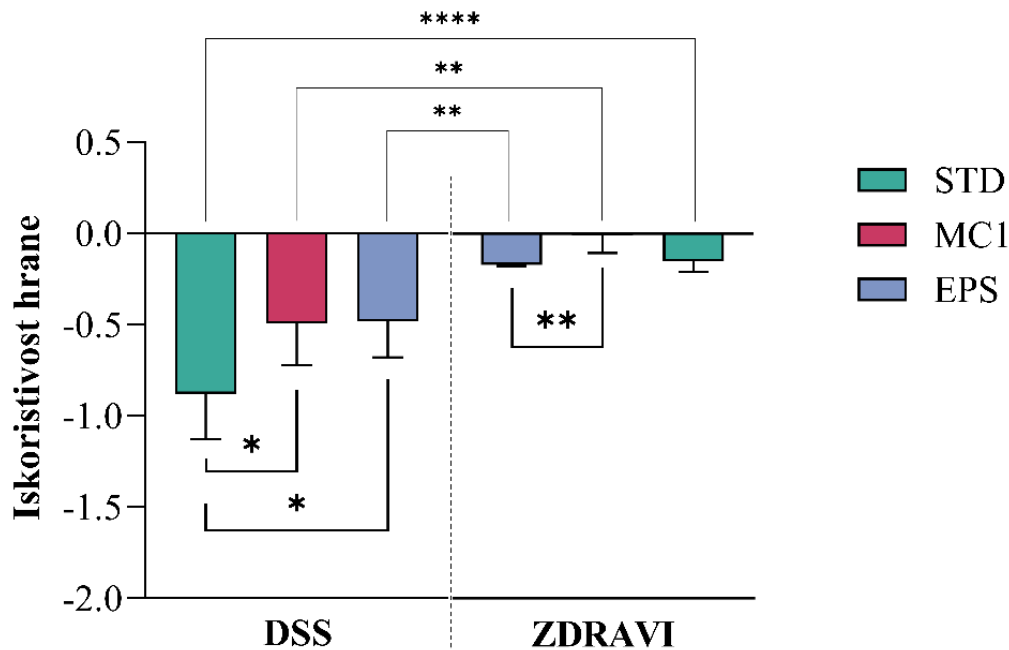
**Slika 51.**  $\alpha$ -raznolikost a) bolesnih i b) zdravih miševa kroz različite vremenske točke hranjenja prikazana “Simpson” (lijevo) i “Shannon” (desno) metrikom

\*Statistički značajno različito ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )

#### 4.4.2. Imunomodulacijski učinak hranjenja sojem *L. fermentum* MC1 i njegovim EPS-ima na upalne procese u crijevima

Osim metagenomičkih analiza kojima se htjela ispitati modulacija fekalne mikrobiote zdravih i bolesnih miševa, provedene su i imunološke metode kako bi se utvrdio utjecaj primjene probiotičkog soja *L. fermentum* MC1 ili egzopolisaharida na imunomodulacijski učinak na upalne procese u crijevima i regeneraciju crijevne sluznice miševa kojima je izazvana upalna bolest crijeva.

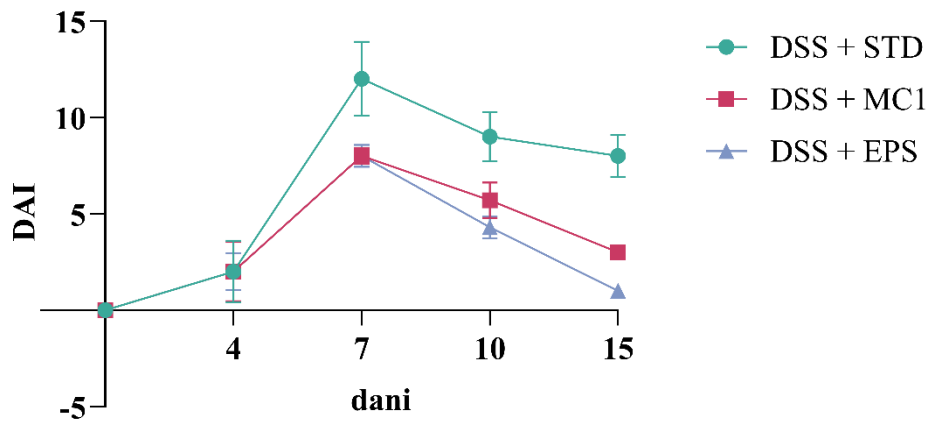
Nakon izazivanja kolitisa petodnevnom primjenom 3 % w/v DSS-a, pratio se razvoj kolitisa te se pokazalo da je došlo do pojave kliničkih simptoma sličnih kao kod ljudskog oblika bolesti. Tijekom indukcije kolitisa i tijekom pokusa praćena je količina unosa hrane i gubitka težine kako bi se vidjele promjene u apetitu i omjeru iskoristivosti hrane s obzirom na unos hrane, koje su ustanovljene i bile su slične, i kod ženki i kod mužjaka, a rezultati su prikazani za mužjake (slika 52). Vidljiva je nešto slabija iskoristivost hrane u skupini bolesnih mužjaka hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (DSS) u odnosu na bolesne mužjake hranjene egzopolisaharidom (DSS+EPS) ili probiotikom (DSS+MC1). Također, primjenom DSS otopine, odnosno napredovanjem upalnog procesa, zabilježen je pad tjelesne mase kod svih ispitivanih skupina životinja (prilog 5), što ukazuje na oštećenje sluznice i smanjenje absorpcije hranjivih tvari. Također, zabilježen je statistički veći pad tjelesne mase svih ispitivanih skupina u odnosu na iste skupine zdravih miševa. Min i sur. (2020) su pokazali da primjenom egzopolisaharida izoliranih iz soja *Lactobacillus plantarum* YW11 dolazi do manjeg smanjenja težine kod tretiranih skupina u odnosu na netretirane. Naši rezultati su u suglasju s navedenim rezultatima budući da je uočen znatno veći gubitak težine i smanjena iskoristivost hrane na kraju pokusa kod skupine miševa tretiranih samo s DSS-om u odnosu na skupine tretirane s vodenom suspenzijom probiotičkog soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1 i njegovih egzopolisaharida. Osim toga, iskoristivost hrane je bolja kod zdravih miševa u usporedbi s istim skupinama bolesnih miševa, što je i bilo za očekivati.



**Slika 52.** Iskoristivost hrane u miševa s DSS-induciranim kolitisom i zdravih miševa hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (STD) sa i bez dodatka soja *L. fermentum* MC1 (MC1) ili njegovih egzopolisaharida (EPS)

\*Statistički značajno različito (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Osim iskoristivosti hrane, određen je i DAI na temelju praćenih parametara težine, konzistencije stolice i prisutnosti krvi u fecesu i anusu. Kod svih skupina je došlo do smanjenja težine te je zabilježena pojava krvi u stolici i promjena konzistencije stolice. U skladu s očekivanjima, DAI se povećavao s napredovanjem upale i pogoršanjem kliničke slike. Iako je obrada s vodenom suspenzijom probiotičkog soja *L. fermentum* MC1 imala pozitivan učinak na usporavanje razvoja bolesti i oporavak nakon izazivanja kolitisa, obrada s njegovim EPS-ima je imala još bolji učinak budući da je DAI bio najmanji (slika 53). Butorac i sur. (2023) su također odredili DAI miševa tretiranih DSS-om, ali hranjenjih sojem *L. plantarum* D13, te je on iznosio  $6,00 \pm 1,20$  na dan žrtvovanja čime se ustanovilo da je došlo do smanjenja upalnog procesa u odnosu na kontrolnu skupinu hranjenu standardnom laboratorijskom hranom. Usporedbom s rezultatima dobivenim hranjenjem sojem MC1 te njegovim EPS-om, može se uočiti statistički značajno smanjenje DAI u odnosu na D13, ali je ipak hranjenje EPS-om imalo najpozitivniji utjecaj na usporavanje razvoja upale uzrokovane DSS-om.



**Slika 53.** Indeks aktivnosti bolesti (DAI) tijekom 15 dana kod miševa s DSS-induciranim kolitisom hranjenih standardnom laboratorijskom hranom (DSS + STD) sa i bez dodatka soja *L. fermentum* MC1 (DSS + MC1) ili njegovih egzopolisaharida (DSS + EPS)

Kod IBD-a, u koji se ubraja UC, jedna od najčešćih ekstraintestinalnih sistemskih komplikacija je anemija (Bergamaschi i sur., 2023). Dva najčešća tipa anemije koji se javljaju su anemija zbog nedostatka željeza te anemija kronične bolesti. Anemija zbog nedostatka željeza javlja se zbog kroničnih krvarenja te smanjenog unosa i apsorpcije željeza. Anemija kronične bolesti uzrokovana je povišenim koncentracijama proupalnih citokina u krvi koji uzrokuju sekvestraciju željeza u makrofagima posredovanu hepcidinom, inhibiciju eritropoeze u koštanoj srži, supresiju proizvodnju eritropoetina i pojačanu eritrofagocitozu (Uspenskiy i sur., 2022). Hepcidin je peptid koji se sintetizira u jetri te se veže za ferroportin, uzrokuje njegovu razgradnju i time sprječava apsorpciju željeza iz enterocita i iz makrofaga, a njegovu proizvodnju simuliraju proupalni citokini (Nemeth i Ganz, 2023). Kako bi se ispitao utjecaj primjene soja MC1 ili EPS-a u očuvanju sluznice i apsorbcije željeza te sprječavanja razvoja anemije kao posljedice UC-a, provedena je hematološka analiza krvi te je u tu svrhu muškim miševima kojima je uzrokovan kolitis i zdravim miševima uzeta krv 24 sata nakon zadnje primjene soja MC1 ili EPS-a, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 12. Kod skupine bolesnih miševa tretiranih EPS-om (DSS + EPS) vidi se statistički značajno povećanje broja eritrocita ( $p < 0,01$ ), koncentracije hemoglobina ( $p < 0,01$ ) i postotka hematokrita ( $p < 0,01$ ) u krvi u odnosu na skupinu koja je tretirana samo DSS-om (DSS + STD). Prema dobivenim podacima, EPS-i mogu smanjiti anemiju kod UC-a što ukazuje da EPS-i imaju povećanu antioksidacijsku sposobnost, ali i smanjuju oštećenje sluznice te posljedično povećavaju apsorbciju željeza iz enterocita. U skupini bolesnih miševa tretiranih probiotikom (DSS + MC1) uočeno je statistički značajno smanjenje jedino MCH ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu tretiranu samo DSS-om, što ukazuje na nedostatnu apsorbciju željeza. Međutim, s obzirom da su svi drugi hematopoetski parametri nešto viši u skupini tretiranoj probiotikom u odnosu na DSS

skupinu, samo smanjenje MCH ne ukazuje na ozbiljni poremećaj anemije. Ipak treba istaknuti da obrada s EPS-om pokazuje više hematopoetske vrijednosti u odnosu na MC1, posebice znatno višu razinu hemoglobina ( $p < 0,01$ ). Što se tiče zdravih miševa, statistički značajan porast vidljiv je u koncentraciji trombocita ( $p < 0,01$ ) u skupini tretiranoj s EPS-ima u odnosu na miševе hranjene standardnom hranom, ali je i dalje bio u granicama referentnog intervala ( $158 - 424 \cdot 10^9/L$ ) dok je kod miševa hranjenih standardnom hranom koncentracija bila ispod donje granice (prilog 6).

**Tablica 12.** Hematološki pokazatelji u miševa s DSS-izazvanim kolitisom

Hematološki pokazatelji	DSS + STD	DSS+MC1	DSS+EPS
<b>Eritrociti (<math>10^{12}/L</math>)</b>	1,81 ± 0,12	1,92 ± 0,20	2,23 ± 0,14**
<b>Leukociti (<math>10^9/L</math>)</b>	1,07 ± 0,26	0,93 ± 0,25	1,47 ± 0,21
<b>Hemoglobin (g/L)</b>	27,50 ± 1,52	27,67 ± 2,89 <sup>Δ</sup>	33,67 ± 2,31**
<b>Hematokrit (%)</b>	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01*
<b>Volumen eritrocita (fL)</b>	55,07 ± 7,79	59,37 ± 2,06	59,07 ± 1,80
<b>MCH (pg)</b>	15,18 ± 0,42	14,40 ± 0,00*	15,10 ± 0,10
<b>MCHC (g/L)</b>	279,83 ± 36,92	243,33 ± 8,33	255,67 ± 9,81
<b>Distribucija eritrocita (%)</b>	22,83 ± 1,62	20,63 ± 4,59	21,60 ± 2,01
<b>Trombociti (<math>10^9/L</math>)</b>	139,83 ± 55,63	123,33 ± 11,24	152,67 ± 30,09
<b>Volumen trombocita (fL)</b>	6,92 ± 0,31	6,63 ± 0,15	6,73 ± 0,06

\*Statistički značajno različito u odnosu na DSS + STD (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

<sup>Δ</sup>Statistički značajno različito u odnosu na DSS + EPS (<sup>Δ</sup> $p < 0,05$ )

DSS + STD – bolesni miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, DSS + MC1 – bolesni miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom i probiotičkim sojem *L. fermentum* MC1, DSS + EPS – bolesni miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom i EPS-ima izoliranim iz soja *L. fermentum* MC1, MCH – sadržaj hemoglobina u eritrocitima, MCHC – koncentracija hemoglobina u eritrocitima

Iako je UC prilično čest, njegova točna patogeneza nije u potpunosti shvaćena, ali je poznato da je povezan s prekomjernim imunološkim odgovorom, a status imuniteta ima ključnu ulogu u povećanju crijevne propusnosti i oštećenoj funkciji barijere. Imunološki odgovor uključuje stanice urođenog i stečenog imunološkog odgovora, a povezuju ih antigen predočne stanice (*engl.* antigen-presenting cells, APC), u koje se ubrajaju dendritičke stanice i makrofagi koji ekspimiraju receptore za prepoznavanje molekularnih uzorka kojima pripadaju TLR (*engl.* Toll-like receptor). Stanice koje pripadaju urođenoj imunosti su neutrofilni, koji čine glavnu komponentu upalnog infiltrata u tkivu crijeva kod UC-a i jedne su od prvih stanica koje sudjeluju u aktivnoj fazi bolesti, a prepoznaju mikroorganizme i sudjeluju u onesposobljavanju mikroorganizama oslobađanjem neutrofilnih izvanstaničnih zamki (*engl.* neutrophil extracellular traps, NET) i degranulacijom vlastitih zrnaca te stvaranjem reaktivnih vrsta kisika (*engl.* Reactive Oxygen Species, ROS). Čimbenici koji povećavaju otpuštanje NET-a uključuju

TNF- $\alpha$ , ali i druge proupalne citokine, te bakterijske lipopolisaharide. Tijekom upale izlučuju se citokini odgovorni za aktivaciju makrofaga, a ovisno o načinu aktivacije dijele se na klasično aktivirane (M1), koji imaju proupalne funkcije i značajno antibakterijsko djelovanje, ili alternativno aktivirane (M2), koji pokazuju protuupalne funkcije i sudjeluju u cijeljenju tkiva (Kałużna i sur., 2022). Tijekom IBD-a, ravnoteža između M1 i M2 makrofaga pomaknuta je prema proupalnom tipu, a intestinalni makrofagi zatim izlučuju proupalne citokine, kao što su IL-6, IL-23 i TNF- $\alpha$ , pokazujući istodobno povećanu citotoksičnost i fagocitnu aktivnost (Porter i sur., 2020). Upala potiče aktivaciju limfocita zbog povećane aktivnosti APC-a u IBD-u, koje doprinose patološkim promjenama uočnim kod UC u crijevima putem proizvodnje proupalnih citokina koji povećavaju upalu i izlučivanje proupalnih citokina i kemokina koji oštećuju epitelne stanice (Kałużna i sur., 2022).

Stoga, kako bi utvrdili jačinu upale kod različitih skupina miševa analizirana je i diferencijalna krvna slika odnosno % leukocitnih stanica (tablica 13) – granulocita (neutrofil, eozinofili, bazofili) i agranulocita (limfociti, monociti). Iz rezultata se može vidjeti da je udio neutrofila statistički značajno smanjen kod skupina bolesnih miševa tretiranih sojem MC1 (DSS + MC1) ili EPS-om (DSS + EPS) u odnosu na DSS skupinu hranjenu standardnom laboratorijskom hranom ( $p < 0,01$  za oba slučaja). Ovaj rezultat se podudara s indeksom razvoja bolesti budući da je znatno povećan broj neutrofila u DSS skupini pokazatelj je progresije bolesti (slika 51). S druge strane, kod skupine DSS + MC1 uočeno je statistički značajno povećanje udjela monocita ( $p < 0,01$ ) što ukazuje na potencijalni antitumorski učinak soja MC1, budući da se pokazalo da povećanje monocita u krvi i smanjenje limfocita može biti uzrokovano upalnim odgovorom protiv rasta tumora (Kamiya i sur., 2022). Kod skupine tretirane sojem MC1 uočeno je smanjenje u udjelu limfocita ( $p < 0,05$ ) te povećanje u udjelu monocita ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu tretiranu samo EPS-om. Niža vrijednost omjera monocita naspram limfocita za skupine hranjenje EPS-ima u odnosu na MC1 ukazuje na prednost potencijalne konzumacije egzopolisaharida budući da je veći omjer povezan s upalom ili čak tumorima. U zdravih miševa koji su tretirani s potencijalnim probiotičkim sojem (MC1) ili egzopolisaharidima (EPS) zapažena je razlika u razini limfocita koja je veća kod miševa hranjenih sojem MC1 u odnosu na miševe hranjene standardnom laboratorijskom hranom (prilog 7).

**Tablica 13.** Diferencijalna krvna slika u miševa s DSS-izazvanim kolitisom tretiranih i netretiranih s probiotikom (MC1) ili egzopolisaharidima (EPS)

Skupina	Neutrofili (%)	Limfociti (%)	Monociti (%)	Eozinofili (%)	Bazofili (%)
DSS + STD	19,98 ± 12,98	69,43 ± 7,51	16,46 ± 6,65	0,28 ± 0,28	0,00 ± 0,00
DSS + MC1	2,60 ± 0,26**	62,77 ± 4,53	34,37 ± 4,97**	0,27 ± 0,27	0,00 ± 0,00
DSS + EPS	1,37 ± 0,74**	76,80 ± 6,07 <sup>Δ</sup>	20,37 ± 4,95 <sup>Δ</sup>	1,47 ± 1,47	0,00 ± 0,00

\*Statistički značajno različito u odnosu na skupinu DSS (\*\* $p < 0,01$ )

<sup>Δ</sup>Statistički značajno različito u odnosu na skupinu DSS + MC1 (<sup>Δ</sup> $p < 0,05$ )

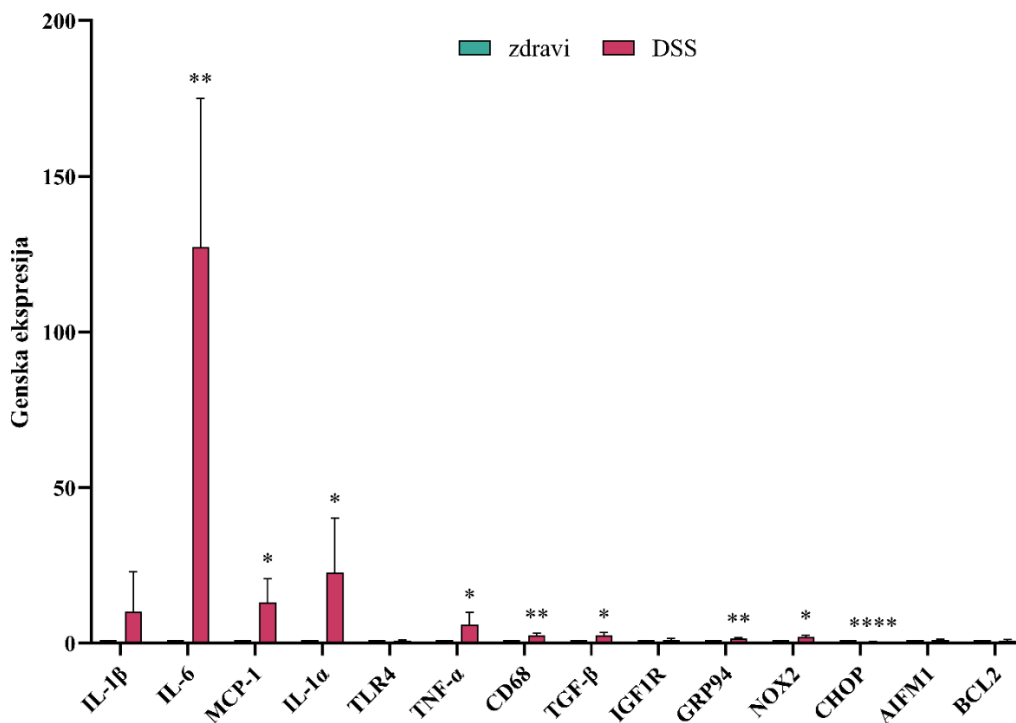
DSS + STD – bolesni miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, DSS + MC1 – bolesni miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom i probiotičkim sojem *L. fermentum* MC1, DSS + EPS – bolesni miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom i EPS-ima izoliranim iz soja *L. fermentum* MC1

Pojačano lučenje proupalnih citokina, a smanjeno lučenje protuupalnih citokina dovodi do razvoja prekomjernog imunskog odgovora. On je povezan s daljnjom aktivacijom i infiltracijom imunskih stanica, povećanom apoptozom stanica, oksidativnim stresom i gubitkom cjelovitosti crijevne barijere (Kalužna i sur., 2022). Oksidativni stres dovodi do oštećenja proteina, lipidne peroksidacije, oštećenja DNA čime može dovesti do karcinogeneze i apoptoze stanica crijeva. Kao što je prije spomenuto, jedan od glavnih proizvođača ROS-a su fagocitne stanice, neutrofili i makrofagi, koji ROS koriste za uklanjanje mikroorganizama (Pereira i sur., 2015), a enzim NOX2 jedan je od glavnih proizvođača ROS-a. Dokazano je da probiotici mogu imati antioksidativno djelovanje – mogu inhibirati enzime koji sudjeluju u generiranju ROS-a, keliraju metale i potiču sintezu antioksidativnih enzima kao što su glutation peroksidaza, katalaza i superoksid dismutaza (*engl.* superoxide dismutase, SOD). Probiotici iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* i sami izlučuju SOD i keliraju metale (Tian i sur., 2017). Şengül i sur. (2011) su pokazali da egzopolisaharidi također smanjuju oksidativni stres u eksperimentalno izazvanom kolitisu povećavajući aktivnost antioksidativnih enzima. Jedna od značajki kroničnog UC-a je narušena cjelovitost crijevne barijere. Smatra se da razvitkom upale u crijevu dolazi do promjena u čvrstim vezama između stanica sluznice crijeva i do pojačane apoptoze epitelnih stanica. Održavanje cjelovitosti crijevne membrane ovisi o ravnoteži između proliferacije i apoptoze stanica koja je u homeostatskim uvjetima strogo regulirana. Do povećane apoptoze u UC-u može doći aktivacijom i vanjskog i unutarnjeg puta. Apoptozu može pokrenuti i jaki stres endoplazmatskog retikuluma te oksidativni stres koji dovodi do disfunkcije mitohondrija (Wan i sur., 2022).

Kako bi odredili stupanj upale, miševima je nakon žrtvovanja izoliran kolon te je iz tkiva kolona izolirana RNA, nakon čega je metodom qPCR napravljena analiza genske ekspresije upalnih biljega (IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, IL-1 $\alpha$ , TLR4, TNF- $\alpha$ , CD68, TGF- $\beta$ ) te



molekularnih biljega koji ukazuju na apoptozu (BCL2, AIFM1, IGF1R), stres endoplazmatskog retikuluma (CHOP i GRP94) i oksidativni stres (NOX2). Iz rezultata se može uočiti statistički značajno povećanje relativne ekspresije IL-6 ( $p < 0,01$ ), MCP-1 ( $p < 0,05$ ), IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), CD68 ( $p < 0,01$ ), TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ), GRP94 ( $p < 0,01$ ) i NOX2 ( $p < 0,05$ ) gena te smanjenje ekspresije CHOP ( $p < 0,0001$ ) gena kod mužjaka (slika 54). Povećanje ekspresije proupalnih citokina ukazuje da je došlo do upale, što je u skladu s očekivanjima budući da je izazvan akutni kolitis, koji se ubraja u upalne bolesti crijeva. Osim proupalnih citokina, kod upalnog procesa povećana je i koncentracija kemokina MCP-1 kojeg izlučuju makrofagi i pod čijim utjecajem na mjesto upale dolazi veliki broj monocita (Kałużna i sur., 2022).



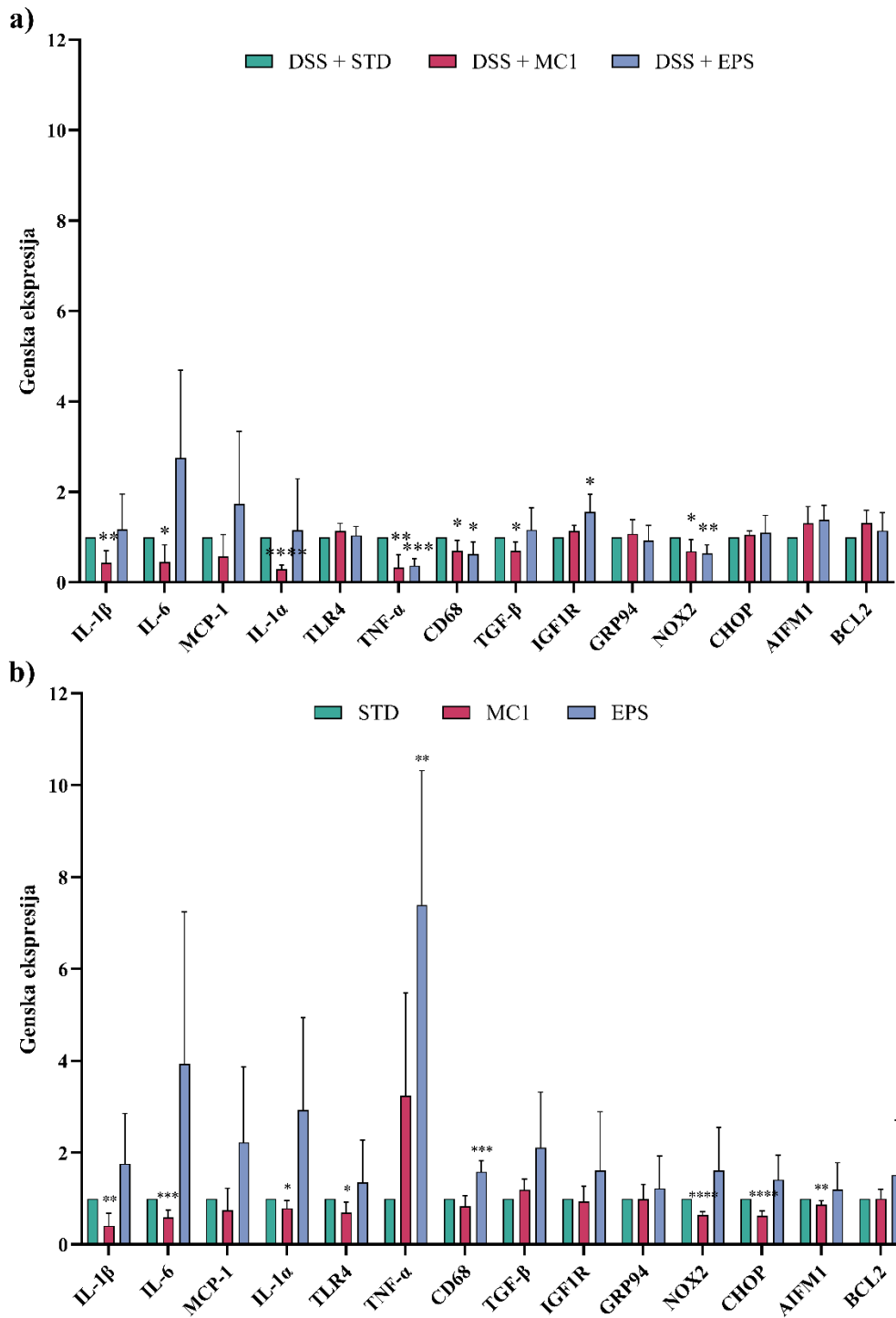
**Slika 54.** Genska ekspresija upalnih biljega i molekularnih pokazatelja apoptoze, stresa endoplazmatskog retikuluma i oksidativnog stresa kod muških miševa soja C57BL/6 prije (zdravi) i nakon (DSS) uzrokovanja kolitisa

\*Statistički značajno različito u odnosu na zdravu skupinu (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

Budući da crijevna mikrobiota ima veliku ulogu u patofiziologiji upalnih bolesti crijeva, može se zaključiti da bi primjena probiotika ili prebiotika mogla koristiti u liječenju UC-a. Kako bi utvrdili ima li promjena u jačini upale između skupine kojoj je izazvan kolitis i skupina koje su naknadno tretirane potencijalnim probiotičkim sojem *L. fermentum* MC1 ili njegovim EPS-ima, pratila se genska ekspresija upalnih biljega te molekularnih biljega koji ukazuju na apoptozu, stres endoplazmatskog retikuluma i oksidativni stres. Tretman mužjaka (slika 55a),

s prethodno izazvanim kolitisom, s probiotičkim sojem MC1 uzrokovao je statistički značajno smanjenje ekspresije IL-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ), IL-6 ( $p < 0,05$ ), IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,001$ ), TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ), CD68 ( $p < 0,05$ ) i TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) gena upalnih biljega te molekularnog biljega koji ukazuje na oksidativni stres NOX2 ( $p < 0,05$ ), dok je tretman s EPS-ima značajno smanjio ekspresiju upalnih biljega TNF- $\alpha$  ( $p < 0,001$ ) i CD68 ( $p < 0,05$ ) te molekularnog biljega koji ukazuje na oksidativni stres NOX2 ( $p < 0,01$ ), a povećao ekspresiju molekularnog biljega IGF1R ( $p < 0,05$ ) koji ukazuje na anti-apoptički učinak i povećano preživljavanje stanica. Ovi rezultati idu u prilog potencijalnom antioksidacijskom djelovanju potencijalnog probiotičkog soja MC1 i njegovih EPS-a budući da je uočeno statistički značajno smanjenje ekspresije NOX2, molekularnog biljega koji ukazuje na oksidativni stres. Također, rezultati prema kojima EPS-i smanjuju proizvodnju pojedinih upalnih citokina u suglasju su s rezultatima da EPS-i mogu smanjiti anemiju kod UC-a. Min i sur. (2020) su pokazali da egzopolisaharidi izolirani iz soja *Lactobacillus plantarum* YW11 smanjuju upalu kod DSS-om izazvanog kolitisa, pojačavajući ekspresiju IL-10 i smanjujući razinu proupalnih citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, INF- $\gamma$ . Slične rezultate dobili su i Liu i sur. (2021) koji su pokazali da egzopolisaharidi iz *Lactobacillus helveticus* smanjuju upalu regulirajući razinu citokina, poboljšavaju cjelovitost barijere te moduliraju crijevnu mikrobiotu. Isto tako, Yang i sur. (2021) su dokazali da *L. ruminis* FXJWS27L3 može ublažiti kolitis izazvan DSS-om, što je vjerojatno povezano sa smanjenjem ekspresije proupalnih citokina, pojačanom regulacijom kratkolančanih masnih kiselina i vraćanjem neravnoteže crijevne mikrobiote. Temeljem dobivenih podataka, smanjene razine upalnih citokina te pojačanje regenerativne sposobnosti sluznice, može se zaključiti da obrada sojem *L. fermentum* MC1 ili njegovim EPS-ima ima ulogu u zaštiti sluznice, održavanju cjelovitosti crijevne barijere kroz smanjenje upale oštećenih okolnih stanica, poticanju regeneracije sluznice te smanjenju procesa krvarenja na što ukazuju više vrijednosti hematopoetskih odrednica te usporen indeks razvoja bolesti (slika 53, slika 55, tablice 13 i 14).

Tretman zdravih mužjaka (slika 55b) s probiotičkim sojem MC1 uzrokovao je statistički značajno smanjenje ekspresije IL-1 $\beta$  ( $p < 0,01$ ), IL-6 ( $p < 0,001$ ), IL-1 $\alpha$  ( $p < 0,05$ ), TLR4 ( $p < 0,05$ ), CD68 ( $p < 0,05$ ) i TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) gena upalnih biljega te molekularnih biljega koji ukazuju na oksidativni stres NOX2 ( $p < 0,0001$ ), stres endoplazmatskog retikuluma CHOP ( $p < 0,0001$ ) i apoptozu AIFM1 ( $p < 0,01$ ). S druge strane, tretman s EPS-ima značajno je povećao ekspresiju upalnog biljega CD68 ( $p < 0,001$ ) što ukazuje na aktivaciju makrofaga kao odgovor na različite upalne podražaje, uključujući LPS toksin. Dobiveni rezultati su pokazali da je tretman zdravih miševa sa sojem MC1 imao bolje učinak na održavanje homeostaze.



**Slika 55.** Genska ekspresija upalnih biljega i molekularnih pokazatelja apoptoze, stresa endoplazmatskog retikuluma i oksidativnog stresa kod muških miševa soja C57BL/6 a) tretiranih i b) netretiranih s DSS-om te hranjenih s probiotikom (MC1) ili egzopolisaharidom (EPS)

\*Statistički značajno različito u odnosu na skupinu STD (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ )

## **4.5. Sustavi isporuke i strategije održavanja vijabilnosti sojeva BMK producenata potencijalnih terapijskih biomolekula**

Humana crijevna mikrobiota predstavlja najveći mikrobiološki sustav ljudskog tijela, s milijardama mikrobnih stanica koje reguliraju višestruke biološke funkcije, poput sazrijevanja imunološkog sustava, proliferacije stanica domaćina, neurološke signalizacije, gustoće kostiju i biosinteze hormona (Sumida i sur., 2021). Ova ravnoteža može biti poremećena brojnim endogenim i vanjskim determinantama, što dovodi do stanja nazvanog “crijevna disbioza“, koja za posljedicu može imati moguće probavne, metaboličke, pa čak i neurološke poremećaje (Centurion i sur., 2021). Dokazano je da konzumacija živih probiotičkih bakterija može odgovoriti na te izazove i donijeti zdravstvene dobrobiti domaćinu, kao što su prevencija bolesti GIT-a, prevencija alergija, antikancerogeni učinci i imunomodulacija, zbog čega imaju veliki potencijal za široku primjenu. Međutim, na njihovu aktivnost utječu metode proizvodnje praškastih pripravaka, skladištenja i nepovoljni uvjeti u probavnom traktu. Jako kisele želučane tekućine, različiti probavni enzimi i žučne soli u tankom crijevu mogu uzrokovati veliku smrtnost probiotika, što dodatno dovodi do ograničene kolonizacije i proliferacije probiotika u GIT-u, čime se značajno narušava njihova funkcija (Luo i sur., 2022). Stoga je fokus istraživača usmjeren na zaštitu probiotičkih bakterija i promicanje njihove uspješne oralne primjene i dostave na ciljno mjesto djelovanja u crijevima. Kako bi se prevladala spomenuta ograničenja, istražuju se različiti sustavi pomoćnih tvari i nosača za dostavu probiotika ključni za osiguravanje dovoljne količine živih stanica prilikom oralne primjene i preživljavanja gastrointestinalnog tranzita. Svaki sustav za isporuku probiotika trebao bi biti dizajniran tako da probiotici mogu prijanjati na sluznicu debelog crijeva i kolonizirati ga, inače se neće zadržati kako bi polučili pozitivne učinke na zdravlje domaćina (Wang i sur., 2022; Bosnea i sur., 2017).

### **4.5.1. Mikroinkapsulacija odabranih sojeva BMK**

Jedna od primjenjivanih tehnika za isporuku probiotika je mikroinkapsulacija bioaktivnih komponenti u zaštitne omotače koji pružaju fizičku barijeru za poboljšanje preživljavanja i biorasploživosti probiotika (Razavi i sur., 2021). Učinkovit sustav mikroinkapsulacije trebao bi održavati stabilnost probiotika tijekom skladištenja, zaštititi ih od nepovoljnih uvjeta u gornjem dijelu GIT-a, otpustiti ih u debelom crijevu kako bi se probiotici adhezirali i kolonizirali crijeva (Cassani i sur., 2020; Anselmo i sur., 2016). Uspješne metode koje se koriste u mikroinkapsulaciji probiotika uključuju sušenje raspršivanjem, hlađenje raspršivanjem, sušenje smrzanjem raspršivanjem, liofilizacija, elektroraspršivanje, metoda „sloj po sloj“ (*engl.* Layer-by-Layer, LbL), sušenje u fluidiziranom sloju, ekstruzija, tehnologija

vibrirajuće mlaznice, emulzifikacija i koacervacija (Pech-Canul i sur., 2020). Tehnika ekstruzije popularna je metoda zbog svoje jednostavnosti, niske cijene i blagih uvjeta formulacije koji osiguravaju preživljavanje bakterijskih stanica. Uključuje pripremu hidrokoloidne otopine (npr. alginat), dodavanje mikroorganizama (probiotici), i istiskivanje stanične suspenzije kroz iglu, uz lagano miješanje, u otopinu koja sadrži viševalentne katione. Nosači za isporuku probiotika unutar mikrokapsula su uglavnom prirodni polimeri kao što su  $\kappa$ -karagenan, alginat, derivati pektina i škroba, guma arabika, gelan, ksantan i životinjski proteini (Yao i sur., 2020). Jedan od najčešće korištenih biopolimernih građevnih jedinica za izgradnju mikrokapsula je alginat, polisaharid izoliran iz morskih algi, a privukao je pozornost zbog svojih izvrsnih fizikalno-kemijskih i mehaničkih svojstava, uključujući jednostavnu strukturu, jednostavne sirovine, nisku toksičnost, blagu obradu i lakoću formiranja matriksa oko bakterije (Wang i sur., 2022). Alginat se naširoko koristi za mikrokapsuliranje probiotičkih bakterijskih sojeva, a radi se o prirodnom polisaharidu koji sadrži ostatke manuronske i guluronske kiseline zbog čega u vodenim otopinama imaju negativan naboj što im omogućuje vanjsko umrežavanje s pozitivno nabijenim ionima (Kowalska i sur., 2022; Yeung i sur., 2016). U ovom obliku, alginati su izuzetno stabilni pri niskom pH, stoga mogu učinkovito zaštititi aktivne tvari koje čine jezgru kapsule, dok bubre u alkalnim uvjetima kako bi otpustili probiotike i lijekove u crijevnom lumenu (Kowalska i sur., 2022). Za mikroinkapsulaciju u alginatni polimer obično se koristi otopina kalcijevog klorida u kojoj se oblikuju kuglice kalcijevog alginata u kojima su uhvaćene bakterijske stanice. Uobičajeno se primijenjuju rasponi koncentracija od 1 – 2 % alginata i 0,05 – 1,5 M kalcijevog klorida (Pech-Canul i sur., 2020). Istraživanje koje su proveli Yeung i sur. (2016) je pokazalo da inkapsulacija probiotika *Lactococcus lactis* u alginatnim mikrokapsulama povećava njegovu stabilnost u stresnim okolišnim uvjetima, što dovodi do povećanje njegovog preživljavanja u usporedbi s neinkapsuliranim probiotikom. Holkem i sur. (2016) su emulgiranjem proizveli alginatne mikrokapsule koje sadrže *Bifidobacterium* BB-12, a zatim su ih osušili zamrzavanjem te se pokazalo da se postigla bolja zaštita i kontroliranije otpuštanje probiotika. Još jedan pristup koji se može koristiti za povećanje sposobnosti preživljavanja inkapsuliranih probiotičkih sojeva tijekom skladištenja i unutar GIT-a ljudi je dodatak prebiotičkih supstrata, koji su neprobavljivi ili samo djelomično probavljivi u GIT-u, ali ih mogu iskoristiti bifidobakterije, BMK i druge poželjne bakterijske vrste u debelom crijevu (Rashidinejad i sur., 2022; Liao i sur., 2019).

Stoga, kako bi se zaštitile BMK, producenti potencijalnih terapijskih biomolekula, i tako povećao njihov probiotički potencijal, jedan od ciljeva doktorske disertacije bio je provesti

mikroinkapsulaciju sojeva u alginatu, alginatu uz dodatak GOS-a i alginatu uz dodatak FOS-a metodom ekstruzije.

Mikroinkapsulacija sojeva producenata S-proteina, *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20, te producenta egzopolisaharida, *L. fermentum* MC1, u alginatu te alginatu uz dodatak prebiotika GOS-a i FOS-a uspješno je provedena metodom ekstruzije (slike 9 i 10). Također, ispitana je i učinkovitost procesa mikroinkapsulacije sojeva producenata potencijalnih terapijskih biomolekula (tablica 14) te se može zaključiti da je najuspješnija bila mikroinkapsulacija sojeva u alginatu uz dodatak prebiotika GOS-a za sve ispitivane sojeve BMK, osim za *L. brevis* MB1 i *L. fermentum* MC1 kod kojih nije bilo značajne razlike između različitih sastava mikrokapsula. Učinkovitost mikroinkapsulacije metodom ekstruzije varira od 30,6 % do 97,7 %, dok je učinkovitost mikroinkapsulacije metodom koekstruzije s različitim prebiotičkim supstratima viša (How i sur., 2022).

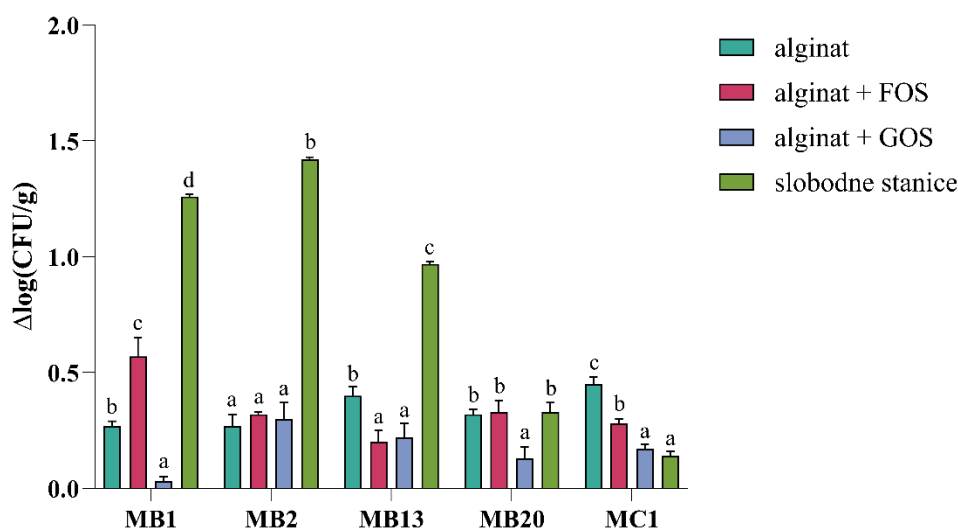
**Tablica 14.** Učinkovitost procesa mikroinkapsulacije (%) sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u alginatu, sa ili bez dodatka galaktooligosaharida (GOS) ili fruktooligosaharida (FOS)

SOJ	alginat	alginat + FOS	alginat + GOS
<i>L. brevis</i> MB1	65,25 ± 5,85 <sup>a</sup>	79,96 ± 8,75 <sup>a</sup>	73,30 ± 5,71 <sup>a</sup>
<i>L. brevis</i> MB2	70,88 ± 4,56 <sup>b</sup>	64,85 ± 9,77 <sup>b</sup>	85,85 ± 7,78 <sup>a</sup>
<i>L. brevis</i> MB13	58,39 ± 3,99 <sup>b</sup>	83,11 ± 5,40 <sup>a</sup>	86,97 ± 9,92 <sup>a</sup>
<i>L. brevis</i> MB20	69,60 ± 7,10 <sup>b</sup>	65,78 ± 3,47 <sup>b</sup>	85,64 ± 5,27 <sup>a</sup>
<i>L. fermentum</i> MC1	64,35 ± 6,00 <sup>a</sup>	59,93 ± 5,43 <sup>a</sup>	72,07 ± 8,12 <sup>a</sup>

Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između podataka u istom retku ( $p < 0,05$ )

Sušenje zamrzavanjem (liofilizacija) jedna je od najadekvatnijih metoda za sušenje osjetljivih materijala poput mikroorganizama, a također ima i dobra svojstva suspendiranja osušenih materijala. Unatoč prednostima liofilizacije, može doći do značajnog gubitka preživljavanja probiotika tijekom procesa sušenja i razdoblja skladištenja zbog promjena membranskih lipida i osjetljivih proteina bakterijske stanice uzrokovanih niskim temperaturama tijekom faze zamrzavanja i nastajanja kristala leda i brzinom isparavanja tih kristala (Gul i Atalar, 2019; Bravo-Ferrada i sur., 2018). Tijekom liofilizacije uzoraka mikrokapsula s probioticima, kao lioprotektivno sredstvo je korišteno obrano mlijeko, budući da se u našim prethodnim istraživanjima pokazalo da stabilizira staničnu membranu i stanici pruža zaštitni omotač (Butorac i sur., 2021; Leboš Pavunc i sur., 2011). Rezultati (slika 56) su pokazali da je stanična smrtnost [ $\Delta\log(\text{CFU/g})$ ] sojeva MB1 i MB20 inkapsuliranih u alginatu

uz dodatak GOS-a manja u odnosu na alginat/alginat+FOS/slobodne stanice, što ukazuje na najbolji protektivni učinak GOS-a. Pokazalo se da su sva tri slučajeva mikroinkapsulacije uspješno zaštitile soj MB2 budući da su slobodne stanice imale najveću smrtnost. Što se tiče soja MB13, mikroinkapsulacija u alginatu uz dodatak prebiotičkih supstrata FOS-a ili GOS-a je imala značajno nižu smrtnost nego kada su stanice bile inkapsulirane u alginatu ili neinkapsulirane (slobodne stanice). Što se tiče producenta EPS-a, soj MC1 je imao najnižu smrtnost nakon mikroinkapsulacije u alginatu uz dodatak GOS-a i kada stanice nisu bile mikroinkapsulirane u odnosu na sve druge ispitivane slučajeve. U konačnici, mikroinkapsulacija sojeva BMK u alginatu uz dodatak prebiotika GOS-a se pokazala najboljom metodom za zaštitu stanica tijekom sušenja smrzanjem. Naša istraživačka skupina već je pokazala da je mikroinkapsulacija soja *L. fermentum* D12 u alginatu značajno poboljšala sposobnost testiranog soja da preživi proces sušenja smrzanjem, kao i preživljavanje u simuliranim GIT uvjetima u usporedbi s neinkapsuliranim sojem (Butorac i sur., 2021). Raddatz i sur. (2020) pokazali da i druge metode mikroinkapsulacije (emulgiranje) s dodatkom različitih prebiotičkih supstrata (kukuruz, inulin i rižine mekinje) također mogu poboljšati preživljavanje procesa liofilizacije, ali i drugih nepovoljnih uvjeta.

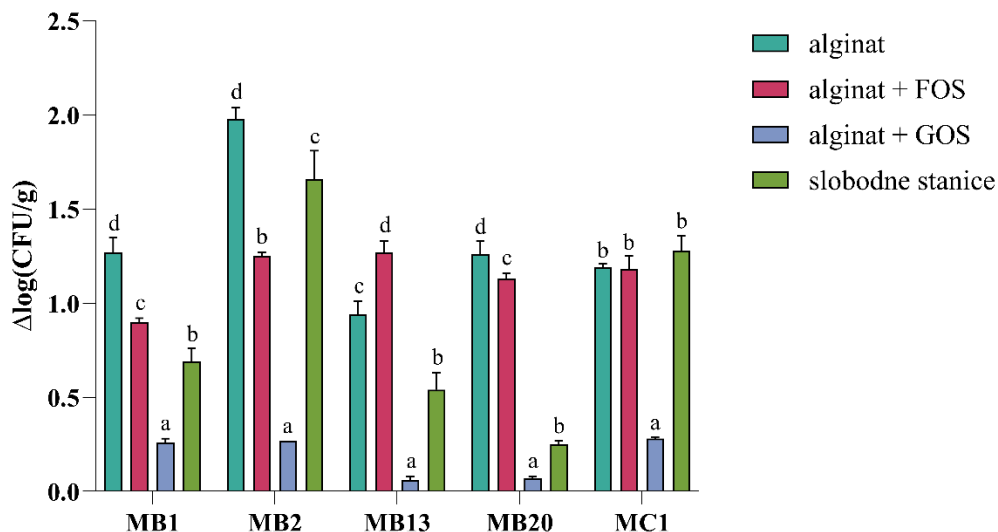


**Slika 56.** Smrtnost stanica [ $\Delta\log(\text{CFU/g})$ ] slobodnih i mikroinkapsuliranih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u alginatu, sa i bez dodatka fruktooligosaharida (FOS) i galaktooligosaharida (GOS), nakon procesa liofilizacije

Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između podataka za pojedini soj ( $p < 0,05$ )

Nakon oralne primjene, probiotičke bakterije su suočene s ekstremno niskim pH vrijednostima želuca, a u debelom crijevu je prisutno natjecanje za hranjive tvari i mjesta

pripranja na sluznici, djelovanje imunološkog sustava domaćina, a sve to može utjecati na koncentraciju živih mikroorganizama *in situ* (Butorac i sur., 2021). Stoga je ispitana sposobnost liofiliziranih mikroinkapsuliranih sojeva BMK, producenata S-proteina i egzopolisaharida, da prežive simulirane uvjete GIT-a tako što se pratila njihova osjetljivost na simulirani želučani sok i sok tankog crijeva (slika 57). Najboljim postupkom zaštite stanica svih ispitivanih sojeva BMK se pokazala mikroinkapsulacija u alginatu uz dodatak prebiotika GOS-a budući da je smrtnost stanica bila značajno niža u odnosu na ostale postupke zaštite te neinkapsulirane (slobodne) stanice. Slične rezultate su dobili Liao i sur. (2019) koji su dokazali da mikroinkapsulacija soja *L. fermentum* L7, također izoliranog iz majčinog mlijeka, u alginatu uz dodatak različitih prebiotika ima pozitivan učinak na preživljavanje simuliranih uvjeta želučanog soka i soka tankog crijeva.



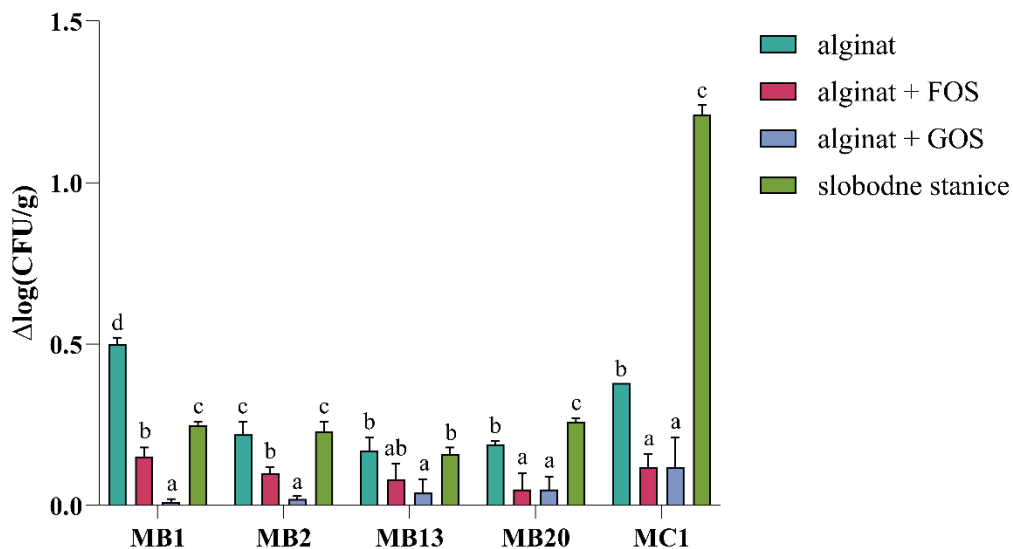
**Slika 57.** Smrtnost stanica [ $\Delta\log(\text{CFU/g})$ ] slobodnih i mikroinkapsuliranih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u alginatu, sa i bez dodatka fruktooligosaharida (FOS) i galaktooligosaharida (GOS), nakon izlaganja simuliranim uvjetima GIT-a

Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između podataka za pojedini soj ( $p < 0,05$ )

Pratilo se i preživljavanje liofiliziranih mikroinkapsuliranih odabranih sojeva BMK čuvanih na 4 °C nakon jednomjesečnog skladištenja. Što se tiče producenata S-proteina, iz rezultata se može vidjeti da je smrtnost stanica [ $\Delta\log(\text{CFU/g})$ ] nakon jednomjesečnog skladištenja liofiliziranih mikroinkapsuliranih sojeva BMK značajno manja kada su stanice mikroinkapsulirane u alginatu uz dodatak prebiotika FOS-a i GOS-a, u odnosu na sam alginat i kontrolu – neinkapsulirane slobodne stanice (slika 58). Rezultati pokazuju da je smrtnost stanica nakon mjesec dana skladištenja značajno niža kada su stanice *L. brevis* MB1 i MB2



mikrokapsulirane u alginatu uz dodatak GOS-a, u usporedbi s alginatom sa ili bez dodatka FOS-a te neinkapsuliranim stanicama. Što se tiče ostalih sojeva, *L. brevis* MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1, dodatak GOS-a je također bio uspješan, ali je dodatak FOS-a imao sličan pozitivan učinak na održavanje vijabilnosti stanica. Već spomenuti soj *L. fermentum* L7 je također pokazao bolje preživljavanje dugotrajnog skladištenja nakon mikroinkapsulacije u alginatu, a pogotovo nakon dodatka različitih prebiotika (Liao i sur., 2019).



**Slika 58.** Smrtnost stanica [ $\Delta\log(\text{CFU/g})$ ] slobodnih i mikroinkapsuliranih sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Limosilactobacillus fermentum* MC1 u alginatu, sa i bez dodatka fruktooligosaharida (FOS) i galaktooligosaharida (GOS), nakon mjesec dana skladištenja

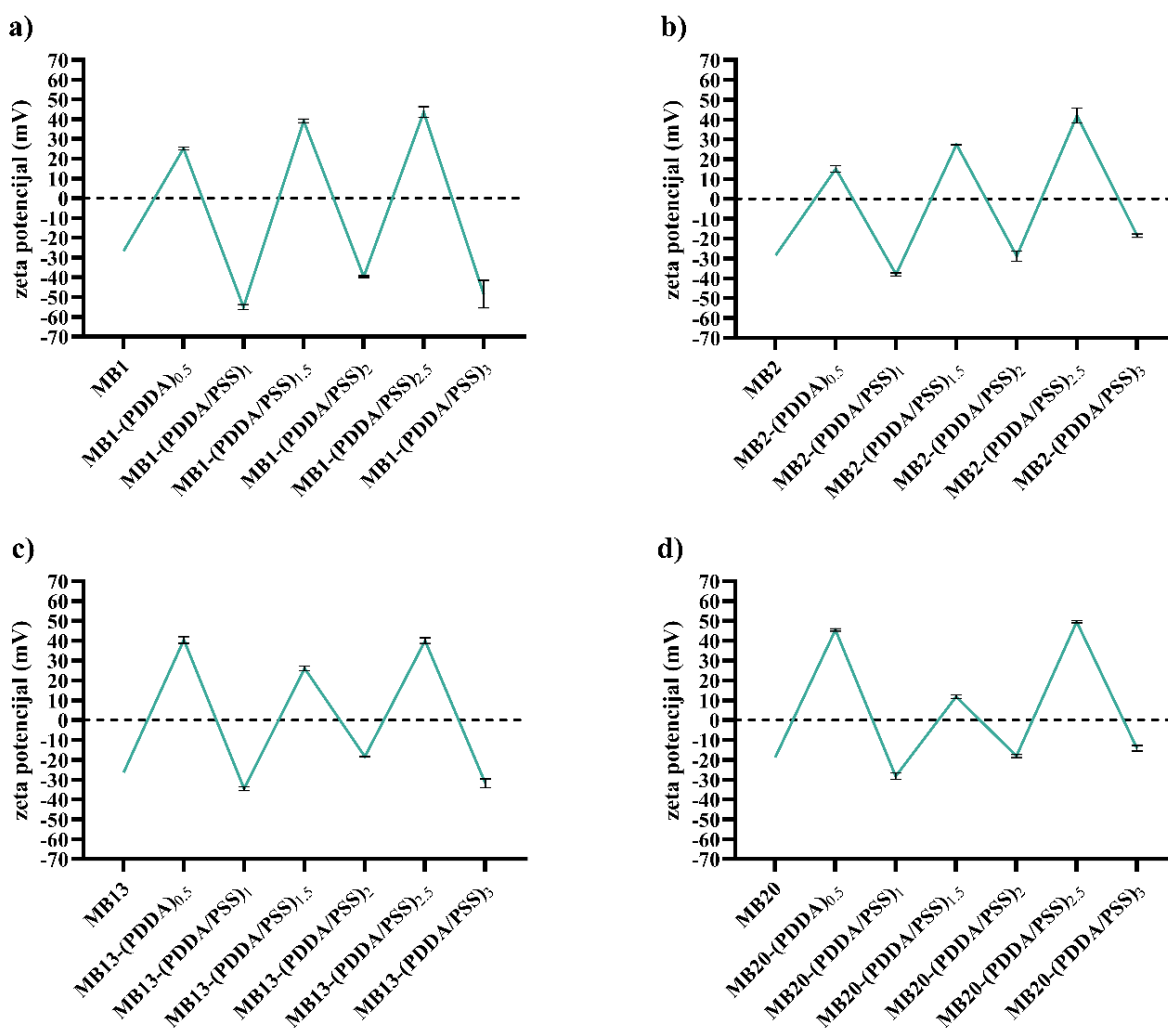
Različita slova označavaju statistički značajnu razliku između podataka za pojedini soj ( $p < 0,05$ )

#### 4.5.2. Nanoinkapsulacija odabranih sojeva BMK

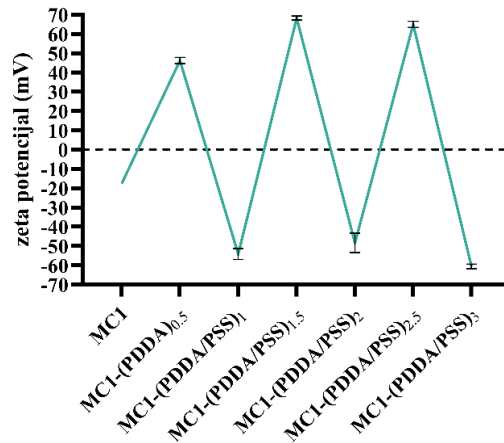
Budući da se pokazalo da mikroinkapsulacija ima i svojih nedostataka, u zadnje se vrijeme kao alternativa pojavila metoda individualne inkapsulacije stanica u nanokapsule, a ističe se metoda „sloj po sloj“ (*engl.* layer-by-layer, LbL). Princip metode temelji se na slaganju slojeva polielektrolita suprotnih naboja – kao polikation s pozitivnim nabojem je korišten poli(dialil-dimetil-amonij klorid) (PDDA), a polianion s negativnim nabojem natrijev polistirensulfonat (PSS).

Kako bi se ispitala uspješnost nanoinkapsulacije sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *L. fermentum* MC1, potrebno je odrediti zeta potencijal. Zeta-potencijal se odnosi na elektrokinetički potencijal u koloidnim sustavima, a utječe na stabilnost i ponašanje inkapsuliranih produkata u probavnom traktu. Amplituda zeta-potencijala, koja se kreće od

-200 do +200 mV, utječe na stabilnost čestica, a na njega utječu čimbenici poput sastava, koncentracije, pH, ionske jakosti i aditiva (Sun i sur., 2023). Naizmjenični slojevi kationskog (PDDA) i anionskog (PSS) polielektrolita nanošeni su na površinu sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Limosilactobacillus fermentum* MC1 elektrostatskim interakcijama u tri dvosloja [(PDDA/PSS)<sub>3</sub>] u svrhu njihove nanoinkapsulacije. Izmjereni zeta potencijali (mV) ispitivanih nanoinkapsuliranih sojeva BMK, producenata S-proteina (slika 59) i egzopolisaharida (slika 60), ukazuje na uspješno proveden postupak nanoinkapsulacije Lbl metodom budući da je dobiven trend nasumične izmjene negativnog i pozitivnog naboja nakon pojedinih slojeva.

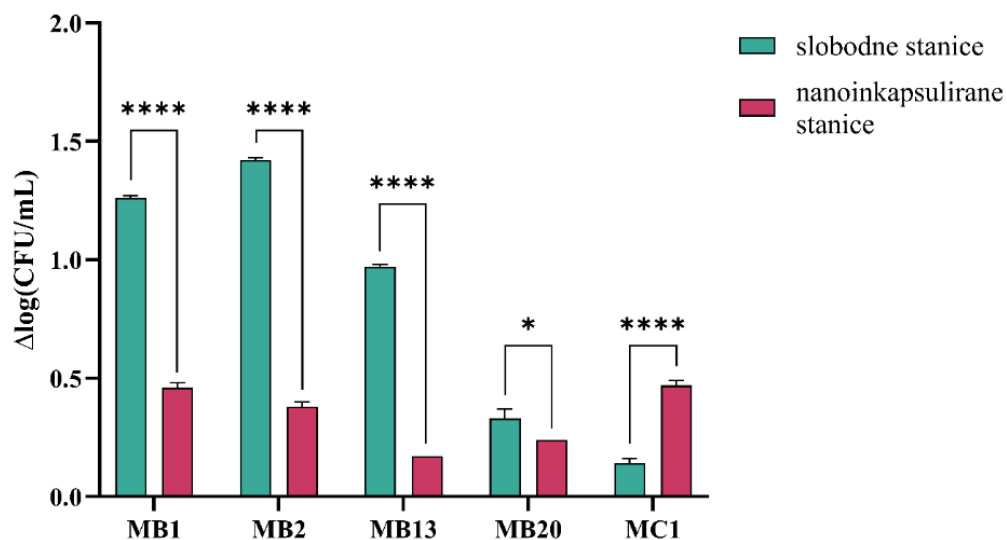


**Slika 59.** Zeta potencijal (mV) izmjeren nakon naizmjeničnih nanošenja slojeva različito nabijenih polielektrolita za sojeve BMK, producente S-proteina, *Levilactobacillus brevis* a) MB1, b) MB2, c) MB13 i d) MB20



**Slika 60.** Zeta potencijal (mV) izmjeren nakon naizmjeničnih nanošenja slojeva različito nabijenih polielektrolita na površini soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1

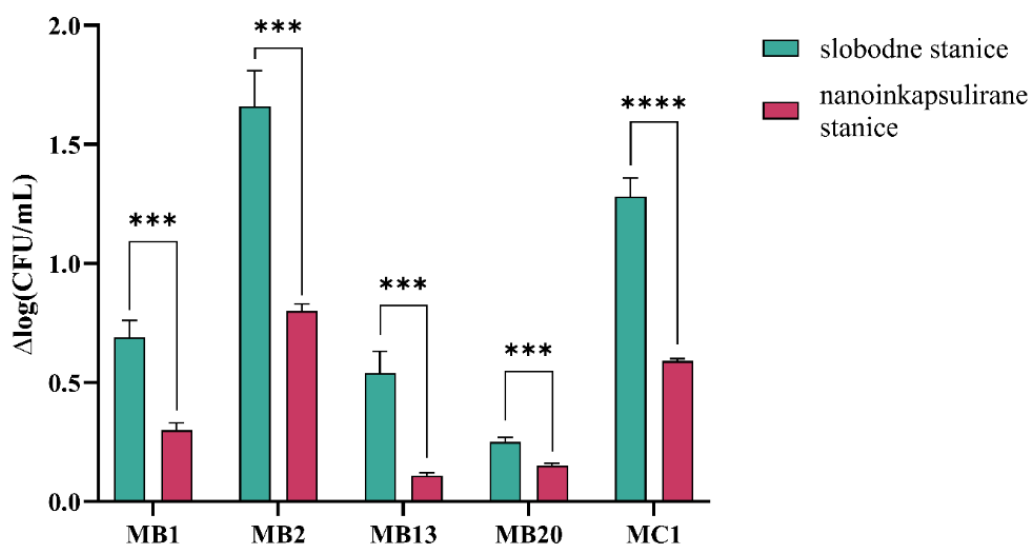
Kao što je već rečeno, industrijska primjena zahtijeva da se bakterijski sojevi mogu sačuvati zamrzavanjem ili liofilizacijom, a mikroorganizmi moraju biti sposobni preživjeti te procese, s time da oštećenja ne smiju utjecati na njihova tehnološka i probiotička svojstva. Ispitan je utjecaj liofilizacije, u obranom mlijeku kao lioprotektoru, na preživljavanje nanoinkapsuliranih i slobodnih stanica sojeva BMK, producenata S-proteina i egzopolisaharida (slika 61). Pokazalo se da je smrtnost stanica producenata S-proteina značajno veća kada stanice nisu nanoinkapsulirane, što ide u prilog zaštiti stanica producenata nanoinkapsulacijom Lbl metodom, a to su dokazali i drugi istraživači (Priya i sur., 2011). Međutim, u slučaju stanica producenta egzopolisaharida dobiveni su suprotni rezultati, ali su nanoinkapsulirane stanice i dalje preživjele u velikom broju ( $> 10^8$  CFU/mL).



**Slika 61.** Smrtnost stanica [ $\Delta\log(\text{CFU/mL})$ ] slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Limosilactobacillus fermentum* MC1 nakon liofilizacije

\*Statistički značajno različito (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Probiotici bi trebali ostati živi nakon oralne primjene kako bi mogli obaviti svoju funkciju, a prije nego što dopiju u debelo crijevo, gdje ispoljavaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina, prolaze kroz dvije značajne vrste prepreka. Prva je kiseli okoliš želučanog soka, koji nije pogodan za opstanak probiotika, a druga su žučne soli prisutne u tankom crijevu, koji mogu ubiti probiotičke stanice otapanjem lipida (Wang i sur., 2019). Stoga je ispitan utjecaj simuliranih uvjeta gastrointestinalnog trakta (simulirani želučani sok i simulirani sok tankog crijeva) na preživljavanje slobodnih i nanoinkapsuliranih sojeva BMK, producenata S-proteina i egzopolisaharida (slika 62). Iz rezultata se može vidjeti da je došlo do značajnog smanjenja smrtnosti sojeva producenata S-proteina i egzopolisaharida nakon nanoinkapsulacije Lbl metodom, čime se dokazao pozitivan učinak nanoinkapsulacije na preživljavanje nepovoljnih uvjeta GIT-a. Wang i sur. (2019) su također dokazali pozitivan učinak nanoinkapsulacije bakterije *Lactobacillus pentosus* u hitozanu na preživljavanje u simuliranim uvjetima GIT-a, dok su Priya i sur. (2011) dokazali pozitivan učinak troslojne nanoinkapsulacije *L. acidophilus*.

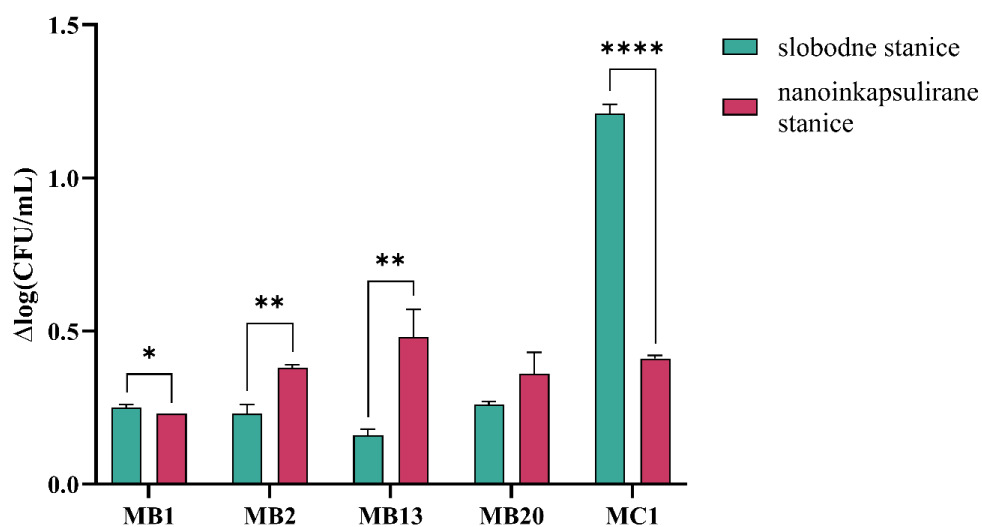


**Slika 62.** Smrtnost stanica [ $\Delta\log(\text{CFU}/\text{mL})$ ] slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Limosilactobacillus fermentum* MC1 nakon izlaganja simuliranim uvjetima GIT-a

\*Statistički značajno različito (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*)  $p < 0,0001$ )

Osim preživljavanja u nepovoljnim uvjetima, ispitano je i preživljavanje odabranih sojeva BMK tijekom skladištenja pri +4 °C kroz jedan mjesec (slika 63). Iz rezultata se može vidjeti da je nanoinkapsulacija sojeva *L. brevis* MB1 i *L. fermentum* MC1 imala pozitivan utjecaj na održavanje vijabilnost stanica budući da je  $\Delta\log(\text{CFU}/\text{g})$  bio značajno manji u odnosu na slobodne stanice, dok je kod ostalih sojeva smrtnost bila značajno veća ili nije bilo značajne razliku u odnosu na slobodne stanice. Iako se nanoinkasulacija nije pokazala najboljom

metodom u zaštiti svih stanica ispitivanih sojeva BMK, preživljavanje je u svim slučajevima i dalje bilo vrlo visoko ( $> 10^8$  CFU/mL).



**Slika 63.** Smrtnost stanica [ $\Delta \log(\text{CFU/mL})$ ] slobodnih i nanoinkapsuliranih stanica sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Limosilactobacillus fermentum* MC1 nakon mjesec dana skladištenja

\*Statistički značajno različito (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

## **5. ZAKLJUČCI**

1. Sekvencioniranjem čitavih genoma odabranih sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka ustanovljeno je da 4 potencijalna producenta S-proteina pripadaju vrsti *Levilactobacillus brevis*, dok soj producent egzopolisaharida pripada vrsti *Limosilactobacillus fermentum*.
2. Detaljna genomička i proteomička analiza S-proteina potvrdila je prisutnost S-proteina na površini sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te je terciarna struktura S-proteina pretpostavljena pomoću I-TASSER servera.
3. Dokazana je zaštitna uloga S-proteina tijekom prolaska sojeva producenata kroz nepovoljne uvjete GIT-a, ali i njihova uloga u adheziji na Caco-2 staničnu liniju te u kompetitivnoj ekskluziji potencijalnih patogena.
4. Detaljnom genomičkom analizom soja *L. fermentum* MC1, producenta EPS-a, pronađeni su geni uključeni u Wzx/Wzy-ovisan put biosinteze EPS-a. Rezultati strukturne karakterizacije izoliranih EPS-a dobiveni <sup>1</sup>H i 2D NMR tehnikama su pokazali da se EPS sastoji od 2 polisaharida, od kojih je glavni sastavljen od ponavljajućih jedinica 1,6 vezane galaktofuranoze s grananjima glukoze na drugom ugljikovom atomu.
5. Dokazana je pozitivna uloga EPS-a (1 mg/mL) u adheziji na Caco-2 staničnu liniju te kompetitivnoj ekskluziji *E. coli* 3014.
6. Turbidimetrijskom metodom je ustanovljeno jako antimikrobno djelovanje supernatanata svih ispitivanih sojeva BMK prema potencijalno patogenim bakterijama, dok je metodom hvatanja radikala DPPH-a utvrđeno snažno antioksidacijsko djelovanje svih ispitivanih sojeva.
7. *In vitro* eksperimenti na staničnim kulturama humanih kolonocita dokazali su regeneracijsko djelovanje ispitivanih sojeva i njihovih biomolekula što se očitovalo povećanjem ekspresije proteina JAM-A, okcludina, ZO-1, MUC2 i ZG16 uključenih u očuvanje crijevnog integriteta u odnosu na kontrolu. Također, ustanovljeno je i imunomodulacijsko djelovanje ispitivanih BMK i njihovih biomolekula što se očitovalo smanjenjem ekspresije ispitivanih proupalnih citokina IL-6, IL-8 i IL-1 $\beta$ .
8. Hranjenje eksperimentalnih miševa sojem *L. fermentum* MC1 i njegovim EPS-ima *in vivo* promijenilo je sastav fekalnog mikrobioma. Hranjenje miševa s DSS-induciranim kolitisom sa sojem *L. fermentum* MC1 te njegovim EPS-ima uzrokovalo je povećanje relativne zastupljenosti koljena *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Firmicutes* te smanjenje *Candidatus saccharibacteria*, *Chlamydiae*, te u slučaju hranjenja EPS-ima, i *Proteobacteria*. Što se tiče hranjenja zdravih miševa sojem *L. fermentum* MC1 i njegovim EPS-ima, uočen je značajan pad relativne zastupljenosti koljena *Candidatus saccharibacteria* te porast relativne

zastupljenosti koljena *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* i, u slučaju hranjenja EPS-ima, *Actinobacteria*.

9. Vezano za rezultate imunskih promjena, tretiranje miševa s EPS-ima je pokazalo smanjenje razine upale i krvarenja kao posljedica DSS-induciranog kolitisa. Osim toga, povećan broj eritrocita, hemoglobina i hematokrita ukazuju na smanjenje anemije kod skupine miševa s induciranim kolitisom hranjenih EPS-ima. Smanjenje upale kod bolesnih miševa hranjenih sojem MC1 ili njegovim EPS-ima očitivalo se i kroz smanjenje ekspresije upalnih biljega te molekularnog biljega koji ukazuje na apoptozu kod miševa s DSS-induciranim kolitisom hranjenih sojem MC1 i njegovim EPS-ima, što ukazuje na njihovu pozitivnu ulogu na smanjenje upalnih procesa u crijevima.
10. Mikroinkapsulacija ekstruzijom u alginatu, sa i bez dodatka galaktooligosaharida (GOS) i fruktooligosaharida (FOS) kao prebiotičkih supstrata, pokazala se pogodnom metodom za očuvanje vijabilnosti ispitivanih sojeva budući da je vrijednost CFU/g bila  $> 10^8$  nakon mikroinkapsulacije i liofilizacije te izlaganja simuliranim uvjetima GIT-a i nakon jednomjesečnog skladištenja, a najbolji su rezultati postignuti mikroinkapsulacijom u alginatu uz dodatak GOS-a.
11. Mjerenje zeta potencijala potvrdilo je uspješnu nanoinkapsulaciju sojeva BMK metodom sloj po sloj. Preživljavanje liofilizacije sojeva producenata S-proteina pokazalo se uspješnijim nakon nanoinkapsulacije, dok je soj MC1 bolje preživio u slobodnom obliku. Preživljavanje svih ispitivanih sojeva BMK u simuliranim uvjetima GIT-a bilo je uspješnije nakon nanoinkapsulacije. S druge strane, nanoinkapsulacija je pozitivno utjecala na preživljavanje jednomjesečnog skladištenja samo kod soja MC1. Također, i nanoinkapsulirane i slobodne stanice su u svim slučajevima preživjele u velikom broju ( $> 10^8$  CFU/mL).



## **6. LITERATURA**

- Abarquero, D., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E. (2022) Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, **57**(1), 16-26.
- Abrahamsson, T. R., Sinkiewicz, G., Jakobsson, T., Fredrikson, M., Björkstén, B. (2009) Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **49**(3), 349-354.
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A. (2018) Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, **75**, 105-114.
- Ahl, D., Liu, H., Schreiber, O., Roos, S., Phillipson, M., Holm, L. (2016) *Lactobacillus reuteri* increases mucus thickness and ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Acta Physiologica*, **217**, 300-310.
- Almeida-Santos, A. C., Novais, C., Peixe, L., Freitas, A. R. (2021) *Enterococcus* spp. as a producer and target of bacteriocins: a double-edged sword in the antimicrobial resistance crisis context. *Antibiotics*, **10**(10), 1215.
- Alp, D., Kuleaşan, H., Korkut Altıntaş, A. (2020) The importance of the S-layer on the adhesion and aggregation ability of lactic acid bacteria. *Molecular Biology Reports*, **47**(5), 3449-3457.
- Andhare, P., Chauhan, K., Dave, M., Pathak, H. (2014) Microbial exopolysaccharides: advances in applications and future prospects. *Biotechnology*, **3**, 25.
- Angelescu, I. R., Zamfir, M., Ionetic, E. C., Grosu-Tudor, S. S. (2024) The Biological Role of the S-Layer Produced by *Lactobacillus helveticus* 34.9 in Cell Protection and Its Probiotic Properties. *Fermentation*, **10**(3), 150.
- Angelin, J., Kavitha, M. (2020) Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, **162**, 853-865.
- Anselmo, A. C., McHugh, K. J., Webster, J., Langer, R., Jaklenec, A. (2016) Layer-by-layer encapsulation of probiotics for delivery to the microbiome. *Advanced Materials*, **28**(43), 9486-9490.
- Arora, A., Sharma, P., Katti, D. S. (2015) Pullulan-based composite scaffolds for bone tissue engineering: Improved osteoconductivity by pore wall mineralization. *Carbohydrate polymers*, **123**, 180-189.

- Assandri, M. H., Malamud, M., Trejo, F. M., de los A Serradell, M. (2023) S-layer proteins as immune players: tales from pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Current Research in Microbial Sciences*, 100187.
- Avall-Jaaskelainen, S., Palva, A. (2005) *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*, **29**, 511-529.
- Ayala, D. I., Cook, P. W., Franco, J. G., Bugarel, M., Kottapalli, K. R., Loneragan, G. H., Brashears, M. M., Nightingale, K. K. (2019) A Systematic Approach to Identify and Characterize the Effectiveness and Safety of Novel Probiotic Strains to Control Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, **10**, 1108.
- Azad, M. A. K., Sarker, M., Li, T., Yin, J. (2018) Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed research international*.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarman, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstain, V., Wilke, A., Zaganitko, O. (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, **9**, 75.
- Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P. (2011) New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, **29**, 54-66.
- Banić, M., Butorac, K., Čuljak, N., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Bellich, B., Kazazić, S., Kazazić, S., Cescutti, P., Šušković, J., Zucko, J., Kos, B. (2022) The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Biomolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(22), 14382.
- Banić, M., Uroić, K., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Zorić, K., Durgo, K., Petković, H., Jamnik, P., Kazazić, S., Kazazić, S., Radović, S., Scalabrin, S., Hynönen, U., Šušković, J., Kos, B. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT – Food Science and Technology*, **93**, 257-267.
- Banzragch, M., Sanli, K., Stensvold, C. R., Kurt, O., Ari, S. (2023) Metabarcoding of colonic cleansing fluid reveals unique bacterial members of mucosal microbiota associated with Inflammatory Bowel Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1-11.

- Barajas-Álvarez, P., González-Ávila, M., Espinosa-Andrews, H. (2023) Recent advances in probiotic encapsulation to improve viability under storage and gastrointestinal conditions and their impact on functional food formulation. *Food Reviews International*, **39**(2), 992-1013.
- Barros, C. P., Guimaraes, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., Ferreira, B. M., Sant'Ana, A. S., Freitas, M. Q., Cruz, A. G. (2020) Paraprobiotics and postbiotics: Concepts and potential applications in dairy products. *Current opinion in food science*, **32**, 1-8.
- Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Gjuračić, K., Špoljarec, M., Šušković, J., Kos, B. (2011) Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *Journal of Food Science*, **76**(2), M124-M129.
- Behare, P. V., Rameshwar, S., Kumar, M., Prajapati, J. B., Singh, R. P. (2009) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: a review. *Journal of Food Science and Technology*, **46**, 1-11.
- Bendinelli, P., De Noni, I., Cattaneo, S., Silvetti, T., Brasca, M., Piazzalunga, F., Donetti, E., Ferraretto, A. (2023) Surface layer proteins from *Lactobacillus helveticus* ATCC® 15009™ affect the gut barrier morphology and function. *Tissue Barriers*, 2289838.
- Bergamaschi, G., Castiglione, F., D'Inca, R., Astegiano, M., Fries, W., Milla, M., Ciacci, C., Rizzello, F., Saibeni, S., Ciccocioppo, R., Orlando, A., Bossa, F., Principi, M., Vernia, P., Ricci, C., Scribano, M. L., Bodini, G., Mazzucco, D., Bassotti, G., Riegler, G., Buda, A., Neri, M., Caprioli, F., Monica, F., Manca, A., Villa, E., Fiorino, G., Comberlato, M., Aronico, N., Corte, C. D., Caccaro, R., Gionchetti, P., Giuffrida, P., Iovino, P., Lenti, M. V., Mengoli, C., Pellegrini, L., Pieraccini, A., Ribaldone, D., Testa, A., Ubezio, C., Viola, A., Vecchi, M., Klersy, C., Di Sabatino, A. (2023) Prevalence, pathogenesis and management of anemia in inflammatory bowel disease: an IG-IBD multicenter, prospective, and observational study. *Inflammatory Bowel Diseases*, **29**(1), 76-84.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A. (2012) Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **61**, 160-174.
- Bintsis, T. (2018) Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, **4**, 665-684.
- Boquien, C. Y. (2018). Human milk: an ideal food for nutrition of preterm newborn. *Frontiers in pediatrics*, **6**, 295.

- Bor, B., Bedree, J. K., Shi, W., McLean, J. S., He, X. (2019) Saccharibacteria (TM7) in the human oral microbiome. *Journal of dental research*, **98**(5), 500-509.
- Bosnea, L. A., Moschakis, T., Biliaderis, C. G. (2017) Microencapsulated cells of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in biopolymer complex coacervates and their function in a yogurt matrix. *Food and Function*, **8**, 554-562.
- Bourgin, M., Kriaa, A., Mkaouar, H., Mariaule, V., Jablaoui, A., Maguin, E., Rhimi, M. (2021) Bile salt hydrolases: at the crossroads of microbiota and human health. *Microorganisms*, **9**(6), 1122.
- Bravo-Ferrada, B. M., Gonçalves, S., Semorile, L., Santos, N. C., Brizuela, N. S., Tymczynszyn, E. E., Hollmann, A. (2018) Cell surface damage and morphological changes in *Oenococcus oeni* after freeze-drying and incubation in synthetic wine. *Cryobiology*, **82**, 15-21.
- Buckley, A., Turner, J. R. (2018) Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **10**, a029314.
- Butorac, K., Novak, J., Banić, M., Leboš Pavunc, A., Čuljak, N., Oršolić, N., Odeh, D., Perica, J., Šušković, J., Kos, B. (2023) Modulation of the Gut Microbiota by the Plantaricin-Producing *Lactiplantibacillus plantarum* D13, Analysed in the DSS-Induced Colitis Mouse Model. *International journal of molecular sciences* **24**(20), 15322.
- Butorac, K., Novak, J., Bellich, B., Terán, L. C., Banić, M., Leboš Pavunc, A., Zjalić, S., Cescutti, P., Šušković, J., Kos, B. (2021) Lyophilized alginate-based microspheres containing *Lactobacillus fermentum* D12, an exopolysaccharides producer, contribute to the strain's functionality *in vitro*. *Microbial Cell Factories*, **20**, 85.
- Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Durgo, K., Oršolić, N., Kukulj, M., Radović, S., Scalabrin, S., Žučko, J., Starčević, A., Šušković, J., Kos, B. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microbial Cell Factories*, **19**, 106.
- Cassani, L., Gomez-Zavaglia, A., Simal-Gandara, J. (2020) Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: From food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. *Food Research International*, **129**, 108852.

- Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. (2018) Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Frontiers in Microbiology*, **9**, 2426.
- Centurion, F., Basit, A. W., Liu, J., Gaisford, S., Rahim, M. A., Kalantar-Zadeh, K. (2021) Nanoencapsulation for probiotic delivery. *ACS nano*, **15**, 18653-18660.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., Vijay-Kumar, M. (2014) Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current protocols in immunology*, **104**, 15-25.
- Chen, Y., Zhang, M., Ren, F. (2019) A role of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* in the intestinal inflammation and mucosal barrier in Caco-2 monolayer and dextran sulphate sodium-induced experimental murine colitis. *Molecules*, **24**, 513.
- Chen, G. Y., Chen, C. Y., Dah-Tsyr Chang, M., Matsuura, Y., Hu, Y. C. (2009) Concanavalin A Affinity Chromatography for Efficient Baculovirus Purification. *Biotechnology Progress*, **25**, 1669-1677.
- Chiang, S. S., Liu, C. F., Tseng, K. C., Mau, J. L., Pan, T. M. (2012) Immunomodulatory effects of dead *Lactobacillus* on murine splenocytes and macrophages. *Food and Agricultural Immunology*, **23**, 183-202.
- Chiba, Y., Shida, K., Nagata, S., Wada, M., Bian, L., Wang, C., Shimizu, T., Yamashiro, Y., Kiyoshima-Shibata, J., Nanno, M., Nomoto, K. (2010) Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei*. *Immunology*, **130**(3), 352-362.
- Cizeikiene, D., Jagelaviciute, J. (2021) Investigation of antibacterial activity and probiotic properties of strains belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera for their potential application in functional food and feed products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **13**, 1387-1403.
- Cuevas-González, P. F., Liceaga, A. M., Aguilar-Toalá, J. E. (2020) Postbiotics and Paraprobiotics: From concepts to applications. *Food Research International*, **136**, 109502.
- Čuljak, N., Bellich, B., Pedron, A., Butorac, K., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Banić, M., Šušković, J., Cescutti, P., Kos, B. (2024a) *Limosilactobacillus fermentum* strains MC1 and D12: functional properties and exopolysaccharides characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **273**, 133215.

- Čuljak, N., Leboš Pavunc, L., Dučkić, K., Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Šušković, J., Kos, B. (2024b) Functionality and protective effect of S-layer proteins in microencapsulated freeze-dried probiotic *Levilactobacillus brevis* strains. *Mljekarstvo*, **74**(3), 208-218.
- Daba, G. M., Elnahas, M. O., Elkhateeb, W. A. (2021) Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **173**, 79-89.
- Damaceno, Q. S., Souza, J. P., Nicoli, J. R., Paula, R. L., Assis, G. B., Figueiredo, H. C., Azevedo, V., Martins, F. S. (2017) Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum. *Probiotics and antimicrobial proteins*, **9**, 371-379.
- D'ambrosio, S., Ventrone, M., Fusco, A., Casillo, A., Dabous, A., Cammarota, M., Corsaro, M. M., Donnarumma, G., Schiraldi, C., Cimini, D. (2022) *Limosilactobacillus fermentum* from buffalo milk is suitable for potential biotechnological process development and inhibits *Helicobacter pylori* in a gastric epithelial cell model. *Biotechnology Reports*, **34**, e00732.
- Das, B., Nair, G. B. (2019) Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. *Journal of Biosciences*, **44**, 117.
- De Andrés, J., Jiménez, E., Chico-Calero, I., Fresno, M., Fernández, L., Rodríguez, J. M. (2017) Physiological translocation of lactic acid bacteria during pregnancy contributes to the composition of the milk microbiota in mice. *Nutrients*, **10**(1), 14.
- de Simone, C. (2019) The unregulated probiotic market. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **17**(5), 809-817.
- de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., Ramos, Ó. L. (2017) Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: *In vitro* behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, **243**, 23-45.
- de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., Cani, P. D. (2022) Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, **71**, 1020-32.
- Di Tommaso, N., Gasbarrini, A., Ponziani, F. R. (2021) Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **18**, 12836.
- Divyashree, S., Anjali, P. G., Somashekaraiah, R., Sreenivasa, M. Y. (2021) Probiotic properties of *Lactobacillus casei*-MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*. *Biotechnology Reports*, **32**, e00672.

- Dörr, T., Moynihan, P. J., Mayer, C. (2019) Bacterial cell wall structure and dynamics. *Frontiers in microbiology*, **10**, 487209.
- dos Santos, C. I., Campos, C. D., Nunes-Neto, W. R., do Carmo, M. S., Nogueira, F. A., Ferreira, R. M., Costa, E. P. S., Gonzaga, L. F., Araújo, J. M. M., Monteiro, J. M., Monteiro, C. R. A. V., Planter, F. S., Figueiredo, I. F. S., Holanda, R. A., Monteiro, S. G., Fernandes, E. S., Monteiro, A. S., Monteiro-Neto, V. (2021) Genomic analysis of *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271, a potential probiotic strain with anti-Candida activity. *Journal of Fungi*, **7**(10), 794.
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier, F., Gänzle, M., Walter, J. (2017) Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS microbiology reviews*, **41**, S27-S48.
- Elshagabee, F. M. F., Rokana, N. (2022) Mitigation of antibiotic resistance using probiotics, prebiotics and synbiotics. A review. *Environmental Chemistry Letters*, **20**(2), 1295-1308.
- Esawy, M. A., Ahmed, E. F., Helmy, W. A., Mansour, N. M., El-Senousy, W. M., El-Safty, M. M. (2012) Antiviral levans from *Bacillus* spp. isolated from honey. *The complex world of polysaccharides*, 195-214.
- Fagan, R. P., Fairweather, N. F. (2014) Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nature Reviews Microbiology*, **12**, 211-222.
- Falasconi, I., Fontana, A., Patrone, V., Rebecchi, A., Duserm Garrido, G., Principato, L., Callegari, M. L., Spigno, G., Morelli, L. (2020) Genome-assisted characterization of *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria*, and *Weissella confusa* strains isolated from sorghum as starters for sourdough fermentation. *Microorganisms*, **8**(9), 1388.
- FAO/WHO (2002) Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1.
- FAO/WHO (2001) Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Córdoba, Argentina, str. 19-20.
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., Ouwehand, A. C. (2019) The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, **7**(3), 83.



- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., Rodríguez, J. M. (2013) The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research*, **69**(1), 1-10.
- Ferrari, M., Hameleers, L., Stuart, M. C., Oerlemans, M. M., de Vos, P., Jurak, E., Walvoort, M. T. (2022) Efficient isolation of membrane-associated exopolysaccharides of four commercial bifidobacterial strains. *Carbohydrate polymers*, **278**, 118913.
- Franco Fraguas, L., Batista-Viera, F., Carlsson, J. (2004) Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots, *Journal of Chromatography B*, **803**, 237-241.
- Franz, B., Balkundi, S. S., Dahl, C., Lvov, Y. M., Prange, A. (2010) Layer-by-layer nano-encapsulation of microbes: controlled cell surface modification and investigation of substrate uptake in bacteria. *Macromolecular bioscience*, **10**, 164-172.
- Fu, G., Zhao, K., Chen, H., Wang, Y., Nie, L., Wei, H., Wan, C. (2019) Effect of 3 lactobacilli on immunoregulation and intestinal microbiota in a  $\beta$ -lactoglobulin-induced allergic mouse model. *Journal of Dairy Science*, **102**, 1943-1958.
- Fukuyama, K., Islam, M., Takagi, M., Ikeda-Ohtsubo, W., Kurata, S., Aso, H., Vignolo, G., Villena, J., Kitazawa, H. (2020) Evaluation of the Immunomodulatory Ability of Lactic Acid Bacteria Isolated from Feedlot Cattle Against Mastitis Using a Bovine Mammary Epithelial Cells *In Vitro* Assay. *Pathogens*, **9**, 410.
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P. Serradell, M. A., Gómez-Zavaglia, A. (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**, 1877-1887.
- Gou, H. Z., Zhang, Y. L., Ren, L. F., Li, Z. J., Zhabg, L. (2022) How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier?. *Frontiers in Microbiology*, **13**, 929346.
- Gradisteanu Pircalabioru, G., Popa, L. I., Marutescu, L., Gheorghe, I., Popa, M., Czobor Barbu, I., Cristescu, R., Chifiriuc, M. C. (2021) Bacteriocins in the era of antibiotic resistance: Rising to the challenge. *Pharmaceutics*, **13**(2), 196.
- Gul, O., Atalar, I. (2019) Different stress tolerance of spray and freeze dried *Lactobacillus casei* Shirota microcapsules with different encapsulating agents. *Food science and biotechnology*, **28**, 807-816.
- Guo, X. Y., Liu, X. J., Hao, J. Y. (2020) Gut microbiota in ulcerative colitis: insights on pathogenesis and treatment. *Journal of digestive diseases*, **21**, 147-159.

- Gupta, R., Jeevaratnam, K., Fatima, A. (2018) Lactic Acid Bacteria: Probiotic Characteristic, Selection Criteria, and its Role in Human Health (A Review). *International Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, **5**(10).
- Haddaji, N., Mahdhi, A. K., Krifi, B., Ismail, M. B., Bakhrouf, A. (2015) Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment. *FEMS microbiology letters*, **362**(9), fmv047.
- Halimeh, F. B., Rafei, R., Osman, M., Kassem, I. I., Diene, S. M., Dabboussi, F., Rolain, H., M., Hamze, M. (2021) Historical, current, and emerging tools for identification and serotyping of *Shigella*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1-13.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4**, 9.
- Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., Castrejón-Jiménez, N. S. (2021) Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals*, **11**(4), 979.
- Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Suárez, A., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. (2012) Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **4**, 227-237.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., Sanders, M. E. (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, **11**(8), 506-514.
- Hoffmann, A., Kleniewska, P., Pawliczak, R. (2021) Antioxidative activity of probiotics. *Archives of Medical Science: AMS*, **17**(3), 792.
- Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Nunes, G. L., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., de Menezes, C. R. (2016) Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT – Food Science and Technology*, **71**, 302-308.

- How, Y. H., Lai, K. W., Pui, L. P., In, L. L. A. (2022) Co-extrusion and extrusion microencapsulation: Effect on microencapsulation efficiency, survivability through gastrointestinal digestion and storage. *Journal of Food Process Engineering*, **45**, e13985.
- Hoxha, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y. (2022) Antibiotic resistance profile of the newly isolated lactic acid bacteria strains from traditional fermented foods. *Current trends in natural sciences*, **11**(21), 247-253.
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., Zuber, M. (2017) Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International journal of biological macromolecules*, **94**, 10-27.
- Hynonen, U., Palva, A. (2013) Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**(12), 5225-5243.
- Javitt, G., Kinzel, A., Reznik, N., Fass, D. (2021) Conformational switches and redox properties of the colon cancer-associated human lectin ZG16. *FEBS Journal*, **288**, 6465-6475.
- Johnson, B., Hymes J., Sanozky-Dawes, R., Henriksen, E. D., Barrangou, R., Klaenhammer, T. R. (2016) Conserved S-layer associated proteins revealed by exoproteomic survey of S-layer forming lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, **82**(1), 134-145.
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Garstein, M., Sodergren, E., Weinstock, G. M. (2019) Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications*, **10**(1), 5029.
- Ju, T., Kong, J. Y., Stothard, P., Willing, B. P. (2019) Defining the role of *Parasutterella*, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota. *The ISME journal*, **13**, 1520-1534.
- Jurášková, D., Ribeiro, S. C., Silva, C. C. (2022) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, **11**(2), 156.
- Kałużna, A., Olczyk, P., Komosińska-Vassev, K. (2022) The role of innate and adaptive immune cells in the pathogenesis and development of the inflammatory response in ulcerative colitis. *Journal of Clinical Medicine*, **11**(2), 400.
- Kamiya, N., Ishikawa, Y., Kotani, K., Hatakeyama, S., Matsumura, M. (2022) Monocyte-to-Lymphocyte Ratio in the Diagnosis of Lymphoma in Adult Patients. *International Journal of General Medicine*, **15**, 4221-4226.

- Kant, R., Uroić, K., Hynonen, U., Kos, B., Šušković, J., Palva, A. (2016) Genome Sequence of *Lactobacillus brevis* Strain D6, Isolated from Smoked Fresh Cheese. *Genome A*, **4**, e00264-16.
- Kers, J. G., Saccenti, E. (2022) The power of microbiome studies: Some considerations on which alpha and beta metrics to use and how to report results. *Frontiers in microbiology*, **12**, 796025.
- Kim, S., Lee, J. Y., Jeong, Y., Kang, C. H. (2022) Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria. *Fermentation*, **8**(1), 29.
- Klotz, C., Goh, Y. J., O'Flaherty, S., Barrangou, R. (2020) S-layer associated proteins contribute to the adhesive and immunomodulatory properties of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *BMC microbiology*, **20**, 1-13.
- Korcz, E., Varga, L. (2021) Exopolysaccharides from lactic acidbacteria: techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, **110**, 375-384.
- Kowalska, E., Ziarno, M., Ekielski, A., Żelaziński, T. (2022) Materials used for the microencapsulation of probiotic bacteria in the food industry. *Molecules*, **27**(10), 3321.
- Kšonžeková, P., Bystrický, P., Vlčková, S., Pätoprstý, V., Pulzová, L., Mudroňová, D., Kubašková, T., Csank, T., Tkáčiková, E. (2016) Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response. *Carbohydrate Polymers*, **141**, 10-19.
- Lan, D., Niu, J., Miao, J., Dong, X., Wang, H., Yang, G., Wang, K., Miao, Y. (2016) Expression of guanylate cyclase-C, guanylin and uroguanylin is downregulated proportionally to the ulcerative colitis disease activity index. *Scientific Reports*, **6**, 25034.
- Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S. K., Hart, A. L., Knight, S. C., Ciclitira, P. J., Al-Hassi, H. O. (2016) Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **22**, 3117-3126.
- Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., Korma, S. A. (2023) Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in microbiology*, **14**, 1216674.
- Lea, T. (2015) Caco-2 cell line. U: *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models* (Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A.,

Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., ured.), Springer, Heidelberg/Berlin, Njemačka, str. 103-111.

Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Kos, B., Buneta, A., Beluhan, S., Šušković, J. (2011) Influence of microencapsulation and transglutaminase on viability of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92 and consistency of set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, **64**(2), 254-261.

Leroy, F., De Vuyst, L. (2016) Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. *Journal of Dairy Science*, **99**, 3229-3238.

Li, W., Lei, X., Feng, H., Li, B., Kong, J., Xing, M. (2022) Layer-by-layer cell encapsulation for drug delivery: the history, technique basis, and applications. *Pharmaceutics*, **14**(2), 297.

Li, F., Wang, D., Zhou, J., Men, D., Zhan, X. E. (2020) Design and biosynthesis of functional protein nanostructures. *Science China Life Sciences*, **63**, 1142-1158.

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

Lièven-Le Moal, V., Servin, A. L. (2006) The front line of enteric host defence against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**, 315-337.

Lin, H., An, Y., Hao, F., Wang, Y., Tang, H. (2016) Correlations of fecal metabonomic and microbiomic changes induced by high-fat diet in the pre-obesity state. *Scientific reports*, **6**, 21618.

Liu, Y., Zheng, S., Cui, J., Guo, T., Zhang, J., Li, B. (2021) Alleviative effects of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* KLDS1.8701 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Microorganisms*, **9**, 2086.

Liu, Y., Yu, X., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., Chen, W. (2020) The role of MUC2 mucin in intestinal homeostasis and the impact of dietary components on MUC2 expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, **164**, 884-891.

Liu, Z., Zhang, Z., Qiu, L., Zhang, F., Xu, X., Wei, H., Tao, X. (2017) Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of Dairy Science*, **100**(9), 6895-6905.

- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z. (2008) Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**(15), 1650-1662.
- Loeffler, M., Hilbig, J., Velasco, L., Weiss, J. (2020) Usage of *in situ* exopolysaccharide-forming lactic acid bacteria in food production: meat products—a new field of application?. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **19**, 2932–2954.
- Luo, Y., De Souza, C., Ramachandran, M., Wang, S., Yi, H., Ma, Z., Zhang, L., Lin, K. (2022) Precise oral delivery systems for probiotics: A review. *Journal of Controlled Release*, **352**, 371-384.
- Lynch, J. B., Gonzalez, E. L., Choy, K., Faull, K. F., Jewell, T., Arellano, A., Liang, J., Paramo, J., Hsiao, E. Y. (2023) Gut microbiota *Turicibacter* strains differentially modify bile acids and host lipids. *Nature communications*, **14**(1), 3669.
- Lynch, K. M., Coffey, A., Arendt, E. K. (2018) Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*, **110**, 52-61.
- Lyons, K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., Stanton, C. (2020) Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health. *Nutrients*, **12**(4), 1039.
- Manivannan, M., Nathan, S. S., Sasikumar, P., Ramkumar, L., Navaneethan, D., Prabu, P., Anjalini, F. M., Dharamari, N., Alqahtani, M. S., Abbas, M. (2023) Review on applications of Pullulan in bone tissue engineering: Blends and composites with natural and synthetic polymers. *Polymers and Polymer Composites*, **31**, 09673911231192810.
- Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017) Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 1021.
- Martínez, B., Rodríguez, A., Kulakauskas, S., Chapot-Chartier, M. P. (2020) Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences. *FEMS microbiology reviews*, **44**(5), 538-564.
- Martyniak, A., Medynska-Przeczek, A., Wedrychowicz, A., Skoczen, S., Tomasik, P. J. (2021) Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. *Biomolecules*, **11**, 1903.
- Mathipa, M. G., Thantsha, M. S. (2017) Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathogens*, **9**, 28.

Matricardi, P., Di Meo, C., Coviello, T., Hennink, W. E., Alhaique, F. (2013) Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, **65**(9), 1172-1187.

Maxmen, A. (2017) Living therapeutics: scientists genetically modify bacteria to deliver drugs. *Nature Medicine*, **23**, 5-7.

Mazhar, S. F., Afzal, M., Almatroudi, A., Munir, S., Ashfaq, U. A., Rasool, M., Raza, H., Munir, H. M. W., Riaz Rajoka, M. S., Khurshid, M. (2020) The prospects for the therapeutic implications of genetically engineered probiotics. *Journal of Food Quality*, **2020**(1), 9676452.

Melamed, J., LeBlanc, G., Constantinides, M. G. (2022) Gut microbiota gestalt. *Cell Host Microbe*, **30**, 899-901.

Meng, H., Li, W., Boardman, L. A., Wang, L. (2018) Loss of ZG16 is associated with molecular and clinicopathological phenotypes of colorectal cancer. *Bmc Cancer*, **18**, 1-11.

Min, Z., Xiaona, H., Aziz, T., Jian, Z., Zhennai, Y. (2020) Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* YW11 improve immune response and ameliorate inflammatory bowel disease symptoms. *Acta Biochimica Polonica*, **67**(4), 485-493.

Mishra, B. K., Das, S., Nandy, S. K., Patel, M., Hati, S. (2023) Genomic and probiotic attributes of *Lactobacillus* strains from rice-based fermented foods of North Eastern India. *Journal of Food Science and Technology*, **60**(2), 504-516.

Misra, S., Pandey, P., Dalbhat, C. G., Mishra, H. N. (2022) Emerging technologies and coating materials for improved probiotic in food products: A review. *Food and Bioprocess Technology*, **15**(5), 998-1039.

Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., Chatzifragkou, A. (2019) Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 6463-6472.

Monteiro, S. S., Schnorr, C. E., Pasquali, M. A. D. B. (2023) Paraprobiotics and Postbiotics- Current State of Scientific Research and Future Trends toward the Development of Functional Foods. *Foods*, **12**(12), 2394.

Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J. P. (2020) Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation*, **6**(1), 23.

- Moscovici, M. (2015) Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in microbiology*, **6**, 1012.
- Munyaka, P. M., Rabbi, M. F., Khafipour, E., Ghia, J. E. (2016) Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *Journal of basic microbiology*, **56**(9), 986-998.
- Nampoothiri, K. M., Beena, D. J., Vasanthakumari, D. S., Ismail, B. (2017) Health benefits of exopolysaccharides in fermented foods. U: *Fermented Foods in Health and Disease Prevention* (Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Pe~nas, E., ured.), Amsterdam: Elsevier, str. 49-62.
- Nemeth, E., Ganz, T. (2023) Hecpidin and iron in health and disease. *Annual review of medicine*, **74**, 261-277.
- Nguyen, P. T., Nguyen, T. T., Bui, D. C., Hong, P. T., Hoang, Q. K., Nguyen, H. T. (2020) Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS microbiology*, **6**(4), 451.
- Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., Andoh, A. (2018) Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical journal of gastroenterology*, **11**, 1-10.
- Novak, J., Butorac, K., Leboš Pavunc, A., Banić, M., Butorac, A., Lepur, A., Oršolić, N., Tonković, K., Bendelja, K., Čuljak, N., Lovrić, M., Šušković, J., Kos, B. (2021) A Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules*, **27**, 160.
- O'Toole, P. W., Marchesi, J. R., Hill, C. (2017) Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature microbiology*, **2**(5), 1-6.
- Otani, T., Furuse, M. (2020) Tight junction structure and function revisited. *Trends Cell Biology*, **30**, 805-817.
- Paparo, L., Tripodi, L., Bruno, C., Pisapia, L., Damiano, C., Pastore, L., Berni Canani, R. (2020) Protective action of *Bacillus clausii* probiotic strains in an *in vitro* model of Rotavirus infection. *Scientific reports*, **10**(1), 12636.
- Parker, R. (1974) Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, **29**, 4-8.



- Patel, A., Prajapati, J. (2013) Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, **1**, 1-7.
- Patel, A. K., Michaud, P., Singhania, R. R., Soccol, C. R., Pandey, A. (2010) Polysaccharides from probiotics: new developments as food additives. *Food Technology and Biotechnology*, **48**(4), 451-463.
- Pech-Canul, A. D. L. C., Ortega, D., García-Triana, A., González-Silva, N., Solis-Oviedo, R. L. (2020) A brief review of edible coating materials for the microencapsulation of probiotics. *Coatings*, **10**, 197.
- Pereira, C., Grácio, D., Teixeira, J. P., Magro, F. (2015) Oxidative Stress and DNA Damage: Implications in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory bowel diseases*, **21**, 2403-2417.
- Pfeifer, K., Ehmoser, E. K., Rittmann, S. K. M., Schleper, C., Pum, D., Sleytr, U. B., Schuster, B. (2022) Isolation and characterization of cell envelope fragments comprising archaeal S-layer proteins. *Nanomaterials*, **12**(14), 2502.
- Phoem, A. N., Chanthachum, S., Voravuthikunchai, S. P. (2015) Applications of microencapsulated *Bifidobacterium longum* with *Eleutherine americana* in fresh milk tofu and pineapple juice. *Nutrients*, **7**(4), 2469-2484.
- Porter, R. J., Kalla, R., Ho, G. T. (2020) Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. *F100 Research*, **9**, 294.
- Prado Acosta, M., Goyette-Desjardins, G., Scheffel, J., Dudeck, A., Ruland, J., Lepenies, B. (2021) S-Layer from *Lactobacillus brevis* modulates antigen-presenting cell functions via the Mincle-Syk-Card9 Axis. *Frontiers in Immunology*, **12**, 511.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Khanda, S. M. (2013) Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate polymers*, **95**(1), 540-549.
- Prechtel, R. M., Wefers, D., Jakob, F., Vogel, R. F. (2018) Structural characterization of the surface-associated heteropolysaccharide of *Lactobacillus plantarum* TMW 1.1478 and genetic analysis of its putative biosynthesis cluster. *Carbohydrate Polymers*, **202**, 236-245.
- Priya, A. J., Vijayalakshmi, S. P., Raichur, A. M. (2011) Enhanced survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by encapsulation with nanostructured polyelectrolyte layers through layer-by-layer approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 11838-11845.

- Qiao, N., Wittouck, S., Mattarelli, P., Zheng, J., Lebeer, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G. (2022) After the storm – Perspectives on the taxonomy of *Lactobacillaceae*. *JDS communications*, **3**(3), 222-227.
- Rabetafika, H. N., Razafindralambo, A., Ebenso, B., Razafindralambo, H. L. (2023) Probiotics as Antibiotic Alternatives for Human and Animal Applications. *Encyclopedia*, **3**(2), 561-581.
- Raddatz, G. C., Poletto, G., de Deus, C., Codevilla, C. F., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Muller, E. I., Moraes Flores, E. M., Esmarino, E. A., de Menezes, C. R. (2020) Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying. *Food Research International*, **130**, 108902.
- Raj, K., K., Sardar, U. R., Bhargavi, E., Devi, I., Bhunia, B., Tiwari, O. N. (2018) Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: a critical review. *Carbohydrate Polymers*, **199**, 353-364.
- Rana, S., Upadhyay, L. S. B. (2020) Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International journal of biological macromolecules*, **157**, 577-583.
- Rashidinejad, A., Bahrami, A., Rehman, A., Rezaei, A., Babazadeh, A., Singh, H., Jafari, S. M. (2022) Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products. *Critical reviews in food science and nutrition*, **62**(9), 2470-2494.
- Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., Gibson, D. L., Hoorfar, M. (2021) Nanomaterial-based encapsulation for controlled gastrointestinal delivery of viable probiotic bacteria. *Nanoscale Advances*, **3**(10), 2699-2709.
- Reese, A. T., Dunn, R. R. (2018) Drivers of microbiome biodiversity: a review of general rules, feces, and ignorance. *MBio*, **9**(4), 10-1128.
- Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Pulcini, G., Mele, M. C. (2019) Food components and dietary habits: keys for a healthy gut microbiota composition. *Nutrients*, **11**(10), 2393.
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., Sato, H. H. (2020) Encapsulated Probiotic Cells: Relevant Techniques, Natural Sources as Encapsulating Materials and Food Applications - A Narrative Review. *Food Research International*, **137**, 109682.

- Roobab, U., Batool, Z., Manzoor, M. F., Shabbir, M. A., Khan, M. R., Aadil, R. M. (2020) Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Current Opinion in Food Science*, **32**, 17-28.
- Saeed, A. H., Salam, A. I. (2013) Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013.
- Sagmeister, T., Gubensäk, N., Buhlheller, C., Grininger, C., Eder, M., Đordić, A., Millán, C., Medina, A., Sánchez Murcia, P. A., Berni, F., Hynönen, U., Vejzović, D., Damisch, E., Kulminskaya, N., Petrowitsch, L., Oberer, M., Palva, A., Malanović, N., Codée, J., Keller, W., Usón, I., Pavkov-Keller, T. (2024) The molecular architecture of *Lactobacillus* S-layer: Assembly and attachment to teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **121**(24), e2401686121.
- Sarkar, A., Lehto, S. M., Harty, S., Dinan, T. G., Cryan, J. F., Burnet, P. W. (2016) Psychobiotics and the manipulation of bacteria–gut–brain signals. *Trends in neurosciences*, **39**(11), 763-781.
- Sartor, R. B., Wu, G. D. (2017) Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. *Gastroenterology*, **152**, 327-339.
- Savoia, C., Volpe, M., Grassi, G., Borghi, C., Agabiti Rosei, E., Touyz, R. M. (2017) Personalized medicine – a modern approach for the diagnosis and management of hypertension. *Clinical science*, **131**(22), 2671-2685.
- Schmid, J. (2018) Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies. *Current opinion in biotechnology*, **53**, 130-136.
- Schuster, B., Sleytr, U. B. (2021) S-layer ultrafiltration membranes. *Membranes*, **11**(4), 275.
- Selvamani, S., Dailin, D. J., Gupta, V. K., Wahid, M., Keat, H. C., Natasya, K. H., Malek, R. A., Haque, S., Sayyed, R. Z., Abomoelak, B., Sukmawati, D., Varzakas, T., El Enshasy, H. A. (2021) An insight into probiotics bio-route: translocation from the mother’s gut to the mammary gland. *Applied Sciences*, **11**(16), 7247.
- Şengül, N., Işık, S., Aslım, B., Uçar, G., Demirbağ, A. E. (2011) The effect of exopolysaccharide-producing probiotic strains on gut oxidative damage in experimental colitis. *Digestive diseases and sciences*, **56**, 707-714.

- Sharma, M., Shukla, G. (2016) Metabiotics: one step ahead of probiotics; an insight into mechanisms involved in anticancerous effect in colorectal cancer. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1940-1940.
- Shori, A. B., Aljohani, G. S., Al-zahrani, A. J., Al-sulbi, O. S., Baba, A. S. (2022) Viability of probiotics and antioxidant activity of cashew milk-based yogurt fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT – Food Science and Technology*, **153**, 112482.
- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., Winterbourn, C. (2022) Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **23**(7), 499-515.
- Singh, P., Medronho, B., Miguel, M. G., Esquena, J. (2018) On the Encapsulation and Viability of Probiotic Bacteria in Edible Carboxymethyl Cellulose-Gelatin Water-in-Water Emulsions. *Food Hydrocolloids*, **75**, 41-50.
- Singh, R. P., Shadan, A., Ma, Y. (2022) Biotechnological applications of probiotics: a multifarious weapon to disease and metabolic abnormality. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **14**(6), 1184-1210.
- Singh, T. P., Natraj, B. H. (2021) Next-generation probiotics: a promising approach towards designing personalized medicine. *Critical Reviews in Microbiology*, **47**(4), 479-498.
- Sixt, B. S. (2021) Host cell death during infection with *Chlamydia*: a double-edged sword. *FEMS Microbiology Reviews*, **45**(1), fuaa043.
- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M., Pum, D. (2014) S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, **38**, 823-864.
- Smits, W. K., Lyras, D., Lacy, D. B., Wilcox, M. H., Kuijper, E. J. (2016) *Clostridium difficile* infection. *Nature reviews Disease primers*, **2**(1), 1-20.
- Song, C., Chai, Z., Chen, S., Zhang, X., Zhou, Y. (2023) Intestinal mucus components and secretion mechanisms: what we do and do not know. *Experimental & Molecular Medicine*, **55**, 681-691.
- Stackebrandt, E., Ebers, J. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*, **33**, 152-155.

Statistics Kingdom (2017) One-way ANOVA Calculator and Tukey HSD, Statistics Kingdom: Website for Statistics calculators, Melbourne, Australia; 2017. Available from: <http://www.statskingdom.com>.

Suárez, L. J., Arboleda, S., Angelov, N., Arce, R. M. (2021) Oral Versus Gastrointestinal Mucosal Immune Niches in Homeostasis and Allostasis. *Frontiers in Immunology*, **12**, 705206.

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., Elinav, E. (2019) The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature medicine*, **25**(5), 716-729.

Sumida, K., Lau, W. L., Kovesdy, C. P., Kalantar-Zadeh, K., Kalantar-Zadeh, K. (2021) Microbiome Modulation as a Novel Therapeutic Approach in Chronic Kidney Disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **30**, 75-84.

Sun, Q., Yin, S., He, Y., Cao, Y., Jiang, C. (2023) Biomaterials and Encapsulation Techniques for Probiotics: Current Status and Future Prospects in Biomedical Applications. *Nanomaterials*, **13**, 2185.

Sun, X., Zhang, J. (2021) Bacterial exopolysaccharides: Chemical structures, gene clusters and genetic engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, **173**, 481-490.

Sun, Z., Harris, H. M., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I. B., Cooney, J. C., Kagawa, T. F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M. C., O'Sullivan, O., Ritari, J., Douillard, F. P., Ross, R. P., Yang, R., Briner, A. E., Felis, G. E., de Vos, W. M., Barrangou, R., Klaenhammer, T. R., Caufield, P. W., Cui, Y., O'Toole, P. W. (2015) Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature communications*, **6**(1), 8322.

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.

Suresh Kumar, A., Mody, K., Jha, B. (2007) Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of basic microbiology*, **47**(2), 103-117.

Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., Gao, C., Olsen, R. E., Ran, C., Zhou, Z. (2020) Paraprobiotics and postbiotics of probiotic *Lactobacilli*, their positive effects on the host and action mechanisms: A review. *Frontiers in nutrition*, **7**, 570344.

- Tett, A., Pasolli, E., Masetti, G., Ercolini, D., Segata, N. (2021) *Prevotella* diversity, niches and interactions with the human host. *Nature Reviews Microbiology*, **19**(9), 585-599.
- Tian, T., Wang, Z., Zhang, J. (2017) Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Torino, M. I., De Valdez, G. F., Mozzi, F. (2015) Biopolymers From Lactic Acid Bacteria. Novel Applications in Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1-16.
- Trush, E. A., Poluektova, E. A., Beniashvili, A. G. (2020) The evolution of human probiotics: challenges and prospects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **12**, 1291-1299.
- Tytgat, H. L., Douillard, F. P., Reunanen, J., Rasinkangas, P., Hendrickx, A. P., Laine, P. K., Paulin, L., Satokari, R., de Vos, W. M. (2016) *Lactobacillus rhamnosus* GG outcompetes *Enterococcus faecium* via mucus-binding pili: evidence for a novel and heterospecific probiotic mechanism. *Applied and environmental microbiology*, **82**(19), 5756-5762.
- Uroić, K., Novak, J., Hynönen, U., Pietilä, T. E., Leboš Pavunc, A., Kant, R., Kos, B., Palva, A., Šušković, J. (2016) The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT – Food Science and Technology*, **69**, 623-632.
- Uspenskiy, Y. P., Ivanov, S. V., Krasichkov, A. S., Galagudza, M. M., Fominykh, Y. A. (2022) Relationship between Undernutrition and Anemia in Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology Insights*, **14**(1), 27-36.
- van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., Kuipers, O. P. (2018) BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, **46**, 278-281.
- van Zyl, W. F., Deane, S. M., Dicks, L. M. T. (2020) Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. *Gut Microbes*, **12**, e1831339.
- Verce, M., De Vuyst, L., Weckx, S. (2020) Comparative genomics of *Lactobacillus fermentum* suggests a free-living lifestyle of this lactic acid bacterial species. *Food microbiology*, **89**, 103448.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L. L. (2020) Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, **9**(2), 59.

- Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., Manvi, D., Gowda, N. N. (2023) A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: Technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*, **3**(1), 100248.
- Wan, Y., Yang, L., Jiang, S., Qian, D., Duan, J. (2022) Excessive Apoptosis in Ulcerative Colitis: Crosstalk Between Apoptosis, ROS, ER Stress, and Intestinal Homeostasis. *Inflammatory Bowel Diseases*, **28**, 639-648.
- Wang, W., Sun, B., Deng, J., Ai, N. (2024) Addressing flavor challenges in reduced-fat dairy products: A review from the perspective of flavor compounds and their improvement strategies. *Food Research International*, 114478.
- Wang, X., Gao, S., Yun, S., Zhang, M., Peng, L., Li, Y., Zhou, Y. (2022) Microencapsulating alginate-based polymers for probiotics delivery systems and their application. *Pharmaceuticals*, **15**, 644.
- Wang, Y., Yin, J., Zhang, T., Xin, Y., Huang, X., Nie, S. (2021) Utilizing relative ordered structure theory to guide polysaccharide purification for structural characterization. *Food Hydrocolloids*, **115**, 06603.
- Wang, G., Huang, S., Cai, S., Yu, H., Wang, Y., Zeng, X., Qiao, S. (2020) *Lactobacillus reuteri* ameliorates intestinal inflammation and modulates gut microbiota and metabolic disorders in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Nutrients*, **12**(8), 2298.
- Wang, M., Yang, J., Li, M., Wang, Y., Wu, H., Xiong, L., Sun, Q. (2019) Enhanced viability of layer-by-layer encapsulated *Lactobacillus pentosus* using chitosan and sodium phytate. *Food chemistry*, **285**, 260-265.
- Wang, X., Shao, C. G., Liu, L., Guo, X., Xu, Y. M., Lu, X. (2017) Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, **103**, 1173-1184.
- Wołosiak, R., Drużyńska, B., Derewiaka, D., Piecyk, M., Majewska, E., Ciecierska, M., Worobiej, E., Pakosz, P. (2022) Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by ABTS and DPPH assays – A practical approach. *Molecules*, **27**(1), 50.
- Wuyts, S., Wittouck, S., De Boeck, I., Allonsius, C. N., Pasolli, E., Segata, N., Lebeer, S. (2017) Large-scale phylogenomics of the *Lactobacillus casei* group highlights taxonomic inconsistencies and reveals novel clade-associated features. *MSystems*, **2**(4), 10-1128.

- Xu, C., Ban, Q., Wang, W., Hou, J., Jiang, Z. (2022) Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems. *Journal of Controlled Release*, **349**, 184-205.
- Yang, B., Li, M., Wang, S., Ross, R. P., Stanton, C., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2021) *Lactobacillus ruminis* alleviates DSS-induced colitis by inflammatory cytokines and gut microbiota modulation. *Foods*, **10**(6), 1349.
- Yang, S. J., Kim, K. T., Kim, T. Y., Paik, H. D. (2020) Probiotic properties and antioxidant activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in fermented black gamju. *Foods*, **9**(9), 1154.
- Yang, J., Wang, Y., Zhang, Y. (2016) ResQ: An approach to unified estimation of B-factor and residue-specific error in protein structure prediction. *Journal of Molecular Biology*, **428**, 693-701.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, **12**, 7-8.
- Yao, H. Y. Y., Wang, J. Q., Yin, J. Y., Nie, S. P., Xie, M. Y. (2021) A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective, *Food Research International*, **143**, 110290.
- Yao, M., Xie, J., Du, H., McClements, D. J., Xiao, H., Li, L. (2020) Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **19**, 857-874.
- Yeung, T. W., Arroyo-Maya, I. J., McClements, D. J., Sela, D. A. (2016) Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: Enhancing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads. *Food and Function*, **7**, 1797-1804.
- Yildiz, H., Karatas, N. (2018) Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, **72**, 41-46.
- Yin, M., Yan, X., Weng, W., Yang, Y., Gao, R., Liu, M., Pan, C., Zhu, Q., Li, H., Wei, Q., Shen, T., Ma, Y., Qin, H. (2018) Micro integral membrane protein (MIMP), a newly discovered anti-inflammatory protein of *Lactobacillus plantarum*, enhances the gut barrier and modulates microbiota and inflammatory cytokines. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **45**(2), 474-490.



- Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M., Øregaard, G., Neves, A. R. (2017) Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS microbiology reviews*, **41**(Supp\_1), S168-S200.
- Zhang, J., Xiao, Y., Wang, H., Zhang, H., Chen, W., Lu, W. (2023) Lactic acid bacteria-derived exopolysaccharide: Formation, immunomodulatory ability, health effects, and structure-function relationship. *Microbiological Research*, **274**, 127432.
- Zhang, H., Duan, Y., Cai, F., Cao, D., Wang, L., Qiao, Z., Hong, Q., Li, N., Zheng, Z., Su, M., Liu, M., Zhu, B. (2022) Next-Generation Probiotics: Microflora Intervention to Human Diseases. *BioMed Research International*, 2022.
- Zhang, L., Zhao, B., Liu, C. J., Yang, E. (2020) Optimization of Biosynthesis Conditions for the Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the Exopolysaccharides Antioxidant Activity Test. *Indian Journal of Microbiology*, **60**, 334-345.
- Zhang, F., Li, Y., Wang, X., Wang, S., Bi, D. (2019) The impact of *Lactobacillus plantarum* on the gut microbiota of mice with DSS-induced colitis. *BioMed Research International*, 2019.
- Zhang, J., Gao, J., Guo, Y., Wu, Z., Pan, D. (2017) Extraction of *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074 S-layer proteins and their ability to inhibit enteropathogenic *Escherichia coli*. *Current microbiology*, **74**, 1123-1129.
- Zhang, W., Zhang, H. (2014) Genomics of lactic acid bacteria. U: *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*, Springer, Dordrecht, str. 205-247.
- 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.
- Zhao, S., Caruso, F., Dähne, L., Decher, G., De Geest, B. G., Fan, J., Feliu, N., Gogotsi, Y., Hammond, P. T., Hersam, M. C., Khademhosseini, A., Kotov, N., Leporatti, S., Li, Z., Lisdat, F., Liz-Marzán, L. M., Moya, S., Mulvaney, P., Rogach, A. L., Roy, S., Shchukin, D. G., Skirtach, A. G., Stevens, M. M., Sukhorukov, G. B., Weiss, P. S., Yue, Z., Zhu, D., Parak, W. J. (2019) The Future of Layer-by-Layer Assembly: A Tribute to ACS Nano Associate Editor Helmuth Möhwald. *ACS Nano*, **13**, 6151-6169.
- Zhao, P., Gu, H., Mi, H., Rao, C., Fu, J., Turng, L. (2018) Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. *Frontiers of Mechanical Engineering*, **13**(1), 107-119.

- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., Lebeer, S. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**(4), 2782-2858.
- Zhou, T. Q., Wang, X. C., Gao, L. Y., Yan, J. N., Wu, H. T. (2024) Construction and properties of curdlan gum/gellan gum binary composite gel system. *Food Hydrocolloids*, **148**, 109391.
- Zhou, X., Liu, H., Zhang, J., Mu, J., Zalan, Z., Hegyi, F., Takács, K., Zhao, X., Du, M. (2019a) Protective effect of *Lactobacillus fermentum* CQPC04 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice is associated with modulation of the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway. *Journal of dairy science*, **102**(11), 9570-9585.
- Zhou, Y., Cui, Y., Qu, X. (2019b) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate polymers*, **207**, 317-332.
- Zhou, X., Qi, W., Hong, T., Xiong, T., Gong, D., Xie, M., Nie, S. (2018) Exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* NCU116 regulate intestinal barrier function via STAT3 signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, **66**, 9719-9727.
- Zhu, S., Li, X., Song, L., Huang, Y., Xiao, Y., Chu, Q., Kang, Y., Duan, S., Wu, D., Ren, Z. (2021) Stachyose inhibits vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization and affects gut microbiota in mice. *Microbial Pathogenesis*, **159**, 105094.
- Zommiti, M., Feuilloley, M. G., Connil, N. (2020) Update of probiotics in human world: a nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*, **8**(12), 1907.

## **7. PRILOZI**

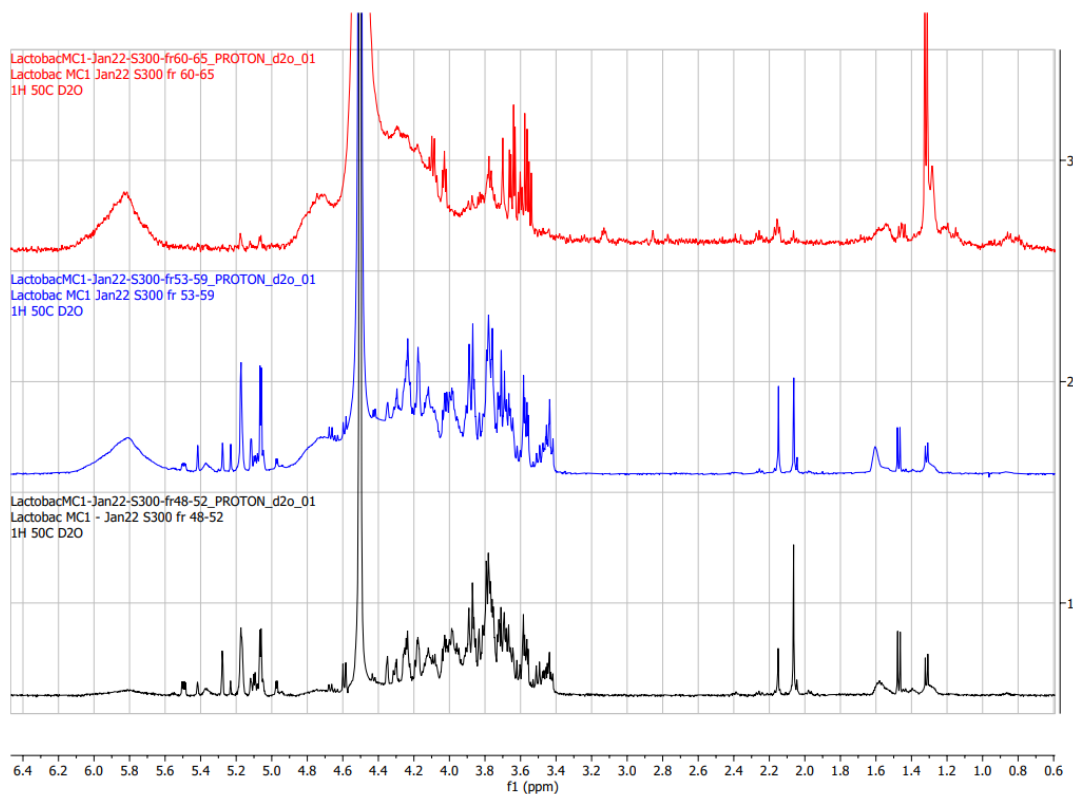
**PRILOG 1.** Sastav matične otopine za reverznu transkripciju za jedan uzorak - prema High Capacity DNA Reverse Transcription Kit uz dodatak RNaznih inhibitora

<b>Sastojak</b>	<b>Volumen (μL)</b>
10x RT pufer	4,0
25x dNTP miks (100 mM)	1,6
10x RT Random Primeri	4,0
Enzim MultiScribe™ Reverse Trascriptase	2,0
RNazni inhibitor (Applied Biosystems, Njemačka)	2,0
mQH <sub>2</sub> O	6,4
Konačan volumen	20,0

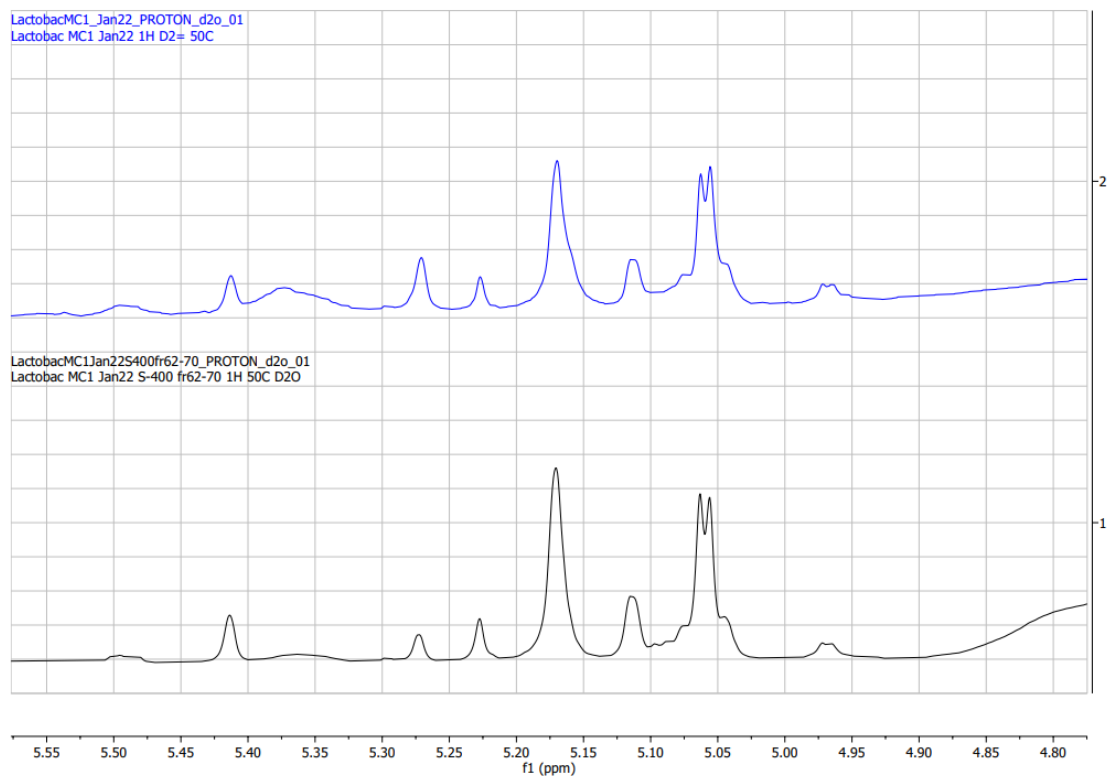
**PRILOG 2.** Početnice korištene za qPCR analizu sa optimiranim uvjetima

Oznaka gena	Sekvenca početnica (5'-3')	qPCR uvjeti *
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	ATGGGCAACCACTTACCTATTT GTTCTAGAGAGTGCTGCCTAATG	64 °C; 3 mM
<i>IL-6</i>	GATAAGCTGGAGTCACAGAAGG TTGCCGAGTAGATCTCAAAGTG	59 °C; 3.5 mM
<i>MCP-1</i>	CCTGGATCGGAACCAAATGA CGGGTCAACTTCACATTCAAAG	62 °C; 3 mM
<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	CCTTACACCTACCAGAGTGATTT CCTTACACCTACCAGAGTGATTT	65 °C; 3 mM
<i>TLR4</i>	TGGTCAGTGTGATTGTGGTATC GCTTCTCCTCTGCTGTACTT	58 °C; 3 mM
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	GTCTCAGAATGAGGCTGGATAAG CATTGCACCTCAGGGAAGAA	63 °C; 2.5 mM
<i>CD68</i>	CTCTTGCTGCCTCTCATCATT CTGGTAGGTTGATTGTTCGTCTG	58 °C; 2.5 mM
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	CTTTAGGAAGGACCTGGGTTG GTGTGTCCAGGCTCCAAATA	66 °C; 3 mM
<i>IGF1R</i>	CCAAGTTACCAGAAGGGCTAAT GGTAGGGACAATACAGGCTAAAT	59 °C; 3 mM
<i>GRP94</i>	AAGAATGAAGGAAAAACAGGACA AAACAAATGGAGAAGATTCCGCC	58 °C; 3 mM
<i>NOX2</i>	ACTCCTTGGGTCAGCACTGG GTTCCCTGTCCAGTTGTCTTCG	62 °C; 3 mM
<i>CHOP</i>	TTGAGCCTAACACGTCGATTAT CACTTCCTTCTGGAACACTCTC	58 °C; 3 mM
<i>AIFM1</i>	CGGGAGGTCAAGTCAATTACAG GGAACAGCTGGATCACTTCTATG	61 °C; 3.5 mM
<i>BCL2</i>	TCCAGCCACCTTCTTTCTATG GTTTCACCATGTTGCCTCTTAC	61 °C; 3 mM

\*optimirani qPCR uvjeti, temperatura prijanjanja početnica i koncentracija MgCl<sub>2</sub>



**PRILOG 3.**  $^1\text{H}$  NMR spektar tri frakcije egzopolisaharida izoliranih iz soja *L. fermentum* MC1 nakon pročišćavanja na koloni Sephacryl S-300 HR



**PRILOG 4.** Usporedba  $^1\text{H}$  NMR spektra anomeričke regije nativnog egzopolisaharida izoliranog iz soja *L. fermentum* MC1 (plavo) i nakon pročišćavanja na koloni Sephacryl S-400 HR (crno)

**PRILOG 5.** Promjena mase bolesnih i zdravih miševa tijekom eksperimenta

Skupina	DSS			ZDRAVI		
	Početna težina (g)	Završna težina (g)	Razlika u težini	Početna težina (g)	Završna težina (g)	Razlika u težini
<b>STD</b>	28,47 ± 0,30	22,56 ± 2,68	-7,16 ± 2,03	30,13 ± 0,73	28,90 ± 1,17	-1,23 ± 0,49****
<b>MC1</b>	24,92 ± 0,49	19,77 ± 2,44	-4,62 ± 2,15	24,90 ± 1,26	24,83 ± 1,86	-0,07 ± 0,94**
<b>EPS</b>	26,97 ± 0,75	21,42 ± 2,69	-4,71 ± 1,93	27,05 ± 0,38	25,20 ± 0,33	-1,85 ± 0,05**

\*Statistički značajna razlika u težini u odnosu na skupinu DSS (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

**PRILOG 6.** Hematološki pokazatelji u zdravih miševa

Hematološki pokazatelji	STD	MC1	EPS
<b>Eritrociti (<math>10^{12}/L</math>)</b>	1,98 ± 0,59	2,15 ± 0,11	2,36 ± 0,56
<b>Leukociti (<math>10^9/L</math>)</b>	1,37 ± 0,10	1,93 ± 0,14	1,70 ± 0,50
<b>Hemoglobin (g/L)</b>	30,00 ± 8,81	32,00 ± 1,93	35,67 ± 8,78
<b>Hematokrit (%)</b>	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,03
<b>Volumen eritrocita (fL)</b>	62,70 ± 4,02	61,63 ± 0,44	60,20 ± 1,87
<b>MCH (pg)</b>	15,13 ± 0,14	14,87 ± 0,15	15,07 ± 0,19
<b>MCHC (g/L)</b>	235,67 ± 16,55	241,33 ± 4,28	250,33 ± 9,40
<b>Distribucija eritrocita (%)</b>	14,00 ± 0,54	13,60 ± 0,04	14,53 ± 1,6
<b>Trombociti (<math>10^9/L</math>)</b>	86,00 ± 50,27	127,00 ± 9,32	172,67 ± 40,30**
<b>Volumen trombocita (fL)</b>	6,90 ± 0,24	6,73 ± 0,06	6,80 ± 0,18

\*Statistički značajno različito u odnosu na STD (\*\* $p < 0,01$ )

STD – zdravi miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, MC1 – zdravi miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom i probiotičkim sojem *L. fermentum* MC1, EPS – zdravi miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom i EPS-ima izoliranima iz soja *L. fermentum* MC1, MCH – sadržaj hemoglobina u eritrocitima, MCHC – koncentracija hemoglobina u eritrocitima

**PRILOG 7.** Diferencijalna krvna slika zdravih C57BL/6 miševa tretiranih sa sojem MC1 ili egzopolisaharidima (EPS)

Skupina	Neutrofili (%)	Limfociti (%)	Monociti (%)	Eozinofili (%)	Bazofili (%)
<b>STD</b>	11,73 ± 1,66	84,60 ± 0,91	2,07 ± 1,48	1,60 ± 1,24	0,00 ± 0,00
<b>MC1</b>	10,03 ± 1,93	88,27 ± 2,44**	0,93 ± 0,36	0,77 ± 1,19	0,00 ± 0,00
<b>EPS</b>	10,43 ± 3,04	79,70 ± 13,43	9,87 ± 11,18	0,00 ± 0,00*	0,00 ± 0,00

\*Statistički značajno različito u odnosu na STD (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

STD – zdravi miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom, MC1 – zdravi miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom i probiotičkim sojem *L. fermentum* MC1, EPS – zdravi miševi hranjeni standardnom laboratorijskom hranom i EPS-ima izoliranima iz soja *L. fermentum* MC1

## **8. ŽIVOTOPIS**



Nina Čuljak rođena je u Zagrebu 12. ožujka 1996. godine, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Prijediplomski studij "Biotehnologija" na Sveučilištu u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu je upisala 2014. godine, a završni rad "Kompetitivna ekskluzija bakterijama mliječne kiseline" izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura pod mentorstvom doc. dr. sc. Ksenije Uroić obranila je 2017. godine. Nakon toga je upisala diplomski studij "Molekularna biotehnologija" na istom Fakultetu te je 2019. godine obranila diplomski rad "Određivanje rezidua tetraciklina u jajima primjenom LC-MS/MS i UHPLC/QTOF-MS metode" izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos sa Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta te neposrednim voditeljstvom znanstvene suradnice dr. sc. Ivane Varenine i znanstvene savjetnice u trajnom zvanju dr. sc. Nine Bilandžić sa Hrvatskog veterinarskog instituta, čime je stekla titulu magistre inženjerke molekularne biotehnologije. Zaposlena je kao asistent 2020. godine na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“, u sklopu kojega je upisala poslijediplomski studij "Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam". Svoj je doktorski rad izradila pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, u okviru HRZZ-ovog projekta „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos. Dobitnica je FEMS-ove stipendije koja joj je omogućila tromjesečnu znanstvenu specijalizaciju 2022. godine na Zavodu za prirodne znanosti Sveučilišta u Trstu. Koautorica je 4 znanstvena rada Q1 kategorije, 1 znanstvenog rada Q2 kategorije, 1 znanstvenog rada Q3 kategorije i 2 znanstvena rada Q4 kategorije te 15 postera prezentiranih na domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima. Kao studentica je bila članica Studentske udruge Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta PROBION, a sada je članica Hrvatskog mikrobiološkog društva, Hrvatskog društva za biotehnologiju i Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista. Usavršavala se na brojnim stručnim radionicama te je sudjelovala u programima popularizacije znanosti za predškolsku i školsku dob. Osim u znanstveno-istraživačkom radu, sudjeluje u nastavi kao asistent na kolegijima Biotehnologija 4, Tehnologija antibiotika, Tehnologija enzima, Mikrobna ekologija, Probiotici i starter kulture i Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje, te pomaže u izradi završnih i diplomskih radova.

### Popis znanstvenih radova objavljenih u časopisu indeksiranom u CC ili SCI:

1. Čuljak, N., Bellich, B., Pedron, A., Butorac, K., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Banić, M., Šušković, J., Cescutti, P., Kos, B. (2024) *Limosilactobacillus fermentum* strains MC1 and D12: functional properties and exopolysaccharides characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **273**, 133215.
2. Čuljak, N., Leboš Pavunc, A., Dučkić, K., Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Šušković, J., Kos, B. (2024) Functionality and protective effect of S-layer proteins in microencapsulated freeze-dried probiotic *Levilactobacillus brevis* strains. *Mljekarstvo*, **74**(3), 208-218.
3. Banić, M., Butorac, K., Čuljak, N., Butorac, A., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Rušanac, A., Stanečić, Ž., Lovrić, M., Šušković, J., Kos, B. (2024) An Integrated Comprehensive Peptidomics and *In Silico* Analysis of Bioactive Peptide-Rich Milk Fermented by Three Autochthonous Cocci Strains. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**(4), 2431.
4. Leboš Pavunc, A., Penava, L., Čuljak, N., Banić, M., Novak, J., Butorac, K., Ceilinger, M., Miličević, J., Čukelj, D., Šušković, J., Kos, B. (2023) Evaluation of the Probiotic Properties of *Lactocaseibacillus casei* 431 Isolated from Food for Special Medical Purposes. *Food Technology and Biotechnology*, **61**(4), 418-429.
5. Butorac, K., Novak, J., Banić, M., Leboš Pavunc, A., Čuljak, N., Oršolić, N., Odeh, D., Perica, J., Šušković, J., Kos, B. (2023) Modulation of the Gut Microbiota by the Plantaricin-Producing *Lactiplantibacillus plantarum* D13, Analysed in the DSS-Induced Colitis Mouse Model. *International journal of molecular sciences*, **24**(20), 15322.
6. Banić, M., Butorac, K., Čuljak, N., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Bellich, B., Kazazić, S., Kazazić, S., Cescutti, P., Šušković, J., Zucko, J., Kos, B. (2022) The Human Milk Microbiota Produces Potential Therapeutic Bimolecules and Shapes the Intestinal Microbiota of Infants. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, 14382.
7. Novak, J., Butorac, K., Leboš Pavunc, A., Banić, M., Butorac, A., Lepur, A., Oršolić, N., Tonković, K., Bendelja, K., Čuljak, N., Lovrić, M., Šušković, J., Kos, B. (2022) A Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules*, **27**(1), 160.
8. Novak, J., Leboš Pavunc, A., Butorac, K., Banić, M., Čuljak, N., Rak, H., Blažević, M., Iveljić, A.-M., Šušković, J., Kos, B. (2022) Caseinolytic proteases of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains isolated from fermented dairy products. *Mljekarstvo*, **72**(1), 11-21.