

Analiza genetičke raznolikosti i proteomička karakterizacija bakterija mliječne kiseline izoliranih iz rasola kiselog kupusa

Melkić, Tina

Undergraduate thesis / Završni rad

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:159:275051>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-01**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Tina Melkić
0058217323**

**ANALIZA GENETIČKE RAZNOLIKOSTI I
PROTEOMIČKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA
MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ RASOLA
KISELOG KUPUSA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: dr.sc. Martina Banić

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Analiza genetičke raznolikosti i proteomička karakterizacija
bakterija mliječne kiseline izoliranih iz rasola kiselog kupusa
Tina Melkić, 0058217323**

Sažetak:

Bakterije mliječne kiseline (BMK) naseljavaju različite dijelove ljudskog tijela i ekosustave poput biljaka, tla, mlijeka i mesa. Komercijalno se primjenjuju u prehrambenoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji. U ovom radu izolirano je 30 sojeva BMK iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa. Izmjerene koncentracije DNA navedenih sojeva oscilirale su u rasponu od 89,19 ng/μL do 475,96 ng/μL, s prosječnom vrijednošću od 238,77 ± 89,18 ng/μL. Provedeno je genotipsko profiliranje pomoću RAPD-PCR analize te su dobiveni elektroforetski profili RAPD-PCR produkata uspoređeni hijerarhijskom klaster analizom s ciljem eliminacije istovjetnih bakterijskih izolata. Analizom dendrograma, ustanovljeno je da je 30 sojeva svrstano u 3 klastera, što ukazuje da su iz rasola kiselog kupusa izolirana tri genetički različita soja. SDS-PAGE analizom nije utvrđena prisutnost dominantnih proteinskih vrpca veličine oko 50 kDa, što ukazuje da sojevi izolirani u ovom radu najvjerojatnije ne proizvode S-proteine.

Ključne riječi: Bakterije mliječne kiseline, RAPD-PCR, SDS-PAGE, hijerarhijska klaster analiza

Rad sadrži: 25 stranice, 12 slika, 3 tablica, 42 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Martina Banić

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac

Datum obrane: 17. lipnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

**Analysis of genetic diversity and proteomic characterization of lactic acid
bacteria isolated from sauerkraut brine
Tina Melkić, 0058217323**

Abstract:

Lactic acid bacteria (LAB) inhabit various parts of the human body and ecosystems such as plants, soil, milk, and meat. They are commercially utilised in the food, cosmetic, pharmaceutical and chemical industries. In this work, 30 LAB strains were isolated from the brine of traditionally produced sauerkraut. The measured DNA concentrations of these strains ranged from 89.19 ng/ μ L to 475.96 ng/ μ L, with an average value of 238.77 ± 89.18 ng/ μ L. Genotypic profiling was performed using RAPD-PCR analysis and the obtained electrophoretic profiles of the RAPD-PCR products were compared using hierarchical cluster analysis to eliminate identical bacterial isolates. Dendrogram analysis revealed that 30 strains were divided into 3 clusters, indicating that three genetically distinct strains were isolated from the sauerkraut brine. SDS-PAGE analysis revealed no dominant protein bands with a molecular weight of about 50 kDa, indicating that the strains isolated in this work most likely do not produce S-proteins.

Keywords: Lactic acid bacteria, RAPD-PCR, SDS-PAGE, hierarchical cluster analysis

Thesis contains: 25 pages, 12 figures, 3 tables, 42 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Martina Banić, PhD,

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD

Thesis defended: June 17, 2024

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PODRIJETLO I ULOGA BMK.....	2
2.2. METABOLIZAM BMK	4
2.3. KARAKTERIZACIJA BMK.....	4
2.3.1. Genetička karakterizacija BMK	4
2.3.2. Proteomička karakterizacija BMK.....	5
2.4. STANIČNA STIJENKA BMK.....	6
2.4.1. Peptidoglikan (PG).....	7
2.4.2. (Lipo)teihoične kiseline (LTA).....	8
2.4.3. Proteini S-sloja.....	9
2.5. FERMENTACIJA	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	11
3.1.2. Hranjive podloge	11
3.1.3. Kemikalije	11
3.1.4. Aparatura i pribor.....	12
3.2. METODE.....	13
3.2.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz kiselog kupusa	13
3.2.2. Pohranjivanje sojeva na -80°C.....	13
3.2.3. Izolacija genomske DNA bakterijskih sojeva pomoću Maxwell uređaja	13
3.2.5. RAPD-PCR i hijerarhijska klaster analiza dobivenih elektroforetskih profila	14
3.2.6. Ekstrakcija i natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (<i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) površinskih proteina.	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
5. ZAKLJUČCI.....	21
6. POPIS LITERATURE	22

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) skupina su Gram-pozitivnih bakterija koje su općenito priznate kao sigurne (*engl.* generally recognised as safe, GRAS) za korištenje u prehrambenim proizvodima (Maggioni i sur., 2018). Ova skupina obuhvaća anaerobne, nesporulirajuće koke ili bacile, određenih morfoloških, metaboličkih i fizioloških karakteristika, koji proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji produkt fermentacije ugljikohidrata (Gerbino i sur., 2015). BMK karakterizira otpornost na niske pH vrijednosti, genetička prilagodljivost i probiotički potencijal.

Fermentacija kiselog kupusa tradicionalni je proces poznat od davnina, čiji je intenzivan razvoj započeo poljoprivrednom revolucijom (Salminen i von Wright, 2004). U posljednje vrijeme, povećanje javne svijesti o zdravoj prehrani dovelo je do povećane potražnje za funkcionalnom fermentiranom i probiotičkom hranom. Kupus se ističe prirodnim bogatstvom šećera, vitamina, minerala i vlakana, a procesom anaerobne fermentacije pomoću BMK se konzervira biološkim putem pri čemu nastaje proizvod povećane nutritivne i funkcionalne vrijednosti (Parlindungan i sur., 2021).

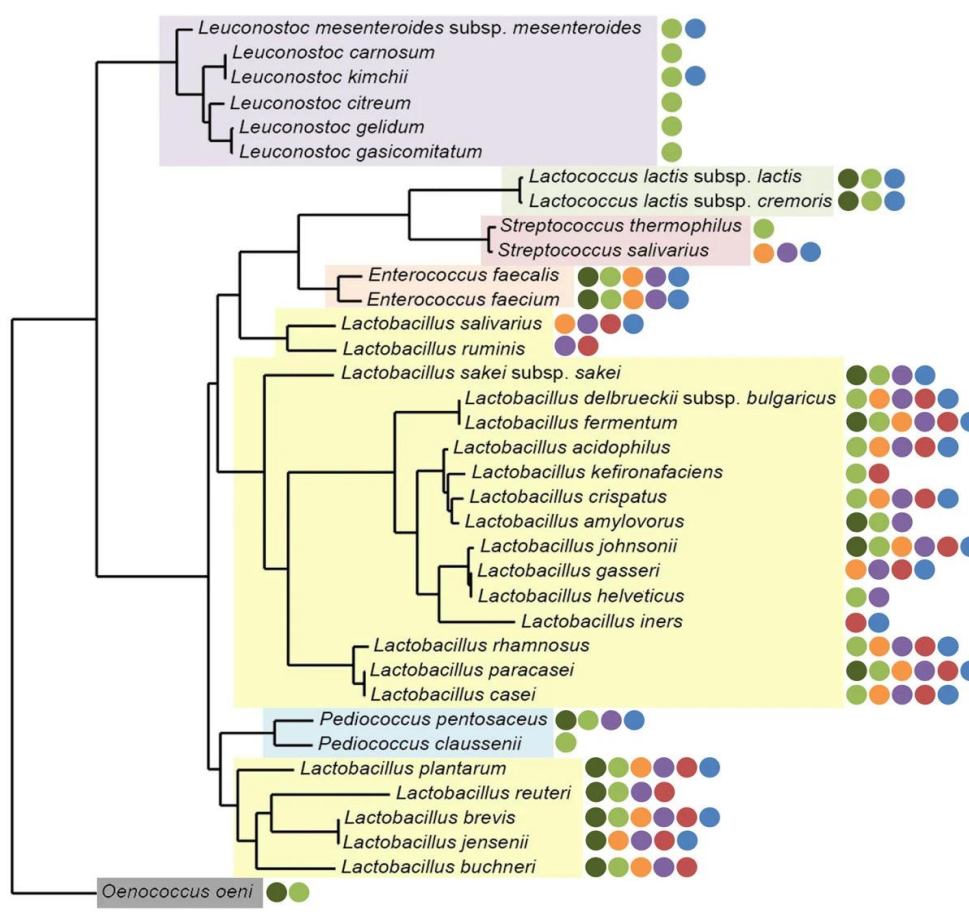
Proteini površinskog (*engl.* surface, S) sloja prekrivaju površinu stanica nekih sojeva BMK te su kao vanjski sloj u direktnom kontaktu s bakterijskim okolišem i stoga su uključeni u mnoge površinske procese poput adhezije i agregacije s drugim mikroorganizmima. Osim toga, odgovorni su za zaštitu bakterija od nepovoljnih uvjeta i imaju ulogu u prepoznavanju površine ili kao nosači faktora virulencije.

Svrha ovog istraživanja bila je izolacija novih sojeva BMK iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa kao potencijalnih probiotičkih sojeva. Nadalje, cilj rada je bio provesti genotipsku karakterizaciju bakterija mliječne kiseline metodom slučajnog umnažanja polimorfne DNA lančanom reakcijom polimeraze (*engl.* randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR) te odabrati genetički različite sojeve hijerarhijskom klaster analizom elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata. Također je ispitano proizvode li sojevi BMK izolirani iz kiselog kupusa S-proteine, spojeve koji su iznimno važni za mikrobnu ekološku prilagodbu i čije prisustvo na površini stanice ukazuje na izniman biotehnološki potencijal soja producenta za primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

2. TEORIJSKI DIO

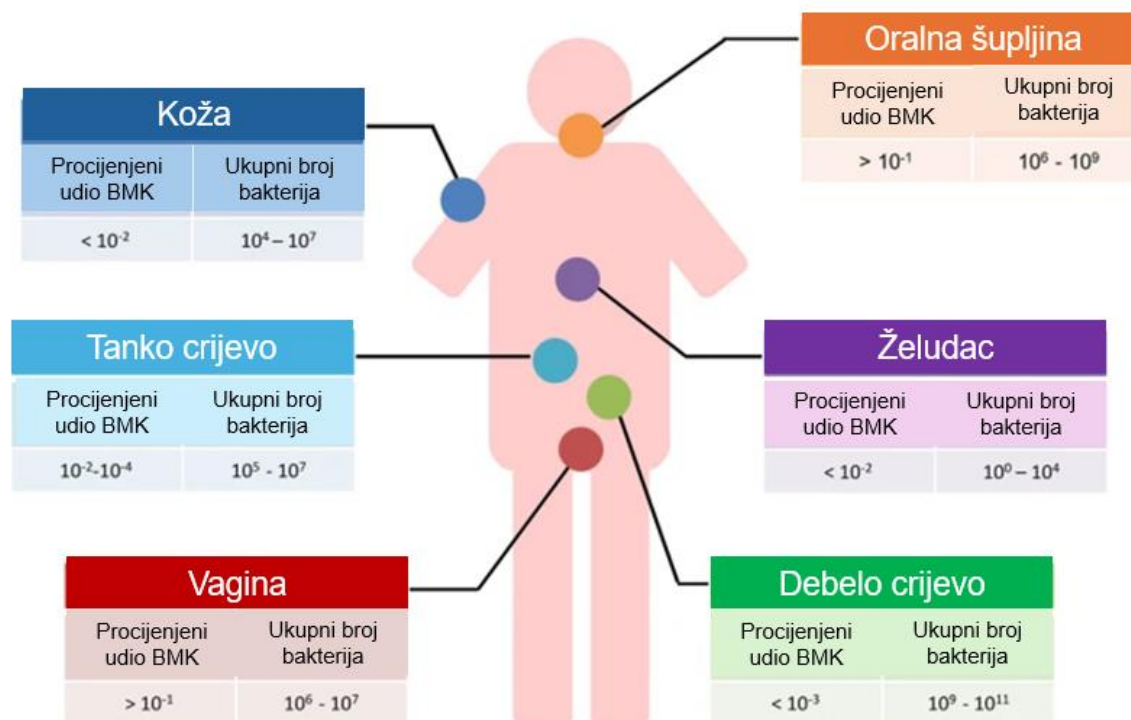
2.1. PODRIJETLO I ULOGA BMK

BMK su Gram-pozitivne, nesporulirajuće, anaerobne bakterije koje izlučuju mliječnu kiselinu kao glavni produkt fermentacije ugljikohidrata. Pripadaju rodovima *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus* (slika 1) te naseljavaju različite dijelove ljudskog tijela, uključujući usta, nos i crijeva, gdje su većinom bezopasne i potencijalno korisne, iako neke vrste, poput streptokoka i enterokoka, mogu biti patogene u određenim uvjetima (Teuber, 2001).



Slika 1. Filogenetičko stablo poznatih vrsta BMK (prema Douillard i de Vos, 2014)

Pripadnici roda *Lactobacillus* su anaerobni ili mikroaerofilni štapićasti mikroorganizmi te obuhvaćaju 13 vrsta bakterija. Dio su normalne ljudske prehrane od davnina, kada je veći dio pohranjene hrane bio prirodno fermentiran. Bitni su članovi zdravog ljudskog mikrobioma (slika 2) i važni sastojci zdrave prehrane (Endo i sur., 2018). Sposobnost laktobacila da rastu u raznolikim okruženjima pokazuje njihovu svestranost i ističe njihov potencijal za primjene u proizvodnji hrane i probiotika u biotehnologiji (Krishnapur, 2023).



Slika 2. Zastupljenost BMK u ljudskom mikrobiomu (prema Douillard i de Vos, 2014)

BMK igraju ključnu ulogu u spontanim fermentacijama organskih tvari biljnog i životinjskog podrijetla bogatih monosaharidima i disaharidima (Teuber, 2001). Izolirane su iz raznih ekosustava poput biljaka, tla, mlijeka, mesa, intestinalnog i urogenitalnog trakta toplokrvnih životinja, kao i kukaca (Chattoraj i Schneider, 1997). U poljoprivredi, posebno u uzgoju životinja, postoji dugotrajna tradicija primjene probiotika. BMK se koriste i u fermentaciji mesa, povrća, voća, pića i mlijeka kao starteri, s ciljem konzerviranja hrane te razvoja njene teksture i okusa, te u proizvodnji probiotika (tablica 1). Zbog GRAS statusa, BMK čine prikladne vektore za dostavu terapijskih proteina ili antigena. Probiotički sojevi koriste se u proizvodnji kako bi se smanjio rizik od kontaminacije mlijeka i sira jer prisutnost bakteriocina poput nisina u hrani može učinkovito smanjiti razine patogena (Collins i sur., 2019).

Tablica 1. Hrana pripremljena uz pomoć BMK (Collins i sur., 2019; Teuber i sur., 1987)

Sirovi materijal	Fermentirani proizvod	Uloga BMK
kupus	kiseli kupus	homo- i heterolaktična fermentacija
mlijeko	sir, kefir, kiselo vrhnje	homo- i heterolaktična fermentacija, formiranje arome, sazrijevanje sira
grožđe	Vino	malolaktična fermentacija

2.2. METABOLIZAM BMK

Primarni izvor metaboličke energije BMK je ATP dobiven iz supstrata. BMK imaju jednostavan metabolizam, ali zahtijevaju bogate nutritivne medije za rast. Osim ugljika, za rast su im potrebne aminokiseline (AK), vitamini, nukleinske kiseline i minerali (Konings, 2002). BMK mogu smanjiti utrošak energije apsorpcijom oligopeptida i eliminacijom viška AK pomoću protonske pokretačke snage. Antimikrobni spojevi BMK imaju potencijal medicinske primjene jer učinkovito inhibiraju rast sojeva rezistentnih na više lijekova. Metaboliti BMK pomažu i u prevenciji vaginalnih gljivičnih infekcija, smanjuju razinu kolesterola (hidrolaza žučnih soli) i poboljšavaju intoleranciju na laktozu (laktaza) (Krishnapur, 2023). BMK imaju obrambene mehanizme kako bi održale stabilnost unutarnje okoline i energetske status uslijed brzih promjena osmolarnosti i izloženosti citotoksicima (Konings, 2002). Na temelju metaboličkih puteva, rod *Lactobacillus* se može podijeliti u tri skupine (Jafarei i Ebrahimi, 2011):

- 1) obligatno homofermentativne vrste - proizvode mliječnu kiselinu (npr. *L. acidophilus*),
- 2) fakultativno heterofermentativne vrste - proizvode mliječnu kiselinu (npr. *L. casei*),
- 3) obligatno heterofermentativne vrste - proizvode mliječnu kiselinu, CO₂ i etanol (npr. *L. kefir*)

2.3. KARAKTERIZACIJA BMK

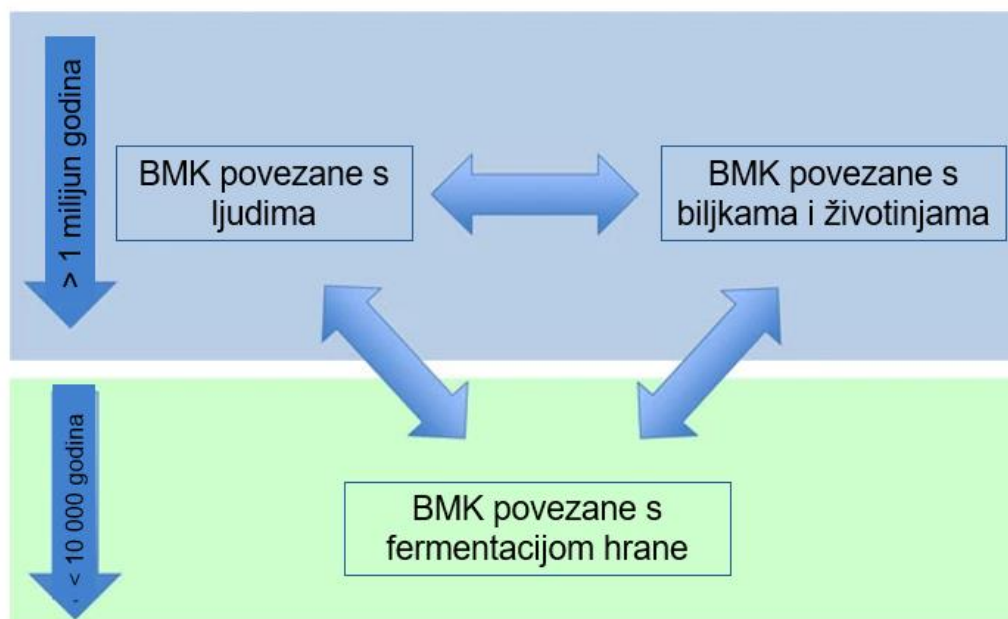
2.3.1. Genetička karakterizacija BMK

Genom BMK je relativno malen (1,7 do 3,3 Mb) i sadrži ograničen broj gena (1600 do 3000) (Mayo i sur., 2008). Unutar skupine BMK, prisutna je velika genetska raznolikost s čak 2,585 skupina gena (Koduru i sur., 2022). S obzirom na filogenetsku povezanost, varijacije u genima upućuju na procese gubitka, dupliciranja i horizontalnog prijenosa gena (tablica 2) (Mayo i sur., 2008). Razlikuju se i u broju rRNA operona i tRNA gena što odražava razlike u ekološkoj konkurentnosti bakterija (Makarova i sur., 2006). Selektivni pritisak ne dolazi samo iz prirodnog okruženja BMK, već i iz ljudskog okoliša, jer su bakterijske kulture tijekom povijesti selektirane za proizvodnju fermentiranih proizvoda (slika 3) (Schroeter i Klaenhammer, 2009).

Tablica 2. Genetička raznolikost vrsta BMK (Mayo i sur., 2008)

vrsta	genom (pb)	GC (%)	proteini	pseudogeni	rRNA	tRNA
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,385,710	59	2,428	/	5	54
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3,308,274	44	3,052	39	5	62
<i>Lactococcus lactis</i>	2,641,635	35	2,509	153	6	62
<i>Streptococci thermophilus</i>	1,864,178	39	1,710	206	6	67

Analiza dostupnih genoma sugerira da je gubitak gena posljedica prilagodbe okolišu. Osim delecijom gena, laktobacili su se prilagodili okolišu duplikacijom gena za enzime i transportere šećera i AK (Makarova i sur., 2006). Ovakva evolucijska putanja oblikovala je njihov metabolizam (Douillard i de Vos, 2014).



Slika 3. Selektivni pritisak na BMK (prema Douillard i de Vos, 2014)

Alati molekularne identifikacije zasnovani su na amplifikaciji DNA PCR-om i sekvenciranju (Ranjbar i sur., 2014). Sekvenciranje 16S rRNA gena molekularna je metoda koja se zasniva na amplifikaciji 16S rDNA PCR-om i sekvenciranju, a koristi se za identifikaciju na razini vrste. Istraživanja funkcionalne genomike unaprijedila su naše razumijevanje BMK, a dostupnost genomskih sekvenci revolucionirala je njihovu komercijalnu upotrebu. Analiza genoma pomaže u karakterizaciji sojeva, odabiru specifičnih svojstava te procjeni sigurnosti i regulatornoj usklađenosti (Douillard i de Vos, 2014) Za fenotipsko prepoznavanje laktobacila koriste se razni testovi poput testa fermentacije mliječne kiseline, metil crvenog, Voges-Proskauerov i katalaza testa, te testa proizvodnje plina (Krishnapur, 2023.).

2.3.2. Proteomička karakterizacija BMK

Proteomička karakterizacija BMK od ključne je važnosti za (Vinusha i sur., 2018):

- 1) proučavanje prilagodbe na uvjete poput niskog pH, kao i različita stresna stanja,
- 2) istraživanje proteina na površini stanica koji posreduju pri adheziji,
- 3) molekularnu karakterizaciju bakterija,
- 4) mapiranje proteina bakterije i izradu kataloga proteina.

BMK sintetiziraju razne proteine za otpor kiselim, oksidativnim i žučnim uvjetima te proteaze. Kodiraju i adhezine koji pomažu pri pričvršćivanju na sluznice, te antimikrobne peptide, bakteriocine, koji se klasificiraju kao: (1) posttranslacijski modificirani peptidi; (2) nemodificirani peptidi; (3) stabilni peptidi. Većina BMK sintetizira proteaze stanične ovojnice (*engl.* cell envelope proteinase, CEP) koje razgrađuju kazein na peptide i aminokiseline (Koduru i sur., 2022).

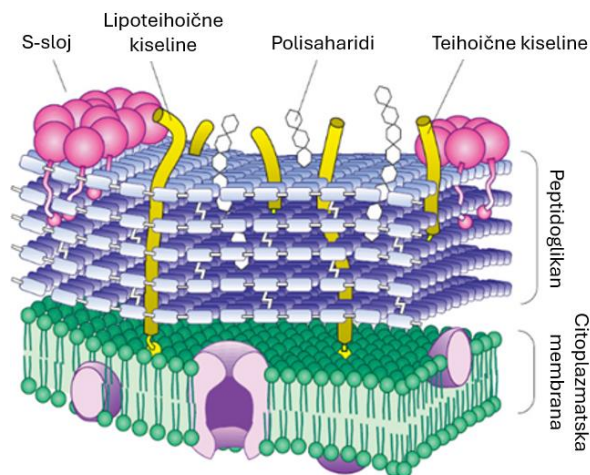
Početna proteomska istraživanja koristila su natrij dodecil sulfat-poliakrilamidnu gel elektroforezu (*engl.* sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) za razdvajanje proteina na temelju molekulske mase, dok su kasnije razvijene i metode za razdvajanje proteina u drugoj dimenziji prema izoelektričnoj točki. Suvremena proteomika uključuje profiliranje pomoću tekuće kromatografije (*engl.* liquid chromatography, LC) spregnute sa spektrometrijom masa (Vinusha i sur., 2018). Masna spektrometrija ultravioletnom fotoizolacijom (*engl.* ultraviolet photodissociation mass spectrometry, UVPD MS) može procijeniti stabilnost proteina i konformacijske promjene (Vallejo i sur., 2022).

U suvremenim istraživanjima, proučavaju se interakcije bakterija i domaćina radi identifikacije novih proteina za terapijske intervencije. Analiziraju se modifikacije proteina imunološkog sustava i identificiraju se novi bakterijski antigeni (Thery i sur., 2021). Nove tehnologije daju procjene stabilnosti proteina povezanih sa strukturom proteina. Tako su npr. mjerenja toplinske stabilnosti proteina pomoću ograničene proteolize i LC-MS analize otkrila visoko stabilne proteine koji mogu biti dobri kandidati za UV zaštitu i stabilizaciju BMK (Vallejo i sur., 2022). U konačnici, sveobuhvatni katalozi proteina će dovesti do novih otkrića u biokemiji i liječenju bolesti.

2.4. STANIČNA STIJENKA BMK

Citoplazmatska membrana prisutna u većini bakterija i arheja stvara barijeru između citoplazme koja sadrži DNK i vanjskog medija, sprječavajući nekontroliranu difuziju metabolita i iona. Omogućuje i stvaranje elektrokemijskog gradijenta, posebno protona, što je ključno za energiju (Gray i Mitchell, 1967).

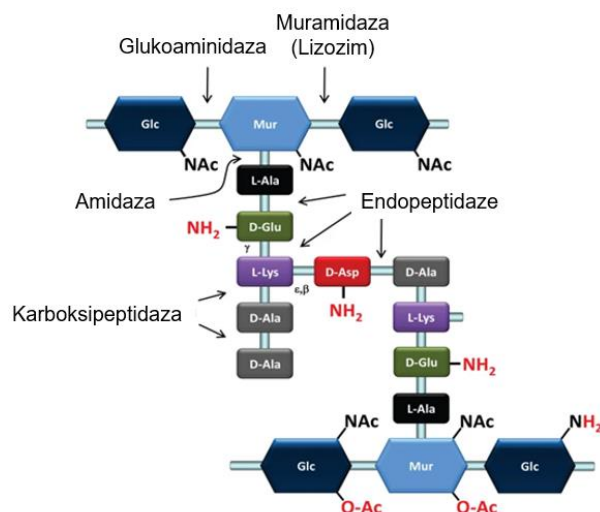
Stanična stijenka oblikuje stanicu i štiti je, a sastoji se od peptidoglikana, (lipo)teihoičnih kiselina, S-sloja i polisaharida (slika 4) (Jafarei i Ebrahimi, 2011). Stanična stijenka mora biti fleksibilna za diobu stanica i rast te posreduje u interakcijama s okolišem, bakteriofagima i eukariotskim staničnim domaćinima (Collins i sur., 2019).



Slika 4. Struktura stanične stijenke *L. acidophilus* (prema Collins i sur., 2019)

2.4.1. Peptidoglikan (PG)

Peptidoglikan (murein) je polimer sastavljen od šećera i aminokiselina koji tvore mrežasti sloj izvan citoplazmene membrane. Sastoji se od β -(1,4)-povezanih ostataka N-acetilglukoamina (NAG) i N-acetilmuraminske kiseline (NAM) te peptidnih lanaca koji formiraju trodimenzionalni mrežasti sloj (slika 5) (Jafarei i Ebrahimi, 2011).



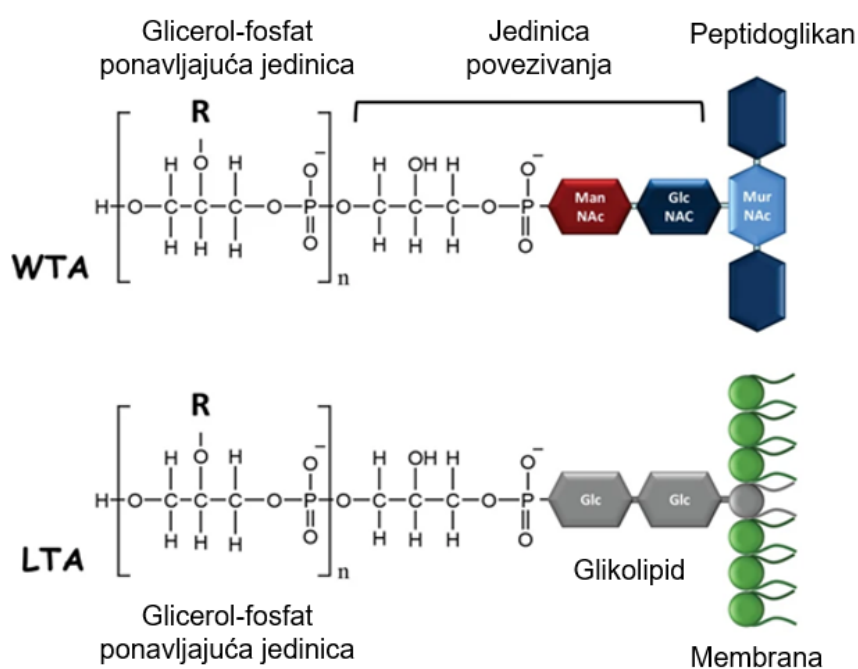
Slika 5. Shematski prikaz strukture peptidoglikana (prema Chapot-Chartier i Kulakauskas, 2014)

Glavna funkcija PG-a je održavanje definiranog oblika stanice i stoga inhibicija biosinteze ili specifična razgradnja PG-a tijekom rasta stanice rezultira lizom (Jafarei i Ebrahimi, 2011). Otpornost mikroorganizama na mehaničke napore je određena elastičnošću peptidoglikanske mreže (Schär-Zammaretti i Ubbink, 2003). Peptidoglikan također služi kao okvir za pričvršćivanje drugih komponenti stanične ovojnice poput proteina i teihoičnih kiselina (Vollmer i sur., 2008).

2.4.2. (Lipo)teihoične kiseline (LTA)

Teihoične kiseline su linearni anionski polimeri s baznom strukturom alditol-fosfata, poput glicerola ili monosaharida, spojenih fosfodieterskim vezama (Schär-Zammaretti i Ubbink, 2003). Razlikuju se ovisno o soju, stadiju rasta, pH, izvoru ugljika i fosfata (Jafarei i Ebrahimi, 2011). Postoje dvije vrste teihoičnih kiselina: teihoične kiseline stanične stijenke (*engl.* wall teichoic acids, WTAs) vezane uz PG i lipoteihoične (*engl.* lipoteichoic acids, LTAs) vezane na citoplazmatsku membranu (slika 6) (Chapot-Chartier i Kulakauskas, 2014).

(Lipo)teihoične kiseline, zbog fosfatnih skupina, imaju polielektrolitski karakter s niskim pKa, dajući staničnoj stijenci negativan naboj i hidrofobnu površinu (Schär-Zammaretti i Ubbink, 2003). Zbog anionskog karaktera, mogu vezati katione i protone, stvarajući pH gradijent. D-alanilni supstituenti mijenjaju naboj stvarajući protonirane amino skupine, što bitno utječe na njihovu funkciju i otpornost na UV stres (Chapot-Chartier i Kulakauskas, 2014). Utvrđeno je da teihoične kiseline mogu biti prisutne u značajnim količinama, ali u nekim slučajevima nisu prisutne (Critchley i sur., 1962). Također, primijećena je veza između LTA i metaboličkih karakteristika organizama (Baddiley i Davison, 1961). Imaju ulogu u kontroli autolize, morfologiji, prepoznavanju bakteriofaga i kolonizaciji domaćina (Chapot-Chartier i Kulakauskas, 2014). LTA iz patogenih bakterija potiču upalnu reakciju i oslobađanje citokina, što doprinosi virulenciji. Nasuprot tome, LTA iz probiotičkih bakterija ublažava upalu i apoptozu u stanicama raka debelog crijeva (Lu i sur., 2022).



Slika 6. Strukturni prikaz teihoične kiseline stanične stijenke (WTA) i lipoteihoične kiseline (LTA) (prema Chapot-Chartier i Kulakauskas, 2014)

2.4.3. Proteini S-sloja

Najučestaliji površinski proteini u *Lactobacillus* vrstama su proteini S-sloja (Smit i sur., 2001). Obično su male molekulske mase 40–60 kDa sa stabilnim tercijskim strukturama (Engelhardt i Peters, 1998). Nekovalentno su vezani za staničnu stijenku, često potpuno ju pokrivaјуći (Schär-Zammaretti i Ubbink, 2003). Proteini S-sloja su visoko bazični proteini s pl vrijednostima u rasponu od 9,35 do 10,4 (Vall-Jääskeläinen i Palva, 2005). Bogati su kiselim i hidrofobnim aminokiselinama te se povezuju nekovalentnim interakcijama. Geni za S-proteine su aktivni, ali ne uvijek istovremeno; postoje tihi geni te antigenske varijacije u ekspresiji (Hynönen i Palva, 2013). Usporedba sekvenci tih gena S-proteina otkrila je dvije domene: N-terminalnu, koja je promjenjiva, i C-terminalnu, koja je vrlo konzervirana i sadrži palindromska ponavljanja (Smit i sur., 2001). Biosinteza S-proteina je rijetko svojstvo BMK ali je od izrazite važnosti zbog uloge S-sloja u zaštiti stanice i iskazivanju probiotičkih svojstava stanice, te zbog širokog potencijala primjene S-proteina u nanobiotehnologiji, npr. za razvoj cjepiva i terapijskih proteina (Hynönen i Palva, 2013). Nova područja uključuju primjenu S-slojeva kao predložaka za formiranje anorganskih nanokristala te kao nosača za funkcionalne lipidne membrane. Prikazivanjem antigena na površini S-sloja, svaka stanica laktobacila može okružiti do 5×10^5 monomera antigena što producente S-proteina čini atraktivnim nosačem za isporuku cjepiva (Vall-Jääskeläinen i Palva, 2005).

2.5. FERMENTACIJA

Fermentacija je mikrobiološki proces proizvodnje različitih prehrambenih proizvoda. Za optimalnu proizvodnju važno je pažljivo optimizirati hranjivi medij, kontrolirati pH, temperaturu, aeraciju i miješanje tijekom fermentacije (Pumphrey B. i Julien C, 1996). Arheološki dokazi pokazuju da je praksa korištenja spontane fermentacije za proizvodnju hrane postojala još u 4. stoljeću prije nove ere. Proizvodi poput kruha, sira i jogurta su bili ključni u prehrani, što potvrđuju antikni dokumenti iz Bliskog Istoka i Mediterana te Novi zavjet Biblije (Teuber, 2001). L. Pasteur je 1857. dokazao da bakterije uzrokuju fermentaciju, a J. Lister je 1873. izolirao prvu čistu bakterijsku kulturu koja je kasnije preimenovana u *Lactococcus lactis* (Schleifer, 1987).

Živi organizmi koriste dvije glavne vrste fermentacije (SFN, 2022)

- 1) fermentacija mliječne kiseline - razgradnja šećera bez kisika, energija u obliku ATP-a,
- 2) alkoholna fermentacija - šećeri se pretvaraju u etanol i ugljični dioksid.

U kiselom kupusu napravljenog od sjeckanog kupusa s dodatkom natrijevog klorida, prisutni su različiti laktobacili poput *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. curvatus* i *L. sakei* (Teuber, 2001). Fermentirana hrana, osim što je nutritivno vrijedna i probavljiva, sadrži vitamine, antioksidanse i molekule koje mogu smanjiti krvni tlak i upalu (ESNM, 2020). Može se podijeliti u dvije skupine (SFN, 2022):

- 1) hrana koja sadrži žive mikrobe kada se konzumira: jogurt, kefir, kisel kupus,
- 2) hrana koja ne sadrži žive mikrobe kada se konzumira: kruh, alkoholna pića (npr. pivo i vino).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu ukupno je izolirano 30 bakterijskih sojeva iz rasola kiselog kupusa proizvedenog spontano fermentacijom. Sojevi su označeni oznakama od TM1-TM30 i pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

3.1.2. Hranjive podloge

U ovom radu su korištene sljedeće podloge:

- 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; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 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.

3.1.3. Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- Coomassie Brilliant Blue, „Sigma-Aldrich“, SAD
- EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „TaKaRa“, Japan
- etanol, 70 % (v/v) „Kemika“, Hrvatska
- etanol, apsolutni, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Njemačka
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glicin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- izopropanol, „Merck-Millipore“, SAD
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- Maxwell 16S Cell DNA purification kit, „Promega“, SAD
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma-Aldrich“, SAD
- octena kiselina, „Carlo Erba“, Italija

- početnice „Invitrogen“, SAD
- RNaza A, „Promega“, SAD
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- TAE pufer, „BioRad“, SAD
- TEMED (N', N', N', N'-tetrametiletilen), „Sigma-Aldrich“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Takara“, Japan

3.1.4. Aparatura i pribor

- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec-nano, „Shimadzu“, Japan
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- kadica za elektroforezu, „Eppendorf“, SAD
- kivete za centrifugiranje od 15 mL i 50 mL, „Falcon“, Engleska
- Maxwell 16 Research System instrument, „Promega“, SAD
- mikrobiološka ušica, „Syntesys“, Italija
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- PCR uređaj ABI 2720, „Applied Biosystems“, SAD
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- plastične epruvete od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNR Bio-Imaging Systems Ltd.“, Izrael
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vorteks mješač V1 plus, „Biosan“, Latvija
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline iz kiselog kupusa

U ovom radu, ukupno je izolirano 30 bakterijskih sojeva nasumičnim odabirom kolonija poraslih na MRS agaru nakon prekonoćne anaerobne inkubacije pri 37 °C uzorka rasola kiselog kupusa proizvedenog spontanom fermentacijom. Pomoću mikrobiološke ušice, svaka odabrana kolonija je u cilju umnožavanja bakterijske biomase sterilno prenesena u 1,5 mL MRS bujona. Nakon prekonoćne anaerobne inkubacije, bakterijska kultura je „streak plate“ metodom nacijepljena na MRS agar kako bi se provjerila čistoća kulture te je nakon prekonoćne inkubacije ponovno odabrana jedna kolonija za umnožavanje u MRS bujonu. Navedeni postupak pročišćavanja bakterijske kulture ponovljen je još jednom, nakon čega su novoizoliranim sojevima dodijeljene oznake od TM1-TM30 te su pohranjeni u Zbirku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kako je opisano u poglavlju 3.2.2.

3.2.2. Pohranjivanje sojeva na -80°C

Nakon izolacije, čiste kulture sojeva su pohranjene i čuvane pri -80 °C u MRS bujonu s 15 % glicerola. U tu svrhu, 0,26 mL 87 % (v/v) sterilnog glicerola pomiješano je s 1,24 mL prekonoćne kulture željenog soja i smrznuto na -80 °C. Dan prije svakog eksperimenta, sojevi su inokulirani u svježju MRS tekuću hranjivu podlogu te inkubirani preko noći pri optimalnim uvjetima rasta.

3.2.3. Izolacija genomske DNA bakterijskih sojeva pomoću Maxwell uređaja

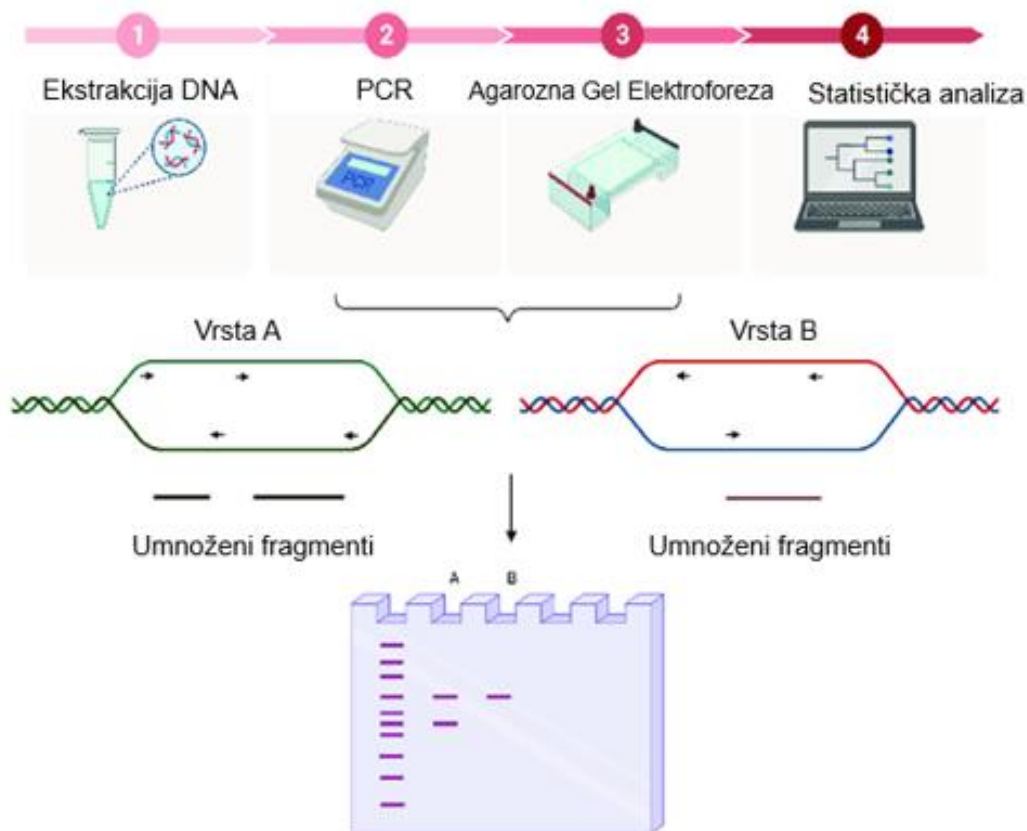
Bakterijski sojevi izolirani iz rasola kiselog kupusa su uzgojeni do koncentracije 10⁹ CFU/mL te je talog stanica prikupljen centrifugiranjem 5 min pri 3600 g. Talog stanica je potom resuspendiran u 400 µL TE pufera kojem je dodano 100 µl lizozima (25mg/mL) te je suspenzija inkubirana 2 h na 37 °C. Uzorci su potom prebačeni u jažice Maxwell 16 Cell DNA purification kita, koje su umetnute u Maxwell 16 Research System uređaj za automatsku izolaciju DNA. S ciljem uklanjanja eventualno prisutne RNA, u 300 µL pufera za eluiranje, dodano je 1,5 µL RNAze A. Nakon završetka ekstrakcije DNA, spektrofotometrijski je određena koncentracija DNA prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.4. te su uzorci pohranjeni na -20 °C do daljnjih analiza.

3.2.4. Određivanje koncentracije DNA

Mjerenje koncentracije DNA provedeno je iz 2 µL uzorka pomoću uređaja BioSpec-nano pri valnoj duljini 0,7 nm, pri čemu je kao slijepa proba korišten pufer za eluiranje iz Maxwell 16 Cell DNA purification kita.

3.2.5. RAPD-PCR i hijerarhijska klaster analiza dobivenih elektroforetskih profila

DNA bakterija izoliranih iz rasola kiselog kupusa korištena je kao kalup u RAPD-PCR reakciji. Reakcijska smjesa volumena 20 μL sadržavala je 10 μL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix 2x Premix, 0,5 μL univerzalne M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') početnice, 7,5 μL vode i 2 μL kalupa. Nakon početnog koraka denaturacije DNA pri 94 °C tijekom 1 min, slijedilo je 35 ciklusa denaturacije pri 94 °C tijekom 1 min, sparivanja početnica pri 40 °C tijekom 20 s i sinteze komplementarnih lanaca 80 s pri 72 °C, a zatim 5 min završne elongacije pri 72 °C. Dobiveni PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na agaroznom gelu (1.5 % (w/v)) pri 100 V u TAE puferu, pri čemu je kao standard korištena smjesa 0,25 μL λ DNA HindIII i 0,5 μL 100 bp DNA Ladder (slika 7). Nakon završetka elektroforeze, gel je obojen etidijevim bromidom koncentracije 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru MiniBIS Pro pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izrael) verzije 7.1. Zatim je usporedbom dobivenih elektroforetskih profila pomoću računalnog programa GelCompar II (Applied Maths, Belgija) provedena hijerarhijska klaster analiza, čiji su rezultati prikazani u obliku dendrograma.



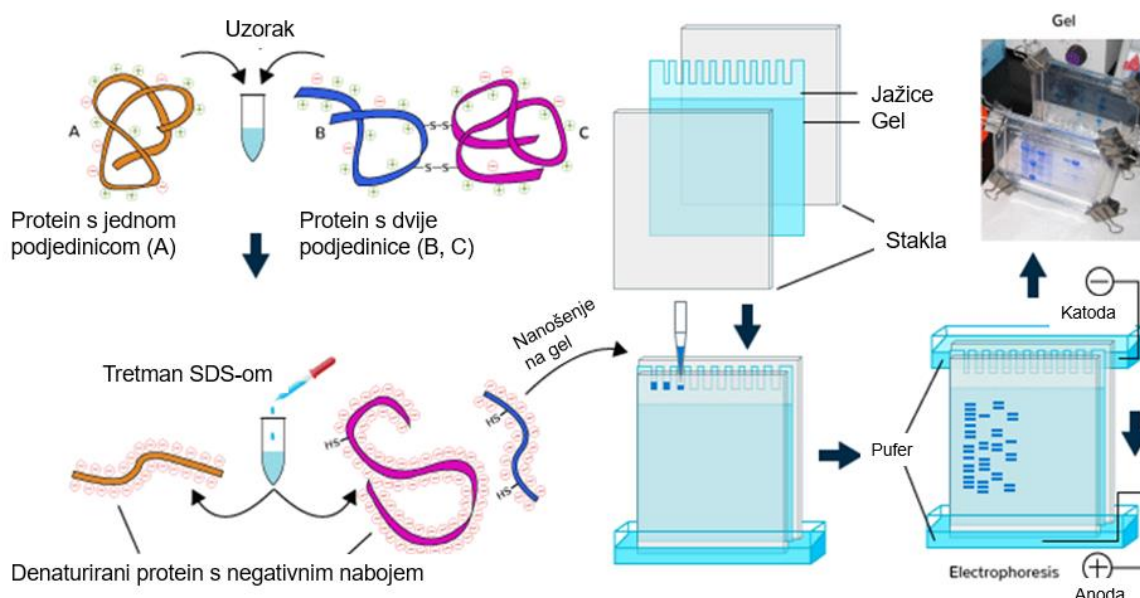
Slika 7. Hodogram provođenja RAPD-PCR: (1) ekstrakcija uzorka DNA, (2) PCR amplifikacija, (3) agarozna gel elektroforeza, (4) statistička analiza (prema Luque i sur., 2023)

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

Optička gustoća (*engl. optical density, OD*) stanica svih prekonoćnih bakterijskih kultura ujednačena je na vrijednost 2 te je 1 mL svake suspenzije ($OD_{620}=2$) centrifugiran 2 min pri 16 000 g. Dobiveni talog stanica je ispran destiliranom vodom i resuspendiran u 50 μ L 2 % (w/v) SDS. Tako priređeni uzorci su prokuhani 10 min te centrifugirani 5 min pri 3600 g. 20 μ L supernatanta potom je pomiješano s 10 μ L reducirajućeg reagensa te je pripravljena suspenzija prokuhana 5 min. Potom je 20 μ L svakog uzorka nanoseno u jažice unaprijed pripremljenog poliakrilamidnog (10 % (v/v)) gela (slika 8).

Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u vertikalnoj kadici za elektroforezu pri konstantnom naponu od 100 V. Pritom je korišten standard ProSieve QuadColor Protein Marker koji sadrži proteine poznate molekulske mase raspona 4,6-315 kDa.

Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran u otopini za bojanje (0,02 % Coomassie Brilliant Blue praša, 25 % izopropanola i 10 % octene kiseline) kroz 2 h, a zatim u otopini octene kiseline (10 % (v/v)) do obezbojenja pozadine.



Slika 8. Princip SDS-PAGE metode (*prema García-Luque i sur., 2023*)

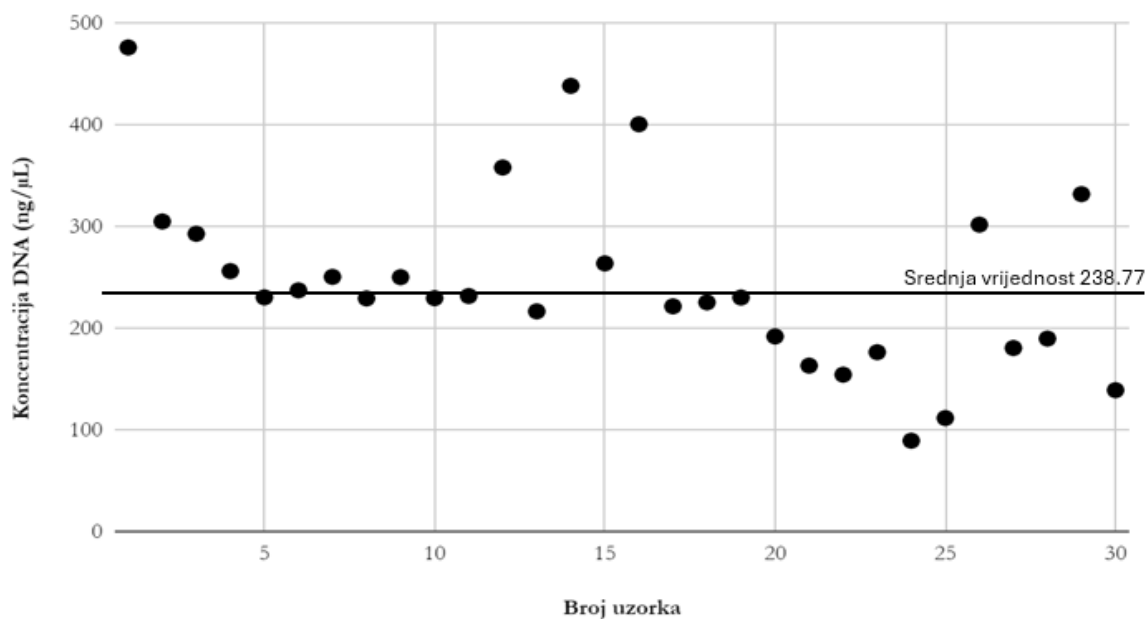
4. REZULTATI I RASPRAVA

Iz uzorka rasola kiselog kupusa proizvedenog spontanom fermentacijom, izolirano je 30 bakterijskih sojeva koji su označeni oznakom TM i brojevima od 1-30 te su pohranjeni na -80 °C u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Iz svih sojeva je uspješno ekstrahirana DNA pomoću Maxwell 16 Research System uređaja te su rezultati spektrofotometrijskog mjerenja koncentracije DNA, provedenog pomoću uređaja Biospec-nano, prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati mjerenja koncentracije DNA uređajem Biospec-nano

Uzorak	DNA (ng/μL)	OD _{260/280}	OD _{260/230}	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₃₀	OD ₃₂₀	Valna duljina (nm)
TM1	475,96	1,85	0,90	19,338	14,969	20,352	9,819	0,696
TM2	304,82	2,03	1,36	8,519	5,420	6,916	2,422	0,696
TM3	292,69	2,05	1,33	8,049	5,056	6,596	2,195	0,696
TM4	256,04	1,93	1,08	8,540	6,078	8,176	3,419	0,696
TM5	230,18	1,86	0,99	8,305	6,175	8,369	3,702	0,696
TM6	237,10	2,06	1,45	5,833	3,399	4,359	1,091	0,696
TM7	250,33	1,94	1,12	7,447	5,017	6,927	2,440	0,696
TM8	229,16	1,94	1,07	8,059	5,839	7,770	3,476	0,696
TM9	250,04	1,95	0,97	8,572	6,137	8,700	3,571	0,696
TM10	229,40	1,98	1,04	9,760	7,494	9,576	5,172	0,696
TM11	231,50	1,90	0,99	8,207	6,018	8,262	3,577	0,696
TM12	357,91	1,79	0,86	16,538	13,383	17,676	9,379	0,696
TM13	216,42	1,76	0,89	9,956	8,088	10,469	5,628	0,696
TM14	438,19	1,81	0,88	19,681	15,766	20,904	10,917	0,696
TM15	263,58	1,81	0,89	11,264	8,909	11,905	5,993	0,696
TM16	400,45	1,79	0,90	17,280	13,742	18,136	9,271	0,696
TM17	221,37	1,67	0,72	11,387	9,612	13,121	6,959	0,696
TM18	225,27	1,65	0,69	11,382	9,607	13,407	6,876	0,696
TM19	230,01	1,70	0,77	11,273	9,377	12,672	6,673	0,696
TM20	191,76	1,73	0,74	9,424	7,810	10,769	5,589	0,696
TM21	163,04	1,70	0,70	8,469	7,131	9,863	5,208	0,696
TM22	154,15	1,73	0,75	7,321	6,019	8,328	4,238	0,696
TM23	176,27	1,69	0,80	9,600	8,165	10,508	6,074	0,696
TM24	89,19	1,68	0,77	4,140	3,415	4,688	2,356	0,696
TM25	111,49	2,03	1,35	3,657	2,527	3,080	1,427	0,696
TM26	301,70	2,03	1,17	9,811	6,756	8,946	3,777	0,696
TM27	180,38	2,02	1,17	5,390	3,568	4,871	1,782	0,696
TM28	189,63	2,06	1,46	5,970	4,019	4,777	2,177	0,696
TM29	331,72	1,79	0,86	13,886	10,951	14,935	7,252	0,696
TM30	138,91	1,85	0,97	5,652	4,373	5,745	2,873	0,696

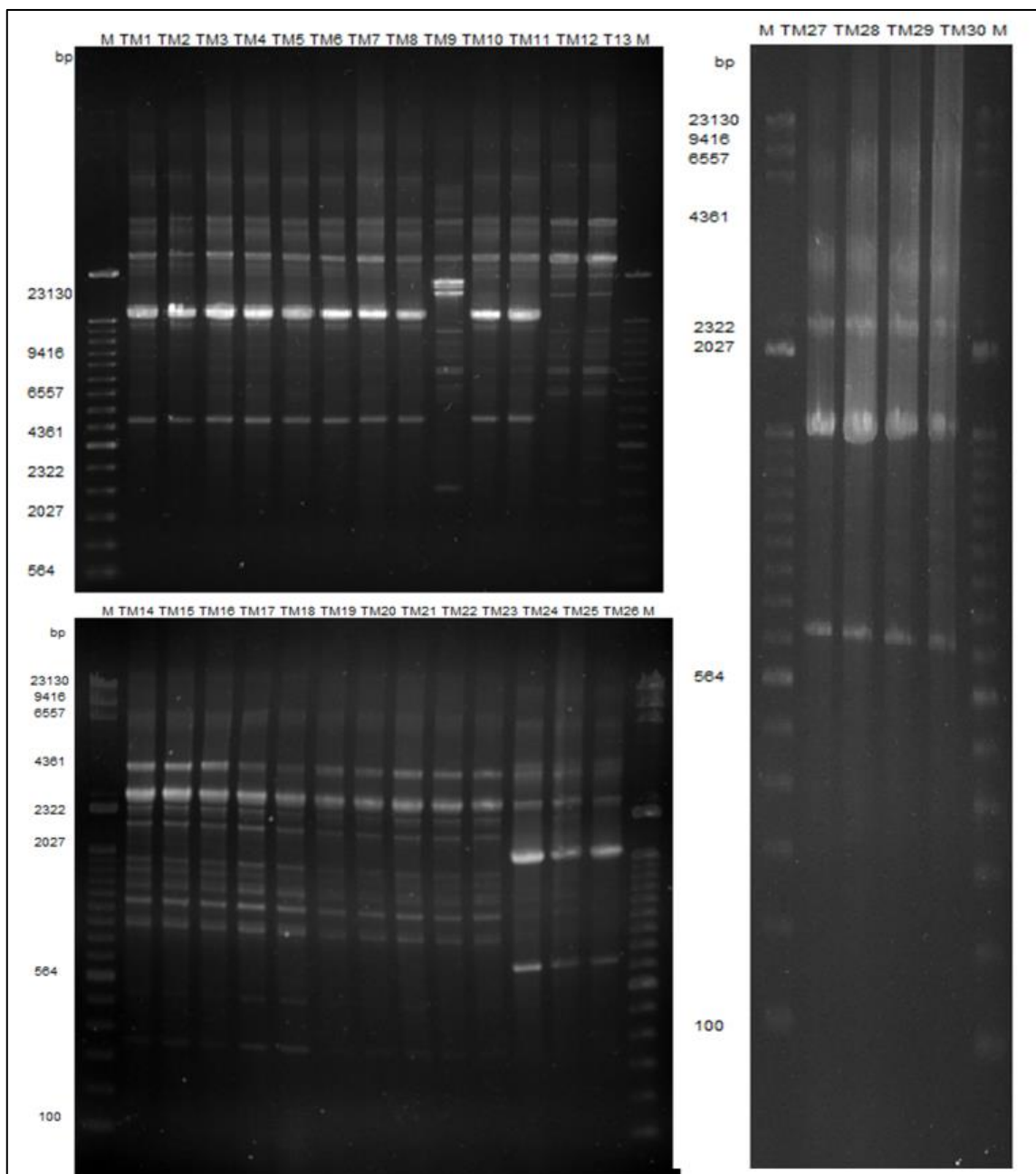
Izmjerene koncentracije DNA su oscilirale u rasponu od 89.19 ng/ μ L (TM 24) do 475.96 ng/ μ L (TM 1), s prosječnom vrijednošću od 238.77 ± 89.18 ng/ μ L (slika 9). Varijacije u koncentracijama DNA mogu se pripisati čimbenicima kao što su kvaliteta uzorka i učinkovitost izolacije DNA.



Slika 9. Varijacije u koncentracijama DNA izolirane iz sojeva TM1-TM30

Zatim je provedena genotipizacija sojeva izoliranih iz kiselog kupusa RAPD-PCR analizom koja se zasniva na amplifikaciji dijela DNA iz male količine genetičkog materijala korištenjem kratke oligonukleotidne sekvence (obično duljine do 10 baza) koja se nasumično veže.

Varijacije u mjestima vezanja početnica i duljini amplificiranih fragmenata omogućuju detekciju polimorfizama prisutnih u DNA sekvencama različitih bakterija, odnosno „DNA fingerprinting“. Agaroznom elektroforezom RAPD-PCR produkata dobiveni su jedinstveni genetički profili svakog bakterijskog soja izoliranog iz kiselog kupusa (slika 10).



Slika 10. Elektroforetska analiza RAPD-PCR produkata DNA sojeva TM1-TM30

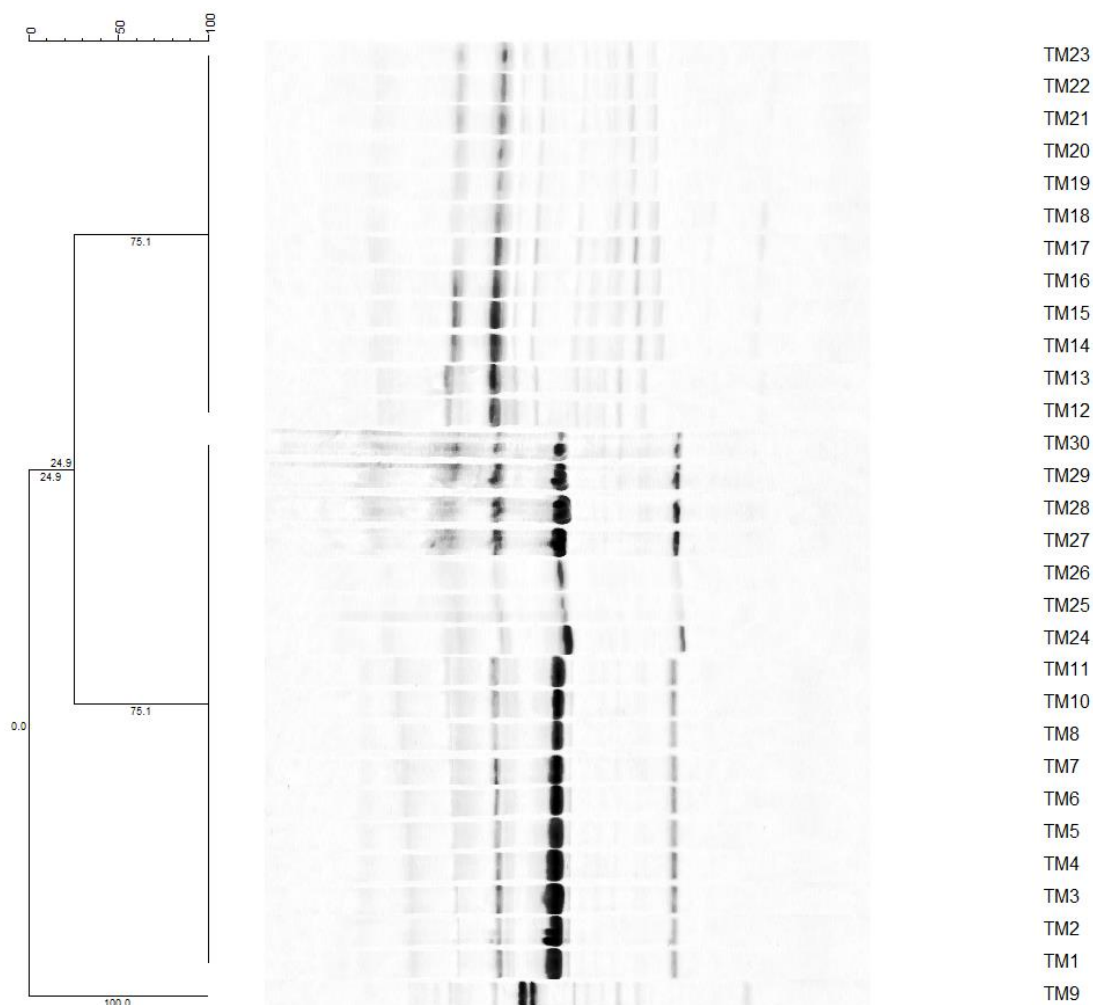
S ciljem eliminacije genetički istovjetnih izolata, elektroforetski profili RAPD-PCR produkata potom su uspoređeni hijerarhijskom klaster analizom s pomoću računalnog programa GelCompar II. Konstruiran je dendrogram (slika 11) unutar kojeg su sojevi na temelju sličnosti elektroforetskih profila grupirani u tri klastera:

Klaster 1: T12, TM13, TM14, TM15, TM16, TM17, TM18, TM19, TM20, TM21, TM22, T23

Klaster 2: TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6, TM7, TM8, TM10, TM11

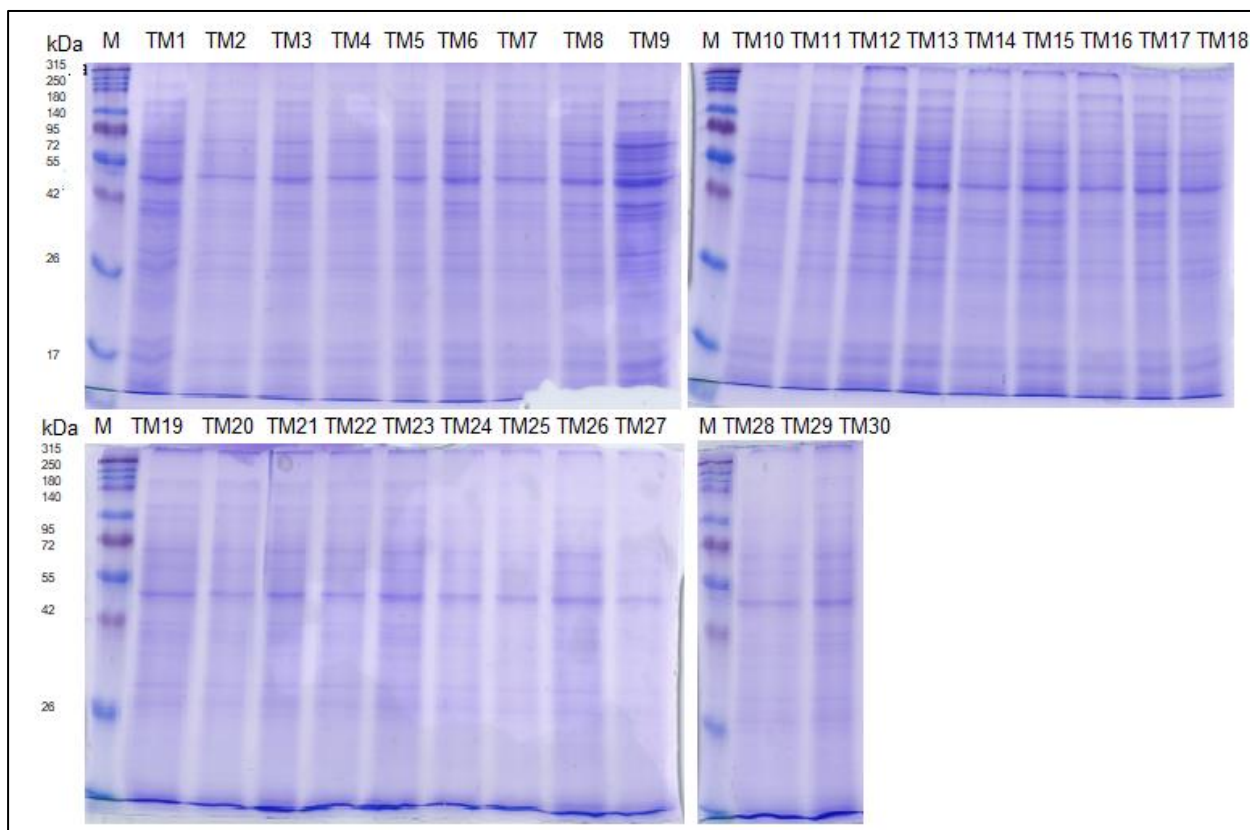
Klaster 3: TM9

RAPD-PCR omogućuje razlikovanje genetički različitih sojeva bez poznavanja njihove genomske sekvence i smatra se da su bakterije identičnih RAPD-PCR profila izolirane iz istog izvora jednake (Nowrouzian i sur., 2019). Stoga, analizom dendrograma se može zaključiti da su iz kiselog kupusa izolirana 3 genetički različita soja.



Slika 11. Dendrogram elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata DNA bakterijskih sojeva izoliranih iz kiselog kupusa

Potom je provedena ekstrakcija površinskih proteina sojeva izoliranih iz kiselog kupusa i njihovo elektroforetsko razdvajanje vertikalnom SDS-PAGE elektroforezom koja omogućuje razdvajanje proteina prema njihovoj veličini pri čemu dulji proteini putuju sporije kroz gel. SDS je anionski detergent koji denaturira proteine i daje im neto negativan naboj zbog čega putuju kroz porozni gel prema pozitivnom polu. SDS-PAGE metoda ima široku primjenu u molekularnoj biologiji, genetici, forenzici i biotehnologiji (García-Luque i sur., 2023). Elektroforetskom analizom površinskih proteina nije uočena prisutnost dominantne proteinske vrpce veličine oko 50 kDa što znači da sojevi izolirani iz kiselog kupusa najvjerojatnije ne proizvode S-proteine (slika 12).



Slika 12. SDS-PAGE površinskih proteina svih sojeva izoliranih iz kiselog kupusa

5. ZAKLJUČCI

1. Iz rasola kiselog kupusa proizvedenog spontanom fermentacijom izolirano je 30 bakterijskih sojeva iz kojih je uspješno izolirana DNA koncentracije $238,77 \pm 89,18$ ng/ μ L
2. Hijerarhijskom klaster analizom konstruiran je dendrogram unutar kojeg su elektroforetski profili RAPD-PCR produkata svrstani u tri klastera što znači da su iz rasola kiselog kupusa izolirana tri genetički različita soja
3. SDS-PAGE analizom je ustanovljeno da sojevi izolirani iz rasola kiselog kupusa ne proizvode S-proteine

6. POPIS LITERATURE

Baddiley J, Davison AL (1961) The occurrence and location of teichoic acids in lactobacilli. *J Gen Microbiol* **24**(2), 295–299. <https://doi.org/10.1099/00221287-24-2-295>

Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S (2014) Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* **13**(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>

Chattoraj DK, Schneider TD (1997) Replication control of plasmid P1 and its host chromosome: the common ground. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **57**, 145–186. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60280-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60280-9)

Collins FWJ, Rea MC, Hill C, Ross RP (2019) Antimicrobials from Lactic Acid Bacteria and Their Potential Applications. U: Vinderola G, Ouwehand A, Salminen S, von Wright A (ured.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 5. izd., CRC Press, Boca Raton, str. 151–174.

Critchley P, Archibald AR, Baddiley J (1962) The Intracellular Teichoic Acid from *Lactobacillus arabinosus*. *Biochem J* **85**(3), 420–431. <https://doi.org/10.1042/bj0850420>

Douillard FP, de Vos WM (2014) Functional genomics of lactic acid bacteria: From food to health. *Microb Cell Fact* **13**(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S8>

Endo A, Maeno S, Tanizawa Y, Kneifel W, Arita M, Dicks L, Salminen S (2018) Fructophilic lactic acid bacteria, a unique group of fructose-fermenting microbes. *Appl Environ Microbiol* **84**(19), e01290-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01290-18>

Engelhardt H, Peters J (1998) Structural Research on Surface Layers: A Focus on Stability, Surface Layer Homology Domains, and Surface Layer–Cell Wall Interactions. *J Struct Biol* **124**(2–3), 276–302. <https://doi.org/10.1006/JSBI.1998.4070>

ESNM (2020) 4 basics facts about fermented foods, Gut Microbiota for Health, <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/4-basics-facts-about-fermented-foods/>. Pristupljeno 5. lipnja 2024.

García-Luque E, del Pino-Pérez A, Viguera E (2023) Molecular Techniques for Analysis of Biodiversity by Agarose Gel Electrophoresis. U: Ku Y-S. (ured.) *Electrophoresis - Recent Advances, New Perspectives and Applications*, 1. izd., IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.1002268>.

- Gerbino E, Carasi P, Mobili P, Serradell MA, Gómez-Zavaglia A (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* **31**(12), 1877–1887. <https://doi.org/10.1007/S11274-015-1952-9>METRICS
- Gray DH, Mitchell JK (1967) Fundamental Aspects of Electro-Osmosis in Soils. *J Soil Mech Found Div* **93**(6), 209–236. <https://doi.org/10.1061/JSFEAQ.0001053>
- Hynönen U, Palva A (2013) *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(12), 5225–5243. <https://doi.org/10.1007/S00253-013-4962-2>
- Jafarei P, Ebrahimi MT (2011) *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. *Afr J Microbiol Res* **5**(24), 4033–4042. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.630>
- Koduru L, Lakshmanan M, Lee YQ, Ho PL, Lim PY, Ler WX, i sur. (2022) Systematic evaluation of genome-wide metabolic landscapes in lactic acid bacteria reveals diet- and strain-specific probiotic idiosyncrasies. *Cell Rep* **41**(10), 111735. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2022.111735>
- Konings, WN (2002) The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**(1-4), 3–27. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2029-8_2
- Krishnapur P (2023) Lactobacilli - Structure, Metabolism, and Testing – AssayGenie. <https://www.assaygenie.com/blog/lactobacilli-structure-metabolism-and-testing>. Pristupljeno 1. lipnja 2024.
- Lu Q, Guo Y, Yang G, Cui L, Wu Z, Zeng X, i sur. (2022) Structure and Anti-Inflammation Potential of Lipoteichoic Acids Isolated from *Lactobacillus* Strains. *Foods* **11**(11), 1610. <https://doi.org/10.3390/FOODS11111610>
- Luque E, Pino-Pérez A, Viguera E (2023) Molecular Techniques for Analysis of Biodiversity by Agarose Gel Electrophoresis. U: Ku Y-S. (ured.) *Electrophoresis - Recent Advances, New Perspectives and Applications*, 1. izd., IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1002268>.
- Maggioni L, von Bothmer R, Poulsen G, Lipman E (2018) Domestication, diversity and use of *Brassica oleracea* L., based on ancient Greek and Latin texts. *Genet Resour Crop Evol* **65**(1), 137–159. <https://doi.org/10.1007/S10722-017-0516-2>

Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, i sur. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**(42), 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0607117103>

Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martín-Sánchez I, Martínez-Bueno M (2008) Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese, using culture-dependent and -independent methods. *Appl Environment Microbiol* **74**(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.00418-08>

Mayo B, van Sinderen D, Ventura M (2008) Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications. *Curr Genomics* **9**(3), 169. <https://doi.org/10.2174/138920208784340731>

Nowrouzian FL, Clermont O, Edin M, Östblom A, Denamur E, Wold AE, i sur. (2019) *Escherichia coli* B2 phylogenetic subgroups in the infant gut microbiota: Predominance of uropathogenic lineages in Swedish infants and enteropathogenic lineages in Pakistani infants. *Appl Environ Microbiol* **85**(24). <https://doi.org/10.1128/AEM.01681-19>

Parlindungan E, Lugli GA, Ventura M, van Sinderen D, Mahony J (2021) Lactic acid bacteria diversity and characterization of probiotic candidates in fermented meats. *Foods* **10**(7). <https://doi.org/10.3390/FOODS10071519/S1>

Pumphrey B, Julien C (1996) An introduction to fermentation, fermentation basics. New Brunswick Scientific. https://www.molecularlab.it/public/data/Dionysos/200991017491_An%20introduction%20to%20fermentation.pdf. Pristupljeno 1. lipnja 2024.

Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina, C (2014) Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: A how-to guide. *New Microbiol* **37**(1), 1-15.

Salminen S, von Wright A (2004) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3. izd., CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9780824752033>

Schär-Zammaretti P, Ubbink J (2003) The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. *Biophys J* **85**, 4076–4092. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74820-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74820-6)

Schleifer KH, Kilpper-Bälz R (1987) Molecular and Chemotaxonomic Approaches to the Classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A Review. *Syst Appl Microbiol* **10**(1), 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(87\)80002-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80002-4)

Schroeter J, Klaenhammer T (2009) Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **292**(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2008.01442.X>

SFN (2022) Science Facts Net, <https://www.sciencefacts.net/fermentation.html>. Pristupljeno 4. lipnja 2024.

Smit E, Oling F, Demel R, Martinez B, Pouwels PH (2001) The S-layer Protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Identification and Characterisation of Domains Responsible for S-protein Assembly and Cell Wall Binding. *J Mol Biol* **305**(2), 245–257. <https://doi.org/10.1006/JMBI.2000.4258>

Teuber M (2001) Lactic Acid Bacteria. U: Rehm HJ, Reed G (ured.) Biotechnology set, 2. izd., Wiley, New Jersey, str. 325-366.

Thery F, Martina L, Asselman C, Zhang Y, Vessely M, Repo H, i sur. (2021) Ring finger protein 213 assembles into a sensor for ISGylated proteins with antimicrobial activity. *Nat Commun* **12**(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-26061-W>

Vallejo DD, Rojas Ramírez C, Parson KF, Han Y, Gadkari VV, Ruotolo BT (2022) Mass Spectrometry Methods for Measuring Protein Stability. *Chem Rev* **122**(8), 7690. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.1C00857>

Vall-Jääskeläinen SA, Palva A (2005) *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev* **29**(3), 511–529. <https://doi.org/10.1016/J.FMRRE.2005.04.003>

Verdenelli MC, Ghelfi F, Silvi S, Orpianesi C, Cecchini C, Cresci A (2009) Probiotic properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces. *Eur J Nutr* **48**(6). <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0021-2>

Vinusha KS, Deepika K, Johnson TS, Agrawal GK, Rakwal R (2018) Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review. *BB Reports* **14**, 140. <https://doi.org/10.1016/J.BBREP.2018.04.009>

Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**(2), 149–167. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2007.00094.X>

Izjava o izvornosti

Ja Tina Melkić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis