Potencijalne terapijske biomolekule probiotičkih sojeva autohtonih bakterija mliječne kiseline

Banić, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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:159:547802

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

MARTINA BANIĆ

Potencijalne terapijske biomolekule probiotičkih sojeva autohtonih bakterija mliječne kiseline

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Blaženka Kos
izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko

Zagreb, 2021

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

MARTINA BANIĆ

Potential therapeutic biomolecules of probiotic strains of autochthonous lactic acid bacteria

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: PhD Blaženka Kos, Full Professor
PhD Jurica Žučko, Associate Professor

Zagreb, 2021

Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, kojeg je pročelnica prof. dr. sc. Jagoda Šušković, a pod dvojnim mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos i izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka, u okviru znanstveno-istraživačkih projekata Hrvatske zaklade za znanost: „Probiotici i starter kulture-površinski proteini i bakteriocini" IP-2014-09-700 (voditelj: prof. dr. sc. Blaženka Kos) i „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika" IP-2019-04-2237 (voditelj: prof. dr. sc. Blaženka Kos).

Informacije o mentoru:

Dr. sc. Blaženka Kos, redovita profesorica u trajnom zvanju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ž I V O T O P I S

Prof. dr. sc. Blaženka Kos rođena je 23. listopada 1968. godine u Zagrebu. Diplomirala je 1992., magistrirala 1995., a doktorirala 2001. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1992. godine, zaposlena je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, najprije kao mladi istraživač i asistent, a od 2018. godine u znanstveno-nastavnom zvanju redovitog profesora u trajnom zvanju.

Aktivno je bila uključena u realizaciju 10 nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekata, 2 tehnologijska razvojno-istraživačka projekta i 11 projekata suradnje s gospodarstvom. Voditelj je znanstveno-istraživačkog projekta „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika" (2019.-2023.), i „Probiotici i starter kulture-površinski proteini i bakteriocini" (2015.-2019.), koje financira HRZZ. Kao istraživač je sudjelovala na međunarodnom EUREKA projektu „Development of probiotic yoghurt technology with improved yoghurt characteristics" (2006.-2009.), zatim FP7 SEE-ERA.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.), voditelj kojih je prof. dr. sc. Jagoda Šušković. Sudjelovala je također na projektima financiranim iz Europskog socijalnog fonda: Istraživačke stipendije za profesionalni razvoj mladih istraživača i poslijedoktoranada „Praćenje biodinamike mješovitih kultura pomoću novorazvijene metode uzimanja otiska prsta" na kojem je bila mentor, te na projektu „Unapređivanje studijskih programa u biotehničkom području prema načelima HKO-a" (2015.-2016. voditeljica prof. dr. sc. Mirjana Hruškar), na kojem je prof. dr. sc. Blaženka Kos bila voditeljica radnog paketa za izradu standarda kvalifikacija za preddiplomski studij Biotehnologija i diplomske studije Bioprocesno inženjerstvo i Molekularna biotehnologija PBF-a Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno sudjeluje u radu znanstvenog Centra izvrsnosti za bioprospekting mora (BioProCro).

Znanstveno-istraživački rad prof. dr. sc. Blaženke Kos obuhvaća područje mikrobne fiziologije i ekologije s posebnim naglaskom na probiotičku aktivnost bakterija mliječne kiseline. Uz opće, tehnološke i funkcionalne aspekte probiotika, istražuje i složene mehanizme djelovanja probiotičkih sojeva u *in vitro* i *in vivo* uvjetima kao i sinbiotički učinak bakterija mliječne kiseline (probiotici i prebiotici u kombinaciji). Istraživanja su bila usmjerena i na razvoj novih proizvoda za specifičnu zdravstvenu namjenu tzv. funkcionalne hrane te razgradnju rezidua antibiotika u hrani. Do sada je objavila 58 znanstvenih radova koji su citirani prema Web of Science 1192 puta; a h-indeks iznosi 16.

Na znanstvenom usavršavanju u laboratoriju prof. Francesco Canganelle, Dipartimento di Agrobiologia-Agrochimica, Universita della Tuscia, Viterbo, Italija, bila je 2004. godine. 2003. godine sudjelovala je na "Methodological courses in biology and medicine: DNA i RNA", na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, 2001. godine na “Bioprocess Engineering Course” pod pokroviteljstvom Europske federacije za biotehnologiju, održanom na Braču, a 1996. godine na "Workshop on biomass production and utilization", International Centre for Theoretical Physics, Trst, Italija. U nekoliko navrata bila je na kraćim znanstvenim usavršavanjima u Nizozemskoj u organizaciji Federation of European Microbiological Societies i Netherlands Society for Microbiology (2002., 2005. i 2011.) Članica je uređivačkih odbora časopisa „Food Technology and Biotechnology”, „Hrvatskog časopisa za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam” i „Mljekarstvo”. Pod njenim mentorstvom izrađeno je 6 doktorata i 3 magistarska rada.

Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sudjeluje u nastavi na kolegijima „Biotehnologija 4“, „Tehnologija antibiotika“, „Tehnologija enzima“ i „Probiotici i starter kulture“ na preddiplomskom studiju „Biotehnologija“, a na diplomskim studijima „Bioprocesno inženjerstvo“, „Molekularna biotehnologija“ i „Nutricionizam“ sudjeluje na kolegijima „Mikrobna ekologija“, „Projektiranje biotehnoloških procesa“ i „Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje“. Nositelj je kolegija „Ostaci antibiotika u hrani“ na specijalističkom studiju „Kvaliteta i sigurnost hrane“, te kolegija „Mikrobna ekologija“ na poslijediplomskom doktorskom studiju „Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam“. Gostujući je nastavnik na internacionalnom preddiplomskom studiju „Blue Economy and Growth“ EU-CONEXUS Minor programmes preko Sveučilišta u Zadru (2020./21.), na diplomskom studiju „Molecular and Industrial Biotechnology“ i doktorskom

studiju „Life Sciences and Biotechnology“ na University of Insubria, Varese, Italy (2019/20.; 2020./21.), na Sveučilištu Josip Juraj Strossmayer u Osijeku 2020. godine za studente preddiplomskih studija iz biotehničkih znanosti, prirodnih znanosti i područja biomedicine i zdravstva te Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta u Mostaru od 2013. godine.

Članica je Akademije tehničkih znanosti Hrvatske, Hrvatskog mikrobiološkog društva (članica Izvršnog odbora 2004.-2008., te predsjednica Sekcije za industrijsku (primijenjenu) mikrobiologiju od 2015. do 2021. godine), Hrvatskog društva za biotehnologiju (članica Izvršnog odbora od 2012. godine), Društva sveučilišnih nastavnika i ostalih znanstvenika u Zagrebu, Društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista Hrvatske (2009.-2012. Predsjednica Odbora za biotehnologiju unutar Društva) i Hrvatske mljekarske udruge.

Dobitnica je Rektorove nagrade za najbolje studentske radove (1992.), Godišnje nagrade za znanstveno-istraživački rad Društva sveučilišnih nastavnika i ostalih znanstvenika u Zagrebu (1998. godine), nagrade Saveza inovatora Poljske i autora tehničkih unapređenja za izložene rezultate na 5. međunarodnoj izložbi inovacija, novih ideja, proizvoda i tehnologija ARCA 2007., srebrne medalje na izložbi ARCA 2017. i Nagrade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za ukupni znanstveni doprinos – za postignutu visoku kvalitetu u znanstvenom radu, na 60. obljetnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 2016. Godine, te Godišnje državne nagrade za znanost, u području biotehničkih znanosti, za primjenu rezultata znanstvenoistraživačkoga rada za istraživanja probiotičke aktivnosti bakterija mliječne kiseline (2018.) i Godišnje nagrade „Rikard Podhorsky“ Akademije tehničkih znanosti Hrvatske (2019.).

Informacije o mentoru:

Dr. sc. Jurica Žučko, izvanredni profesor Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ž I V O T O P I S

Izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko rođen je u Zagrebu 1. travnja 1979. godine. Diplomirao je 2005. godine smjer Biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu pod mentorstvom prof. dr.sc. Daslava Hranuelija, a doktorski rad pod naslovom "*In silico* analysis of polyketide synthases", izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Johna Culluma i prof. dr. sc. Daslava Hranuelija, obranio je 2010. godine na Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, Njemačka. Od 2005. do 2008. godine, bio je zaposlen u informatičkoj tvrtki Novalis Ltd., Zagreb, a od 2008. godine, zaposlen je u Kabinetu za bioinformatiku Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Na znanstvenom usavršavanju na LB Genetik, FB Biologie, Tehnische Universität Kaiserslautern u Njemačkoj, boravio je ukupno 42 mjeseca u periodu od 2006. do 2009. godine.

Znanstveno-istraživački rad izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka, obuhvaća bioinformatičke analize metaboličkih puteva biološki aktivnih supstancija porijeklom iz morskih organizama, bioinformatičke analize poliketid sintaza amebe *Dictyostelium discoideum*, proteomske analize struktura poliketid sintaza tipa II, evolucijske analize funkcionalnih domena proteina, izradu i primjenu generičkih programskih paketa ClustScan i CompGen, te bioinformatičke analize metaboličkog puta biosinteze šikimata. Navedena istraživanja su se provodila u okviru projekata "Sustav za *in silico* osmišljavanje novih biološko aktivnih kemijskih entiteta" (2006.-2009.; TP-05/0058-23) i "Generiranje potencijalnih lijekova u uvjetima *in silico*" (2008.-2013.; 058-0000000-3475), financiranih od Ministarstva znanosti i obrazovanja RH. Osim toga, znanstvena aktivnost izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka, ogleda se i kroz sudjelovanje u radu na bilateralnom njemačko-hrvatskom projektu "*In silico* studies of recombination in modular biosynthetic clusters" (2006.-2008.) te voditeljstvu bilateralnog istraživačkog projekta MZOS-DAAD „Biologija genoma bakterijskog roda *Streptomyces*" (2015.-2016.). Aktivno je sudjelovao u provedbi FP7 projekta „AmylolEnzymes Captured by Targeted Metagenomics" (2011.-2014.,

FP7-KBBE-2010-4) kao član spin-off kompanije PBF-a SemGen d.o.o. zadužene za analizu i izvlačenje podataka iz metagenomskih setova ključnih za enzime koji sudjeluju u razgradnji škrobnih supstrata. Od 2012. do 2014. bio je suradnik na istraživačkom projektu „Rizici zagađenja Jadranskog mora naftom“ Hrvatske zaklade za znanost (br. 09/5), a od 2014. do 2015. je i voditelj toga projekta. Pored toga, izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko je vrlo aktivno sudjelovao u razvoju generičkih programskih paketa ClustScan i CompGen, baza podataka ClustScan database (CSDB) i recombinant ClustScan DataBase (r-CSDB) objedinjenih u ekspertni sustav 3DIS, te u razvoju bioinformatičke platforme za analizu sekvenci DNA/proteina/metagenoma/genoma MEGGASENSE (Metagenome/Genome Annotated Sequence Natural Language Search Engine), pomoću koje su razvijene baze podataka ZoophyteBase (Searchable database of a coral proteome) i SCATT (Streptomyces cattlea proteome database). Koautor je PCT patentne prijave (PCT/HR2008/000012) odobrene 2014. godine. Rezultati znanstveno-istraživačkog rada izv. prof. dr. sc. Jurice Žučka, prikazani su u obliku priopćenja (usmenih izlaganja ili postera) na 26 međunarodnih znanstvenih skupova, te na 3 znanstvena skupa održanih u zemlji.

Izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko autor je ili koautor 27 znanstvenih radova, čija citiranost prema Scopus bazi podataka iznosi 460 puta, a prema Google Znalac 806 puta, a h-indeks 14 prema Scopus bazi podataka i 14 prema Google Znalac.

Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sudjeluje u nastavi na kolegijima „Molekularna prehrana i genomika“, „Bioinformatika“ i „Primijenjena proteomika“. Nositelj je kolegija „Proizvodnja terapeutskih proteina“, „Molekularna genetika biosinteze antibiotika“, te „Nutrigenomika“.

Član je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog genetičkog društva. Dobitnik je nagrade mladim znanstvenicima Hrvatskog mikrobiološkog društva (2013.), nagrade Željko Trgovčević Hrvatskog genetičkog društva (2011.) i nagrade za najbolji doktorski rad u 2011. godini Fakulteta biologije Tehničkog sveučilišta u Kaiserslauternu.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akad. god. 2019./2020. održanoj dana 20. svibnja 2020., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 15. rujna 2020. godine.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
UDK: 577.112:579.67:613.287.1-053.3(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

POTENCIJALNE TERAPIJSKE BIOMOLEKULE PROBIOTIČKIH SOJEVA AUTOHTONIH BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Martina Banić, mag. ing. biotechn.

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

Mentori: prof. dr. sc. Blaženka Kos
izv. prof. dr. sc. Jurica Žučko

Kratki sažetak:
Iz 30 uzoraka majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, izolirana je DNA te je provedeno sekvenciranje V1-V3 regije 16S rRNA gena. Taksonomskom analizom dobivenih sekvenci, utvrđena je korelacija u sastavu mikrobioma mlijeka majki i fecesa njihove dojenčadi. Hijerarhijskom klaster analizom RAPD-PCR elektroforetskih profila 100 bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, odabrano je 28 genetički različitih sojeva. SDS-PAGE analizom je po prvi puta ustanovljena prisutnost S-proteina kod 4 soja izolirana iz majčinog mlijeka, a PCR analizom je kod 6 *Lactobacillus plantarum* sojeva potvrđena prisutnost 3 gena (*plnJ*, *plnA* i *plnEF*) koji sudjeluju u biosintezi bakteriocina. Detaljno su okarakterizirani i probiotički sojevi producenti potencijalnih terapijskih biomolekula, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C, izolirani iz rasola kiselog kupusa. Analizom cijelog genoma soja SF9B, pronađena su 3 gena (*slpB*, *slp* i *slpD*) koji kodiraju S-proteine. LC-MS analizom proteinskih vrpci dobivenih SDS-PAGE i 2D-EF, ustanovljena je ekspresija samo jednog, *slpB* gena. Sekundarna struktura izoliranog S-proteina je pretpostavljena PSIPRED metodom, a tercijarna pomoću I-TASSER servera. Potvrđeno je da soj SF9C sadrži 9 gena koji kodiraju za bakteriocine. Tercijarne strukture plantaricina PlnJK i PlnEF pretpostavljene su pomoću SWISS-MODEL servera, a fizikalno-kemijska svojstva njihovih α-uzvojnica HeliQuest serverom. DGGE analizom i analizom fekalnog mikrobioma, potvrđen je *in vivo* utjecaj primjene združene kulture sojeva SF9B i SF9C na sastav fekalnog mikrobioma 18 štakora.

Broj stranica: 198
Broj slika: 46
Broj tablica: 19
Broj literaturnih navoda: 355
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: probiotici, S-proteini, bakteriocini, mikrobiom majčinog mlijeka, mikrobiom fecesa dojenčadi

Datum obrane: 23. srpnja 2021.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
3. dr. sc. Ivanka Jerić, **znanstveni savjetnik**
4. prof. dr. sc. Jadranka Frece (zamjena)

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **PhD Thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
UDK: 577.112:579.67:613.287.1-053.3(043.3)
Postgraduate University Doctoral Study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Biotechnology

POTENTIAL THERAPEUTIC BIOMOLECULES OF PROBIOTIC STRAINS OF AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA

Martina Banić, MSc

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

Supervisors: PhD Blaženka Kos, Full Professor having a tenure
PhD Jurica Žučko, Associate Professor

Short abstract:
DNA was isolated from 30 samples of breast milk and infant feces, and sequencing of the V1-V3 region of the 16S rRNA gene was performed. By taxonomic analysis of the obtained sequences, a correlation in the composition of the microbiome of breast milk and infant feaces was found. 28 genetically distinct strains were selected by hierarchical cluster analysis of RAPD-PCR electrophoresis profiles of 100 strains isolated from breast milk. The SDS-PAGE analysis revealed for the first time the presence of S-proteins in 4 strains isolated from breast milk, and PCR analysis confirmed the presence of 3 genes (*plnJ*, *plnA* and *plnEF*) involved in bacteriocin biosynthesis in 6 *Lactobacillus plantarum* strains. *Lb. brevis* SF9B and *Lb. plantarum* SF9C, probiotic strains producing potential therapeutic biomolecules isolated from sauerkraut brine, were also characterized in detail. WGS analysis of the SF9B strain revealed 3 genes (*slpB*, *slpC* and *slpD*) encoding S-proteins. LC-MS analysis of the protein bands obtained by SDS-PAGE and 2D-EF revealed the expression of only one, the *slpB* gene. Prediction of the secondary structure of the S-protein was performed using the PSIPRED method, and that of the tertiary structure using the I-TASSER server. It was confirmed that the strain SF9C contains 9 bacteriocin-encoding genes. The SWISS-MODEL server was used to predict the tertiary structure of PlnJK and PlnEF plantaricins, whereas physicochemical properties of their α-helices were determined using the HeliQuest server. DGGE analyses and faecal microbiome analyses confirmed the *in vivo* impact of SF9B and SF9C co-culture application on the faecal microbiome composition of 18 rats.

Number of pages: 198
Number of figures: 46
Number of tables: 19
Number of references: 355
Original in: Croatian

Key words: probiotics, S-proteins, bakteriocins, breast milk microbiome, infant faecal microbiome

Date of the thesis defense: July 23rd, 2021

Reviewers:
1. **PhD** Jagoda Šušković, **Full Professor having a tenure**
2. **PhD** Andreja Leboš Pavunc, **Assistant Professor**
3. **PhD** Ivanka Jerić, **Scientific Adviser**
4. **PhD** Jadranka Frece, **Full Professor**

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

SAŽETAK

Provedeno je ispitavanje utjecaja sastava mikrobioma majčinog mlijeka na mikrobiom fecesa dojenčadi te fenotipska i genotipska identifikacija bakterija mliječne kiseline (BMK), izoliranih iz majčinog mlijeka, kao potencijalnih probiotika nove generacije (*engl.* Next-generation probiotics, probiotics 2.0). Prikupljeno je 30 uzoraka majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, iz kojih je ekstrahirana DNA te je provedeno sekvenciranje V1-V3 regije 16S rRNA gena pomoću Illumina MiSeq platforme. Analizom podataka dobivenih sekvenciranjem pomoću QIIME 2 platforme, ustanovljeno je da je mikrobiom mlijeka svake majke i fecesa svakog djeteta jedinstven, te je utvrđeno postojanje korelacije u sastavu mikrobioma mlijeka majki i fecesa njihove djece. Također je potvrđeno da se sastav mikrobioma majčinog mlijeka mijenja tijekom perioda laktacije, kao i mikrobiom fecesa dojenčadi. Analizom α-raznolikosti prikupljenih uzoraka, ustanovljeno je da je mikrobiota majčinog mlijeka raznolikija, tj. bogatija brojem vrsta od crijevne mikrobiote dojenčadi. U svrhu odabira novih sojeva, potencijalnih probiotika nove generacije, ukupno je izolirano 100 bakterijskih sojeva, po 20 iz uzoraka mlijeka svake majke. S ciljem eliminacije genetički istovjetnih izolata, napravljen je DNA "fingerprinting" svih izoliranih sojeva pomoću RAPD-PCR metode. Elektroforezom RAPD-PCR produkata, dobiveni su jedinstveni genetički profili svakog soja, koji su hijerarhijskom klaster analizom svrstani u 5 dendrograma. Analizom dendrograma, odabrano je 28 genetički različitih sojeva koji su potom fenotipski okarakterizirani nizom metoda i identificirani sekvenciranjem 16S rRNA gena. Usporedbom rezultata sekvenciranja s rezultatima hijerarhijske klaster analize svih 100 izolata, ustanovljeno je da 46 % izoliranih sojeva pripada rodu *Enterococcus,* 27 % *Staphylococcus,* 22 % *Lactobacillus* i 5 % *Streptococcus.* SDS-PAGE analizom je utvrđeno da čak 4 *Lactobacillus brevis* sojeva (MB1, MB2, MB13 i MB20) sadrže površinske (*engl.* Surface, S) proteine, koji su po prvi put otkriveni i identificirani u sojevima izoliranim iz majčinog mlijeka. PCR analizom je ustanovljeno da su 6 *Lactobacillus plantarum* sojeva potencijalni producenti bakteriocina, koji sadrže čak 3 gena (*plnJ*, *plnA* i *plnEF*) koji su odgovorni za biosintezu bakteriocina. Istraživanja antimikrobne aktivnosti, preživljavanja u nepovoljnim uvjetima te agregacije i adhezije na različite epitelne i subepitelne strukture intestinalnog trakta, pokazale su da najveći probiotički potencijal među sojevima izoliranim iz majčinog mlijeka, imaju producenti potencijalnih terapijskih biomolekula S-proteina i bakteriocina. Također, provedena je i detaljna genomička i proteomička karakterizacija probiotičkih sojeva producenata potencijalnih terapijskih

biomolekula, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C, ranije izoliranih iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa i identificiranih u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura. Analizom sekvence cijelog genoma (*engl.* whole genome sequence, WGS) soja SF9B, pronađena su 3 gena (*slpB*, *slpC* i *slpD*) koja kodiraju za S-proteine. LC-MS analizom proteinskih vrpci dobivenih SDS-PAGE i 2D-EF, ustanovljeno je da u *in vitro* uvjetima dolazi do ekspresije samo jednog, *slpB* gena, koji kodira protein veličine oko 50 kDa i pI vrijednosti 10, homologan SlpB proteinu soja *Lb. brevis* ATCC 14869, dok se ekspresija *slpC* i *slpD* gena smatra utišanom. Sekundarna struktura izoliranog S-proteina pretpostavljena je korištenjem PSIPRED metode implementirane u Phyre2 serveru, a tercijarna struktura homolognim modeliranjem pomoću I-TASSER servera. Anotacija genoma RAST serverom otkrila je da treću najzastupljeniju skupinu gena soja SF9B čine geni povezani sa staničnom stijenkom i kapsulom. Nizom eksperimenata, potvrđena je i iznimna važnost S-proteina tijekom preživljavanja soja SF9B tijekom liofilizacije i prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT), kao i tijekom autoagregacije i koagregacije te adhezije na mucin, proteine ekstracelularnog matriksa (*engl*. ExtraCellular Matrix, ECM) i Caco-2 crijevne epitelne stanice. PCR-analizom je potvrđeno da soj *Lb. plantarum* SF9C sadrži 3 gena (*plnJ*, *plnEF* i *plnA*) koji sudjeluju u biosintezi plantaricina. U svrhu detaljnije karakterizacije biosinteze plantaricina na genomskoj razini, provedena je *in silico* identifikacija klastera gena uključenih u biosintezu plantaricina primjenom BAGEL4 servera te je identificirano jedno područje interesa (*engl*. Area Of Interest, AOI) locirano na kontigu 13. Translatirana nukleotidna sekvenca gena smještenih na *pln* lokusu je korištenjem BLASTx algoritma uspoređena s proteinima pohranjenim u NCBI bazi podataka. Tako je otkriveno da soj SF9C sadrži čak 9 gena (*plnK, plnJ, plnN, plnO, plnA, plnC, plnD, plnF, plnE* i *plnS*) koji kodiraju za bakteriocine, kao i ABC-transportere te specifične imunosne proteine koji producentu osiguravaju otpornost na proizvedeni bakteriocin. Pomoću SWISS-MODEL servera, pretpostavljene su 3D-strukture PlnJK i PlnEF plantaricina, a fizikalno-kemijska svojstva (hidrofobnost, hidrofobni moment i netto naboj) njihovih α-uzvojnica određena su pomoću HeliQuest servera. Naposljetku je ispitan utjecaj združene kulture sojeva SF9B i SF9C na sastav fekalnog mikrobioma 18 laboratorijskih štakora podijeljenih u dvije jednake skupine, od kojih je jedna predstavljala model crijevne disbioze izazvane Alzheimerovom bolešću, potaknutom intraperitonealnim ubrizgavanjem $AlCl_3$ i D-galaktoze, a druga skupina, koja je tretirana na isti način fiziološkom otopinom, model normalne crijevne mikrobiote.

Određivanjem AChE aktivnosti te imunohistokemijskom analizom homogenata tkiva malog mozga, potvrđene su promjene povezane s Alzheimerovom bolesti kod štakora izloženih $AlCl_3$. Usporedba sastava fekalnog mikrobioma navedenih štakora sa sastavom fekalnog mikrobioma štakora kontrolne skupine, potvrdila je crijevnu disbiozu kod štakora izloženih $AlCl_3$. Naposljetku, DGGE analiza i analiza fekalnog mikrobioma štakora pomoću QIIME 2 platforme, potvrdili su da *in vivo* primjena združene kulture sojeva SF9B i SF9C uzrokuje promjene u sastavu fekalnog mikrobioma. Naime, kaniliranje štakora probiotičkom suspenzijom navedena dva soja, uzrokovalo je smanjenje udjela patogenih bakterija iz rodova *Escherichia*, *Helicobacter*, *Sutterella* i *Acintetobacter*, te porast zastupljenosti korisnih bakterija.

SUMMARY

The influence of the composition of the breast milk microbiome on the fecal microbiome of the infant was investigated and a phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria (LAB) isolated from breast milk as potential new generation probiotics (NGM) was performed. 30 samples of breast milk and infant feaces were collected, from which DNA was extracted, and sequencing of the V1-V3 region of the 16S rRNA gene was performed using the Illumina MiSeq platform. Analysis of the sequencing data using the QIIME 2 platform revealed that the microbiome of each breast milk and each infant's feaces is unique, and showed the existence of a correlation in the composition of the microbiome of mothers' milk and their infants' feaces. It was also confirmed that the composition of the breast milk microbiome changes during lactation, as does the feaces microbiome. By analyzing the α-diversity of the collected samples, it was found that the breast milk microbiota is more diverse, i. e. richer in species, than the infant feacal microbiota. In order to select new strains, potential next-generation probiotics, a total of 100 bacterial strains were isolated, 20 from each mothers' milk. To eliminate genetically identical isolates, DNA "fingerprinting" of all isolated strains was performed using the RAPD-PCR method. Electrophoresis of the RAPD-PCR products yielded unique genetic profiles of each strain, which were then classified into 5 dendrograms by hierarchical cluster analysis. After dendrogram analysis, 28 genetically distinct strains were selected, phenotypically characterized by a series of methods, and identified by 16S rRNA gene sequencing. Comparison of the sequencing results with the results of hierarchical cluster analysis of all 100 isolates revealed that 46 % of the isolated strains belonged to the genus *Enterococcus*, 27 % to *Staphylococcus*, 22 % to *Lactobacillus* and 5 % to *Streptococcus*. SDS-PAGE analysis revealed that as many as 4 *Lactobacillus brevis* strains (MB1, MB2, MB13, and MB20) contained S-proteins, which were detected and identified for the first time ever in strains isolated from breast milk. PCR analysis confirmed that 6 *Lactobacillus plantarum* strains were potential producers of bacteriocins, as they contained as many as 3 genes (*plnJ*, *plnA* and *plnEF*) responsible for bacteriocin biosynthesis. Studies on antimicrobial activity, survival under adverse conditions, aggregation and adhesion to various epithelial and subepithelial structures of the intestinal tract have shown that the producers of the potential therapeutic biomolecules, S-proteins and bacteriocins, have the greatest probiotic potential among all strains isolated from breast milk. A detailed genetic and proteomic characterization of the probiotic strains producers of potential therapeutic

biomolecules, *Lb. brevis* SF9B and *Lb. plantarum* SF9C, previously isolated from the brine of traditionally produced sauerkraut and identified in Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology, was also performed. Whole-genome sequence analysis of the SF9B strain revealed that it contains 3 genes (*slpB*, *slpC* and *slpD*) encoding S-proteins. The LC-MS analysis of SDS-PAGE- and 2-DE-derived protein bands revealed that merely one, the *slpB* gene, which encodes a protein of approximately 50 kDa and a pI value of 10, and is homologous to the SlpB protein of the *Lb. brevis* ATCC 14869 strain, was expressed *in vitro*, whereas the expression of the *slpC* and *slpD* genes is considered silent. The secondary structure of the isolated S-protein was assumed using the PSIPRED method implemented in the Phyre2 server, and the tertiary structure was assumed by homologous modeling using the I-TASSER server. Genome annotation performed with the RAST server revealed that the third most abundant group of SF9B genes consists of genes associated with the cell wall and capsule. Through a series of experiments, the exceptional importance of the S-protein in the survival of the SF9B strain during lyophilization and passage through the GIT, as well as during autoaggregation and coaggregation and adhesion to mucin, ECM proteins and Caco-2 intestinal epithelial cells, was confirmed. PCR analysis confirmed that strain *Lb. plantarum* SF9C contains 3 genes (*plnJ*, *plnEF*, and *plnA*) involved in plantaricin biosynthesis. For a more detailed characterization of plantaricin biosynthesis at the genomic level, *in silico* identification of gene clusters involved in plantaricin biosynthesis was performed using the BAGEL4 server, and one area of interest (AOI) was identified in contig 13. The translated nucleotide sequence of the genes located on the *pln* locus was compared with the proteins stored in the NCBI database using the algorithm BLASTx. Thus, the SF9C strain was found to contain no less than 9 genes (*plnK*, *plnJ*, *plnN*, *plnO*, *plnA*, *plnC*, *plnD*, *plnF*, *plnE* and *plnS*) encoding bacteriocins, as well as ABC transporters and specific immune proteins conferring producer the resistance to the produced bacteriocin. Using the SWISS-MODEL server, the tertiary structures of PlnJK and PlnEF plantaricin were assumed, and the physicochemical properties (hydrophobicity, hydrophobic moment, and net charge) of their α-helices were determined using a HeliQuest server. Finally, the effect of SF9B and SF9C co-culture on the composition of the faecal microbiome was examined in 18 laboratory rats divided into two equal groups. One group represented a model of intestinal dysbiosis caused by Alzheimer's disease induced by intraperitoneal injection of $AlCl_3$ and D-galactose, whereas the second group, treated with saline solution in the same manner, represented a model of normal

intestinal microbiota. Determination of AChE activity and immunohistochemical analysis of cerebellar tissue homogenates confirmed Alzheimer's disease-related changes in the rats exposed to $AlCl_3$. Comparison of the faecal microbiome composition of these rats with the faecal microbiome composition of the control group, confirmed intestinal dysbiosis in the $AlCl_3$-exposed rats. Finally, DGGE analysis and analysis of the faecal microbiome of the rats using the QIIME 2 platform confirmed that *in vivo* administration of SF9B and SF9C co-culture caused changes in the composition of the faecal microbiome. Namely, cannulation of rats with a probiotic suspension of these two strains caused a decrease in the proportion of pathogenic bacteria of the genera *Escherichia*, *Helicobacter*, *Sutterella* and *Acintetobacter*, and an increase in the proportion of beneficial bacteria.

ZAHVALA

Zahvaljujem prof. dr. sc. Jagodi Šušković, pročelnici Laboratorija u kojem sam izradila svoj Diplomski i Doktorski rad, jer mi je ukazala povjerenje i pružila priliku da se bavim znanstveno-istraživačkim radom kao dio njenog tima i tijekom proteklih godina me neprestano bodrila, savjetovala i na mene nesebično prenosila svoje neprocjenjivo znanje i bogato poslovno i životno iskustvo.

Veliko hvala mojoj mentorici, prof. dr. sc. Blaženki Kos čiji su mi entuzijazam i predanost radu konstantna motivacija i inspiracija. Hvala na svim dobronamjernim savjetima, bezrezervnoj podršci i nemjerljivoj pomoći pri svakodnevnom radu, a posebno pri izradi Doktorskog rada.

Iskreno i od srca hvala mom mentoru, izv. prof. dr. sc. Jurici Žučku, na velikoj pomoći, motivaciji, prijateljskom odnosu i dobronamjernim savjetima!

Posebno zahvaljujem mojim dragim kolegicama, prof. dr. sc. Jasni Novak, doc. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc, Katarini Butorac, mag. ing. biotechn. i Nini Čuljak, mag. ing. biotechn., koje su zaslužne što niti jedan dan proveden na poslu nije prošao bez smijeha. Hvala na prijateljstvu, pomoći, ohrabrenju – na svemu!

Dragim kolegama sa Zavoda za biokemijsko inženjerstvo zahvaljujem na ugodnoj radnoj atmosferi i prijateljskom odnosu.

Svim mojim prijateljima i kumovima hvala na predivnim zajedničkim trenutcima koji su mi uvijek punili baterije i davali snagu za sve poslovne i životne izazove.

Neizmjerno hvala cijeloj mojoj obitelji, a posebno najboljoj mami, tati, sestri i bratu jer bez njih ništa, pa ni ovo, ne bi bilo moguće. Uvijek su bili moja najveća potpora, motivacija i rame za plakanje, i davali mi snagu da nastavim dalje kad ni sama nisam vjerovala da mogu.

Iznad svega, hvala Miri – najboljem mužu i najiskrenijem prijatelju, čija mi bezuvjetna ljubav i podrška daju vjeru i snagu da mogu sve!

Mojoj Nori – jer je igra s tobom najljepši dio svakog mog dana, jer je tvoj zagrljaj rješenje za sve moje probleme i jer nijedan trenutak nije potpun ako ti nisi dio njega. Volim te!

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 5
2.1. Crijevni mikrobiom kao novi organ ljudskog tijela 5
2.2. Crijeva-jetra-mozak: sistemski učinak na organizam 6
2.3. Razvoj probiotičkog koncepta 9
2.4. Identifikacija i kriteriji odabira probiotičkih sojeva 10
2.5. Probiotici nove generacije 14
2.6. Selekcija probiotičkih sojeva nove generacije 16
2.6.1. Selekcija komensalnih terapijskih bakterija nove generacije 18
2.6.2. Konstrukcija probiotika nove generacije poboljšanjem svojstava ranije etabliranih probiotičkih sojeva upotrebom metoda bioinženjerstva 23
2.6.3. Selekcija probiotičkih sojeva nove generacije iz novih izvora korištenjem modernih tehnologija 26
2.6.3.1. Majčino mlijeko - izvor probiotičkih sojeva nove generacije 27
2.7. Funkcionalne molekule probiotičkih sojeva 31
2.7.1. Bakteriocini 32
2.7.1.1. Bakteriocini Gram-pozitivnih bakterija 37
2.7.1.2. Bakteriocini Gram-negativnih bakterija 38
2.7.1.3. Mehanizam djelovanja bakteriocina 39
2.7.2. S-proteini 40
2.7.2.1. Struktura i lokacija S-proteina 40
2.7.2.2. Vezanje S-proteina na površinu stanice 42
2.7.2.3. Izolacija i posttranslacijske modifikacije S-proteina 43
2.7.2.4. Kristalizacija S-proteina 44
2.7.2.5. Uloga S-proteina 46
3. MATERIJALI I METODE 53
3.1. Materijali 53
3.1.1. Uzorci majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi 53
3.1.2. Mikroorganizmi 54
3.1.3. Stanične linije 54
3.1.4. Hranjive podloge 54
3.1.5. Kemikalije 55
3.1.6. Aparatura i pribor 58
3.1.7. API 59

3.1.8. Antibiotici *60*
3.2. METODE RADA 61
3.2.1. Izolacija DNA iz majčinog mlijeka *61*
3.2.2. Izolacija DNA iz fecesa dojenčadi *61*
3.2.3. Određivanje koncentracije DNA *61*
3.2.4. Sekvenciranje DNA izolirane iz majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi *61*
3.2.5. Analiza mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi pomoću QIIME2 platforme-određivanje taksonomije te α- i β-raznolikosti *62*
3.2.6. Izolacija bakterija iz majčinog mlijeka i analiza genetičke raznolikosti izolata *63*
3.2.6.1. Izolacija bakterija iz majčinog mlijeka 63
3.2.6.2. Održavanje i čuvanje mikroorganizama 63
3.2.6.3. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva 64
3.2.6.4. RAPD-PCR i hijerarhijska klaster analiza dobivenih elektroforetskih profila 64
3.2.7. Identifikacija odabranih bakterijskih sojeva iz majčinog mlijeka *65*
3.2.7.1. Fenotipska identifikacija odabranih sojeva iz majčinog mlijeka 65
3.2.7.1.1. Bojanje bakterijskih stanica po Gramu *65*
3.2.7.1.2. Kalij-hidroksid (KOH) metoda *65*
3.2.7.1.3. Katalaza test *65*
3.2.7.1.4. API 50 CHL metoda *65*
3.2.7.2. Genotipska identifikacija bakterija sekvenciranjem 16S rRNA gena 66
3.2.7.2.1. Amplifikacija potpune sekvence 16S rRNA gena PCR metodom *66*
3.2.7.2.2. Sekvenciranje 16S rRNA gena *67*
3.2.8. Detekcija producenata potencijalnih terapijskih biomolekula među bakterijama izoliranim iz majčinog mlijeka *68*
3.2.8.1. Detekcija proizvodnje S-proteina kod bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka 68
3.2.8.1.1. Ekstrakcija i natrij dodecil sulfat-poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) površinskih proteina *68*
3.2.8.1.2. Detekcija gena koji kodiraju za S-proteine PCR metodom *68*
3.2.8.2. Detekcija proizvodnje bakteriocina kod bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka 69
3.2.8.2.1. Detekcija gena uključenih u biosintezu bakteriocina PCR metodom *69*
3.2.8.2.2. Određivanje antimikrobnog djelovanja bakterija metodom difuzije s rupama u agaru (engl. agar well-diffusion method) *70*
3.2.8.2.3. Određivanje antimikrobnog djelovanja bakterija metodom s dvostrukim slojem agara (engl. agar spot-test method) *70*
3.2.9. Ispitivanje osjetljivosti bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka na antibiotike *71*
3.2.9.1. Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike E-testom i disk-difuzijskom metodom 71
3.2.9.2. Detekcija gena za rezistenciju na antibiotike PCR metodom 72
3.2.10. Preživljavanje sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) izoliranih iz majčinog mlijeka *73*

3.2.10.1. Preživljavanje BMK tijekom postupka liofilizacije ... 73
3.2.10.1.1. Liofilizacija bakterijskih stanica ... 73
3.2.10.1.2. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom ... 73
3.2.10.2. Preživljavanje BMK izoliranih iz majčinog mlijeka u simuliranim uvjetima GIT-a ... 74
3.2.10.2.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva ... 74
3.2.10.2.2. Inkubiranje bakterijskih stanica u simuliranim sokovima GI sustava ... 74
3.2.10.3. Mikrobna adhezija na otapala (engl. Microbial adhesion to solvents, MATS) ... 74
3.2.11. Ispitivanje svojstava agregacije i adhezije BMK izoliranih iz majčinog mlijeka ... 74
3.2.11.1. Ispitivanje svojstava autoagregacije bakterijskih stanica ... 74
3.2.11.2. Ispitivanje svojstava koagregacije bakterijskih stanica ... 75
3.2.11.3. In vitro adhezija na mucin ... 75
3.2.11.4. Adhezija bakterijskih stanica na Caco-2 stanice ... 76
3.2.11.5. Adhezija bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa ... 77
3.2.12. Analiza sekvence cijelog genoma producenata potencijalnih terapijskih biomolekula ... 78
3.2.13. Analiza S-proteina soja Lb. brevis SF9B ... 79
3.2.13.1. Izolacija S-proteina ... 79
3.2.13.2. Identifikacija i karakterizacija S-proteina ... 79
3.2.14. Ispitivanje utjecaja združene kulture sojeva producenata potecijalnih terapijskih biomolekula na sastav crijevnog mikrobioma eksperimentalnih životinja ... 79
3.2.15. PCR-DGGE analiza ... 81
3.2.16. Statistička analiza i prikaz rezultata ... 81
4. REZULTATI ... 82
4.1. Analiza sastava mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi ... 82
4.2. Izolacija i identifikacija bakterija iz majčinog mlijeka te odabir sojeva BMK-potencijalnih probiotika nove generacije ... 90
4.3. Detekcija sojeva producenata potencijalnih terapijskih biomolekula, S-proteina i bakteriocina, među BMK izoliranim iz majčinog mlijeka ... 98
4.4. Probiotički potencijal sojeva producenata S-proteina i bakteriocina izoliranih iz majčinog mlijeka ... 103
4.5. Genomička i proteomička karakterizacija S-proteina i bakteriocina probiotičkih sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C ... 110
5. RASPRAVA ... 123
5.1. Analiza sastava mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi ... 123
5.2. Izolacija i identifikacija bakterija iz majčinog mlijeka te odabir sojeva BMK-potencijalnih probiotika nove generacije ... 131
5.3. Detekcija sojeva producenata potencijalnih terapijskih biomolekula, S-proteina i bakteriocina, među BMK izoliranim iz majčinog mlijeka ... 133

5.4. Probiotički potencijal sojeva producenata S-proteina i bakteriocina izoliranih iz majčinog mlijeka 139
5.5. Genomička i proteomička karakterizacija S-proteina i bakteriocina probiotičkih sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C 151
6. ZAKLJUČCI 159
7. LITERATURA 161
8. ŽIVOTOPIS 197

1. UVOD

Ljudski GIT predstavlja jedan od najkompleksnijih poznatih ekosustava koji pruža stabilno stanište i nutrijente za čak 10^{13}-10^{14} pripadnika približno 1000 različitih bakterijskih vrsta (Corfield, 2018). Složeni mutualistički odnos domaćina i njegovog crijevnog mikrobioma je osnova održavanja crijevne homeostaze zdravog pojedinca, na koju utječu i dob, stil života, prehrana, bolesti, lijekovi te okolišni i nasljedni faktori. Saznanja o štetnosti crijevne disbioze su dovela do ekspanzije potražnje za probioticima, koji su prepoznati kao učinkoviti modulatori ravnoteže crijevnog mikrobioma (Šušković i Kos, 2020; Gómez-Gallego i sur., 2016). Probiotici se definiraju kao živi mikroorganizmi koji primijenjeni u adekvatnoj količini imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina (FAO/WHO, 2001). Zastupljeni su u ljudskoj prehrani od davnina kroz tradicionalne proizvode nastale spontanom fermentacijom mlijeka te voća, povrća i njihovih sokova, a danas se primjenjuju kao žive kulture ili spore, izravno ili putem fermentiranih mliječnih proizvoda, hrane i pića (Khan i Malik, 2019; Šušković, 1996). Brojna istraživanja potvrđuju njihovu ulogu u održavanju zdravog mikrobioma, jačanju funkcije crijevne barijere, u antialergijskom, antimikrobnom, protuupalnom, endokrinološkom, imunomodulatornom i neurološkom djelovanju, te u prevenciji i liječenju GI i kardiovaskularnih bolesti, pretilosti pa čak i tumora (Song i sur., 2018).

Veliki interes istraživača na području probiotičkog koncepta doveo je do razvoja probiogenomike, nove grane funkcionalne genomike usmjerene isključivo na genetičku karakterizaciju probiotika (Sarsaiya i sur., 2019; Ventura i sur., 2012). Probiogenomička istraživanja su pokazala da probiotici dostupni na tržištu imaju ograničene funkcionalne učinke na domaćina te da je potrebna dodatna selekcija i formulacija probiotičkih sojeva (Žučko i sur., 2020; Hage i sur., 2017). Stoga su najnovija istraživanja na području probiotičkog koncepta usmjerena na razvoj probiotika nove generacije, koje Američka agencija za hranu i lijekove (*engl.* Food and Drug Administration, FDA) definira kao „žive bioterapijske pripravke“ (*engl.* Live Biotherapeutic Products, LBPs) namijenjene za terapijsko liječenje i prevenciju bolesti (Maxmen, 2017). Pritom su prepoznate tri različite razvojne strategije od kojih jedna uključuje i identifikaciju, karakterizaciju te selekciju BMK i bifidobakterija iz novih izvora (Sornplang i Piyadeatsoontorn, 2016), pri čijem se odabiru koristi moderan pristup baziran na „omičkim“ tehnologijama te *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima probiotičkog potencijala i potencijalnih funkcionalnih svojstava tih bakterija u promicanju zdravlja ljudi (Douillard i de Vos, 2019).

Jedan od potencijalnih izvora novih probiotičkih sojeva je majčino mlijeko, kompleksna biološka tekućina koja ispunjava sve nutritivne zahtjeve djeteta tijekom prvih 6 mjeseci života te poboljšava kognitivni razvoj djeteta, smanjuje rizik razvoja alergije, astme, dijabetesa, pretilosti, sindroma iritabilnog crijeva, kardiovaskularnih bolesti i Chronove bolesti (Azad, 2019; Le Doare i sur., 2018). Korisni učinak majčinog mlijeka na zdravlje djeteta je rezultat sinergističkog djelovanja u njemu prisutnih bjelančevina, ugljikohidrata, minerala, masnoća, vitamina, citokina, imunoglobulina, antimikrobnih spojeva i bakterija (Zimmermann i Curtis, 2016). Prvotno se smatralo da su bakterije prisutne u majčinom mlijeku posljedica kožne ili fekalne kontaminacije što je opovrgnula njihova izolacija iz uzoraka prikupljenih u aseptičkim uvjetima te genotipska analiza koja je pokazala da se bakterije prisutne u majčinom mlijeku genotipski razlikuju od onih prisutnih na koži (Ruiz i sur., 2019). Istraživanja su potvrdila da majčino mlijeko sadrži jedinstven mikrobiom raznolikiji od crijevnog mikrobioma (Biagi i sur., 2017), te da bakterije prisutne u majčinom mlijeku, uz one stečene tijekom trudnoće i pri porodu, sudjeluju u primarnoj kolonizaciji crijeva dojenčadi (Maldonado i sur., 2019; Pannaraj i sur., 2017).

Tijekom perioda laktacije, dolazi do promjene nutritivnog, imunološkog i mikrobiološkog sastava majčinog mlijeka, što posljedično utječe i na sastav crijevnog mikrobioma dojenčadi. Stoga su istraživanja provedena u ovom doktorskom radu bila usmjerena na *in silico* analizu sastava mikrobioma majčinog mlijeka tijekom različitih perioda laktacije i njegovog utjecaja na sastav mikroboma fecesa dojenčadi, upotrebom sekvenciranja 16S rRNA gena Illumina MiSeq platformom te QIIME 2 platforme za analizu mikrobioma. Istovremeno, iz prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka izolirano je 100 bakterijskih sojeva, koji su fenotipski i genotipski identificirani u svrhu odabira BMK, producenata potencijalnih terapijskih biomolekula, kao probiotika nove generacije. Iako postoji mnogo dokaza o korisnom učinku probiotika na zdravlje domaćina, molekularni mehanizmi njihovog djelovanja nisu dovoljno razjašnjeni, ali se zna da su multifaktorijalni i da uključuju različite bioaktivne proizvode mikrobnog metabolizma poput površinskih molekula i metabolita. Razvoj molekularno-genetičkih alata i dostupnost genomskih sekvenci tisuća mikroorganizama pohranjenih u bazama podataka, omogućili su identifikaciju skupina gena čiji produkti doprinose probiotičkom efektu, ali i brzu detekciju i eliminaciju potencijalno opasnih sojeva nositelja gena za rezistenciju na antibiotike ili virulenciju (Papadimitriou i sur., 2015).

Jedne od najistraživanijih površinskih molekula koje značajno doprinose probiotičkom učinku su S-proteini, koji u obliku sloja prekrivaju staničnu stijenku bakterija u svim fazama rasta. Protektivni omotač S-proteina, tzv. S-sloj, pruža domaćinu selekcijsku prednost u visokokompetitivnim staništima kakav je GIT čovjeka, jer štiti stanicu od osmotskog i mehaničkog stresa, promjena pH, bakteriolitičkih enzima i antimikrobnih peptida, zračenja i bakteriofaga. Proizvodnja S-proteina je rijetko svojstvo probiotičkih sojeva, ali je od iznimne važnosti za iskazivanje njihovih probiotičkih svojstava. Naime, kao najizloženiji sloj mikroorganizama u odsutnosti kapsule i glikokaliksa, S-proteini su u izravnom kontaktu s bakterijskim okolišem i utječu na mnoga površinska svojstva, uključujući površinsko prepoznavanje, autoagregaciju i koagregaciju, adheziju na mucin, epitelne stanice, proteine ekstracelularnog matriksa (*engl.* Extracellular matrix proteins, ECMs), itd. U novije vrijeme, istraživanja S-proteina se fokusiraju na atraktivnu nanobiotehnološku primjenu tih proteina kao atenuiranih patogena, nosača antigena, umjetnih omotača virusa u genskoj terapiji te nosača u antitumorskoj i antialergijskoj imunoterapiji (Rodrigues-Oliveira i sur., 2019).

Osim površinskih molekula, važne probiotičke djelatne molekule su i različiti metaboliti koje bakterije luče u izvanstanični prostor, poput bakteriocina. Bakteriocini su ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi male molekulske mase koji imaju bakteriostatsko ili bakteriocidno djelovanje prema srodnim ili ne-srodnim bakterijama, pri čemu sam mikroorganizam producent nije osjetljiv na proizvedeni bakteriocin, što mu osigurava preživljavanje u visokokompetitivnom polimikrobnom okruženju (Simons i sur., 2020). Zahvaljujući prirodnom porijeklu, toplinskoj stabilnosti i inhibicijskoj aktivnosti prema patogenim bakterijama, već dugo se koriste kao biokonzervansi u prehrambenoj industriji (Ghrairi i sur., 2012), a u posljednje vrijeme se razmatra i njihova potencijalna bioterapijska primjena kao moguće alternative antibioticima u liječenju bolesti uzrokovanim bakterijama rezistentnim na antibiotike i drugih infektivnih bolesti te u liječenju malignih tumora (Wu i sur., 2019).

Stoga je u ovom radu, uz izolaciju potencijalnih probiotika nove generacije izoliranih iz majčinog mlijeka, provedena i detaljna karakterizacija prethodno identificiranih i okarakteriziranih probiotičkih producenata potencijalnih terapijskih biomolekula, sojeva *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus plantarum* SF9C, izoliranih iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa (Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018). DGGE analizom i

analizom mikrobioma pomoću QIIME 2 platforme, ispitan je *in vivo* utjecaj primjene združene kulture sojeva SF9B i SF9C na sastav crijevnog mikrobioma 18 eksperimentalnih životinja. Provedeno je i sekvenciranje cijelih genoma sojeva SF9B i SF9C te njihova anotacija korištenjem RAST servera, genomička i proteomička karakterizacija potencijalnih terapijskih biomolekula koje proizvode, kao i ispitivanje uloge S-proteina i bakteriocina u probiotičkom kapacitetu navedenih sojeva.

Detaljna identifikacija i karakterizacija potencijalnih terapijskih biomolekula i njihovih producenata te određivanje njihove složene funkcije u *in vitro* i in *vivo* uvjetima, omogućit će selekciju probiotičkih sojeva za moguću bioterapijsku primjenu i otkrivanje dosad nepoznatih probiotičkih funkcija.

2. TEORIJSKI DIO

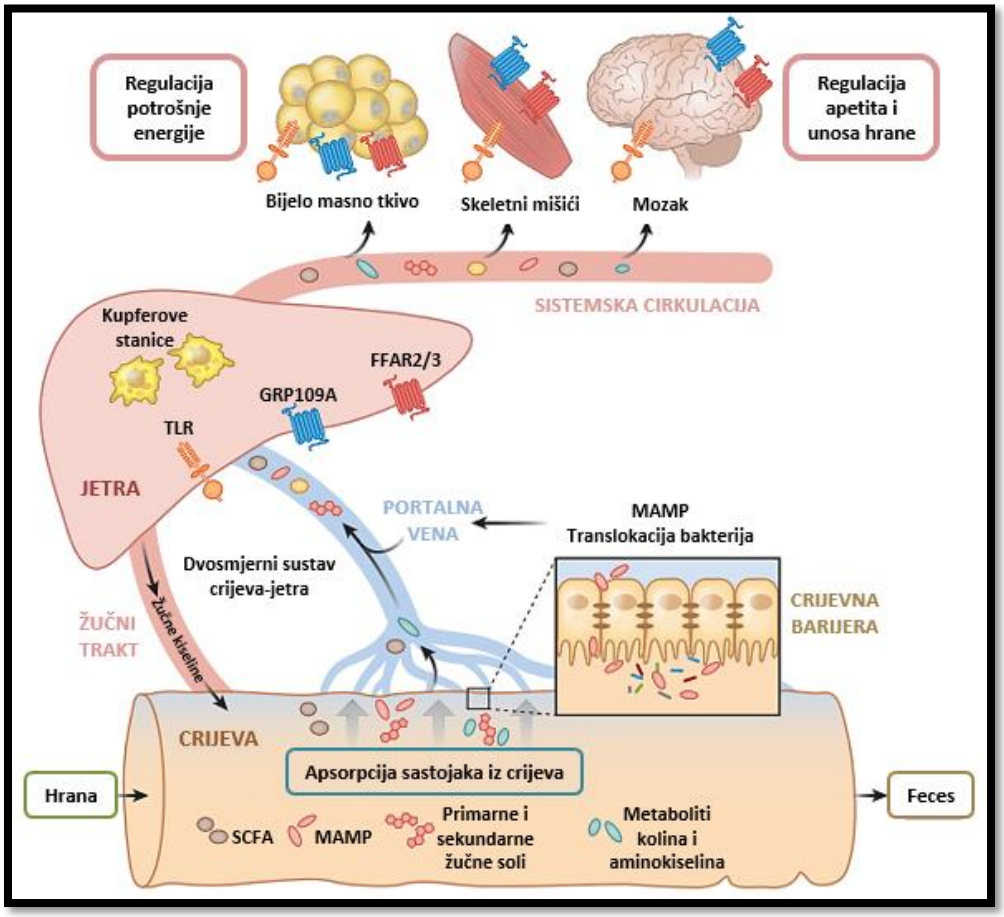
2.1. Crijevni mikrobiom kao novi organ ljudskog tijela

Ljudsko tijelo nastanjuju brojne bakterije, arheje, protisti, kvasci, praživotinje i virusi, organizirani u složene mikrobne zajednice, tj. mikrobiotu gastrointestinalnog (GI), urinarnog, reproduktivnog i respiratornog trakta, kože i usne šupljine. (Dekaboruah i sur., 2020; Sender i sur., 2016). Svi komensalni, simbiotski i patogeni mikroorganizmi, zajedno sa svojim genetičkim materijalom (mikrobiomom) i okolnim uvjetima staništa mikrobiote, čine kompleksan mikrobni ekosustav čovjeka (Dekaboruah i sur., 2020). Humani mikrobiom sadrži oko 232 milijuna gena (Tierney i sur., 2019) te je stoga genetički puno raznolikiji i ima mnogo veći potencijal proizvodnje proteina i metabolita od genoma čovjeka, koji sa svega oko 20 000 gena predstavlja samo malu frakciju ukupnog genetičkog resursa ljudskog organizma (Manzoni i sur., 2018; Morris, 2018). Fiziologija svakog makroorganizma, uključujući i čovjeka, rezultat je ekspresije i uzajamnog djelovanja njegovog genoma i mikrobioma (Morris, 2018). Mikrobiom je specifičan za svakog pojedinca, djelomično nasljedan i koevoluira sa svojim domaćinom. Evolucijske promjene u bilo kojoj sastavnici kolektivnog genomskog sadržaja živog bića (hologenoma), utječu na funkciju holobionta, odnosno domaćina i svih njegovih mikroorganizama, od kojih se većina nalazi u crijevima (Anwar i sur., 2019; Morris, 2018).

Crijevni mikrobiom je složen, dinamičan i nestabilan ekosustav koji obitava u simbiozi s domaćinom, a oblikuju ga okolišni i nasljedni faktori koji uključuju genetiku domaćina, način porođaja (vaginalni ili carski rez), prehranu, dob, spol, stil života, socijalne interakcije, bolesti, izloženost patogenim i parazitskim organizmima te ksenobioticima, ali i interakcije s domaćinom (Mabwi i sur., 2021; Šušković i Kos, 2020; Clarke i sur., 2019). Složene biokemijske interakcije s crijevnim mikrobiomom izravno ili neizravno utječu na zdravstveno stanje domaćina, zbog čega se sve više usvaja hipoteza o crijevnom mikrobiomu kao jedinstvenom endokrinom organu s potencijalom proizvodnje i izlučivanja stotinjak različitih hormona i drugih metabolita koji se apsorbiraju u krv i utječu na ostale organe (Busnelli i sur., 2020). Razotkrivanje terapijskog potencijala mikrobioma ljudskih crijeva otežava njegova složenost, koja uključuje više od 1000 vrsta, uglavnom nekultivabilnih mikroorganizama (Rajilić-Stojanović i de Vos, 2014).

2.2. Crijeva-jetra-mozak: sistemski učinak na organizam

Razvoj novih molekularnih tehnologija poput metatranskriptomike, metagenomike i metabolomike, pomogao je u razumijevanju mikrobioma i njegove uloge u zdravlju i bolesti. Crijevna mikrobiota, osim što sudjeluje u metabolizmu ksenobiotika (lijekova, toksina, fitokemikalija, itd.) i neprobavljivih sastojaka hrane, proizvodnji antioksidansa i vitamina, regulaciji neurotransmitera i hormona, održavanju integriteta crijevne barijere i zaštiti od patogena, ima sistemski učinak na domaćina putem sustava crijeva-jetra-mozak (slika 1).



Slika 1. Dvosmjerni komunikacijski sustav crijeva-jetra-mozak (prilagođeno prema Ringseis i sur., 2020)

Sustav crijeva-jetra je dvosmjerni komunikacijski sustav kojim crijevna mikrobiota utječe na energetski metabolizam domaćina, a domaćin kontrolira i oblikuje crijevnu mikrobiotu i štiti crijevnu barijeru. Pojam sustava crijeva-jetra ukazuje da ti organi imaju zajedničko razvojno podrijetlo od ventralnog endoderma prednjeg crijeva i da međusobno komuniciraju putem žučnog trakta, portalne vene i sistemske cirkulacije. Zbog vaskularne veze crijeva i jetre putem portalne

vene, jetra prima približno dvije trećine svoje krvi iz crijeva i prvi je primatelj nutrijenata i drugih sastojaka transportiranih kroz crijevnu barijeru te djeluje kao ključni metabolički organ i središte za distribuciju nutrijenata u druga tkiva (Brandl i sur., 2017). Jetra ima i sekretornu funkciju, tj. sintetizira primarne žučne kiseline koje se u hepatocitima konjugiraju s glicinom i taurinom te se s ostalim komponentama žuči izlučuju u tanko crijevo (Rutsch i sur., 2020), gdje olakšavaju probavu hranjivih sastojaka topivih u mastima i moduliraju sastav crijevne mikrobiote izravno (inhibicijom rasta određenih bakterijskih skupina), ili neizravno, stimulacijom proizvodnje antimikrobnih spojeva (Zhou i sur., 2020). Enterohepatičkom cirkulacijom se većina (>95 %) žučnih kiselina resorbira iz ileuma i transportira portalnom venom natrag u jetru pomoću transportera žučnih kiselina, odakle se ponovno izlučuje u žučni trakt, dok manji dio postaje dostupan u sistemskoj cirkulaciji (Brønden i sur., 2018). Konjugate glicina i taurina koji izbjegnu enterohepatičku cirkulaciju metabolizira crijevna mikrobiota pri čemu nastaju sekundarne žučne kiseline (Ringseis i sur., 2020). Sekundarne žučne kiseline nastale metaboličkom aktivnošću crijevne mikrobiote se talože i izlučuju fecesom što zahtijeva sintezu novih žučnih kiselina u jetri iz kolesterola što se ujedno smatra jednim od potencijalnih hipokolesterolemičkih učinaka crijevne mikrobiote (Kos, 2001). Žučne kiseline imaju važan regulatorni učinak na metaboličke i signalne puteve na intestinalnoj i na sistemskoj razini jer djeluju kao signalne molekule koje se vežu za različite jezgrine hormonske receptore, uključujući FXR, receptor za pregnan X i vitamin D te TGR5 u svim ključnim tkivima energetskog metabolizma (jetri, koštanim mišićima i bijelom masnom tkivu) i regulacije unosa hrane (mozgu). Jetra, zajedno s crijevima, čini i važan izvor imunoglobulina A (IgA) koji sudjeluju u uklanjanju crijevnih antigena, zaštiti organizma od patogena i održavanju integriteta crijevne barijere (Ringseis i sur., 2020). Crijevnu barijeru čine stanice crijevnog epitela čvrsto povezane sa susjednim stanicama proteinima čvrstog spoja (*engl.* tight junction proteins), a dodatno je jačaju mucini, IgA, antimikrobni peptidi poput lektina, defensina i katelicidina te crijevna mikrobiota (Zong i sur., 2020). Crijevna barijera služi kao funkcionalna i fizička barijera čiji integritet narušavaju prevalencija patogena (disbioza crijevne mikrobiote) i oštećenja crijevne sluznice, što dovodi do sindroma propusnog crijeva, odnosno translokacije mikroorganizama i njihovih produkata (metabolita i komponenti stanične stijenke) u sistemsku cirkulaciju i udaljena tkiva (Chakaroun i sur., 2020). Uslijed oštećenja crijevne barijere, jetra se suočava s mikroorganizmima i molekularnim uzorcima povezanim s mikrobima (*engl.* Microbial Associated Molecular Patterns, MAMPs), poput bakterijske DNA i komponenti

stanične stijenke, pri čemu imunološke stanice jetre (Kupfferove, jetrene zvjezdaste, prirodnoubilačke (*engl.* Natural Killer, NK) i NK-T) štite ostala tkiva od štetnih učinaka ovih infektivnih stimulansa (Ringseis i sur., 2020; Balmer i sur., 2014). Crijevna mikrobiota koristi nutrijente i molekule domaćina (npr. žučne kiseline i endogene proteine) za proizvodnju mikrobnih metabolita (kratkolančanih masnih kiselina (*engl.* Short-Chain Fatty Acids, SCFAs), MAMP-a, metilamina, sumporovodika te fenolnih i indolnih spojeva), koji djeluju kao komunikacijski signali koji se vežu za receptore domaćina (Toll-like receptore (TLR) te receptore hidrokarboksilne kiseline (GPR109A), SCFA, slobodnih masnih (FFAR2, FFAR3) i žučnih kiselina), čime se stimuliraju signalni i metabolički putevi u svim ključnim tkivima energetskog metabolizma (jetre, skeletnih mišića i bijelog masnog tkiva) i regulacije unosa hrane (mozga).

Komunikacija između centralnog živčanog sustava, crijeva i crijevne mikrobiote se odvija putem sustava crijeva-mozak; kompleksne dvosmjerne komunikacijske mreže koja uključuje autonomni i enterički živčani sustav, endokrini i imunosni sustav, sustav hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, imunosni sustav te mikrobiotu i njene metabolite (Burberry i sur., 2020). Mnoštvo neurotransmitera i mikrobnih metabolita poput sekundarnih žučnih soli, aminokiselina, esencijalnih vitamina i SCFA, modulira puteve imunosnog sustava što utječe na ponašanje, kretanje i pamćenje (Rutsch i sur., 2020). Povećana translokacija MAMP-a, uslijed poremećaja crijevne barijere, dovodi do upale jetre i hipotalamusa što uzrokuje poremećaj u regulaciji apetita i sitosti u mozgu te u ključnim metaboličkim putevima u perifernim tkivima. Kvantitativno najvažniji proizvodi bakterijske fermentacije neprobavljivih ugljikohidrata u crijevima su SCFA, od kojih prevladavaju acetat, propionat i butirat, dok valerat, izovalerat, formijat i kaproat čine manje od 5 % (Ringseis i sur., 2020). Apsorbiraju se velikom brzinom i dio metaboliziraju epitelne stanice crijeva, dok se ostatak prenosi u jetru pomoću portalne vene, gdje se koriste kao supstrati za glukoneogenezu (propionat) i lipogenezu (acetat, butirat). Uz to, SCFA djeluju i kao važne signalne molekule u komunikaciji mikrobiote i tkiva domaćina jer se vežu za receptore domaćina i reguliraju apetit, unos hrane i potrošnju energije. Butirat i propionat potiču izlučivanje peptida YY i glukagonu sličnog peptida-1 (*engl.* glucagon-like peptide 1, GLP-1), koji potiču sitost u mozgu suzbijajući oreksigene neurone. Acetat ubrizgan u debelo crijevo miševa prolazi krvno-moždanu barijeru i ulazi u mozak, a intraperitonealno ubrizgani acetat mijenja hipotalamičku ekspresiju oreksigenih/anoreksigenih neuropeptida i tako suzbija apetit (Frost i sur., 2014). Izravna regulacija apetita pomoću SCFA dokazana je i kod ljudi (Jiang i sur., 2013).

2.3. Razvoj probiotičkog koncepta

Složeni mutualistički odnos domaćina i njegovog crijevnog mikrobioma je osnova održavanja crijevne homeostaze zdravog pojedinca. Svaka kvantitativna i kvalitativna promjena raznolikosti crijevne mikrobiote može rezultirati disbiozom, koju karakterizira prevalencija nepoželjnih i patogenih vrsta bakterija (Rosenfeld, 2017). Disbioza crijevne mikrobiote se povezuje s povećanom incidencijom kroničnih, tumorskih, autoimunih, endokrinih, metaboličkih, kardiovaskularnih, GI i neuroloških bolesti (Anwar i sur., 2019; Rosenfeld, 2017). Saznanja o štetnosti disbioze, dovela su do ekspanzije u istraživanju probiotika, koji su prepoznati kao učinkoviti modulatori ravnoteže crijevnog mikrobioma (Šušković i Kos, 2020; Gómez-Gallego i sur., 2016). Probiotičke bakterije su zastupljene u ljudskoj prehrani više od 10 000 godina kroz proizvode nastale spontanom fermentacijom mlijeka te voća, povrća i njihovih sokova. Premda je još Louis Pasteur dokazao da su za fermentaciju odgovorni mikrobi, pionirskim radom na probioticima smatraju se istraživanja učinka fermentiranih proizvoda na zdravlje, koje je proveo Élie Metchnikoff početkom 20. stoljeća (Ozen i Dinleyici, 2015). Povezao je dugovječnost bugarskih seljaka s konzumacijom kiselog mlijeka koje sadrži *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i zaključio da hrana utječe na sastav mikrobiote i da može zamijeniti štetne korisnim mikrobima, čime je postavio temelj probiotičkog koncepta (Burki, 2018; Šušković, 1996). Prvi probiotički proizvod na tržištu bio je Yakult, piće koje je 1935. komercijalizirao Minoru Shirota (Khan i Malik, 2019). Od tada su istraživanja na probioticima uglavnom bila zanemarena sve do 1995., kada je prvi put sekvenciran cijeli genom bakterije *Haemophilus influenza* (Khan i Malik, 2019). Revolucija u sekvenciranju DNA, pružila je bolje razumijevanje uloge mikrobioma u zdravlju, što je potaknulo intenzivnu komercijalizaciju probiotičkih sojeva i izazvalo potrebu za jasnim smjernicama za njihovu identifikaciju, procjenu sigurnosti i regulaciju. Stoga su 2001., dvije agencije Ujedinjenih naroda; Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* World Health Organization, WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu (*engl.* Food and Agriculture Organization, FAO), organizirale susret na kojem su probiotici definirani kao „živi mikroorganizmi koji primijenjeni u adekvatnoj količini imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina“ (Hill i sur., 2014; FAO/WHO, 2001). Dogovoreno je da se izraz probiotik koristi samo za mikrobne vrste i definirane mikrobne konzorcije ljudskog podrijetla dokazanih zdravstvenih učinaka i sigurnosti. Također je usuglašeno da se nedefinirane mikrobne zajednice te živi mikroorganizmi bez poznatih zdravstvenih koristi, ne smiju deklarirati kao probiotici.

2.4. Identifikacija i kriteriji odabira probiotičkih sojeva

Probiotici se primjenjuju kao žive kulture ili spore, izravno ili putem fermentiranih mliječnih proizvoda, hrane i pića (Šušković, 1996; Khan i Malik, 2019). Brojna istraživanja potvrđuju njihovu ulogu u održavanju zdravog mikrobioma, u imunomodulatornom, antimikrobnom, endokrinološkom, antialergijskom, protuupalnom i neurološkom djelovanju te u prevenciji i liječenju GI i kardiovaskularnih bolesti, pretilosti pa čak i tumora (Song i sur., 2018). Probioticima se uspješno suzbijaju simptomi poput proljeva, zatvora, vaginitisa, nekrotizirajućeg enterokolitisa, upalnih bolesti crijeva i infekcije izazvane s *Clostridium difficile* (Khan i Malik, 2019; Šušković, 1996).

Probiotici imaju dugu povijest sigurne upotrebe. Dva najčešće korištena bakterijska roda, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium,* pripadaju koljenu *Firmicutes,* odnosno *Actinobacteria*. Rod *Bifidobacterium* čine Gram-pozitivne, obligatno-anaerobne, nepokretne, nesporogene, polimorfne bakterije raspoređene u 70 vrsta i 10 podvrsta male filogenetske i genomske raznolikosti (Khan i Malik, 2019). *Lactobacillus* je najveći rod u skupini BMK, a čine ga Gram-pozitivne, štapićaste, nesporogene i katalaza-negativne bakterije koje se najčešće koriste kao starter kulture i probiotici (Šušković i Kos, 2020; Šušković, 1996). Tradicionalno se dijele u 3 skupine; obligatno-homofermentativne (*Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii, Lb. helveticus, Lb. salivarius*), obligatno-heterofermentativne (*Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. fermentum, Lb. reuteri*) i fakultativno-heterofermentativne (*Lb. casei, Lb. curvatus, Lb. plantarum, Lb. sakei*) (De Angelis i Gobbetti, 2011; Šušković, 1996). Razvoj sofisticiranih pristupa poput sekvenciranja cijelog genoma, prosječnog nukleotidnog identiteta i analize multilokusnih sekvenci te ogroman broj javno-dostupnih genomskih sekvenci BMK i bifidobakterija, pružio je uvid u njihovu filogenetičku raznolikost i doveo do boljeg razumijevanja taksonomije usko povezanih probiotičkih sojeva (Huang i sur., 2018). Utvrđeno je da sojevi poput *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius* i *Lb. sakei* imaju visoku raznolikost unutar vrste (Harris i sur., 2017; Ceapa i sur., 2016) te da su njihova funkcionalna svojstva u velikoj mjeri ovisna o soju, dok je raznolikost *B. animalis* subsp. *lactis* niska, što ukazuje da sojevi te vrste imaju nedavnog zajedničkog pretka i često pokazuju usporediva fenotipska svojstva (Milani i sur., 2013). Dubinskom analizom genoma stotina sojeva, zaključeno je da je rod *Lactobacillus* izrazito heterogen i da sadrži čak 261 vrstu, zbog čega više nalikuje porodici nego rodu (Zheng i sur., 2020). Stoga je uslijedilo revidiranje taksonomije roda *Lactobacillus* i predložena je nova nomenklatura po kojoj se dijeli na čak 25 rodova: *Holzapfelia,*

Paralactobacillus, Fructilactobacillus, Ligilactobacillus, Levilactobacillus, Amylolactobacillus, Bombilactobacillus, Latilactobacillus, Acetilactobacillus, Lentilactobacillus, Paucilactobacillus, Secundilactobacillus, Lactobacillus, Agrilactobacillus, Loigolactobacilus, Lacticaseibacillus, Lapidilactobacillus, Furfurilactobacillus, Liquorilactobacillus, Dellaglioa, Limosilactobacillus, Apilactobacillus, Schleiferilactobacillus, Lactiplantibacillus i *Companilactobacillus*.

Brojni mikroorganizmi prisutni u crijevima se još uvijek ne mogu kultivirati, a mnogi potencijalni probiotici su nedovoljno opisani i zahtijevaju ispravnu identifikaciju i rigoroznu evaluaciju kroz probiotičke kriterije. Prije nego se uporaba novoizoliranog probiotičkog soja kod ljudi odobri, on mora biti temeljito okarakteriziran, pri čemu je najvažnija ispravna taksonomska identifikacija organizma do nivoa soja (Khan i Malik, 2019; Šušković, 1996). Probiotička su svojstva često specifična te se pretpostavljeni zdravstveni učinci ne smiju generalizirati i pripisati drugom soju čak i ako pripada istoj bakterijskoj vrsti (Campana i sur., 2017). Stoga se preporučuje identifikacija svih potencijalnih probiotičkih sojeva pomoću Međunarodnog kodeksa nomenklature (*engl.* International Code of Nomenclature, ICN) i njihova pohrana u međunarodno priznatu zbirku mikrobioloških kultura (Morelli i Capurso, 2012). Regulatorna tijela za identifikaciju probiotičkih sojeva preporučuju kombiniranje fenotipskih i genotipskih tehnika te uporabu suvremenih tehnika poput sekvenciranja 16S i 23S rRNA gena, elektroforeze u pulsnom polju (*engl.* Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE), polimerazne lančane reakcije nasumično umnožene polimorfne DNA (*engl.* Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction, RAPD-PCR), polimorfizma dužine umnoženih fragmenata (*engl.* Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP), restrikcijske analize umnožene ribosomske DNA (*engl.* Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA), DNA-DNA hibridizacije, ribotipiziranja te sekvenciranja cijelog genoma (Castro-González i sur., 2019).

Osnovni preduvjet iskazivanja pozitivnog učinka probiotičkog soja na zdravlje domaćina je kolonizacija u crijevima, koja mu omogućuje antagonističko djelovanje prema patogenim mikroorganizmima i stimulaciju imunosnog sustava (Toscano i sur., 2017). Kako bi soj mogao doći do mjesta djelovanja u dovoljnom broju, mora preživjeti stresne uvjete ljudskog organizma. Stoga oralno primijenjeni probiotik mora biti otporan ili tolerantan na enzime prisutne u usnoj šupljini; posebno lizozim, na koji je većina Gram-pozitivnih bakterija osjetljiva, no neke bakterije roda *Lactobacillus* su dovoljno otporne da čine dio oralnog mikrobioma čovjeka (Kõll i sur., 2008). Tijekom daljnjeg prolaska kroz GIT, bakterije su izložene žučnim sokovima i pepsinu u

želucu te žučnim sokovima koje izlučuje jetra. Tolerancija na nizak pH i visoke koncentracije žučnih soli, preduvjeti su kolonizacije i metaboličke aktivnosti bakterija u crijevima, zbog čega se preporučuje da probiotički sojevi budu tolerantni na raspon pH od 2-5 i koncentracije žučnih soli od 0,3-2 % (Ogunremi i sur., 2015; Šušković, 1996). Mnoge probiotičke bakterije aktivnošću enzima hidrolaze žučnih soli, koji katalizira dekonjugaciju žučnih soli, mogu regulirati koncentraciju kolesterola (Kos, 2001). Svojstvo agregacije, adhezije i formiranja biofilmova, uvjetovano je biokemijskim sastavom površine bakterijske stanice, pri čemu je prisutnost polisaharida povezana s hidrofilnom, a prisutnost površinskih proteina s hidrofobnom naravi bakterijske stanice (Firoozmand i Rousseau, 2016). Svojstvo autoagregacije, koje pomaže bakterijama da postignu visoku gustoću stanica i omogućuje bolju adheziju na površine crijeva, u direktnoj je korelaciji sa svojstvom koagregacije, koje omogućuje probioticima da manipuliraju mikrookolišem patogena i spriječe njihovog rast izlučivanjem antimikrobnih spojeva na maloj udaljenosti (Khan i Malik, 2019; Kos, 2001). Sljedeći preduvjet kolonizacije probiotika je adhezija, koja ovisi o površinskim svojstvima epitelnih stanica domaćina i biokemijskom sastavu površine stanice probiotičkog soja. Brojna ispitivanja potvrdila su *in vitro* adheziju probiotičkih bakterija na površine presvučene mucinom i proteinima ECM te na stanične linije GIT-a (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016). Važnost adhezije istaknuta je u opsežnoj studiji u kojoj je kod 163 soja iz porodice *Lactobacillaceace* ispitana prisutnost 14 gena potencijalno uključenih u adheziju, te je primijećeno da su neki od njih (*ef-Tu*, *jaz*, *groEl* i *srtA*) „housekeeping geni“, prisutni u svim sojevima, dok je većina drugih gena uključenih u adheziju (*apf*, *cnb*, *fpbA*, *mapA*, *mub1* i *mub2*) bila prisutna kod više od 86 % sojeva (Turpin i sur., 2012). Važno je ispitati zdravstvenu dobrobit potencijalnog probiotika te osigurati da nema svojstva koja mogu naštetiti domaćinu, poput infektivnosti i patogenosti. Iako su probiotici općenito prepoznati kao sigurni ((*engl.* Generally Recognized as Safe, GRAS) prema FDA i Qualified Presumption of Safety, QPS prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (*engl.* European Food Safety Authority, EFSA)), procjena njihove sigurnosti je iznimno važna zbog nagle ekspanzije tržišta probiotika i sve većeg broja mikroorganizama koji se koriste u tu svrhu, a srodni su patogenim vrstama, poput članova roda *Clostridium* (Saarela, 2019). Moguća je i infekcija i proizvodnja toksina od strane soja kontaminanta ili pogrešno identificiranog probiotičkog soja (Khan i Malik, 2019), a uporaba probiotika može dovesti i do poremećaja metabolizma i sistemske infekcije (Doron i Snydman, 2015). Stoga regulatorna tijela donose nove propise za procjenu sigurnosti probiotika koji

zahtijevaju dokaze o povijesti izolacije, identifikaciji i odsutnosti štetnih svojstava poput infektivnosti, virulencije, toksičnosti i prisutnosti potencijalno prenosivih gena za rezistenciju na antibiotike (Pradhan i sur., 2019). Stoga bi prije komercijalizacije trebalo provesti sekvenciranje cijelog genoma probiotičkog soja, kako bi se ispitala prisutnost nepoželjnih gena za rezistenciju i virulenciju, te gena za enzime koji sudjeluju u patogenezi, poput kolagenaze, hijaluronidaze i neuraminidaze (Khan i Malik, 2019).

Da bi se postigle odgovarajuće zdravstvene dobrobiti, probiotički soj mora biti prisutan u dovoljnom broju u konačnom proizvodu (Šušković, 1996). Stoga mora biti pogodan za industrijsku proizvodnju, tj. imati svojstvo brzog rasta tijekom fermentacije u industrijskom postrojenju i preživljavanja u proizvodu tijekom skladištenja. Kako bi se odredila ispravna doza i drugi parametri, sojeve bi trebalo testirati i na ljudima, što odabir probiotika čini višestupanjskim sustavnim pristupom (de Melo Pereira i sur., 2018). Osim svojstva preživljavanja nepovoljnih uvjeta, probiotički kandidati moraju imati dokazane zdravstvene prednosti, a jedna od najvažnijih je antimikrobna aktivnost prema patogenim bakterijama, koja može biti posljedica proizvodnje antimikrobnih spojeva poput bakteriocina, enzima, vodikovog peroksida i organskih kiselina (Guimarães i sur., 2018; Kos i sur., 2011; Šušković i sur., 2010) ili kompetitivne ekskluzije, tj. antagonizma kroz nadmetanje za hranjive sastojke i prostor za vezanje (Šušković i Kos, 2020; Lebeer i sur., 2018). Primarne zdravstvene prednosti probiotika su modulacija aktivnosti i sastava mikrobiote domaćina, jačanje funkcije crijevne barijere i modulacija imunosnog sustava, sistemskog metaboličkog odgovora i signalizacije središnjeg živčanog sustava (Lebeer i sur., 2018). Mehanizmi kojima probiotički mikroorganizmi djeluju na mikrobiotu i domaćina svrstani su u tri kategorije (Khan i Malik, 2019; Hill i sur., 2014). Prva je široko rasprostranjena i zajednička većini probiotičkih sojeva, a uključuje proizvodnju SCFA, otpornost na kolonizaciju, kompetitivnu ekskluziju patogena, normalizaciju ravnoteže crijevne mikrobiote, povećani promet enterocita i regulaciju crijevnog tranzita. Druga skupina mehanizama je rjeđa i zajednička na razini vrste, a uključuje proizvodnju vitamina, enzimsku aktivnost, neutralizaciju karcinogena, metabolizam žučnih soli i izravni antagonizam. Treća kategorija mehanizama je rijetka i specifična za određeni soj ili nekoliko njih, a uključuje neurološke, imunosne i endokrinološke učinke i proizvodnju specifičnih bioaktivnih spojeva (Hill i sur., 2014).

2.5. Probiotici nove generacije

Premda je definicija probiotika prikladna za hranu, dodatke prehrani i lijekove, šira javnost pod tim pojmom najčešće podrazumijeva hranu ili dodatak prehrani, a ne lijek. Iako se čini da su te granice nejasne, regulatorna razlika je vrlo jasna; dodaci prehrani su namijenjeni održavanju ili poboljšanju zdravstvenog stanja zdrave ili rizične populacije, a lijekovi za liječenje ili prevenciju bolesti i patofizioloških stanja bolesnih (Cordaillat-Simmons i sur., 2020). Navedeno pravilo je međunarodno prihvaćeno i ne ovisi o prirodi i sastavu proizvoda, zbog čega je pri plasiranju novog proizvoda na tržište ključno pitanje njegove namjene. U Europskoj uniji (EU), hranu i dodatke prehrani regulira EFSA, a lijekove Europska agencija za lijekove (*engl.* European Medicines Agency, EMA), dok u SAD-u o obje kategorije brine FDA.

U pokušaju izbjegavanja zabune između prirode proizvoda i njegovog regulatornog statusa, pojam farmabiotika se počeo pojavljivati u literaturi, podrazumijevajući proizvode koji sadrže žive mikroorganizme čiji je cilj sprječavanje ili liječenje bolesti (Cordaillat-Simmons i sur., 2020; Šušković i Kos, 2020). Takva terminologija nije imala pravnu osnovu i nije bila međunarodno priznata, uglavnom zato što farmabiotici mogu obuhvaćati i nešto drugo osim živih mikroorganizama. FDA je 2010. predložila razmatranje statusa lijeka za probiotičke proizvode, a 2012. je službeno uvela kategoriju LBP-a, tj. probiotika nove generacije, koje je definirala kao „biološke proizvode koji nisu cjepiva, a sadrže žive mikroorganizme poput bakterija, namijenjene prevenciji ili liječenju različitih stanja i bolesti ljudi“ (Rouanet i sur., 2020). Objavljivanjem monografije Europske farmakopeje, Europska uprava za kvalitetu lijekova i zdravstvenu skrb (*engl.* European Directorate for the Quality of Medicines and healthcare, EDQM) je 2019. službeno prihvatila LBP-e kao novu kategoriju medicinskih proizvoda za tržište EU i definirala ih kao „medicinske proizvode namijenjene za ljudsku upotrebu koji sadrže žive mikroorganizme”. Kao i svi proizvodi namijenjeni za sprečavanje ili liječenje bolesti, LBP-i će se morati registrirati kao medicinski proizvodi kako bi se plasirali na američko i europsko tržište, pri čemu će regulatorna tijela (FDA u Americi, EMA u EU) i farmaceutska industrija, rutinski pratiti smjernice Međunarodnog vijeća za usklađivanje tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku uporabu (*engl.* International Council for Harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use, ICH), koje nisu pravno-obvezujuće, ali su prepoznate od strane svih ovlaštenih institucija za lijekove u svijetu (Cordaillat-Simmons i sur., 2020). Smjernice ICH-a pomažu u ispunjavanju zahtjeva o kvaliteti, sigurnosti i djelotvornosti lijeka, koje se očekuju od

proizvođača kako bi se odobrilo stavljanje lijeka na tržište, koje se odbija ako je omjer koristi i rizika nepovoljan ili ako terapijska učinkovitost lijeka nije dovoljno potkrijepljena kliničkim studijama. U proizvodnji LBP-a, kao i ostalih lijekova, treba primjenjivati načela dobre proizvođačke prakse (*engl.* Good Manufacturing Practice, GMP), koja su inače usmjerena na uklanjanje mikroorganizama iz proizvoda, dok je kod LBP-a neophodno osigurati deklarirani broj živih mikroorganizama (*engl.* Colony forming units g^{-1}, CFU g^{-1}) u konačnom proizvodu do kraja roka trajanja, uz izbjegavanje onečišćenja neželjenim mikroorganizmima (Cordaillat-Simmons i sur., 2020). Kliničku učinkovitost LBP-a je teško dokazati jer na vijabilnost mikroorganizama, čak i kad su proizvedeni pod GMP uvjetima, utječu okolišni faktori (uvjeti skladištenja i transport) i čimbenici povezani s domaćinom (pH, stres, prehrana, zdravlje, lijekovi, etnička pripadnost i sastav mikrobioma). Prehrana ima glavnu ulogu u oblikovanju sastava i aktivnosti mikrobiote jer se sastojci prehrane (tirozin, histidin, triptofan, glutamat, vlakna, žučne kiseline) pretvaraju u biološki aktivne spojeve kao što su GABA (*engl.* gamma aminobutyric acid), SCFA, histamin, tiramin, serotonin, deoksiholna i litoholna kiselina), koji imaju ulogu u održavanju crijevnog epitela, percepciji boli, raspoloženja i ponašanja, u endokrinološkim, imunološkim, sistemskim i metaboličkim odgovorima pa čak i u onkogenezi (Cordaillat-Simmons i sur., 2020). Perry i sur. (2007) su dokazali da je broj genomskih kopija amilaze iz sline povezan s količinom škroba u prehrani, što ukazuje da prehrana može djelovati na metaboličku aktivnost mikrobiote i utjecati na učinak primjene LBP-a (Cordaillat-Simmons i sur., 2020).

Dostupnost „omičkih“ tehnologija te poznavanje opsežnog metaboličkog kapaciteta i relativno visoke plastičnosti mikrobiote, omogućuje da se pri razvoju LBP-a uzme u obzir njihova interakcija s mikrobiomom i prehranom. Premda su neki LBP-i napredovali do treće faze kliničkih studija, do lipnja 2021., niti jedan nije odobren za ljudsku uporabu od strane FDA. Također, unatoč brojnim dokazima o njihovom korisnom učinku na zdravlje i napretku u njihovoj karakterizaciji na molekularnoj razini, samo je ograničen broj odobrenih zdravstvenih tvrdnji povezan s probioticima, vjerojatno zbog načina na koji se zdravstvene dobrobiti bilježe u regulatornim procesima (Kleerebezem i sur., 2019). Unatoč tome, tržište probiotika u 2019. godini iznosilo je 48 milijardi dolara i očekuje se da će uz godišnju stopu rasta od približno 7 %, dosegnuti 94 milijarde dolara u 2027. godini (Market Research Report, 2020).

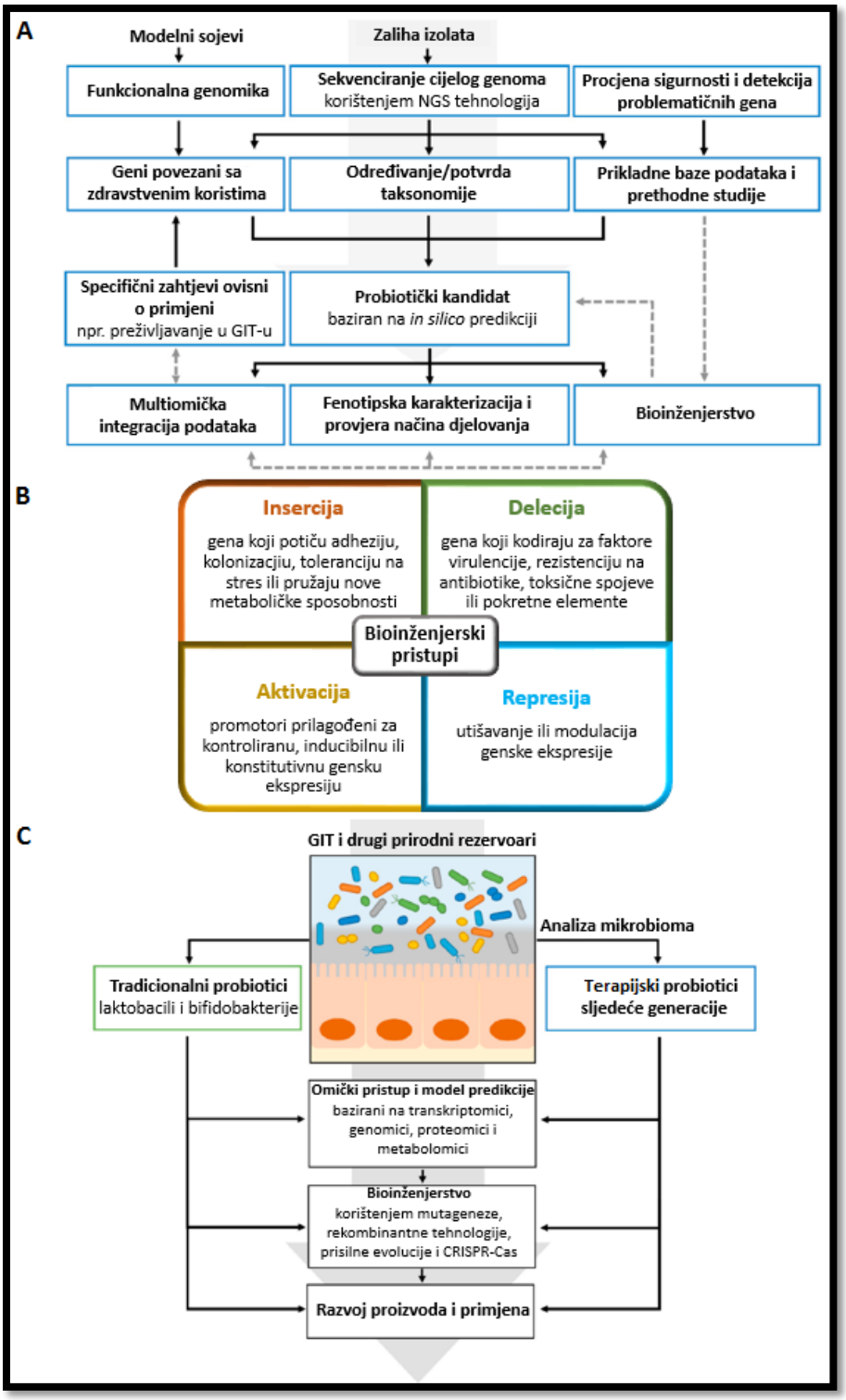
2.6. Selekcija probiotičkih sojeva nove generacije

Veliki interes istraživača na području probiotičkog koncepta doveo je do razvoja probiogenomike, nove grane funkcionalne genomike usmjerene isključivo na genetičku karakterizaciju probiotika (Sarsaiya i sur., 2019; Ventura i sur., 2012). Istraživanja su pokazala da probiotici dostupni na tržištu imaju ograničene funkcionalne učinke na domaćina te da je potrebna dodatna selekcija i formulacija probiotičkih sojeva (Žučko i sur., 2020; Hage i sur., 2017). Snažan rast tržišta potaknuo je potrebu za daljnjim razvojem terapijskih i funkcionalnih probiotičkih proizvoda te odabirom probiotičkih sojeva nove generacije, pri čemu su prepoznate tri različite razvojne strategije (Douillard i de Vos, 2019):

Prva strategija (slika 2A) uključuje izolaciju i karakterizaciju komensalnih terapijskih bakterija poput *Faecalibacterium prausnitzii* i *Akkermansia muciniphila*, koje ne pripadaju skupini laktobacila i bifidobakterija te posjeduju svojstva koja nisu prethodno uočena kod tradicionalnih probiotičkih sojeva (Martín i sur., 2018). Budući da su te bakterije prirodno prisutne u crijevima ljudi, njihova bi kolonizacija trebala trajati dulje od one tradicionalnih, nekomensalnih probiotičkih sojeva (Schmidt, 2013), ali navedena hipoteza još nije potvrđena, jer su metagenomička sekvenciranja transplantata fekalnog mikrobioma pokazala značajnu kompeticiju između sojeva istih komensalnih vrsta u crijevima ljudi (Li i sur., 2014).

Druga strategija (slika 2B) u razvoju probiotika nove generacije uključuje upotrebu alata bioinženjerstva u poboljšanju svojstava ranije etabliranih probiotičkih sojeva (Mays i Nair, 2018). Pri tome se najčešće koristi pristup u kojem se ne konstruiraju genetički modificirani organizmi (*engl*. Genetically Modified Organisms, GMOs), čija je upotreba strogo regulirana u EU, nego sojevi sa svojstvima oplemenjenim korištenjem klasičnih mutacija i prirodnih sustava za transfer gena koji se mogu koristiti bez posebnih ograničenja (Bron i sur., 2018).

Treća strategija (slika 2C) uključuje identifikaciju, karakterizaciju i selekciju probiotičkih sojeva BMK i bifidobakterija iz novih izvora (Sornplang i Piyadeatsoontorn, 2016), pri čijem se odabiru koristi moderan i sistematičan pristup baziran na genomici i drugim „omičkim“ tehnologijama te *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima probiotičkog potencijala i potencijalnih funkcionalnih svojstava tih bakterija u promicanju zdravlja ljudi (Douillard i de Vos, 2019).



Slika 2. Strategije izbora živih bioterapijskih pripravaka (*engl.* Live Biotherapeutic Products, LBPs) **A** Selekcija netradicionalnih komensalnih probiotičkih sojeva **B** Razvoj LBP-a korištenjem metoda bioinženjerstva **C** Selekcija tradicionalnih probiotičkih sojeva iz novih izvora korištenjem „omičkih“ tehnologija (prilagođeno prema Douillard i de Vos, 2019)

Probiotički su mikroorganizmi filogenetički puno raznolikiji nego se prije mislilo, te pojam probiotik više nije rezerviran za nekoliko konvencionalno korištenih vrsta već uključuje i probiotičke vrste nove generacije iz rodova *Akkermansia, Bifidobacterium, Faecalibacterium, Clostridium, Bacteroides* i *Streptococcus* (Šušković i Kos, 2020; Saarela, 2019), a neke studije tvrde da i pripadnici rodova *Pediococcus, Streptococcus, Propionibacterium* i *Saccharomyces* također pokazuju probiotička svojstva (Khan i Malik, 2019).

2.6.1. Selekcija komensalnih terapijskih bakterija nove generacije

Napretkom u razumijevanju ljudskog mikrobioma, poveznica između crijevnog mikrobioma i njegove uloge u ljudskom zdravlju postaje sve jasnija. Nakon što su brojna istraživanja potvrdila utjecaj crijevne mikrobiote na način na koji pojedinci reagiraju na određene terapije lijekovima, pobudio se interes farmaceutske industrije za crijevnim mikrobiomom, što je omogućilo financiranje njegova istraživanja. Većina uvida u ljudski mikrobiom temeljena je na analizi 16S rDNA, koja je otkrila da se naglašena prisutnost pojedinih bakterija može povezati s određenim zdravstvenim parametrima te da su neki rodovi, iako se ne nalaze u konvencionalnoj probiotičkoj hrani, povezani sa zdravim i otpornim crijevnim mikrobiomom (Douillard i de Vos, 2019; Khan i Malik, 2019). Navedena saznanja su otvorila put novim dijagnostičkim pristupima temeljenim na prisutnosti specifičnih bakterija kod bolesnika i omogućila lakši odabir potencijalnih komensalnih probiotika nove generacije. Nakon odabira soja, najčešće se provode studije sigurnosti na mišjim modelima, iako je poznato da se mikrobiota miša znatno razlikuje od mikrobiote čovjeka (Hugenholtz i de Vos, 2018). Na taj način je odabrano nekoliko anaerobnih bakterija povezanih sa zdravim crijevnim mikrobiomom, koje su pokazale jasne zdravstvene koristi u studijama na životinjama, a pripadaju glavnim koljenima prisutnim u crijevima ljudi, poput *Bacteroidetes, Verrucomicrobia* i *Firmicutes*. Istraživanje mehanizama djelovanja komensalnih terapijskih bakterija sljedeće generacije je pokazalo da određene vrste proizvode butirat, što nije karakteristika tradicionalnih probiotičkih sojeva, a može objasniti neke zdravstvene dobrobiti (Schroeder i Bäckhed, 2016).

Koljeno *Bacteroidetes* čine Gram-negativne bakterije visokozastupljene (20-40 %) u crijevnom traktu čovjeka (Million i sur., 2013). Najznačajniji rod tog koljena je *Bacteroides* unutar kojeg je opisano najmanje 25 različitih vrsta, uključujući neke potencijalno patogene (Rajilić-Stojanović i de Vos, 2014). Pokazalo se da neke vrste tog roda poput *B. thetaiotaomicron*

i *B. fragilis* mogu učinkovito metabolizirati složene polisaharide, proizvoditi SCFA te modulirati imunosni sustav domaćina (Khan i Malik, 2019). Interes za novim imunomodulatornim terapeutikom usmjeren je na *B. xylanisolvens,* obligatnog anaeroba koji metabolizira ksilan i druge šećere u acetat, propionat i sukcinat (Chassard i sur., 2008). *B. xylanisolvens*, uz još neke *Bacteroides* vrste, sadrži strukture koje su imunokemijski identične α-Gal epitopu ili Thomsen-Friedenreich (TFα) tumorski specifičnom antigenu ugljikohidrata. Na temelju hipoteze da neživi *B. xylanisolvens* i dalje sadrži tu strukturu i inducira željeni imunosni odgovor, provedena je detaljna procjena sigurnosti pasteriziranih stanica i zaključeno je da su toplinski obrađeni mliječni proizvodi fermentirani sa sojem *B. xylanisolvens* DSM 23964 sigurni za upotrebu kod ljudi pod određenim uvjetima, a ispitivanje na ljudima je potvrdilo da pasterizirani *B. xylanisolvens* DSM 23964 može inducirati imunoglobulin M serumska antitijela protiv TFα antigena (Ulsemer i sur., 2016). Buduće studije će razjasniti zdravstvene koristi i mogućnost primjene pasteriziranog *B. xylanisolvens*.

Koljeno *Firmicutes* čini jednu od najvećih skupina crijevnih bakterija po zastupljenosti i bogatstvu vrsta (Million i sur., 2013). U ovo koljeno se ubraja porodica *Lactobacillicaeae*, koja uključuje tradicionalne probiotičke sojeve čija je zastupljenost u crijevnom traktu vrlo skromna i iznosi najviše 1 %. Mnogo su češći anaerobi koji, između ostalog, pripadaju razredu *Clostridia* i uključuju *Clostridiaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae* i *Christensenellaceae*. Jedna od najčešće proučavanih vrsta koljena *Firmicutes* je *Clostridium butyricum,* sporotvorni anaerob koji proizvodi butirat, butanol i 1,3-propandiol, istovremeno proizvodeći vodik (Douillard i de Vos, 2019). Netoksikogeni soj *C. butyricum* MIYAIRI 588 smanjuje simptome dijareje uzrokovane antibioticima kod novorođenčadi (Seki i sur., 2003) i komercijalno je dostupan kao dodatak hrani na azijskom tržištu, dok je u EU dopuštena njegova uporaba u hrani za životinje (Saarela, 2019). Istraživanja su pokazala da smanjuje rast *Clostridium difficile* u modelu glodavaca te štiti gnotobiotičke miševe od infekcije *E. coli* O157:H7 (Oka i sur., 2018; Hayashi i sur. 2013). Genom *C. butyricum* MIYAIRI 588 nije objavljen, ali je poznata sekvenca plazmida koji kodira bakteriocin nalik butiricinu (Nakanishi i Tanaka, 2010), što može djelomično objasniti njegovu učinkovitost. Cassir i sur. (2016) su opisali potencijalne sigurnosne probleme sojeva *C. butyricum,* često prisutnih kod novorođenčadi s nekrotizirajućim enterokolitisom, no zbog duge povijesti sigurne uporabe, *C. butyricum* MIYAIRI 588 je dopušten na tržištu EU. U razred *Clostridia* se ubrajaju i bakterije iz porodica *Ruminococacceae* i *Lachnospiraceae,*

najzastupljenijih crijevnih anaeroba i potencijalnih probiotika nove generacije. Pritom je pozornost najviše usmjerena na *Faecalibacterium prausnitzii*, Gram-negativnu bakteriju iz porodice *Ruminococacceae*, koja čini i do 15 % ukupne bakterijske populacije u crijevnom traktu (Lopez-Siles i sur., 2017). Zbog svoje zastupljenosti i relativno lakog otkrivanja, proveden je impresivan broj studija koje su dokazale da je zastupljenost *F. prausnitzii*, koja ima imunomodulatorni učinak i proizvodi butirat, značajno smanjena kod osoba oboljelih od ulceroznog kolitisa te Crohnove i drugih bolesti (Khan i Malik, 2019). Pokazalo se da stanice i supernatant kulture soja *F. prausnitzii* A2-165 štite miševe od kolitisa (Sokol i sur., 2008), dok soj *F. prausnitzii* HTF-F tvori biofilmove i pokazuje protuupalno djelovanje *in vitro* (Rossi i sur., 2016). Nedavne studije sekvenciranja pokazale su da postoje najmanje tri različite filogrupe *F. prausnitzii*, koje vjerojatno predstavljaju različite vrste (Benevides i sur., 2017), što su potvrdile i sveobuhvatne studije na desetak izolata koji su pokazali znatne razlike u antibiotičkoj rezistenciji, osjetljivosti na kisik i imunomodulatornim svojstvima (Martín i sur., 2017). Takve detaljne komparativne studije nude mogućnost odabira sojeva koji su učinkoviti, ne nose gene za rezistenciju na antibiotike i mogu se uzgojiti u dovoljno velikoj količini za komercijalizaciju. Nakon opsežne analize mikrobiote velike skupine blizanaca, utvrđeno je da su bakterije iz porodice *Christensenellaceae* nasljedne i povezane s mršavim fenotipom (Goodrich i sur., 2014). Prvi i zasad jedini izolat iz te porodice je *C. minuta* DSM 22607, nesporotvorni anaerob sposoban proizvesti butirat iz nekoliko šećera. Iako pripada koljenu *Firmicutes*, boji se poput Gram-negativne bakterije, što je značajka uočena i kod *F. prausnitzii*. Analiza genoma veličine 2,5 Mb, otkrila je da sadrži nekoliko gena za rezistenciju, uključujući *tetW*, a nedavno provedeno istraživanje otkrilo je prisutnost *C. minuta* u krvi bolesnika s upalom slijepog crijeva (Alonso i sur., 2017). Također je utvrđeno da proizvodi lipopolisaharid (LPS), koji ima ograničenu agonističku aktivnost u *ex vivo* modelima u usporedbi s LPS-om *E. coli* (Yang i sur., 2018). Prisutnost LPS-a i potencijalno-prenosivih gena rezistencije ukazuju da je prije ispitivanja na ljudima potrebna detaljna analiza toksičnosti ove vrste. Razmatra se i primjena *Eubacterium hallii* kao probiotika sljedeće generacije za upotrebu u transplantaciji fekalne mikrobiote. Nakon duodenalne infuzije fekalnom mikrobiotom zdravog donora, osobama s metaboličkim sindromom se značajno poboljšala inzulinska osjetljivost, a biopsija dvanaesnika je potvrdila povećani udio *E. hallii* kod pacijenata koji su primili transplantat zdravog davatelja u usporedbi s autolognim kontrolama (Vrieze i sur., 2012). Primjena soja *E. hallii* L2-7 izoliranog iz zdravog dojenčeta na

pretilim miševima s dijabetesom, uzrokovala je poboljšanu osjetljivost na inzulin i masnoće, povišenje koncentracije fekalnog butirata, modifikaciju metabolizma žučnih kiselina i smanjenje razine triglicerida u jetri (Udayappan i sur., 2016). *E. hallii* je metabolički svestrana bakterija koja, osim što proizvodi butirat iz glukoze i drugih šećera, u prisutnosti acetata pretvara D- i L-laktat u butirat (Duncan i sur., 2004) te proizvodi propionat iz 1,2-propandiola, međuprodukta koji se može generirati iz ramnoze i fukoze (Engels i sur., 2016). Smatra se da je pretvaranje laktata i acetata u butirat u tankom crijevu mehanizam kojim *E. hallii* L2-7 poboljšava metaboličko zdravlje domaćina. Rod *Eubacterium* nije monofiletičan i iako se neke njegove vrste ubrajaju u *Ruminococcaceae*, butirat-producirajući *E. hallii* ima drugačiji filogenetički položaj i svrstava se u *Lachnospiraceae* (Rajilić-Stojanović i de Vos, 2014). Poboljšanje uvida u genomske i fiziološke karakteristike *E. hallii*, dovelo je do prilagodbe njegovog filogenetičkog položaja te je sada svrstan u rod *Anaerobutyricum* s dvije vrste: *A. hallii* i *A. soehngenii* (Shetty i sur., 2018). Proizvodnja butirata iz laktata i acetata je posredovana samo malom skupinom crijevnih bakterija, uključujući srodne vrste roda *Anaerobutyricum* i *Anaerostipes* (Shetty i sur., 2020), koje predstavljaju potencijalne terapijske bakterije sljedeće generacije, posebno za liječenje osoba s metaboličkim sindromom (Douillard i de Vos, 2019). Iako je većina industrijskih probiotičkih sojeva izolirana iz čovjeka, neke su životinjskog podrijetla poput *Butyricicoccus pullicaecorum*, producenta butirata izoliranog iz slijepog crijeva pileta (Eeckhaut i sur., 2008). Iako prvotno svrstan u *Ruminococcaceae*, *B. pullicaecorum* se ubraja u nerazvrstane klostridije, koji također pripadaju koljenu *Firmicutes* (Rajilić-Stojanović i de Vos, 2014). Nakon što je u stolici oboljelih od upalne bolesti crijeva uočen smanjeni udio *Butyricicoccus* vrsta, za daljnju analizu je odabran soj *B. pullicaecorum* 25-3T, čija je oralna primjena pokazala izniman zaštitni učinak na modelu kolitisa miša (Eeckhaut i sur., 2013). Ispitivanja sigurnosti primjene soja kod štakora i zdravih osoba, pokazala su da je *B. pullicaecorum* 25-3T siguran za primjenu (Boesmans i sur., 2018). Tijekom studije na ljudima nije bilo utjecaja na sastav mikrobne zajednice, a nije primijećena ni akumulacija roda *Butyricicoccus*, vjerojatno zbog njegove relativno visoke početne zastupljenosti. Kao i za mnoge druge bakterije sljedeće generacije, ne postoje selektivne hranjive podloge za navedeni soj, ali sekvenciranje metagenoma u kombinaciji s naprednim računalnim metodama može omogućiti analizu zastupljenosti soja *B. pullicaecorum* 25-3T kao kandidata za terapijske bakterije sljedeće generacije koje bi mogle imati kliničku primjenu u liječenju upalnih bolesti crijeva (Li i sur., 2014).

Suprotno uvriježenom vjerovanju, probiotičke bakterije mogu biti i Gram-negativne, poput dobro definiranog probiotičkog soja *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) te *Akkermansia muciniphila* (Khan i Malik, 2019). EcN, izolirana iz fecesa vojnika, najistraživanija je Gram-negativna probiotička bakterija koja se već stotinjak godina koristi kao sastojak licenciranog medicinskog proizvoda Mutaflora, dostupnog na tržištu nekoliko zemalja, a rekombinantnim manipulacijama genoma se pokušavaju stvoriti GMO sojevi koji će se koristiti kao nosači bioaktivnih molekula ili vektorski sustavi za razvoj živih oralnih cjepiva (Sonnenborn, 2016).

Posljednjih godina, istraživanja probiotika nove generacije su usmjerena na obligatno-anaerobnu, nepokretnu, nesporogenu bakteriju *A. muciniphila*, koja čini jedinog predstavnika koljena *Verrucomicrobia* u ljudskom GIT-u. Dio ove pažnje može se objasniti njenim lakim otkrivanjem, jer se zbog svog duboko ukorijenjenog filogenetskog položaja ističe u mnogim studijama profiliranja crijevne mikrobiote. Zastupljenost *A. muciniphila* u debelom crijevu zdravih ispitanika može iznositi čak 2-5 %, a filogenetske i genomske analize su pokazale da svi izolirani sojevi pripadaju istoj vrsti (Geerlings i sur., 2018). Njena prisutnost je povezana sa zdravljem u desecima studija (Derrien i sur., 2017). Dokazano je da žive stanice *A. muciniphila* mogu zaštititi miševe od pretilosti uzrokovane prehranom i poboljšati funkciju crijevne barijere (Everard i sur., 2013). Pri ispitivanju molekularnih mehanizama djelovanja navedene bakterije, identificiran je specifični protein vanjske membrane Amuc_1100 veličine 30 kDa, koji djeluje kao signal za TLR2-receptor te je termostabilan, što objašnjava zašto su i pasterizirane stanice *A. muciniphila* sposobne poboljšati funkciju barijere i zaštititi miševe od pretilosti izazvane prehranom (Plovier i sur., 2017). Navedeno saznanje omogućuje proizvodnju stabilnih i inaktiviranih stanica *A. muciniphila* koje bi se mogle koristiti kao probiotici sljedeće generacije. Sigurnost *A. muciniphila* proizvedene u mediju bez životinjskih komponenata je ispitana na ljudima, što ovu neobičnu komensalnu bakteriju čini jednim od najperspektivnijih kandidata za terapeutike sljedeće generacije (Plovier i sur., 2017).

2.6.2. Konstrukcija probiotika nove generacije poboljšanjem svojstava ranije etabliranih probiotičkih sojeva upotrebom metoda bioinženjerstva

Razvoj molekularno-genetičkih alata i dostupnost genomskih sekvenci tisuća mikroorganizama pohranjenih u NCBI bazi podataka, omogućio je značajan napredak u istraživanju gena čiji produkti doprinose probiotičkom efektu te brzu detekciju i eliminaciju potencijalno opasnih sojeva nositelja gena za rezistenciju na antibiotike ili virulenciju (Papadimitriou i sur., 2015). Dostupnost metoda bioinženjerstva i velika količina prikupljenog znanja o načinu djelovanja probiotičkih bakterija na crijevnu mikrobiotu i domaćina, omogućuju dizajniranje probiotičkih sojeva s izmijenjenim funkcionalnim svojstvima. Korištenjem različitih strategija genetičkog inženjerstva i nasumične mutageneze, kodirajući kapacitet probiotičkih bakterija se može izmijeniti kako bi se poboljšala adhezija na sluznicu, stabilnost, quorum-sensing, otpornost na stres, interakcija s domaćinom, imunomodulacija, antimikrobno djelovanje te proizvodnja aktivnih spojeva, metabolita i nutrijenata poput SCFA, enzima, strukturnih proteina i vitamina (Douillard i de Vos, 2019).

Dostupnost genoma probiotičkih bakterija omogućila je razvoj modela na razini genoma koji bi mogli optimirati njihovu proizvodnju, što se pokazalo vrlo učinkovitim kod LBP-a izoliranih iz ljudskih crijeva (van der Ark i sur., 2018). Kod obligatnog anaeroba *Faecalibacterium prausnitzii*, to je omogućilo poboljšano razumijevanje uvjeta rasta potrebnih za proizvodnju butirata i metaboličko međudjelovanje s *Bifidobacterium adolescentis* (El-Semman i sur., 2014), a u slučaju *A. muciniphila*, model zasnovan na genomu je doveo do identifikacije parametara rasta i dizajna medija bez životinjskih komponenata (van der Ark i sur., 2018). Optimizacija etabliranih probiotičkih bakterija može se provesti na više načina. Jedan od zanemarenih pristupa je optimizacija fermentacije provedena s *Propionibacterium freudenreichii* W200, rijetko korištenog probiotičkog soja i prirodnog proizvođača vitamina B12, kako bi proizvodio dovoljno vitamina za zadržavanje EFSA-ine potvrđene zdravstvene tvrdnje (Piwowarek i sur., 2018).

Ostali poznati pristupi uključuju selekciju nasumičnom mutagenezom, uređivanje genoma pomoću CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated protein 9), usmjerenu evoluciju i upotrebu kriptičnog plazmida i vektora (Derkx i sur., 2014). Ovi pristupi omogućuju prilagodbu kodirajućeg svojsta probiotičkih sojeva željenoj primjeni i stvaranje niza fenotipova istog soja promjenom jedne osobine, ali treba imati na umu da neke od

tih tehnologija stvaraju inačice koje se u nekim zemljama mogu smatrati GMO-ima. Budući da je njihova primjena vrlo ograničena, ne-GMO pristupi imaju širi spektar primjene u industriji. Tako je u soju *Lb. rhamnosus* GG provedena nasumična mutageneza kako bi se konstruirali ne-GMO sojevi koji nemaju mukus-vezujuće pile kao posljedicu mutacija unutar klastera gena za pile ili velikih kromosomskih preslagivanja (Rasinkangas, 2014), a na sličan način su dobiveni i sojevi koji jače adheziraju na mukus (Rasinkangas, 2016). Iako je nasumična mutageneza nespecificiran pristup u kojem dolazi i do sekundarnih, neželjenih mutacija koje mogu imati štetan utjecaj na fenotip, korištenjem sekvenciranja sljedeće generacije visoke propusnosti (*engl.* high-throughput Next Generation Sequencing, NGS), neželjeni sojevi se mogu lako detektirati i ukloniti iz postupka selekcije (Rasinkangas i sur., 2014).

Izravniji pristup je konstrukcija GMO-a, koja se često koristi za poboljšanje prilagodbe sojeva crijevnom okolišu. GMO pristupi koriste se i za prikaz antigena ili antitijela i proizvodnju rekombinantnih proteina poput interleukina 10 (IL-10) ili humane fenilalanin hidroksilaze u *Lb. plantarum* (Szatraj i sur, 2017). Metode genetičkog inženjerstva pružaju mogućnost delecije problematičnih gena, poput gena za virulenciju i rezistenciju na antibiotike, prisutnih u izolatima s probiotičkim potencijalom. Potreba za učinkovitom inaktivacijom gena probiotičkih sojeva koji će se naći na tržištu se povećava zbog rastućeg problema antimikrobne rezistencije. Mnogi crijevni anaerobi su otporni na antibiotike zbog izloženosti domaćina njihovoj upotrebi, a potencijalno-prenosivi geni za rezistenciju pronađeni su i kod različitih vrsta roda *Lactobacillus*. Poželjno je korištenje sustava za ekspresiju temeljenih na DNA koja je homologna domaćinu ili drugim bakterijama prisutnim u hrani, kako bi se izbjegli markeri antibiotičke rezistencije. Takav je pristup bio uspješan kod *Lactococcus lactis* koji eksprimira gen za elafin (inhibitor proteaze) za liječenje upalnih bolesti crijeva (Motta i sur., 2012) i izlučuje IL-10 za liječenje alergija na hranu (Robert i Steidler, 2014). Široki spektar BMK i bifidobakterija je uspješno podvrgnut genetičkom inženjerstvu, uključujući vrste roda *Lactobacillus,* poput *Lb. paracasei, Lb. lactis, Lb. salivarius* i *Lb. reuteri* (Mathipa i Thantsha, 2017).

Tijekom posljednjih nekoliko godina, alat za uređivanje genoma CRISPR-Cas revolucionarizirao je znanstvena istraživanja, a zasigurno će imati i ogroman utjecaj na bioinženjerstvo probiotičkih sojeva. To je moćan alat za kontrolu genske ekspresije koji omogućuje manipulaciju DNA živog organizma na jeftiniji i jednostavniji način od alternativnih pristupa, a razvijen je iz prirodnog prokariotskog mehanizma zaštite od bakteriofaga (Doudna i

Charpentier, 2014). CRISPR sekvence su kratke palindromske sekvence koje se nalaze u genomu prokariota te zajedno s *cas* genima imaju ključnu ulogu u stečenom imunitetu bakterija i arheja na bakteriofage. Naime, u CRISPR sekvencama je pohranjena genetička informacija virusa koji su prethodno napali prokariotsku stanicu. Kada dođe do nove infekcije, ekspresijom *cas* gena nastaju obrambeni enzimi Cas9 koji nose dio genetičkog koda virusa pohranjenog u CRISPR sekvencama te cijepaju komplementarnu sekvencu virusne nukleinske kiseline. Doudna i Charpentier (2014) su otkrile da se na Cas9 endonukleazu može vezati bilo koji željeni RNA-vodič, tj. gRNA (*engl.* Guide RNA) kako bi enzim pocijepao komplementarnu DNA sekvencu, za što su 2020. dobile Nobelovu nagradu za kemiju. CRISPR-Cas predstavlja alternativu genetičkom inženjerstvu jer omogućuje modifikaciju složenih organizama, uključujući i čovjeka, bez unosa strane DNA, pri čemu ne nastaje GMO te bi takvi cisgenični organizmi trebali biti isključeni iz GMO regulative (Soda i sur., 2018). Za razliku od ostalih metoda za manipulaciju DNA *in vitro,* CRISPR-Cas omogućuje uklanjanje odabranih sekvenci i njihovu zamjenu korisnim ili neutralnim genetičkim materijalom unutar živog organizma, tj. *in vivo* (Asquer i Krachkovskaya, 2020). Stoga se smatra da će CRISPR-Cas postati snažan alat u genskoj terapiji genetički-nasljednih bolesti, hematoloških, kardiovaskularnih i infektivnih bolesti, AIDS-a, tumora, itd. (Uddin i sur., 2020; Greely, 2017). CRISPR-Cas pruža mogućnost napretka u razvoju bakterija poboljšanih probiotičkih svojstava prilagođenih određenoj primjeni (van Pijkeren i Barrangou, 2017) i uspješno je implementiran u laktobacile i bifidobakterije, ali su potrebna daljnja istraživanja zbog različite učinkovitosti među sojevima iste vrste (Leenay i sur., 2019). Budući da CRISPR-Cas uzrokuje ireverzibilne promjene genetičke informacije, etički je kontroverzan i predstavlja sigurnosni rizik zbog mogućih posljedica na okoliš izazvanih izmjenama genoma čitavih vrsta koje se mogu prenijeti na potomstvo. Naime, pomoću CRISPR-Cas sustava, osim što je moguće dizajnirati biljke, životinje i ljude poboljšanih svojstava, moguće je i eliminirati čitavu populaciju malaričnih komaraca pa čak i „oživjeti“ izumrle vrste poput mamuta, mijenjanjem genoma azijskog slona (Greely, 2017).

2.6.3. Selekcija probiotičkih sojeva nove generacije iz novih izvora korištenjem modernih tehnologija

Korištenjem klasičnih metoda probira, novi probiotički sojevi se odabiru na temelju niza kriterija utvrđenih od strane FAO i WHO, kojima se procjenjuju njihove fenotipske/genotipske osobine i funkcionalna svojstva poput sigurnosti, identifikacije, tolerancije na stres, adezije, itd. (Šušković i Kos, 2020; de Melo Pereira i sur., 2018). Razvoj *in silico* metoda, spriječio je opsežne laboratorijske pretrage i omogućio brzu analizu i izolaciju velikog broja probiotičkih kandidata. Međutim, sekvenciranje potencijalnih probiotičkih sojeva nije dostatno za njihovu karakterizaciju, jer ponekad ne postoji evidentna povezanost gena i funkcije, te je radi boljeg razumijevanja probiotičkog djelovanja i aktivnosti gena u različitim uvjetima potrebna fenotipska karakterizacija i uporaba „omičkih" pristupa poput transkriptomike, metabolomike, proteomike ili metilomike (epigenomike) ili (Douillard i de Vos, 2019). Komparativne genomske analize omogućuju odabir novih izolata identifikacijom skupova gena povezanih s probiotičkim funkcijama, poput adhezije ili tolerancije na stres. Tako su u soju *Lb. salivarius* UCC118 identificirani geni koji kodiraju mukus-vezujuće LPXTG proteine koji su zatim analizirani adhezijskim testovima (van Pijkeren i sur., 2006). Budući da probiotici dostupni na tržištu imaju ograničene funkcionalne učinke na domaćina, uz generičke kriterije za njihov odabir, treba proučavati i funkcionalna svojstva sojeva u svrhu liječenja specifičnih zdravstvenih stanja poput pretilosti, depresije, dijabetesa, raka, itd. Također, fenotipska svojstva probiotičkih sojeva moraju biti kompatibilna s industrijskim procesima i ne smiju mijenjati organoleptička svojstva proizvoda u koje su dodani, zbog čega je prije komercijalizacije nužno ispitati i različite industrijske i proizvodne aspekte. Značajan napor je usmjeren na očuvanje velikog broja živih bakterija tijekom liofilizacije te sušenja u fluidiziranom sloju i raspršivanjem; povećavanjem njihove otpornosti na stres, poboljšanjem procesa proizvodnje, dodatkom zaštitnih sredstava, kontrolom parametara procesa i prestresiranjem probiotika prije sušenja (Broeckx i sur., 2016). Također, optimiziraju se postupci naknadnog sušenja te različite tehnike inkapsulacije. Osim tijekom proizvodnje, važno je osigurati i preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom skladištenja i tranzita do mjesta djelovanja nakon konzumacije. Tijekom priprave i formulacije probiotičkih proizvoda treba voditi računa o temperaturi, aktivitetu vode, pH, tlaku, količini vlage i razini atmosferskog kisika jer su većina probiotika nove generacije obligatni anaerobi (Šipailienė i Petraitytė, 2018).

2.6.3.1. Majčino mlijeko - izvor probiotičkih sojeva nove generacije

Probiotički mikroorganizmi su do sada uglavnom izolirani iz mlijeka i mliječnih proizvoda (jogurt, sir, kefir, fermentirano mlijeko, itd.), fermentiranog mesa, ribe, žitarica, voća i povrća, te različitih staništa ljudskog i životinjskog tijela poput usne šupljine, kože, GIT-a i vaginalnog područja (Khan i Malik, 2019). Jedan od potencijalnih novih izvora probiotičkih sojeva je i majčino mlijeko (de Melo Pereira i sur., 2018). Korisni učinak majčinog mlijeka na zdravlje djeteta rezultat je sinergističkog djelovanja esencijalnih nutrijenata (proteina, masti, ugljikohidrata, vitamina i minerala) te mnoštva imunosnih stanica i bioaktivnih spojeva s protuupalnim, antiinfektivnim i probiotičkim djelovanjem poput antimikrobnih peptida (lizozima, bakteriocina, laktoferina, laktadherina), imunoglobulina, citokina, kemokina, glikokonjugata, oligosaharida, leukocita, mikro-RNA, masnih kiselina i faktora rasta, koji imaju važnu ulogu u razvoju imunosnog sustava dojenčeta i pružanju zaštite od patogena (Zimmermann i Curtis, 2020; Bardanzelllu, 2017).

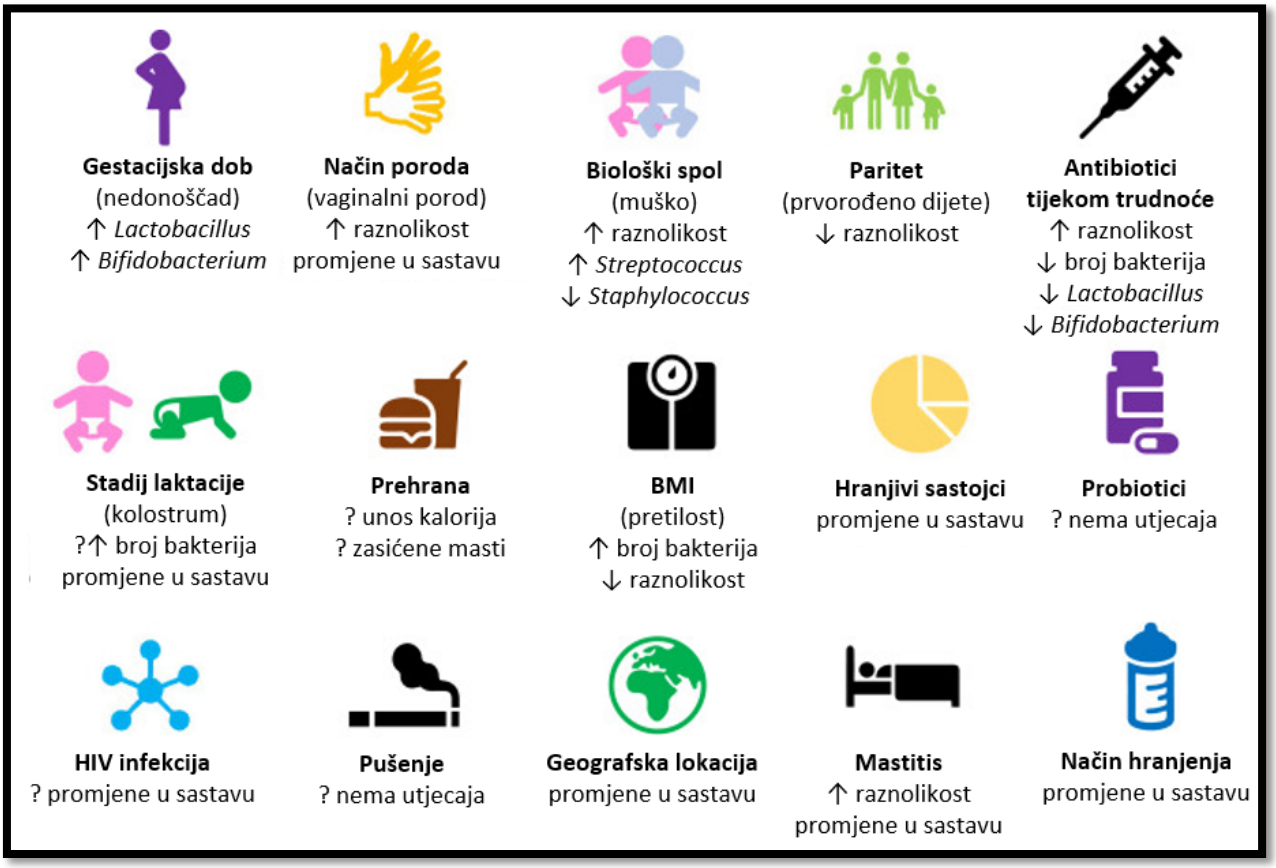
Majčino mlijeko je biološka tekućina čiji se sastav mijenja tijekom perioda laktacije kako bi se zadovoljile nutritivne potrebe djeteta, zbog čega se kolostrum razlikuje od zrelog mlijeka po boji, sastavu i konzistenciji te sadrži više proteina sirutke, klorida, minerala i iona Na i Mg, a manje laktoze, masti, iona K i Ca, te vitamina (Lyons i sur., 2020). Prijelazno mlijeko je sastavom slično kolostrumu, a proizvodi se između petog i četrnaestog dana nakon poroda, nakon čega se mlijeko smatra zrelim (Lyons i sur., 2020; Sundekilde i sur., 2016). Tijekom laktacije se osim nutritivnog, mijenja i imunološki sastav majčinog mlijeka, pa tako kolostrum sadrži više imunoglobulina, citokina i imunoloških stanica od zrelog mlijeka (Boix-Amorós i sur., 2016). Pokazalo se da imunološki sastav majčinog mlijeka ovisi i o zdravstvenom stanju djeteta. Dosadašnja saznanja sugeriraju da dolazi do retrogradnog toka mlijeka i ulaska sline dojenčeta u mliječne kanaliće, što može stimulirati proizvodnju leukocita i antitijela u majčinom mlijeku (Lyons i sur., 2020). Spomenutu hipotezu potvrđuju brojna istraživanja u kojima je zabilježeno povećanje razine leukocita (posebice makrofaga) i TNF-α u majčinom mlijeku tijekom dojenja bolesnog djeteta (Hassiotou i sur., 2013; Riskin i sur., 2012).

Dojenje oblikuje neonatalnu crijevnu mikrobiotu direktno, odnosno izlaganjem mikrobioti majčinog mlijeka te indirektno pomoću bioaktivnih spojeva iz mlijeka koji utječu na rast i metabolizam bakterija (van den Elsen i sur., 2019). Majčino mlijeko pruža zaštitu od GI i respiratornih infekcija, nekrotizirajućeg enterokolitisa i smanjuje rizik od iznenadne dojenačke

smrti, a njegov protektivni učinak je posebno izražen kod prerano rođene i bolesne djece (Lyons i sur., 2020; Zimmermann i Curtis, 2020). Pokazalo se da dojenje u trajanju duljem od četiri mjeseca smanjuje hospitalizaciju novorođenčadi uslijed infekcija donjeg respiratornog trakta za 72 % (Ip i sur., 2007), dok dojenje u trajanju od šest mjeseci smanjuje učestalost infekcija uha i grla za 63 % (Duijts i sur., 2010). Dugoročne zdravstvene prednosti dojenja uključuju bolji kognitivni razvoj djeteta i manji rizik razvoja alergija, astme, dijabetesa, pretilosti, sindroma iritabilnog crijeva, kardiovaskularnih bolesti i Chronove bolesti (Azad, 2019; Ibrahim i sur., 2019). Dojenje smanjuje rizik raka dojke i jajnika, hipertenzije, dijabetesa, dislipidemije te kardiovaskularnih i drugih bolesti majke, a laktobacili izolirani iz majčinog mlijeka su se pokazali učinkovitom alternativom antibioticima u liječenju mastitisa (Jirakittidul i sur., 2019).

Prvotno se smatralo da su bakterije prisutne u majčinom mlijeku posljedica fekalne ili kožne kontaminacije, što je opovrgnula njihova izolacija iz uzoraka prikupljenih u aseptičkim uvjetima i genotipska analiza koja je pokazala da su bakterije prisutne u mlijeku genotipski različite od onih prisutnih na koži (Ruiz i sur., 2019). Iduća hipoteza bila je da se mliječni kanalići koloniziraju oralnom mikrobiotom djeteta tijekom dojenja, što je opovrgnula izolacija bakterija iz kolostruma prije uspostavljanja prvog podoja (Damaceno i sur., 2017). Porijeklo bakterija u majčinom mlijeku još je uvijek nerazjašnjeno (Zimmermann i Curtis, 2020). Prisutnost istovjetnih bakterija u mlijeku i crijevima majke, implicira postojanje entero-mliječnog puta kojim se crijevni mikroorganizmi ili njihova DNA translociraju u mliječne žlijezde (Zimmermann i Curtis, 2020). Translokacija iz crijeva se vjerojatno odvija putem limfoidnih tkiva povezanih s crijevima (*engl*. Gut-Associated Lymphoid Tissues, GALT) i uključuje transport bakterija pomoću dendritičkih stanica i makrofaga. Sam mehanizam translokacije uključuje prolazak dendritičkih stanica kroz crijevni epitel i preuzimanje bakterija iz crijevnog lumena te njihov transport pomoću makrofaga u mezenterične limfne čvorove i u konačnici do mliječnih žlijezda (Rodríguez, 2014). Tijekom kasne trudnoće i laktacije, češće dolazi do translokacije, što rezultira nakupljanjem imunosnih stanica u mliječnim žlijezdama. Cirkulacija IgA-producirajućih stanica je dobro poznata, a dokazano je i da dendritičke stanice unutar mezenteričkih limfnih čvorova nekoliko dana zadržavaju mali broj živih komensalnih bakterija (Macpherson i Harris, 2004). Uočeno je da se nakon oralne primjene probiotičkog soja iz roda *Lactobacillus*, isti soj može izolirati i iz majčinog mlijeka, baš kao i bakterije koje se inače nalaze u hrani (Abrahamsson i sur., 2009). Dokazana je i translokacija bakterija iz rodova *Bacteroides*,

Bifidobacterium, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Blautia*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Collinsella*, *Parabacteroides*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Veillonella*, *Streptococcus* i *Cutibacterium* iz crijeva majke u majčino mlijeko i zatim u crijeva djeteta (Jost i sur., 2014). Nedvojbeno je da majčino mlijeko sadrži jedinstven mikrobiom koji uključuje 10^2-10^4 CFU mL^{-1} bakterija (Lyons i sur., 2020). Dojenče majčinim mlijekom dnevno unese 10^5-10^7 bakterija koje, s bakterijama stečenim tijekom trudnoće i pri porodu, sudjeluju u primarnoj kolonizaciji crijeva dojenčadi (Maldonado i sur., 2019; Pannaraj i sur., 2017; Heikkilä i Saris, 2003). Prehrana, dob, zdravlje, indeks tjelesne mase, genetika majke te demografski i okolišni čimbenici, uzrokuju promjene mikrobioma majčinog mlijeka (slika 3), što utječe na kolonizaciju crijeva, zaštitu od patogena, probavu, metabolizam te neuroendokrini i imunosni razvoj dojenčeta i zdravlje majke (Fernández i sur., 2020; Zimmermann i Curtis, 2020).



Slika 3. Utjecaj različitih čimbenika na sastav mikrobiote majčinog mlijeka (prilagođeno prema Zimmermann i Curtis, 2020)

Razumijevanje mikrobioma majčinog mlijeka bilo je ograničeno nemogućnošću brze kultivacije mnogih bakterijskih vrsta, što je usmjerilo istraživanja na lako kultivabilne mikroorganizme (Lyons i sur., 2020). Upotreba prve generacije molekularnih tehnika neovisnih o kultivaciji, poput PCR-a u kombinaciji s elektroforezom u denaturirajućem gradijentu (*engl.* Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) ili elektroforezom u temperaturnom gradijentu (*engl.* Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE), omogućila je bolje razumijevanje bakterijskih populacija u majčinom mlijeku. Sekvenciranje sljedeće generacije, uključujući metataksonomski (analizu amplikona 16S rRNA) i metagenomski pristup (sekvenciranje ukupne DNA u uzorku), omogućilo je detekciju bakterija koje je bilo nemoguće otkriti konvencionalnim kultivacijskim metodama i pružilo je detaljan uvid u kompleksnost i raznolikost mikrobnog ekosustava majčinog mlijeka (Fernández i sur., 2020; Lyons i sur., 2020).

Sekvenciranjem 16S rRNA gena ustanovljeno je da je mikrobiota majčinog mlijeka raznolikija od crijevne mikrobiote (Biagi i sur., 2017; Murphy i sur., 2017) i da sadrži bakterije iz 25 koljena, 185 porodica i 590 rodova, uključujući i dotad nepoznate rodove *Lactomassilus*, *Lactimicrobium*, *Anaerolactibacter*, *Galactobacillus* i *Acidipropionibacterium* (Togo i sur., 2019). Pritom su najzastupljenije bakterije iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Rothia*, *Cutibacterium*, *Veillonella* i *Bacteroides* (Zimmermann i Curtis, 2020).

Napredak u istraživanju majčinog mlijeka, doveo je do napretka u formulaciji adaptiranog mlijeka kojem se dodaju bioaktivni spojevi poput: a) laktoferina, drugog najzastupljenijeg proteina u mlijeku koji ima antimikrobnu aktivnost i sudjeluje u razvoju GIT-a i mozga, a kliničke studije su potvrdile njegovu ulogu u sprječavanju pojave neonatalne sepse, dijareje i nekrotizirajućeg enterokolitisa kod dojenčadi; b) oligosaharida majčinog mlijeka (*engl.* Human Milk Oligosaccharides, HMOs), kompleksnih neprobavljivih glikana s bifidogenim učinkom, koji služe kao prebiotički supstrati koji potiču rast korisnih mikroorganizama crijevne mikrobiote dojenčadi. Majčino mlijeko sadrži preko 200 HMO-a koji djeluju antimikrobno, moduliraju odgovor crijevnih epitelnih stanica i sprečavaju adheziju patogena na crijevni epitel; c) kolina koji sudjeluje u razvoju mozga (Lyons i sur., 2020). Također, majčino mlijeko predstavlja i izvor potencijalnih probiotičkih BMK i bifidobakterija kojima bi se moglo suplementirati adaptirano mlijeko za dojenčad kako bi bilo što sličnije majčinom mlijeku (Maldonado i sur., 2019).

Bakterije prisutne u majčinom mlijeku pružaju zaštitu od infekcija uzrokovanih virusima, bakterijama i kvascima pomoću različitih mehanizama: a) biosinteze spojeva s antimikrobnom aktivnošću, uključujući organske kiseline (mliječnu, octenu), etanol, bakteriocine, reuterin ili vodikov peroksid (Cárdenas i sur., 2019; Kos i sur., 2011; Šušković i sur., 2010); b) koagregacije s patobiontima, ometajući im pristup crijevnim epitelnim stanicama (Cárdenas i sur., 2019); c) kompetitivnom ekskluzijom patobionata za nutrijente ili receptore domaćina (Olivares i sur., 2006); d) jačanjem crijevne barijere i smanjenjem propusnosti crijeva dojenčeta te povećanjem biosinteze mucina (Olivares i sur., 2006); i e) imunomodulacijom.

Iako je identificiran značajan broj bakterijskih izolata iz mikrobiote majčinog mlijeka (Poinsot i sur., 2020; Damaceno i sur., 2017), zbog svoje kompleksnosti i bioraznolikosti i dalje je u fokusu brojnih istraživačkih grupa diljem svijeta kao jedan od najzanimljivijih izvora potencijalnih probiotika nove generacije. Iako su „omički“ alati otvorili nove puteve razumijevanja korisnih zdravstvenih učinaka dojenja s mikrobiološke, metaboličke i imunološke perspektive i omogućili razvoj strategija za izolaciju i komercijalizaciju probiotika iz majčinog mlijeka, njihov potencijal još uvijek nije dovoljno iskorišten, te su za holističko razumijevanje genetičke raznolikosti i funkcionalnog kapaciteta mikrobioma majčinog mlijeka nužna sveobuhvatna metagenomička, metabolomička i metatranskriptomička istraživanja (Fernández i sur., 2020).

2.7. Funkcionalne molekule probiotičkih sojeva

Iako su korisni učinci probiotika na zdravlje domaćina dobro poznati, molekularni mehanizmi djelovanja još nisu dovoljno razjašnjeni. Razvoj sekvenciranja sljedeće generacije i dostupnost sve većeg broja genoma probiotičkih bakterija, omogućili su detaljnu karakterizaciju kodirajućeg kapaciteta probiotičkih sojeva, a funkcionalna genomika dala je uvid u molekularne mehanizme i način djelovanja probiotičkih sojeva, što je rezultiralo identifikacijom skupina gena (*engl.* gene clusters) povezanih s probiotičkim funkcijama (Douillard i de Vos, 2019). Povrh toga, ključnu ulogu u otkrivanju mehanizama probiotičkog djelovanja imale su studije na mutantima, koje su omogućile izravno povezivanje genotipa s fenotipom.

Prema dosadašnjim spoznajama, molekularni mehanizmi probiotičkog djelovanja su multifaktorijalni i uključuju različite bioaktivne proizvode mikrobnog metabolizma, uključujući površinske molekule te metabolite koji uzrokuju modifikaciju sastava crijevne mikrobiote,

poboljšanje funkcije epitelne barijere i indukciju imunosnog odgovora (Beganović i sur., 2011). Površinske komponente komensalnih i probiotičkih bakterija, poput (gliko)proteina (uključujući S-proteine), lipoproteina, lipoteihonske kiseline, LPS-a, kapsularnih polisaharida, muropeptida, egzopolisaharida (EPS-a), pilusa i flagelina čine MAMP-e koji se specifično vežu na receptore prepoznavanja uzoraka (*engl.* Pattern Recognition Receptors, PRR) domaćina poput TLR i NLR (*engl.* Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptors) i koji mogu regulirati signalne puteve u crijevnim epitelnim stanicama kao što su nuklearni faktor kappa B (NF-κB), mitogenom-aktivirana protein kinaza (MAPK), peroksisom proliferator aktivirani receptor gamma (PPARγ), signalna kaskadu ovisnu o staničnoj proteazi, itd., za proizvodnju citokina i kemokina ili inhibiciju apoptoze te tako ublažiti upalu i poboljšati funkciju crijevnog epitela (Lebeer i sur., 2018). Na taj način dolazi do modulacije crijevnog, a potom i sistemskog imunosnog sustava (Do Carmo i sur., 2018).

Osim površinskih komponenti, dobro dokumentirane probiotičke djelatne molekule su i različiti metaboliti koje bakterije luče u izvanstanični prostor, poput ekstracelularnih proteina, organskih kiselina, indola, H_2O_2, dušikovog (II) oksida, metabolita triptofana i histamina, ekstracelularnih vezikula, SCFA, bakteriocina, CpG-bogate DNA i različitih enzima poput laktaze i hidrolaze žučnih soli, koji štite integritet crijevne epitelne barijere izravno (indukcijom lučenja sluzi pomoću vrčastih stanica i povećanjem sekrecije antimikrobnih peptida), ili neizravno, tako što djeluju kao ligandi u interakciji s receptorima domaćina što posljedično dovodi do regulacije signalnih puteva (Lebeer i sur, 2018; Kos i sur., 2011; Šušković i sur., 2010).

2.7.1. Bakteriocini

Kontinuiranim širenjem antimikrobne rezistencije među bakterijama, došlo je do pojave multi-rezistentnih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih sojeva, otpornih na tri ili više skupina antibiotika; ekstenzivno-rezistentnih bakterija otpornih na sve osim jedne do dvije skupine antibiotika; te pan-rezistentnih sojeva otpornih na sve poznate skupine antibiotike, što predstavlja jedno od ključnih zdravstvenih i ekonomskih problema današnjice (Leboš Pavunc i sur., 2013). Stalno rastuća stopa morbiditeta i smrtnosti povezanih s meticilin-rezistentnim stafilokokom, vankomicin-rezistentnim enterokokom, penicilin-rezistentnim *Streptococcus pneumoniae* i multi-rezistentnim Gram-negativnim bakterijama poput *Pseudomonas aeruginosa* i *E. coli*, uzrokuje

ozbiljno zdravstveno i ekonomsko opterećenje bolnicama i cjelokupnoj zajednici, zbog čega se javlja potreba za razvojem novih antibiotika i drugih antimikrobnih spojeva. Pritom su istraženi brojni prirodni resursi, uključujući biljke, životinje i mikroorganizme te je pomoću kemijskih i biotehnoloških metoda odabrano nekoliko perspektivnih antimikrobnih spojeva. Tako su iz bakterijskih sojeva koje posjeduju antagonističku aktivnost izolirani bakteriocini, koji su pokazali obećavajuća antimikrobna svojstva protiv različitih bakterijskih, fungalnih i virusnih vrsta te prirodno-rezistentnih struktura poput bakterijskih biofilmova, zbog čega se smatraju mogućom alternativom antibioticima u liječenju bolesti uzrokovanih bakterijama rezistentnim na antibiotike (Hassan i sur., 2012; Šušković i sur., 2010).

Bakteriocini su ribosomski-sintetizirani antimikrobni peptidi male molekulske mase koji imaju bakteriostatsko ili baktericidno djelovanje prvenstveno prema srodnim, a oni šireg spektra djelovanja i prema nesrodnim bakterijama, pri čemu sam mikroorganizam producent nije osjetljiv na proizvedeni bakteriocin, što mu omogućava preživljavanje u visokokompetitivnom polimikrobnom okruženju (Simons i sur., 2020; Šušković i sur., 2010). Sastoje se od 30-60 aminokiselina, a proizvode ih Gram-pozitivne (2-6 kDa) i Gram-negativne (10-20 kDa) bakterije (Chauhan, 2020). Za razliku od antibiotika koje sintetiziraju multienzimski kompleksi i koji su aktivni u mikromolarnom rasponu protiv širokog spektra mikroorganizama, bakteriocini se sintetiziraju u ribosomima i posttranslacijski modificiraju, osjetljivi su na proteolitičke enzime poput proteaza prisutnih u GIT-u sisavaca, aktivni su pri nižim (nanomolarnim) koncentracijama i imaju uži spektar djelovanja, zbog čega se pomoću njih mogu eliminirati specifični patogeni bez utjecaja na komensalnu mikrobiotu (Mak, 2018). Smatra se da bi upotreba bakteriocina ili komensalnih sojeva koji ih proizvode s ciljem liječenja ili sprječavanja širenja zaraznih bolesti bila isplativa, netoksična za ljude i životinje i sigurna za okoliš (Mak, 2018).

Biološka uloga bakteriocina je složena i nije ograničena samo na inhibiciju rasta ostalih sojeva u istoj ekološkoj niši tijekom prenapučenosti i iscrpljivanja hranjivih sastojaka. Zahvaljujući prirodnom podrijetlu, toplinskoj stabilnosti i inhibicijskoj aktivnosti prema patogenim bakterijama, bakteriocin nisin se već dugo koristi kao biokonzervans i sredstvo za poboljšanje kvalitete i senzorskih svojstava hrane (Ghrairi i sur., 2012). Postoje razni pristupi za primjenu bakteriocina u prehrambenim proizvodima: a) izravna inokulacija producenata bakteriocina u prehrambene proizvode, b) dodatak pročišćenog bakteriocina kao konzervansa, ili c) dodatak fermentiranog proizvoda koji sadrži producente bakteriocina (Simons i sur., 2020).

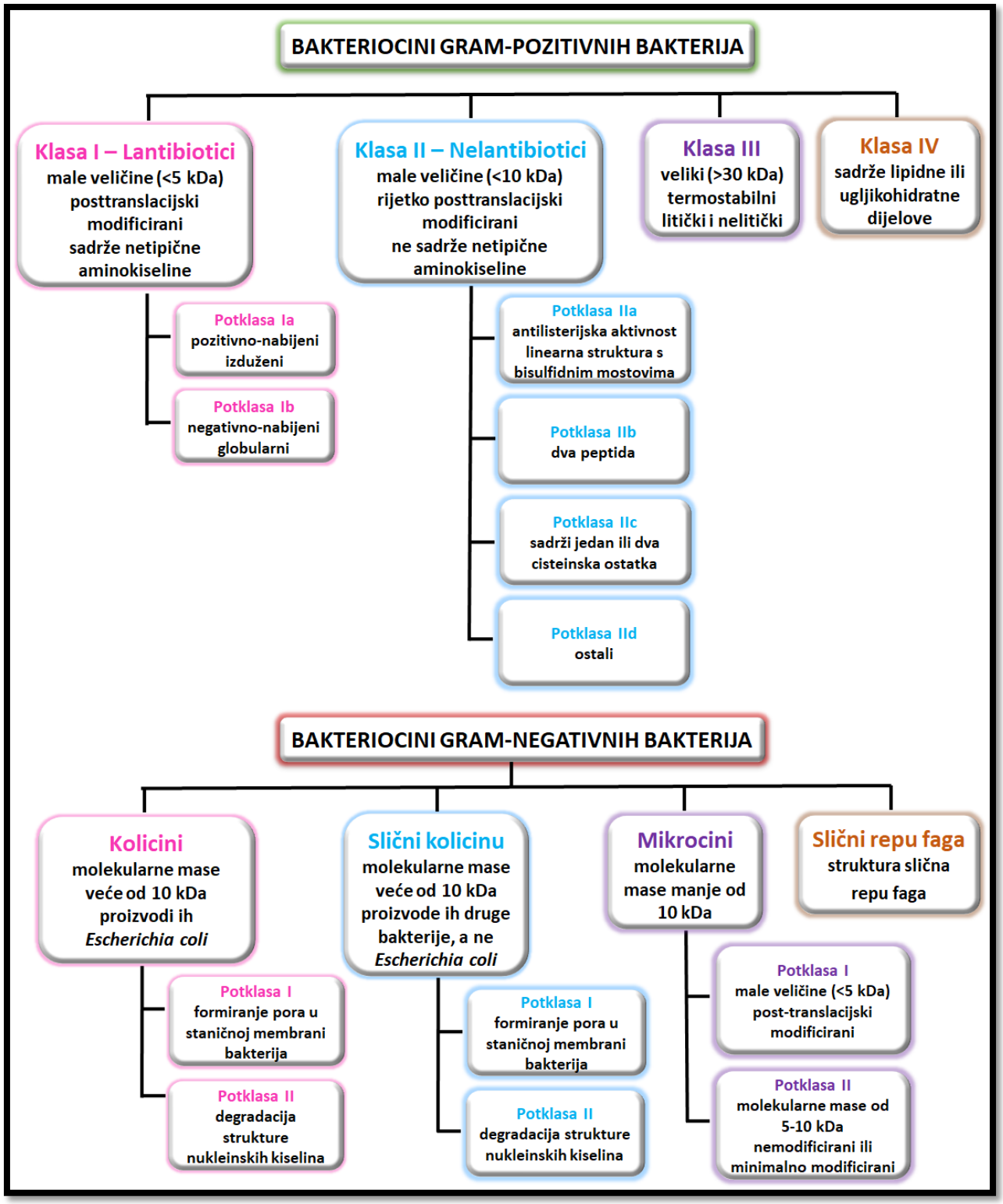
Osim najčešće korištenog bakteriocina u prehrambenoj industriji, nisina, istražuje se primjena i brojnih drugih bakteriocina poput lakticina 147 i 481, koji su pokazali potencijal upotrebe kao prirodni konzervansi i poboljšivači okusa (Deegan i sur., 2006). Nisin (E234) je antimikrobni peptid molekulske mase 3,5 kDa koji djeluje inhibitorno na rast Gram-pozitivnih patogena prisutnih u hrani poput *L. monocytogenes*, a pritom je netoksičan, termostabilan, lako razgradiv probavnim enzimima te ne utječe na okus i miris, zbog čega ima široku primjenu u proizvodnji konzervirane hrane i mliječnih proizvoda (Negash i Tsehai, 2020; Šušković i sur., 2010).

Farmakološki potencijal bakteriocina ogleda se u raznolikosti njihovih molekula, specifičnosti njihovih antimikrobnih mehanizama i potencijalnoj sinergiji s drugim lijekovima. Brojne studije su pokazale njihovo snažno inhibitorno djelovanje prema *Helicobacter pylori*, uzročniku čira na želucu, potencijal njihovog korištenja u poticanju rasta biljaka te bioterapijski potencijal u liječenju različitih bolesti ljudi i životinja, ponovljenih infekcija sa *Streptococcus pyogenes* i *Mycobacterium* vrsta, terapiji malignih tumora, liječenju akni, zaštiti oralnog i vaginalnog zdravlja, itd. (Negash i Tsehai, 2020; Wu i sur., 2019; Hassan i sur., 2012). Nadalje, utvrđena je učinkovitost bakteriocina lizostafina u borbi protiv organizama odgovornih za nazalne i sistemske infekcije, bakterijemiju, endokarditis te nastajanje biofilma na intravaskularnim površinama katetera (Oluola i sur., 2007). Unatoč širokoj mogućnosti njihove primjene, samo su tri bakteriocina; nisin, pediocin-PA1 i Micocin® (smjesa karnociklina A, karnobakteriocina BM1 i piscikolina 126) odobrena od strane FDA i komercijalno dostupna (Radaic i sur., 2020).

Prema Fuqua i sur. (2001), na nakupljanje bakteriocina utječu različiti okolišni uvjeti te prisutnost kemijskih spojeva i guste mikrobne populacije (*engl*. Quorum). Proizvodnja bakteriocina, kao i proteina koji osiguravaju imunost producenta na bakteriocin, često je dio bakterijskih quorum-sensing sustava, a uz to može biti inducirana i čimbenicima stresa (oštećenjem DNA, UV svjetlošću, antibioticima) koji djeluju putem SOS promotora (Butorac i sur., 2020; Šušković i sur., 2010). Geni za bakteriocine su obično organizirani u operonske klastere smještene na kromosomima ili pokretnim genetičkim elementima poput transpozona i plazmida, a uključuju gene koji kodiraju inaktivni prekursor, proteine transportere, enzime koji sudjeluju u posttranslacijskim modifikacijama i proteine koji producentu omogućuju imunost na proizvedeni bakteriocin (Zacharof i Lovitt, 2012).

Biosinteza bakteriocina započinje u ribosomima, pri čemu nastaje inaktivni prekursor koji sadrži N-terminalnu signalnu sekvencu, tj. vodeći peptid, koji održava molekulu u neaktivnom obliku, omogućava interakciju s transportnim sustavom te kojega, u slučaju posttranslacijski-modificiranih bakteriocina, prepoznaju enzimi odgovorni za modifikacije (Cotter i sur., 2005). Tijekom translokacije prekursora u izvanstanični prostor sustavima za izlučivanje proteina ili općim sekretornim putem, dolazi do cijepanja vodećeg peptida pomoću ekstracelularne proteaze kodirane u operonskom klasteru gena za biosintezu bakteriocina, pri čemu nastaje aktivna molekula bakteriocina (Mak, 2018). U operonskom klasteru su smješteni i geni koji kodiraju za specifične imunosne proteine koji omogućuju otpornost producenta na proizvedeni bakteriocin tako što djeluju kao antagonistički receptori sintetiziranog bakteriocina ili kao specijalizirani sustavi za izlučivanje bakteriocina iz stanice proizvođača. Njihova ekspresija je ključna jer su visokospecifični i omogućuju razlikovanje stanica producenata i ciljnih stanica koje su obično blisko srodne i obitavaju u istoj ekološkoj niši (Mak, 2018).

Sekvence i fizikalno-kemijski parametri bakteriocina, zajedno s informacijama o njihovoj strukturi, taksonomiji, bibliografiji i biološkoj aktivnosti integrirani su u bazu podataka nazvanu BACTIBASE koja trenutno sadrži 230 bakteriocina. Zbog ogromnog broja identificiranih bakteriocina i njihovih preklapajućih strukturnih, funkcionalnih i genetičkih karakteristika, klasifikacija bakteriocina još uvijek predstavlja problem. Prema podacima o veličini, strukturi, molekularnom sastavu, mehanizmu biosinteze, posttranslacijskim modifikacijama, biokemijskim svojstvima, biološkoj aktivnosti te spektru i načinu djelovanja, nedavno je provedena pregrupacija bakteriocina u nove klase (Simons i sur., 2020; Mak, 2018; Ahmad i sur., 2017; Šušković i sur., 2010). Pritom je inicijalno razlikovanje bakteriocina provedeno na temelju mikroorganizma producenta, zbog čega se dijele na bakteriocine Gram-pozitivnih i bakteriocine Gram-negativnih bakterija (slika 4).



Slika 4. Klasifikacija bakteriocina **A** Bakteriocini Gram-pozitivnih bakterija **B** Bakteriocini Gram-negativnih bakterija (prilagođeno prema Simons i sur., 2020)

2.7.1.1. Bakteriocini Gram-pozitivnih bakterija

Gram-pozitivne bakterije, posebice BMK, proizvode većinu identificiranih bakteriocina, koji su klasificirani u 4 klase (Ahmad i sur., 2017; Zacharof i Lovitt, 2012):

Klasa I (lantibiotici): uključuje male (<5 kDa), posttranslacijski modificirane bakteriocine, koji djeluju inhibitorno na Gram-pozitivne bakterije i patogene u hrani (Savadogo i sur., 2006). Zajedničko obilježje ove skupine je prisutnost neuobičajenih aminokiselina poput dehidriranih aminokiselina, lantionina i 3-metillantionina koji tvore višestruke prstenaste strukture i doprinose toplinskoj, pH i proteolitičkoj stabilnosti bakteriocina (Nishie i sur., 2012). Prisutnost ovih aminokiselina rezultat je post-translacijskih modifikacija, odnosno dehidracije i ciklizacije specifičnih aminokiselinskih ostataka. Ova je klasa obično povezana s inhibicijom Gram-pozitivnih bakterija i patogena koji se prenose hranom (Savadogo i sur., 2006). Lantibiotici se mogu dalje klasificirati u potklase pa se tako pozitivno-nabijeni izduženi peptidi (nisin, epidermin, galidermin), koji stvaraju pore u bakterijskim membranama, svrstavaju u potklasu Ia, dok se negativno-nabijeni bakteriocini globularne i nefleksibilne strukture (lakticin 481, citolizin, salivaricin), čiji je mehanizam djelovanja povezan s inhibicijom specifičnih enzima neophodnih za ciljane bakterije, svrstavaju u potklasu Ib (Simons i sur., 2020).

Klasa II (nelantibiotici): uključuje male (<10 kDa), toplinski stabilne bakteriocine, poput pediocina PA-1 i AcH, koji ne sadrže neuobičajene aminokiseline u svojoj strukturi, a post-translacijske modifikacije su rijetke i ograničene samo na nastajanje bisulfidnih mostova (Simons i sur., 2020). Mehanizam njihovog djelovanja uključuje destabilizaciju i permeabilizaciju bakterijskih membrana ili stvaranje pora u membrani (Oscáriz i Pisabarro, 2001). Ova se skupina može podijeliti u četiri potklase. Članovi potklase IIa (leukocin A, acidocin A, pediocin PA-1) imaju linearnu strukturu te se zbog svog antilisterijskog djelovanja nazivaju antilisterijskim bakteriocinima. Potklasu IIb čine dvopeptidni bakteriocini poput laktokocina G, laktokocina Q i plantaricina NC8; potklasu IIc mali bakteriocini (laktokocin A, divergicin A ili acidocin B) povezani s vodećom peptidnom sekvencom, koji u svojoj strukturi mogu sadržavati jedan do dva ostatka cisteina; a potklasu IId svi bakteriocini klase II koji nisu uključeni u druge podskupine (Simons i sur., 2020; Oscáriz i Pisabarro, 2001).

Bakteriocini klase III su veliki peptidi (>30 kDa) koji mogu biti toplinski labilni, litički ili nelitički. U ovu su skupinu uključeni su bakteriocini poput zoocina A, lizotafina ili helveticina J i

V, koji imaju antibakterijsko djelovanje povezano s enzimskom aktivnošću (npr. endopeptidaze), što dovodi do razgradnje stanične stijenke bakterija (Simons i sur., 2020).

Bakteriocine klase IV čine nedovoljno karakterizirani složeni proteini, poput plantaricina S ili leukonocina S, koji sadrže ugljikohidratne ili lipidne dijelove, zbog čega su osjetljivi na nekoliko glikolitičkih ili lipolitičkih enzima (Simons i sur., 2020).

2.7.1.2. Bakteriocini Gram-negativnih bakterija

Većina bakteriocina Gram-negativnih bakterija izolirana je iz *E. coli*, ali ih proizvode i bakterije drugih rodova, poput *Pseudomonas* ili *Klebsiella*. Podijeljeni su u četiri skupine: prvu čine kolicini, bakteriocini molekularne mase veće od 10 kDa koje proizvodi *E. coli* i koji formiraju pore u staničnoj membrani bakterija (kolicini A, B, E1, Ia, Ib, K i 5) ili imaju nukleaznu aktivnost sličnu onoj DNA-za, RNA-za ili tRNA-za (kolicini E2-E9) (Gillor i sur., 2004). Drugu skupinu čine bakteriocini koji su po strukturi, veličini i funkciji slični kolicinu, ali ih proizvode bakterijske vrste roda *Klebsiella* (klebicin) i *Pseudomonas aeruginosa* (S-piocin). Mikrocini predstavljaju treću skupinu malih peptida (<10 kDa) koji se mogu svrstati u dvije potklase (Duquesne i sur., 2007): potklasu I čine posttranslacijski modificirani bakteriocini molekulske mase manje od 5 kDa (mikrocini B17, C7, J25 i D93), a potklasu II nemodificirani ili minimalno modificirani peptidi (mikrocini E492, V, L H47 i 24) molekulske mase od 5-10 kDa. Mehanizam djelovanja mikrocina uključuje disrupciju membrane (mikrocin E492) ili inhibiciju vitalnih enzimskih funkcija poput kompleksa ATP-sintaze (mikrocini M i H47), RNA-polimeraze (mikrocin J25), DNA-giraze (mikrocin B17) ili aspartil-tRNA sintetaze (mikrocin C). Četvrtu skupinu čine peptidi velike molekulske mase koji imaju cilindrične strukture slične strukturi repa faga, sposobne perforirati membranu bakterija i uzrokovati staničnu smrt. Tu se ubrajaju R- i F-piocini koje proizvodi *P. aeruginosa*, koji uzrokuju poremećaj membranskog potencijala i stvaranje pora u membrani. Iako mikrocine i kolicine proizvode iste vrste, a ponekad i isti sojevi, primjetne su razlike u njihovom spektru antibakterijskog djelovanja (Gillor i sur., 2004). Mikrocini imaju veći antimikrobni spektar koji pokriva i druge Gram-negativne bakterije osim *E. coli* (Duquesne i sur., 2007), pri čemu je producent otporan na njihovo djelovanje. S druge strane, kolicin i kolicinu-slične bakteriocine proizvode Gram-negativne bakterije koje imaju specifičan baktericidni učinak na sojeve iste vrste te je soj producent osjetljiv na njihovo djelovanje jer je njihovo oslobađanje povezano s lizom membrane i staničnom smrću (Simons i sur., 2020).

2.7.1.3. Mehanizam djelovanja bakteriocina

Bakteriocini inhibiraju rast ciljnih organizama mehanizmima koji djeluju prvenstveno na staničnu ovojnicu i mehanizmima koji utječu na ekspresiju gena i proizvodnju proteina unutar stanice. Antimikrobno djelovanje bakteriocina Gram-pozitivnih bakterija se većinom zasniva na narušavanju integriteta stanične membrane, izravno ili vezanjem na određeni receptor, što uzrokuje smrt stanice (Cavera i sur., 2015).

Određeni bakteriocini klase I imaju dvojaki način djelovanja, poput nisina koji ulazi u interakcije s lipidom II (prekursorom u sintezi peptidoglikana) vezanim na staničnu membranu i tako inhibiraju sintezu stanične stijenke. Također, koriste lipid II kao molekulu za prianjanje kako bi započeli formiranje pora koje povećava membransku propusnost i uzrokuje smrt stanice.

Bakteriocini klase II (npr. laktokocin A), koriste manoza-fosfotransferazni sustav kao receptor, što dovodi do formiranja pora i izlijevanja staničnog sadržaja (Simons i sur., 2020).

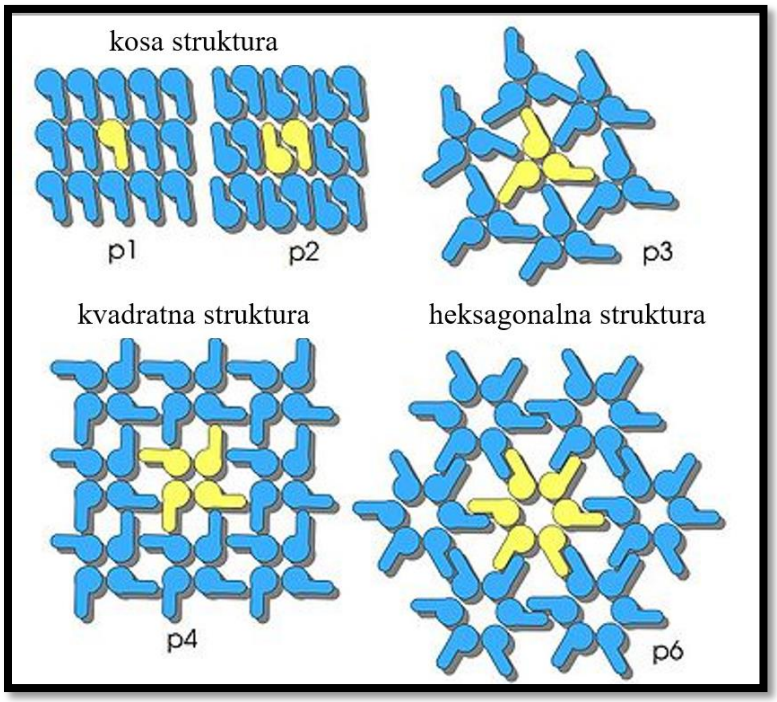
Za razliku od bakteriocina klase I i II, veliki bakteriolitički proteini klase III poput lizostafina, ne trebaju receptor nego izravno djeluju na staničnu stijenku Gram-pozitivnih bakterija i uzrokuju lizu i smrt stanice (Cotter i sur., 2005). Dok Gram-pozitivne bakterije imaju samoregulirane namjenske transportne mehanizme za oslobađanje bakteriocina, bakteriocini Gram-negativnih bakterija se obično oslobađaju staničnom lizom koja često ovisi o SOS regulaciji, zbog čega je njihova proizvodnja često smrtonosna za producenta (Chauhan, 2020). Također, imaju uži spektar antimikrobnog djelovanja u usporedbi s bakteriocinima Gram-pozitivnih bakterija što ograničava njihovu upotrebu. Bakteriocini Gram-negativnih bakterija iskazuju antimikrobno djelovanje pomoću dva mehanizma: formiranjem pora na unutarnjoj membrani (E492, M, H47) ili ometanjem metabolizma DNA, RNA i proteina, što zahtjeva ulazak bakteriocina u stanicu (Duquesne i sur., 2007). Tako mikrocin J25 inhibira RNA-polimerazu, mikrocin B17 DNA-girazu, a mikrocin C7-C51 aspartil-tRNA sintetazu, dok određeni bakteriocini pokazuju antimikrobno djelovanje DNA-znom (kolicin E2), RNA-znom (kolicin E3) i fosfolipaznom (megacin A-216) aktivnošću protiv ciljnog organizma (Negash i Tsehai, 2020).

2.7.2. S-proteini

Većina mikroorganizama, osim manjeg dijela prokariota koji su razvili strategije preživljavanja u veoma specifičnim i često ekstremnim uvjetima okoliša, mora preživljavati u visoko-kompetitivnim polimikrobnim staništima. Pritom selektivnu prednost određeni bakterijski sojevi osiguravaju sintezom dvodimenzionalnih, parakristalinskih, monomolekularnih nizova površinskih (*engl.* Surface, S) (gliko)proteina, koji u obliku sloja prekrivaju staničnu površinu stotina različitih vrsta gotovo svake taksonomske skupine Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija i arheja. Više od 400 vrsta bakterija i arheja prisutnih u prirodi posjeduju S-slojeve (Li i sur., 2020); najjednostavnije biološke (gliko)proteinske membrane razvijene tijekom evolucije (Banić i sur., 2018; Ilk i sur., 2011). Budući da su vanjski dijelovi stanice u direktnom kontaktu s okolišem i drugim stanicama, raznolikost u molekularnoj građi njihovih staničnih ovojnica, posebice najudaljenijih rubnih slojeva, odražava evolucionarne prilagodbe organizama specifičnim uvjetima okoliša. Iako je građa površinskog sloja stanice prokariota uglavnom slična i konzervirana unutar taksonomskih grupa, njihovi S-proteini se značajno razlikuju čak i unutar iste vrste (Carmo i sur., 2018).

2.7.2.1. Struktura i lokacija S-proteina

Slojevi S-proteina su najčešće građeni od jedne vrste (gliko)proteina molekularne mase 40-170 kDa (Messner i sur., 2010), koji su većinom bogati hidrofobnim aminokiselinama (40-60%), a siromašni aminokiselinama koje sadrže sumpor (Pum i Sleytr, 2014). pI vrijednosti većine S-proteina su niske i kreću se u rasponu 4-6, no kod nekih arheja i laktobacila su utvrđene pI vrijednosti proteina S-sloja vrijednosti između 8 i 10 (Sára i Sleytr, 2000). S-proteini roda *Lactobacillus* su obično mali (do 71 kDa) i visokobazični (pI>9), a zastupljeni su u vrstama *Lb. acidophilus, Lb. gallinarum, Lb. gasseri, Lb. johnsonii, Lb. brevis, Lb. helveticus* i *Lb. crispatus*. Identične podjedinice (gliko)proteina se raspoređuju u rešetku kose (p1, p2), kvadratne (p4) ili heksagonalne simetrije (p3, p6) s niskim sadržajem slobodne energije (Sleytr i sur., 2011). Ovisno o tipu rešetke, morfološke podjedinice se sastoje od jednog, dva, tri, četiri, odnosno šest monomera (slika 5). Udaljenost između centara morfoloških podjedinica iznosi 2,5-35 nm zbog čega su rešetke S-sloja vrlo porozne. Pore zauzimaju do 70 % površine rešetki sloja S-proteina te su ujednačene veličine (2-8 nm) i oblika. Bakterijski S-slojevi imaju prilično glatku vanjsku i nabranu unutarnju površinu te su obično debljine 5-10 nm, dok su S-slojevi arheja puno deblji.



Slika 5. Različite simetrije struktura S-sloja proteina (Anonymous 1, 2021)

S-proteini obuhvaćaju otprilike 10-20 % ukupnih staničnih proteina bakterija (Li i sur., 2020) te stoga predstavljaju zanimljive modelne sustave za proučavanje procesa uključenih u sintezu, izlučivanje i združivanje proteina. Iako je translokacija proteina kroz staničnu ovojnicu esencijalan proces u svim bakterijama, sekrecija proteina S-sloja predstavlja velik problem za bakterije zbog velike količine proteina potrebne za stvaranje parakristalinskog niza. Istraživanja *in vivo* morfogeneze S-proteina su pokazala da prekrivaju površinu mikroorganizma u svim fazama rasta (Rachel, 2010). Tijekom eksponencijalne faze rasta, približno 500 podjedinica S-proteina po sekundi mora biti sintetizirano, translocirano na površinu stanice i ugrađeno u postojeću rešetku S-proteina, zbog čega promotori gena koji kodiraju S-proteine moraju biti vrlo jaki (Klotz i Barrangou, 2018; Sleytr i sur., 2014). Dokazano je da je promotor gena S-proteina *Lb. acidophilus* dvostruko učinkovitiji od onog za laktat dehidrogenazu, koji se smatra jednim od najjačih bakterijskih promotora (Pouwels i sur, 1997). S-proteini sadrže N-terminalni sekrecijski signalni peptid koji se odcjepljuje nakon translokacije kroz plazminu membranu, s iznimkom proteina S-sloja nekih Gram-negativnih bakterija poput *Caulobacter crescentus, Campylobacter fetus* i *Serratia marcescens,* koji sadrže C-terminalni sekrecijski signalni peptid koji ostaje vezan na protein nakon njegovog transporta tip I sekretornim putem koji obuhvaća ABC (ATP-binding cassette) transporter unutarnje membrane i poru vanjske membrane.

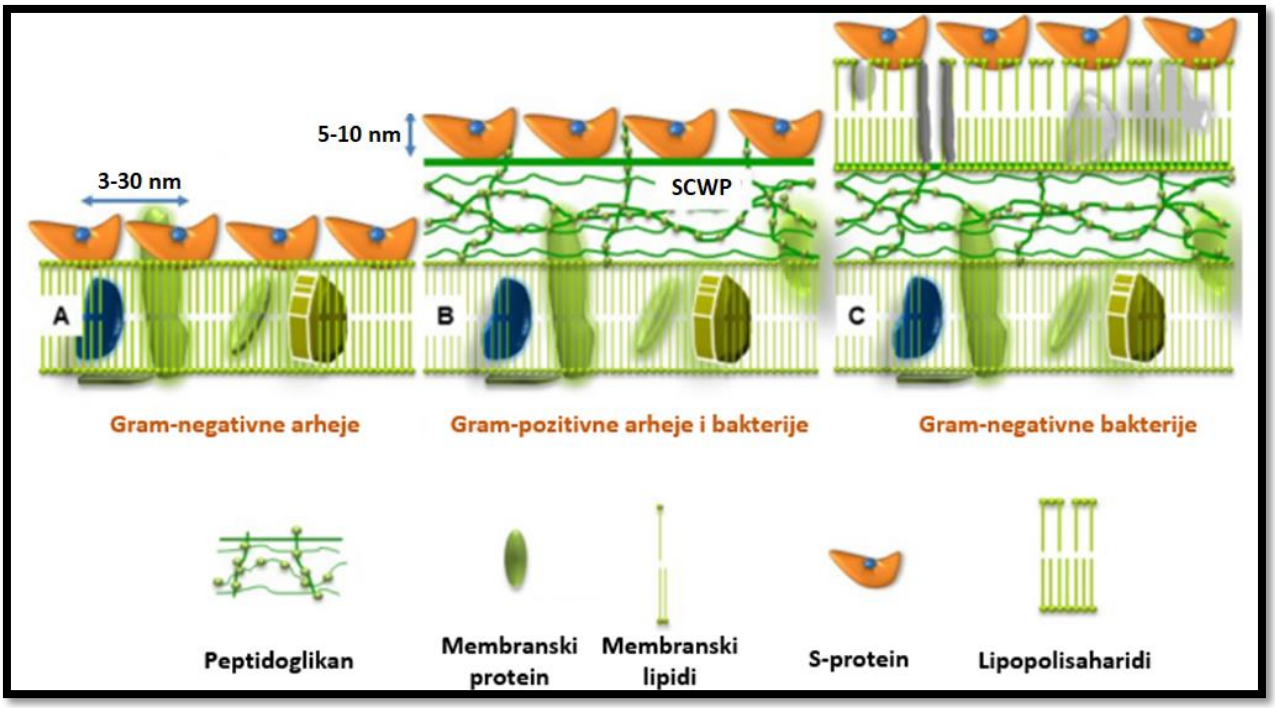
2.7.2.2. Vezanje S-proteina na površinu stanice

Pokazalo se da proteini S-sloja imaju najmanje 2 funkcionalne domene; vezujuću, odgovornu za vezanje proteina na staničnu stijenku te kristalizacijsku, koja posreduje u združivanju S-proteina, odnosno u S-protein-S-protein interakciji. Mehanizam vezanja S-proteina na površinu stanice domaćina ovisi o građi stanične stijenke jer S-proteini ulaze u nekovalentne interakcije s površinskim strukturama, najčešće LPS-ima Gram-negativnih i sekundarnim polimerima stanične stijenke (*engl.* Secondary Cell Wall Polimers, SCWPs) Gram-pozitivnih bakterija, koji su kovalentno vezani na peptidoglikan stanične stijenke (Sleytr i sur., 2014).

Vezanje sloja S-proteina na staničnu stijenku Gram-negativnih bakterija je općenito slabije proučeno te nije identificiran nikakav općeniti motiv S-proteina koji služi za vezanje, no zna se da se vezanje s LPS-ima vanjske membrane odvija preko N- ili C-terminalnog kraja S-proteina (Bingle i sur., 1997).

Vezanje kod Gram-pozitivnih bakterija je puno bolje objašnjeno i odvija se putem različitih konzerviranih vezujućih domena (SLH, CWB2 ili CWBD), koje se sastoje od tri uzastopno ponovljena motiva locirana na N- ili C-terminalnom kraju proteina. SLH domena je najčešća i nalazi se u S-proteinima puno *Bacillus* vrsta, *Thermus thermophillus*, *Deinococcus radiodurans*, *Clostridium thermocellum* itd., dok je CWB2 domena najčešća kod klostridija (Fagan i Fairweather, 2014). S-proteini *Lactobacillus* vrsta sadrže konzerviranu CWBD domenu koja može biti C-terminalna (*Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus*) ili N-terminalna (*Lb. brevis*) i služi za vezanje proteina na SCWP-e stanične stijenke te varijabilnu kristalizacijsku domenu na suprotnom kraju proteina koja služi za združivanje S-proteina (Hynönen i Palva, 2013). Do sada karakterizirani SCWP-i na koje se veže S-sloj laktobacila su teihonska kiselina, lipoteihonska kiselina i neutralni polisaharidi.

Kod Gram-negativnih arheja, sloj S-proteina često čini jedinu komponentu stanične stijenke koja se nalazi s vanjske strane citoplazmatske membrane te je uključen u procese određivanja oblika i dijeljenja stanice, dok stanična stijenka Gram-pozitivnih arheja posjeduje i peptidoglikan i polimere (npr. pseudomurein ili metanokondroitin), koji se nalaze između citoplazmatske membrane i S-proteina (slika 6).



Slika 6. Građa stanične ovojnice prokariota koje sadrže sloj S-proteina **A** Gram-negativne arheje: S-sloj je jedini sastojak stanične stijenke **B** Gram-pozitivne arheje i bakterije: stanična stijenka se sastoji uglavnom od peptidoglikana. Kod bakterija su prisutni SCWP-i, a u arhejama drugi polimeri (pseudomurein ili metanokondroitin) **C** Gram-negativne bakterije: sadrže tanki sloj peptidoglikana i vanjsku membranu (prilagođeno prema Sleytr i Beverigde, 1999)

2.7.2.3. Izolacija i posttranslacijske modifikacije S-proteina

Osjetljivost rešetki sloja S-proteina na razaranje u monomerne podjedinice i izolaciju iz potporne strukture stanice se značajno razlikuje. S-proteini se izoliraju iz dijelova stanične stijenke dobivenih razaranjem stanice dodatkom gvanidin hidroklorida (GHCl-a) ili uree koji cijepaju vodikovu vezu, trikloroctene kiseline, detergenata, etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) ili zamjenom kationa, npr. Na^+ ili Li^+ umjesto Ca^{2+} (Pum i sur., 2000). Ponekad čak i ispiranje stanica deioniziranom vodom može dovesti do raspadanja rešetke proteina S-sloja. S-slojevi arheja su povezani s citoplazmatskom membranom i stoga su iznimno otporni na najčešće korištene denaturirajuće agense te su za njihovu izolaciju potrebni posebni izolacijski postupci (Rachel, 2010).

Pri izolaciji S-proteina, često se izoliraju i proteini povezani sa S-slojem (*engl*. Surface Layer Associated Proteins, SLAPs), koji su vezani na rešetku S-proteina, te drugi proteini

nekovalentno vezani na staničnu stijenku, koji mogu imati različite funkcije (Carmo i sur., 2018). Pokazalo se da su ti proteini veoma važni za interakciju probiotičkih bakterija s domaćinom i da utječu na toleranciju stanice na stresne uvjete, preživljavanje u GIT-u, adheziju na stanice domaćina ili modulaciju upalnih procesa u crijevima. Različiti eksperimenti ekstrakcije i dezintegracije S-proteina su otkrili da su veze između podjedinica u rešetkama S-slojeva jače od onih koje povezuju te kristalinske nizove s potpornim slojem stanice (Sleytr i Beveridge, 1999). Ovo jedinstveno svojstvo je glavni uvjet za neprekidnu rekristalizaciju rešetke u raspored niske slobodne energije tijekom rasta i dijeljenja stanice. Kod mnogo S-slojeva, dokazano je da se izolirane podjedinice nakon uklanjanja disruptivnog agensa ponovno združuju u rešetke identične onima na netaknutim stanicama.

S-proteini podliježu posttranslacijskim modifikacijama, uključujući cijepanje karboksi- ili amino-terminalnih fragmenata te fosforilaciju i glikozilaciju proteina. Glikozilacija je značajna karakteristika mnogih arhejskih i ponekih bakterijskih proteina S-sloja. Većina glikana glikoproteina S-sloja arheja se sastoji od kratkih heteropolisaharida koji obično ne sadrže ponavljajuće jedinice i koji su N-glikozidnim kovalentnim vezama vezani na asparaginske ostatke ciljanog proteina. S-proteini arheja mogu biti i N- i O-glikozilirani, dok je kod bakterija N-glikozilacija vrlo rijetka i uglavnom zastupljena samo kod *Campylobacter*, *Helicobacter* i *Desulphovibrio* vrsta (Stimson i sur., 1995). Stupanj glikozilacije bakterijskih proteina S-sloja, odnosno kovalentnih O-glikozidnih veza glikana s odabranim serinskim, treoninskim i tirozinskim ostacima, obično varira između 2 i 10 %, te su proteini obično višestruko glikozilirani i oslanjaju se na puno veću raznolikost komponenti, tipova veza i struktura od eukariotskih glikana. Iako je većina S-proteina isključivo N- ili O-glikozilirana, ponekad mogu biti prisutne obje modifikacije na jednom proteinu, kao kod *Lb. kefiri* (Cavallero i sur., 2017).

2.7.2.4. Kristalizacija S-proteina

Provedene su brojne *in vitro* i *in vivo* studije kako bi se razjasnio dinamički proces ugradnje i ponovnog združivanja novosintetiziranih podjedinica S-proteina u rešetke S-sloja tijekom rasta stanice. Jedini uvjet za zadržavanje visokouređenih monomolekularnih nizova bez praznina na površini rastuće stanice je kontinuirana sinteza proteinskih podjedinica i njihova translokacija na mjesta nastajanja rešetke. U većini organizama, čini se da je brzina sinteze proteina S-sloja strogo kontroliran proces jer je moguće detektirati samo male količine slobodnih

S-proteina koji nisu ugrađeni u rešetku. S druge strane, istraživanja su pokazala da u peptidoglikanskom matriksu stanične stijenke bakterija iz porodice *Bacillaceae,* postoji zaliha S-proteina dovoljna za izgradnju barem još jednog cjelovitog sloja S-proteina (Breitwieser i sur., 1992).

Formiranje nizova S-proteina određeno je aminokiselinskom sekvencom polipeptidnih lanaca i tercijarnom strukturom proteina S-sloja, a budući da proteini S-sloja imaju visok udio nepolarnih aminokiselina, najvjerojatnije su hidrofobne interakcije uključene u početni stadij procesa združivanja. Neki S-slojevi su stabilizirani dvovalentnim kationima poput Ca^{2+} ili Mg^{2+} kod ekstremnih halofila, koji ulaze u interakcije s kiselim aminokiselinama (Baranova i sur., 2012). Studije o raspodjeli funkcionalnih skupina na površini proteina su pokazale da su slobodne karboksilne i amino skupine smještene u velikoj blizini zbog čega elektrostatskim interakcijama doprinose koheziji proteina (Györvary i sur., 2004).

Proteini S-sloja su međusobno nekovalentno povezani, a u slučaju njihove adhezije na potporne strukture (npr. silikon, metalne čvrste površine, polimerne čvrste površine ili lipidne membrane), za strukturalni integritet su odgovorne i različite kombinacije slabih interakcija (hidrofobne, vodikove te ionske veze koje uključuju dvovalentne katione ili direktnu interakciju polarnih skupina). Eksperimenti dezintegracije i ponovnog združivanja S-proteina su doveli do zaključka da su veze koje drže proteine S-sloja na okupu puno snažnije od onih koje ih vežu na potporu. Budući da nikad nije uočeno da jednom ugrađeni proteini S-sloja napuštaju rešetku, može se zaključiti da je rast rešetke ireverzibilan jer takav konformacijski raspored S-proteina predstavlja stanje najniže slobodne energije. Tijekom dijalize disruptivnog agensa nasuprot puferske otopine, dolazi do ponovnog združivanja S-proteina, što je moguće kontrolirati promjenom pH i ionske jakosti okoliša. Formiranje koherentnih kristalinskih domena ovisi o vrsti proteina S-sloja, okolišnim uvjetima i svojstvima stanične površine, pa je tako formiranje S-sloja puno brže na hidrofobnim nego na hidrofilnim površinama.

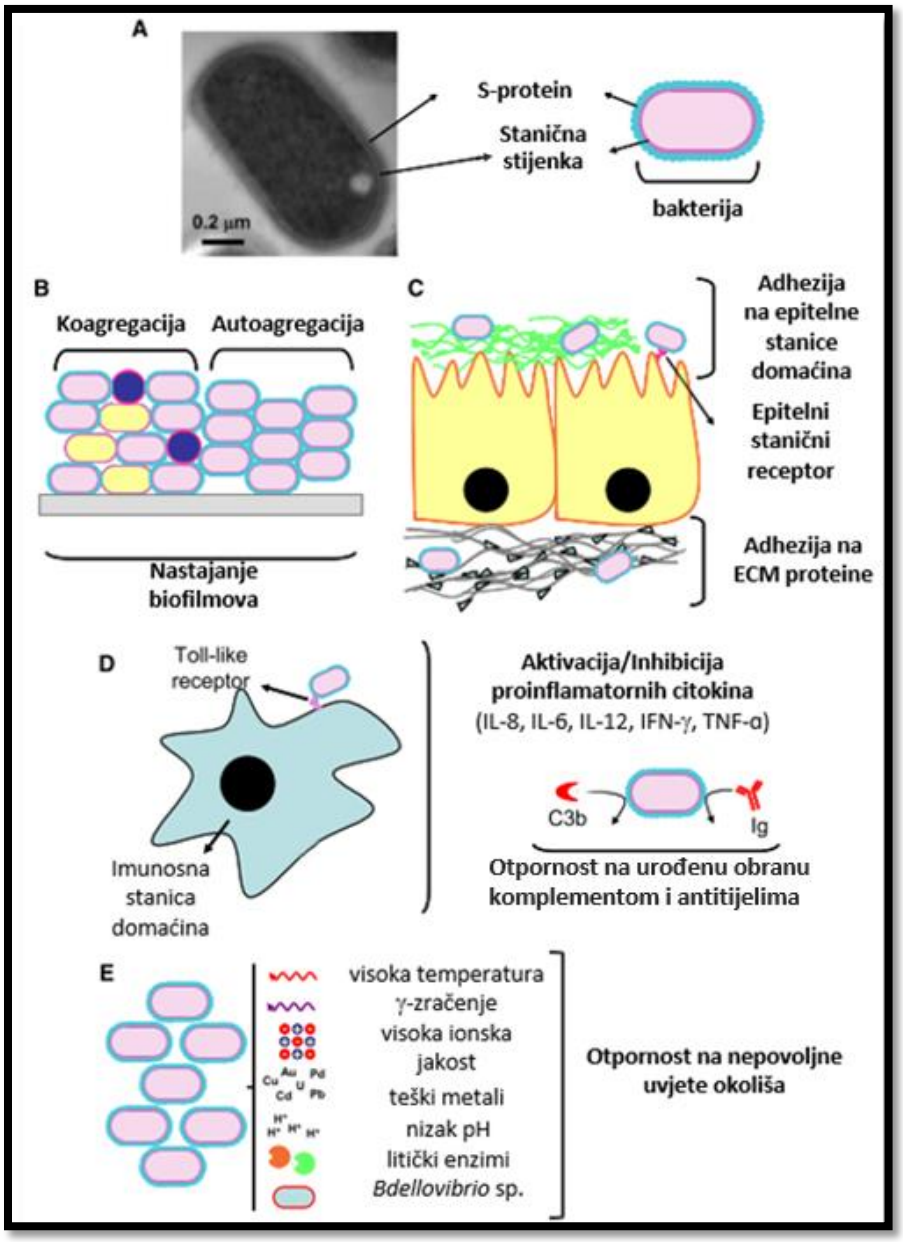
Najvažnija svojstva proteina S-sloja mogu biti promijenjena kemijskim modifikacijama i genetičkim inženjerstvom, nakon čega se oni mogu ponovno združiti *in vitro* i formirati kristalnu rešetku na različitim površinama ili u suspenziji (Pum i Sleytr, 2014). Istraživanja proteina S-sloja su pokazala i da fuzijski proteini mogu formirati kristalnu rešetku nakon genetičke rekombinacije i ekspresije gena koji kodira za S-protein sa stranim fragmentom (Li i sur., 2020).

Uspješno su konstruirani različiti fuzijski proteini SbpA proteina S-sloja te zelenog fluorescentnog proteina, kamelidnog antitijela i IgG-vezujuće domene (Pleschberger i sur., 2004).

S-proteini su raspoređeni u uređenu rešetku s brojnim karboksilnim, amino i hidroksilnim funkcionalnim skupinama i stoga može vezati funkcionalne molekule kovalentnim i nekovalentnim vezama (Li i sur., 2020). Nakon imobilizacije funkcionalnih molekula na S-sloj, one zadržavaju aktivnost i S-sloj se može ponovno rekristalizirati na različitim površinama (Li i sur., 2020). Mnoge funkcionalne molekule poput enzima, antitijela i antigena se mogu uspješno imobilizirati na površinu S-sloja te koristiti kao biosenzori visoke osjetljivosti za detekciju šećera u krvi i drugih analita. S-proteini se uspješno koriste u različitim biosenzorima temeljenim na glukoza-oksidazi, a primjenjivi su i u senzorima za kolesterol i kisik (Guimarães i sur., 2014). U posljednje vrijeme, pokazalo se da senzori temeljeni na S-proteinima mogu detektirati receptore folata u stanicama raka dojke i stanične markere u ovalnim stanicama jetre i tumorskim stanicama (Damiati i sur., 2018). Studije o strukturi, morfogenezi, kemiji, genetici, združivanju, funkciji i evolucijskoj povezanosti S-slojeva, otkrile su da su S-proteini metabolički vrijedni proizvodi koji imaju veliki potencijal primjene u (nano)biotehnologiji, biomimetici, biomedicini i sintetičkoj biologiji.

2.7.2.5. Uloga S-proteina

Geni proteina S-sloja su obično visoko-eksprimirani, ali je ukupna sličnost njihovih sekvenci vrlo niska. Stoga se potvrda prisutnosti S-proteina uglavnom provodi elektronskom mikroskopijom (slika 7A), a najboljom tehnikom pripreme uzorka pokazao se „freeze-etching“ (Rachel, 2010). Za karakterizaciju rešetki sloja S-proteina, sve se češće koristi mikroskopija atomskih sila (*engl*. AFM-atomic force microscopy), mikroskopiranje sa skenirajućom sondom te tehnike rasapa X-zraka i neutrona (Baranova i sur., 2012).



Slika 7. A Sloj S-proteina vidljiv skenirajućim elektronskim mikroskopom (60 000 x) **B-E** Najvažnije funkcije S-proteina: **B** Utjecaj na agregaciju i nastanak biofilmova **C** Uloga u adheziji na stanične linije (Caco-2, HeLa, Hep-2), mucin i proteine ekstracelularnog matriksa (laminin, fibronektin i kolagen) **D** Interakcija S-proteina s TLR2 i TLR4 uzrokuje modulaciju citokina koje izlučuju monociti, makrofagi i dendritičke stanice. S-proteini štite patogene od urođene obrane komplementom i od antitijela **E** Bakterijama pruža otpornost na GI uvjete (nizak pH, proteolitičke enzime), ekstremne uvjete okoliša (visoku temperaturu i ionsku jakost, γ-zračenje i teške metale), a neke vrste štiti od predatorske bakterije *Bdellovibrio bacteriovorans* (prilagođeno prema Gerbino i sur., 2015)

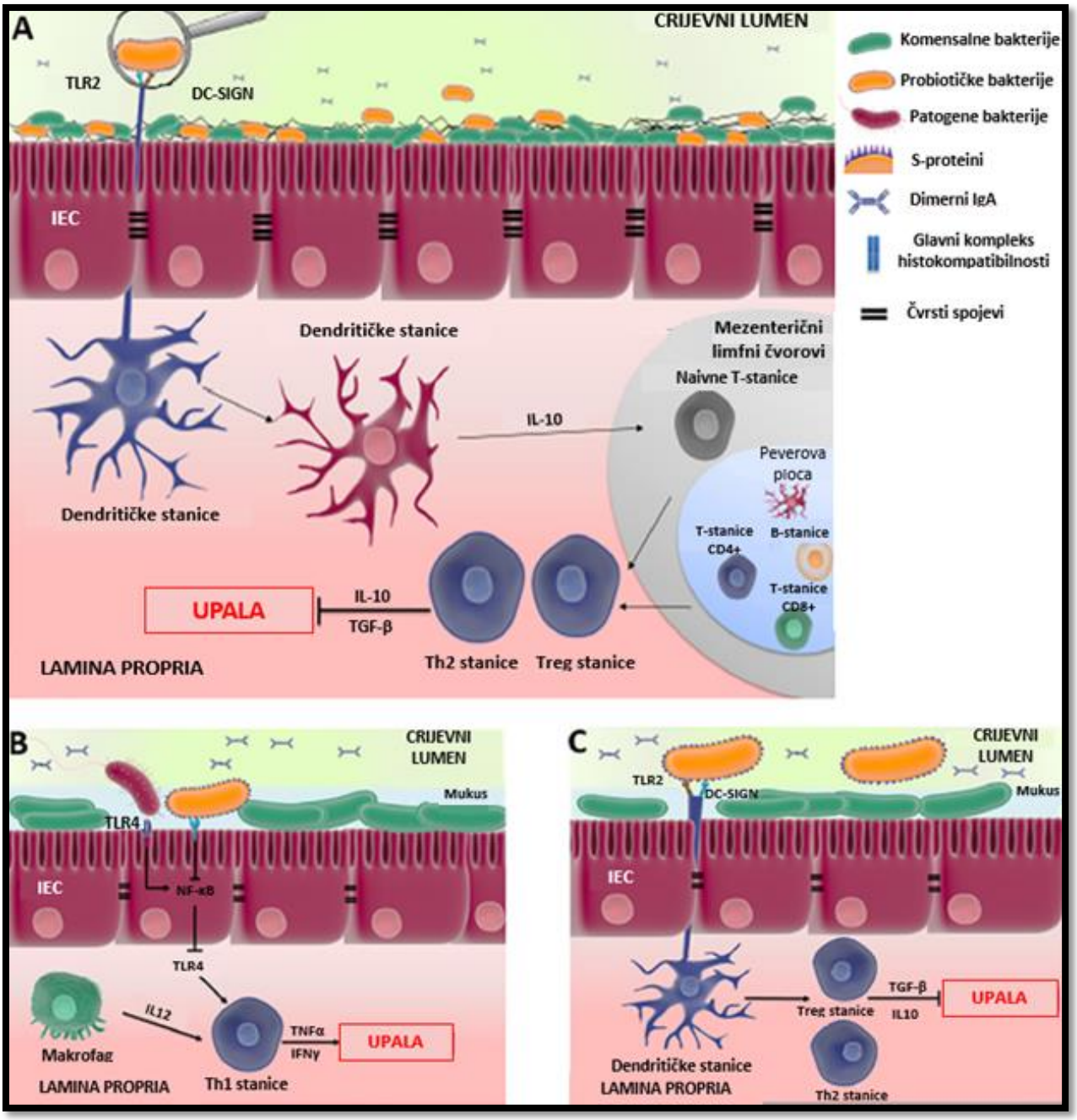
U nativnim slojevima S-proteina, karboksilne su skupine neutralizirane jednakim brojem amino skupina što vodi neutralnom naboju vanjske površine (Weigert i Sára, 1995). Sloj S-proteina Gram-pozitivnih bakterija maskira *netto* negativan naboj peptidoglikanskog sloja što značajno utječe na interakcije između živih stanica i njihovog okoliša. S-slojevi mogu ulaziti u interakcije s materijalima različitih fizikalno-kemijskih svojstava i tako potaknuti adheziju cijelih stanica na čvrste površine. Prisutnost sloja S-proteina čini površinu stanice puno hidrofobnijom (Petrova i sur., 2019), a utječe i na mnoga površinska svojstva stanice te poboljšava autoagregaciju i koagregaciju s drugim bakterijama i plijesnima (slika 7B) te adheziju na mucin, eukariotske stanice i proteine ECM-a, što je nužan preduvjet kolonizacije i metaboličke aktivnosti u crijevima domaćina (slika 7C). Bakterije u prirodi ulaze u međusobne interakcije i bivaju uklopljene u matriks egzopolimera (EPS-a (gliko)proteina, (gliko)lipida, i ekstracelularne DNA) koje su same proizvele i na taj način formiraju složene mikrobne zajednice (biofilmove) pričvršćene na površinu (slika 7B). Bakterije u biofilmovima su otpornije od planktonskih na stresne uvjete okoliša, antimikrobne agense i mehanizme obrane domaćina. Preferirani bakterijski životni stil uvelike ovisi o sastojcima površine stanice i stoga se smatra S-proteini imaju važnu ulogu u nastajanju biofilmova.

Otpornost S-proteina na ekstremne okolišne uvjete (npr. visoke temperature, niski pH, veliku ionsku jakost) sugerira njihovu moguću ulogu u zaštiti i stabilnosti stanica. Smatra se da prisutnost puno kopija *slp* gena u genomu omogućava bakterijskim sojevima brzu adaptaciju na promjenjive uvjete okoliša. To je posebice očito kod Gram-negativnih ekstremofilnih arheja, kod kojih su S-proteini pričvršćeni na citoplazmatsku membranu. U *Deinococcus radiodurans* R1, delecija *slpA* gena je uzrokovala značajne promjene strukture stanične ovojnice i smanjenje odgovora na stresne uvjete u usporedbi s divljim tipom. Kao najizloženiji sloj mikroorganizama u odsutnosti kapsule i glikokaliksa, sloj S-proteina je u direktnom kontaktu s bakterijskim okolišem i pruža domaćinu selekcijsku prednost u visokokompetitivnim staništima kakav je GIT čovjeka jer štiti stanicu od nepovoljnih uvjeta okoliša poput osmotskog i mehaničkog stresa, promjena pH, antimikrobnih peptida i bakteriolitičkih enzima, zračenja te bakteriofaga i drugih mikrobnih predatora (slika 7E). Naime, sloj S-proteina onemogućava pristup litičkim enzimima poput muramidaza i proteaza te štiti stanicu od antimikrobnih peptida prisutnih u okolišu (de la Fuente-Núñez i sur., 2012). S-proteini Gram-negativnih bakterija poput *A. salmonicida*, *C. fetus*, *A. serpens* i *C. crescentus* štite stanice od napada bakterijskih parazita prekrivanjem komponenti i

receptora vanjske membrane, ali ne pokazuju zaštitnu funkciju protiv drugih predatora poput protozoa (Beveridge i sur., 1997). Smatra se da S-proteini imaju ulogu i u uklanjanju toksičnih metala iz onečišćenog tla i vode u rudarskim područjima koji sadrže visoku koncentraciju metala i radionuklida. Naime, bakterije koje žive u takvim područjima posjeduju različite mehanizme biotransformacije metala i radionuklida uključujući biosorpciju i bioakumulaciju te se mogu koristiti za pročišćavanje otpadnih voda, obnavljanje dragocjenih metala iz otpada elektroničke industrije i za proizvodnju nano-nakupina metala.

S-proteini patogenih i nepatogenih mikroorganizama su uključeni u njihovu interakciju s imunosnim sustavom domaćina (slika 7D). S-proteini probiotičkih bakterija mogu smanjiti aktivaciju NF-kB i posljedično ekspresiju IL-8 u crijevnim epitelnim stanicama i tako ublažiti upalni odgovor uzrokovan patogenima (slika 8B). Taverniti i sur. (2013) su pokazali da pročišćeni SlpA *Lb. helveticus* MIMLh5 djeluje protuupalno smanjenjem aktivacije NF-κB na crijevnim epitelnim Caco-2 stanicama, istodobno djelujući kao stimulator urođenog imunosnog sustava izazivanjem ekspresije proinflamatornih faktora poput TNFα i ciklooksigenaze 2 (*engl.* Cyclooxygenase 2, COX-2) u staničnoj liniji ljudskih makrofaga U937 prepoznavanjem putem Toll-like 2 receptora (TLR 2).

Osim s crijevnim epitelnim stanicama, S-proteini ulaze i u interakcije s antigen-prezentirajućim stanicama poput dendritičkih stanica koje se nalaze u Peyerovoj ploči, lamini propriji i mezenteričnim limfnim čvorovima. Dendritičke stanice su glavni stimulatori naivnih T-stanica koje potiču njihovu diferencijaciju prema Th1, Th2, nepolariziranim T-stanicama, Th17 ili T-regulatornim (Treg) staničnim odgovorima (slika 8A). S-proteini doprinose protuupalnom efektu probiotičkih bakterija u crijevima tako što ulaze u interakciju s dendritičkim stanicama putem različitih PRR-a, što inicira diferencijaciju Treg stanica, kako je prikazano na slici 8C. Konstantinov i sur. (2008) su pomoću „knock-out mutanata“ dokazali da SlpA protein *Lb. acidophilus* NCFM ulazi u interakcije s glavnim receptorom (DC-SIGN) na površini dendritičkih stanica. Također, S-proteini *Lb. acidophilus, Lb. brevis, Lb. helveticus* i *Lb. kefiri* blokiraju DC-SIGN receptore *in vitro* i sprječavaju adheziju patogenih bakterija na stanice koje ih sadrže (Prado Acosta i sur., 2016).



Slika 8. Međudjelovanje probiotičkih bakterija i domaćina posredovano crijevnim epitelnim stanicama i stanicama imunosnog sustava **A** Interakcija antigen-prezentirajućih (dendritičkih) stanica s probiotičkim bakterijama dovodi do indukcije Treg/Th2 protuupalnog odgovora, dok interakcija dendritičkih stanica i patogenih bakterija inducira Th1/Th17 proupalni odgovor **B** S-proteini inhibiraju proupalni odgovor epitelnih stanica redukcijom NF-κB aktivnosti inducirane patogenim bakterijama **C** Proteine S-sloja prepoznaju dendritičke stanice pomoću DC-SIGN i TLR2 receptora što inducira imunosni odgovor (prilagođeno prema Carmo i sur., 2018)

S-proteini patogenih bakterija čine korisne alate za izbjegavanje mehanizama imunosnog sustava domaćina. Doprinose njihovoj virulenciji putem nekoliko mehanizama poput adhezije na stanice domaćina ili komponente ECM, koagregacije s drugim mikroorganizmima, nastajanja biofilmova i izbjegavanja imunosnog odgovora modulacijom odgovora T-stanica, antigenskom varijacijom i zaštitom od komplementom-posredovanog ubijanja i fagocitoze. Dokazano je da je prisutnost S-sloja *Bacillus anthracis* i *Bacillus cereus* G9241, važna za patogenezu antraksa i bolesti sličnih antraksu i da S-proteini i SLAP-i imaju različite funkcije tijekom infekcije (Wang i sur, 2013). Jedna od njih je kontrola duljine lanca vegetativnih oblika, što je mehanizam bakterijskog izbjegavanja ubijanja opsonizacijom. Naime, ako duljina lanca bacila premašuje veličinu makrofaga ili granulocita, bakterije ne mogu biti progutane (Wang i sur., 2013). Proteini S-sloja posreduju u vezanju *Clostridium difficile* na crijevne epitelne stanice i na komponente njihovog ECM, što doprinosi daljnjem oštećenju tkiva (Cerquetti i sur., 2002). Usto, S-proteini *C. difficile* imaju svojstvo modulacije funkcije humanih monocita i dendritičkih stanica te indukcije inflamatornih i regulatornih citokina i tako mogu podesiti ravnotežu Th1/Th2 odgovora i utjecati na odaziv antitijela. Stoga se razmatra potencijalna uporaba proteina S-sloja u višekomponentnom cjepivu protiv *C. difficile* kod visokorizičnih pacijenata. Proteini S-sloja imaju ključnu ulogu i u virulenciji *Campylobacter fetus*, štiteći bakteriju od fagocitoze i ubijanja serumom, a S-proteini periodontalnog patogena *Campylobacter rectus* induciraju inhibiciju proinflamatornih citokina poput IL-6, IL-8 i TNF-α (Wang i sur., 2000).

Budući da sastojci površine često posreduju u specifičnim interakcijama patogena s domaćinom, smatra se da S-proteini patogenih sojeva imaju važnu ulogu u virulenciji i stoga čine glavne kandidate za razvoj cjepiva. Trenutni eksperimenti se fokusiraju na korištenje proteina S-sloja kao atenuiranih patogena, nosača antigena/haptena, katalizatora i sastojaka cjepiva (Sleytr i sur., 2002). Proizvedeno je nekoliko konjugatnih cjepiva s proteinima S-sloja i ugljikohidratnim antigenima (poli- i oligosaharidima), haptenima ili rekombinantnim alergenom polena breze Bet v1, koja su dala obećavajuće rezultate u ispitivanjima učinkovitosti cjepiva. Prve studije o primjenjivosti sloja S-proteina kao nosača cjepiva za liječenje alergije tipa 1 su provedene korištenjem pripravaka S-sloja i stanične stijenke *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111–69 i L110–69 i *Lysinibacillus sphaericus* CCM 2177 te za imobilizaciju rekombinantnog glavnog alergena polena breze Bet v1 (Jahn-Schmid i sur., 1996). Stimulacija ljudskih alergen-specifičnih Th2 limfocita s Bet v1 konjugiranim sa S-proteinima, rezultirala je modulacijom

načina proizvodnje citokina što sugerira da bi S-proteini mogli biti prikladni nosači za imunoterapijska cjepiva za tip 1 hipersenzitivnost. Ubrzo su postupci kemijskog združivanja zamijenjeni genetičkom fuzijom glavnog alergena polena breze Bet v1 s bakterijskim proteinima S-sloja što je rezultiralo nastajanjem rekombinantnih fuzijskih proteina koji su pokazivali smanjenu alergenost i imunomodulatorni kapacitet. U nedavnoj studiji je za ekspresiju rekombinantnog S-protein/alergen fuzijskog proteina rSbpA/Betv1 korištena Gram-pozitivna, nepatogena bakterija *Bacillus subtilis* 1012 koja ima visok sekretorni kapacitet (Ilk i sur., 2011). Strukturalna i imunološka ispitivanja dobivenog fuzijskog proteina su pokazala da rSbpA/Bet v1 ne sadrži endotoksin i da ima izvrsna rekristalizacijska svojstva i imunoreaktivnost. Na taj način je po prvi put proizveden rekombinantni fuzijski protein za razvoj cjepiva korištenjem Gram-pozitivnog ekspresijskog sustava *B. subtilis* 1012.

Prikaz heterolognih proteina na površini stanica BMK daje obećavajuće rezultate za razvoj živih mukoznih cjepiva korištenjem *Lactobacillus* sojeva koji sadrže S-slojeve građene od hibridnih proteina (Hynönen i Palva, 2013). Većina BMK su otporne na nizak pH i žučne soli i ulaze u interakcije s imunosnim sustavom, što ih čini idealnim kandidatima za nosače antigena (Li i sur., 2020). U usporedbi s tradicionalnom intravenoznom ili intramišićnom primjenom cjepiva, mukozni put omogućava oralnu primjenu cjepiva što smanjuje potencijalne nuspojave, a pojačava specifičnost u liječenju kroničnih bolesti i infekcija povezanih s mukoznim tkivima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

Uzorke mlijeka te uzorke fecesa dojenčadi, navedene u tablici 1, prikupljale su majke (n=5), dobrovoljne sudionice istraživanja, isti dan u zasebne sterilne posudice u 3 odvojena termina; unutar 7 dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta. Neposredno prije prikupljanja svakog uzorka, majke su oprale bradavice, areole te ruke sapunom i vodom. Uzorci mlijeka su prikupljeni prije samog dojenja izdajanjem manualnom ekspresijom u sterilne posudice, pri čemu je prvih nekoliko kapljica mlijeka odbačeno. Prvi sljedeći uzorak fecesa dojenčadi je također prikupljen u zasebnu sterilnu posudicu. Ukupno je prikupljeno 15 uzoraka mlijeka i 15 uzoraka fecesa dojenčadi. Za prikupljanje i rad s navedenim uzorcima, dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva (Br. 380-59-10106-17-100/99, Klasa 641-01/17-02/01) Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su smrznuti odmah nakon prikupljanja i u tom stanju transportirani u Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i pohranjeni na -80 °C do daljnjih analiza.

Tablica 1. Uzorci majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi korišteni u ovom radu

Oznaka dojilje	Vrijeme uzorkovanja	Oznaka uzorka mlijeka	Oznaka uzorka fecesa
KR	Unutar 7 dana nakon poroda	KRM1	KRF1
	Mjesec dana nakon poroda	KRM2	KRF2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	KRM3	KRF3
MC	Unutar 7 dana nakon poroda	MCM1	MCF1
	Mjesec dana nakon poroda	MCM2	MCF2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	MCM3	MCF3
AF	Unutar 7 dana nakon poroda	AFM1	AFF1
	Mjesec dana nakon poroda	AFM2	AFF2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	AFM3	AFF3
MB	Unutar 7 dana nakon poroda	MBM1	MBF1
	Mjesec dana nakon poroda	MBM2	MBF2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	MBM3	MBF3
RS	Unutar 7 dana nakon poroda	RSM1	RSF1
	Mjesec dana nakon poroda	RSM2	RSF2
	Mjesec dana nakon uvođenja krute hrane	RSM3	RSF3

3.1.2. Mikroorganizmi

U ovom radu ukupno je izolirano 100 bakterijskih sojeva, po 20 iz uzoraka mlijeka svake od 5 dojilja. Uz sojeve izolirane iz majčinog mlijeka, korišteni su i *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus plantarum* SF9C, autohtoni sojevi BMK i producenti potencijalnih terapijskih biomolekula S-proteina i bakteriocina, izolirani iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa. Kao pozitivna kontrola u ispitivanju prisutnosti sloja S-proteina te njegovog utjecaja na probiotička svojstva soja producenta, korišten je soj *Lactobacillus helveticus* M92 koji posjeduje S-sloj, dok je kao negativna kontrola korišten soj *Lactobacillus plantarum* D13 koji ne sadrži S-sloj. U ispitivanju antimikrobnog djelovanja i koagregacije, korišteni su test-mikroorganizmimi *Staphylococcus aureus* 3048, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1 i *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™. Svi navedeni sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.3. Stanične linije

Caco-2 stanična linija je kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela. Pohranjena je na -80 °C u mediju (Eagle's minimal essential medium, EMEM) s dodatkom 10 % glicerola kao krioprotektivnog sredstva.

3.1.4. 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^{-1} destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvaščev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0,1; $MnSO_4$ x $7H_20$ 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 BMK roda *Lactococcus*

- M17 agar („Biolife“, Italija), sastava (g L^{-1} destilirane vode): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5; pepton 2,5; sojin pepton 5; kvaščev ekstrakt 2,5; mesni ekstrakt 5; laktoza 5; natrijev

glicerofosfat 19; magnezijev sulfat 0,25; askorbinska kiselina 0,5. pH vrijednost podloge iznosi 7,1, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

- M17 bujon („Biolife“, Italija), istog sastava kao podloga M17 agar, ali bez dodatka agara.

c) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test-mikroorganizama

- HA (hranjivi agar) („Biolife“, Italija), sastava (g L^{-1} destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K-fosfat 0,3; agar 18. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
- HB (hranjivi bujon) („Biolife“, Italija), istog sastava kao HA, ali bez dodatka agara

d) hranjive podloge za kultivaciju staničnih linija

- Eagle's minimal essential medium (EMEM) s 10 % fetalnog goveđeg seruma (Thermo Fisher Scientific, SAD) za kultivaciju Caco-2 stanične linije

3.1.5. Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- 2’, 3’-dideoksinukleotidi, „TaKaRa”, SAD
- agaroza, „Appligane“, Francuska
- akrilamid/bisakrilamid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- alginat, „Fluka“, Švicarska
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- bromfenol plavo, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Coomassie Brilliant Blue, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Deoksinukleotidi, „TaKaRa”, SAD
- EDTA, „Sigma-Aldrich“, SAD
- EmeraldAmp Max HS PCR Master Mix (2x Premix), „TaKaRa“, Japan
- etanol, 70 % (v v^{-1}) „Kemika“, Hrvatska
- etanol, apsolutni, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Njemačka
- fenilmetilsulfonil fluorid „Sigma-Aldrich“, SAD
- Folin-Ciocalteau Fenol reagens, „Merck”, Njemačka
- formamid, „BioRad“, SAD

- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- fosfo-PHF-Tau monoklonalna antitijela, „Termo Fisher Scientific, SAD”
- fruktooligosaharid (FOS), „Magdis d.o.o.”, Hrvatska
- fruktoza, „Kemika“, Hrvatska
- galaktoza, „Kemika“, Hrvatska
- Genomic Wizard DNA Purification kit, „Promega“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- glicin, „Gram-mol“, Hrvatska
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- GoTaq G2 Hot Start polimeraza, „Promega“, SAD
- gvanidin hidroklorid, „Sigma-Aldrich”, SAD
- HotStarTaq Plus Master Mix Kit, „Qiagen“, SAD
- Iba1 antitijela, „Wako Pure Chemical Industries”, Japan
- inulin, „Difco”, SAD
- kalijev hidroksid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- ketamin, „Vetoquinol“, Švicarska
- klorovodična kiselina, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kristal violet, „Sigma-Aldrich“, SAD
- ksilazin, „Vetoquinol Biowet“, Poljska
- laktoza, „Kemika“, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- Maxwell 16S Tissue DNA purification kit, „Promega“, SAD
- metanol, „Sigma-Aldrich“, SAD
- metilensko modrilo R-250, „Sigma-Aldrich“, SAD
- $MgCl_2$, „Applied Biosystems”, SAD
- mikrotitarske pločice presvučene fibronektinom, lamininom i kolagenom, Corning® BioCoat™, „Corning Inc.“, SAD
- mineralno ulje, „BioMérieux”, Francuska
- mliječna kiselina, „Kemika“, Hrvatska

- natrijev dodecilsulfat, „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijev klorid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijeva lužina, „Kemika“, Hrvatska
- Nextera DNA Library Preparation Kit, „Illumina“ SAD
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- obrano mlijeko, „Fluka”, Njemačka
- octena kiselina, „Carlo Erba“, Italija
- Oxgall žučne soli, „Difco“, SAD
- pankreatin, „Fluka”, Švicarska
- pepsin, „Sigma-Aldrich“, SAD
- početnice „Invitrogen“, SAD
- proteinaza K, „Invitrogen”, SAD
- pufer bez $MgCl_2$, „Applied Biosystems”, SAD
- QIAquick PCR purification kit, „QIAGEN”, Njemačka
- Ringerova otopina, „Merck”, Njemačka
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- saharoza, „Kemika“, Hrvatska
- sorbitol, „Kemika“, Hrvatska
- standard za elektroforezu proteina ProSieve QuadColor (molekulske mase 4,6-315 kDa), „Lonza“, SAD
- TAE pufer, „BioRad“, SAD
- Taq polimeraza, „TaKaRa”, SAD
- TE pufer, „Sigma-Aldrich“, SAD
- TEMED (N', N', N', N'-tetrametiletilen), „Sigma-Aldrich“, SAD
- trikloroctena kiselina, „ Termo Fisher Scientific”, SAD
- tripsin, „Merck”, Njemačka
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- Triton X-100, „AppliChem”, Njemačka
- urea, „BioRad“, SAD
- žučne soli, „Difco”, SAD

- β-amiloidna antitijela (4G8), „BioLegend”, SAD
- β-merkaptoetanol, „Sigma-Aldrich“, SAD
- κ-karagenan, „Sigma-Aldrich“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada

3.1.6. Aparatura i pribor

- Agilent 2100 Bioanalyzer, „Agilent Technologies“, SAD
- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- BioSpec-nano, „Shimadzu“, Japan
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- denzitometar, „BioMérieux“, Francuska
- DGGE uređaj, „Bio-Rad Laboratories“, SAD
- digitalna kamera AxioCam ERc5s, „Zeiss“, Njemačka
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyer tikvice, „Golias“, Slovenija
- fluorometar Qubit 2,0, „Invitrogen“, SAD
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD
- kadica za elektroforezu, „Eppendorf“, SAD
- kivete za centrifugiranje 15 ml i 50 ml, „Falcon“, Engleska
- kivete, „Eppendorf“, SAD
- liofilizator CHRIST Alpha 1–2 LDplus, „Martin Christ“, Njemačka
- magnetna mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- Maxwell 16 Research System instrument, „Promega“, SAD
- mikrobiološka ušica, „Syntesys“, Italija
- mikrotitarske pločice s 96 i 24 jažice, „Falcon“, SAD

- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- PCR uređaj ABI 2720, „Applied Biosystems“, SAD
- petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta, „Isolab“, Njemačka
- plastične tubice od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- sekvencer MiSeq2500, „Illumina“, SAD
- sonikator Sonopuls mini20, „Bandelin“, Njemačka
- stalci za epruvete, „NeoLab“, Njemačka
- stalci za kivete, „NeoLab“, Njemačka
- T-boca 25 cm^3, „Corning“, SAD
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNR Bio-Imaging Systems Ltd.”, Izrael
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vodena kupelj, „Inkolab“, Hrvatska
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD

3.1.7. API

API 50 CHL strip (BioMérieux, Francuska) sadrži 49 ampula ispunjenih različitim ugljikohidratima te omogućuje identifikaciju bakterija iz roda *Lactobacillus* i srodnih rodova softverskim očitanjem fermentacijskog profila mikroorganizma dobivenog nakon inkubacije inokuliranog API 50 CHL medija u ampulama. Medij (BioMérieux, Francuska) je pH vrijednosti 6,1-7,1 i sastava (g L^{-1}): polipepton 10; ekstrakt kvasca 5; Tween 80 1; dikalijev fosfat 2; natrijev acetat 5; diamonijev citrat 2; magnezijev sulfat 0,20; manganov sulfat 0,05; bromkrezol ljubičasto 0,17.

3.1.8. Antibiotici

Za ispitivanje osjetljivosti izoliranih bakterijskih sojeva na antibiotike disk-difuzijskom metodom korišteni su BD BBL™ Sensi-Disc™ (BD Diagnostic Systems, SAD) filter diskovi promjera 6 mm koji sadrže poznatu količinu antibiotika:

- ampicilin 10 μg
- eritromicin 15 μg
- gentamicin 10 μg
- klindamicin 2 μg
- kloramfenikol 30 μg
- kanamicin 30 μg
- streptomicin 10 μg
- tetraciklin 30 μg
- vankomicin 30 μg

Osjetljivost odabranih bakterijskih sojeva na navedene antibiotike ispitana je i primjenom M. I. C. E. Evaluators™ E-testa (Oxoid Ltd., UK)., odnosno očitavanjem minimalne inhibicijske koncentracije (*engl.* Minimum inhibitory concentration, MIC) na vrhu zone inhibicije oko test-vrpce koja sadrži antibiotik ampicilin, eritromicin, gentamicin, klindamicin, kloramfenikol, kanamicin, tetraciklin ili vankomicin u gradijentu koncentracije 0,016-256 μg mL^{-1}, odnosno streptomicin u gradijentu koncentracije 0,064-1026 μg mL^{-1}.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Izolacija DNA iz majčinog mlijeka

5 mL uzorka mlijeka centrifugirano je 10 min pri 3600 g i 4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta i masnog sloja, bakterijske stanice prisutne u talogu su lizirane dvosatnom inkubacijom u 200 µL otopine lizozima (5 mg mL^{-1}) 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 kaseta Maxwell 16 Tissue DNA purification kita, koje su umetnute u Maxwell 16 Research System uređaj za automatsku izolaciju DNA. Nakon završetka ekstrakcije DNA, spojeni su eluati 3 paralele izolirane DNA svakog uzorka mlijeka. Spektrofotometrijski je određena koncentracija DNA prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3. te su uzorci pohranjeni na -20 °C do daljnjih analiza.

3.2.2. Izolacija DNA iz fecesa dojenčadi

100 mg uzorka fecesa resuspendirano je u 1 mL destilirane vode. Dobivena suspenzija je centrifugirana 10 min pri 3600 g i 4 °C. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice su lizirane tijekom 2 h u 200 µL otopine lizozima (5 mg mL^{-1}) u TE puferu. Zatim je provedena sonikacija stanica i izolacija DNA kako je opisanu u poglavlju 3.2.1.

3.2.3. Određivanje koncentracije DNA

Mjerenje koncentracije DNA je provedeno 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.

3.2.4. Sekvenciranje DNA izolirane iz majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

30 µL uzoraka DNA izoliranih iz majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi poslano je u Molecular Research LP (MR DNA, SAD) na sekvenciranje primjenom Illumina MiSeq (Illumina, SAD) platforme, a ostatak je pohranjen na -20 °C. Amplifikacija V1-V3 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena provedena je primjenom ill27Fmod (5′-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) i ill519Rmod (5′-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3′) početnica. Za pripremu uzoraka za PCR korišten je HotStarTaq Plus Master Mix Kit. Nakon početnog koraka denaturacije DNA pri 94 °C tijekom 3 min, uslijedilo je 28 ciklusa (30 s pri 94 °C, 40 s pri 53 °C i 1 min pri 72 °C) praćenih

posljednjim korakom elongacije (5 min pri 72 °C). Uspješnost amplifikacije je provjerena na agaroznom gelu (2 % (w v^{-1})). Više uzoraka je na temelju molekularne mase i koncentracije DNA spojeno u jedan u jednakim omjerima, nakon čega su pročišćeni s Ampure XP kuglicama. Pročišćeni PCR produkti su korišteni za pripremu Illumina DNA knjižnice upotrebom Illumina TruSeq DNA library protokola i sekvencirani na MiSeq uređaju prema uputama proizvođača.

3.2.5. Analiza mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi pomoću QIIME2 platforme-određivanje taksonomije te α- i β-raznolikosti

Podaci dobiveni sekvenciranjem 16S rRNA gena, analizirani su u suradnji s Laboratorijem za bioinformatiku Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sirovi podaci u obliku FASTQ datoteka, od kojih je jedna odgovarala očitanim sljedovima nukleotida svih uzoraka u prednjem (*engl.* forward), a druga u stražnjem (*engl.* reverse) načinu čitanja slijeda, preuzeti su s Illumina Basespace (https://basespace.illumina.com) platforme. Datoteke su nakon preuzimanja učitane u QIIME 2 programski paket (*engl.* Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (https://qiime2.org), te je svaki slijed dodijeljen odgovarajućem uzorku u postupku demultipleksiranja. Taj postupak je proveden korištenjem q2-demux dodatka na osnovu definiranog slijeda nukleotida, jedinstvenog za svaki uzorak, koji se nalazi na početku svake očitane sekvence (barkoda). Nakon dodjeljivanja svake sekvence odgovarajućem uzorku, podaci su proslijeđeni q2-DADA2 dodatku, čija je funkcija spajanje sljedova, smanjivanje šuma i grešaka sekvenciranja te izrada tablice varijanti amplikonskih sekvenci (*engl*. Amplicon Sequence Variants, ASV). DADA2 je programski paket razvijen za modeliranje i uklanjanje grešaka nastalih kod sekvenciranja amplikona Illumina platformom. Njegova prednost je da generira ASV-ove koji se razlikuju samo u jednom nukleotidu te tako povećava razlučivost postupka u usporedbi s prije korištenim operativnim taksonomskim jedinicama (*engl.* Operational Taxonomic Units, OTUs) definiranim na temelju sličnosti sekvenci. Dobivene varijante amplikonskih sekvenci poravnate su mafft algoritmom i iz dobivenog poravnanja je izračunato filogenetsko drvo korištenjem fasttree2 programa implementiranog u q2-phylogeny dodatku. Dobiveni podaci korišteni su za računanje α- i β-raznolikosti uzoraka, za što je bilo potrebno odrediti dubinu sekvenciranja (*engl.* sequencing depth) iz DADA2 tablice svojstava pomoću "feature table summary" naredbe. Za prikaz α-raznolikosti uzoraka, korištene su metrike „Observed OTUs", „Shannon" i „Faith's phylogenetic diversity (pd)". Nizom naredbi, kreiran je graf krivulja razrjeđenja, koje služe za vizualizaciju rezultata, tj. utvrđivanje bioraznolikosti

bakterijskih vrsta prisutnih u uzorku te omogućuju da se utvrdi je li dubina sekvenciranja bila dovoljna da vjerno prikaže mikrobnu raznolikost svakog pojedinog uzorka. Uzorci koji sadrže manji broj sekvenci od traženog, izostavljaju se iz rezultata. Točka u kojoj se broj ASV-ova ne povećava s daljnjim uzorkovanjem je točka u kojoj je uzeto dovoljno uzoraka za preciznu karakterizaciju zajednice. QIIME 2 platforma sadrži više metrika za računanje β-raznolikosti, a u ovom radu je korištena netežinska (*engl.* Unweighted) UniFrac metrika, kojom se generira kvadratni matriks u kojem je izračunata udaljenost, tj. različitost svakog uzorka, što se vizualizira pomoću analize glavnih koordinata (*engl.* Principal coordinates analysis, PCoA) koja smješta uzorke u trodimenzionalni okvir na temelju udaljenosti određene UniFrac metrikom. Taksonomija je dodijeljena svakom ASV-u upotrebom q2-feature-classifier dodatka i classify-sklearn naive Bayes metode trenirane na Greengenes 13_8 99% OTU referentnoj taksonomskoj bazi. Za određivanje razlike u zastupljenosti pojedinih ASV-ova između uzoraka ili grupa uzoraka, korištena je ANCOM metoda.

3.2.6. Izolacija bakterija iz majčinog mlijeka i analiza genetičke raznolikosti izolata

3.2.6.1. Izolacija bakterija iz majčinog mlijeka

U ovom radu, ukupno je izolirano 100 bakterijskih sojeva nasumičnim odabirom 20 kolonija poraslih nakon 48 h inkubacije uzoraka mlijeka svake majke (n=5) na MRS agaru pri 37 °C. Pomoću mikrobiološke ušice, svaka odabrana kolonija je u cilju umnožavanja bakterijske biomase sterilno prenesena u 1,5 mL MRS bujona. Nakon 18 h anaerobne inkubacije, bakterijska kultura je „streak plate“ metodom nacijepljena na MRS agar kako bi se provjerila čistoća kulture te je nakon 48 h inkubacije ponovno odabrana jedna kolonija za umnožavanje u MRS bujonu. Nakon 18 h inkubacije, postupak pročišćavanja bakterijske kulture ponovljen je još jednom, nakon čega su svi novoizolirani sojevi pohranjeni u Zbirku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kako je opisano u poglavlju 3.2.7.2.

3.2.6.2. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi BMK su čuvani pri -80 °C u MRS bujonu s 15 % glicerola, a test mikroorganizmi i izolati roda *Staphylococcus* su čuvani pri -80 °C u hranjivom bujonu s 15 % glicerola. Dan prije eksperimenta, sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnim uvjetima rasta.

3.2.6.3. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva

Ekstrakcija genomske DNA sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, provedena je pomoću Genomic Wizard DNA kita iz bakterijske biomase izdvojene centrifugiranjem 5 mL bakterijske kulture 2 min pri 13000 g. Stanice prikupljene centrifugiranjem su resuspendirane u 480 µL EDTA (50 mM) i 120 µL otopine lizozima (10 mg mL^{-1}) te je dobivena suspenzija inkubirana u vodenoj kupelji 45 min pri 37 °C. Centrifugiranjem uzorka nakon inkubacije, dobiven je talog koji je potom resuspendiran u 600 µL otopine za lizu jezgre i inkubiran u vodenoj kupelji 5 min pri 80 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, lizatu je dodano 3 µL otopine RNAze te je dobivena suspenzija inkubirana 30 min pri 37 °C. Zatim je uzorku sobne temperature dodano 200 µL otopine za taloženje proteina te je vorteksiran 20 s, inkubiran 5 min na ledu i centrifugiran na 13000 g 3 min. Izdvojeni supernatant koji sadrži DNA prebačen je u čistu tubicu u koju je prethodno dodano 600 µL izopropanola sobne temperature, nakon čega se uzorak miješao okretanjem tubice dok niti DNA nisu formirale vidljivu masu. Supernatant je zatim uklonjen centrifugiranjem te je nakon sušenja tubice na čistom apsorbirajućem papiru, talog DNA ispran sa 600 µL etanola (70 % (v v^{-1})). Nakon 10-15 min sušenja na zraku, talogu je dodano 100 µL otopine za rehidraciju DNA nakon čega je uslijedila inkubacija u vodenoj kupelji 1 h pri 65 °C. Dobivenim uzorcima DNA je spektrofotometrijski izmjerena koncentracija kako je opisano u poglavlju 3.2.3. te su pohranjeni pri 4 °C.

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

DNA bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka korištena je kao kalup u RAPD-PCR reakciji provedenoj u ABl 2720 PCR uređaju. Reakcijska smjesa volumena 25 µL sadržavala je 12,5 µL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix 2x Premix, 0,5 µL univerzalne M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') početnice, 10 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 % (w v^{-1})) pri 60 V, pri čemu je kao standard korištena smjesa 0,25 µL λ DNA HindIII i 0,5 µL 100 bp DNA Ladder. Nakon završetka elektroforeze, gel je obojen etidijevim bromidom koncentracije 0,5 µg mL^{-1} 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 (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Zatim je usporedbom dobivenih elektroforetskih profila pomoću GelCompar II softvera (Applied Maths, Belgija) provedena hijerarhijska klaster analiza, čiji su rezultati prikazani u obliku dendrograma.

3.2.7. Identifikacija odabranih bakterijskih sojeva iz majčinog mlijeka

3.2.7.1. Fenotipska identifikacija odabranih sojeva iz majčinog mlijeka

3.2.7.1.1. Bojanje bakterijskih stanica po Gramu

Suspenzija stanica bakterijske kulture, nanesena je u tankom sloju na predmetnicu, osušena na zraku i fiksirana provlačenjem kroz plamen. Potom su fiksirane stanice obojene primarnim bojilom kristal-violet tijekom 1-2 min i ispirane destiliranom vodom, te tretirane lugolovom otopinom. Nakon 1 min, preparat je ispran etanolom (96 % (v v^{-1})) i destiliranom vodom. Nakon ispiranja, naneseno je kontrastno bojilo safranin koje je nakon 3-5 min ispirano destiliranom vodom. Pripremljeni preparat je osušen na zraku i mikroskopiran uz dodatak imerzijskog ulja pri povećanju 100 x.

3.2.7.1.2. Kalij-hidroksid (KOH) metoda

Na predmetno stakalce je naneseno 10 µl KOH (3 % (w v^{-1})) u obliku kapi, u koju je potom mikrobiološkom ušicom dodana vidljiva količina bakterijske biomase. Sadržaj kapi je zatim mikrobiološkom ušicom promiješan i proširen do promjera od 1,5 cm. Pojava viskozne ili gelaste suspenzije unutar 5-60 s ukazuje da je ispitivana bakterija Gram-negativna, a u protivnom je Gram-pozitivna.

3.2.7.1.3. Katalaza test

Na predmetno stakalce je mikrobiološkom ušicom prenesena vidljiva količina bakterijske biomase, u koju je potom dodana 1-2 kapi vodikovog peroksida (3 % (v v^{-1})). Prisutnost katalaze potvrđuju mjehurići nastali zbog oslobađanja kisika uslijed razgradnje vodikovog peroksida.

3.2.7.1.4. API 50 CHL metoda

Biomasa bakterija poraslih u obliku kolonija nakon 24 h uzgoja pri optimalnim uvjetima na krutoj hranjivoj podlozi, resuspendirana je pomoću mikrobiološke ušice u API 50 CHL mediju do postizanja gustoće suspenzije mjerene denzitometrom vrijednosti 2 McF. Tako pripremljenom suspenzijom su napunjene ampule API 50 CH stripa u koje je zatim nakapano mineralno ulje

kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C su očitani rezultati (slika 9). Pozitivnim se smatra rezultat u kojem je u ampuli uslijed fermentacije šećera došlo do zakiseljenja koje se detektira promjenom boje medija koji sadrži bromkrezol-purpuni indikator iz ljubičaste u žutu. U ampuli broj 25, koja sadrži eskulin, pozitivnim rezultatom se smatra promjena boje iz ljubičaste u crnu. Rezultati su analizirani pomoću Api-web™ (V 5.0) identifikacijskog softvera (BioMerieux, Francuska).



Slika 9. Fermentacijski profil KR19 izolata iz majčinog mlijeka dobivenog API CHL 50 testom

3.2.7.2. Genotipska identifikacija bakterija sekvenciranjem 16S rRNA gena

3.2.7.2.1. Amplifikacija potpune sekvence 16S rRNA gena PCR metodom

Reakcijska smjesa potrebna za umnožavanje 16S rDNA regije sadržavala je 1x GoTaq Flexi pufera bez $MgCl_2$, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,025 U μl^{-1} Taq polimeraze, 1,5 µM početnica UNI16SF (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i UNI16SR (5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3'), 0,2 mM deoksinukleotida (*engl.* Deoxynucleoside Triphosphates, dNTPs) i 1 ng μL^{-1} 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. 30 µL pročišćenih PCR produkata poslano je na sekvenciranje u Macrogen (Macrogen, Nizozemska).

3.2.7.2.2. Sekvenciranje 16S rRNA gena

Sekvenciranje umnožene 16S rDNA provedeno je u Macrogen servisu, korištenjem automatskog četverokapilarnog uređaja ABI 3730xl Genetic Analyser, koji radi na principu Sangerove dideoksi metode zaustavljanja sinteze DNA ugradnjom 2',3'-dideoksinukleotida (*engl.* Dideoxynucleoside Triphosphates, ddNTPs).

Za provođenje reakcije je potrebno osigurati jednolančanu DNA (kalup), DNA polimerazu, DNA početnice, dNTP-e te ddNTP. Uzorak DNA se podijeli u 4 različite reakcijske smjese od kojih svaka sadrži DNA polimerazu i sve potrebne deoksinukleotide (dATP, dGTP, dCTP i dTTP). Dodatno, u svaku od četiri reakcije se dodaje jedan od različito fluorescentno ili radioaktivno obilježenih 2',3'-ddNTP-a (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP) u sto 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, 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 se pomoću četiri odvojene reakcije i smjese 4 dNTP-a te jednog obilježenog ddNTP-a, dobije kompletna informacija o slijedu nukleotida u analiziranoj DNA.

Dobiveni rezultati se uspoređuju 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.

3.2.8. Detekcija producenata potencijalnih terapijskih biomolekula među bakterijama izoliranim iz majčinog mlijeka

3.2.8.1. Detekcija proizvodnje S-proteina kod bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka

3.2.8.1.1. 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 µL 2 x koncentriranog Laemmli pufera (1,25 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 4 mL SDS (10 % (w v^{-1})), 2 mL glicerol (100 % (v v^{-1})), 0,5 mL 0,5 M EDTA, 4 mg bromfenol plavo, 0,2 mL β-merkaptoetanol). Tako priređeni uzorci su prokuhani 5 min te je 20 µL naneseno u jažice unaprijed pripremljenog poliakrilamidnog (10 % (v v^{-1})) gela. Elektroforetsko razdvajanje proteina na gelu provedeno je u komori za elektroforezu 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 otopini octene kiseline (10 % (v v^{-1})) do obezbojenja pozadine. Naposljetku je pomoću softvera GelCompar II, usporedbom dobivenih elektroforetskih profila, provedena hijerarhijska klaster analiza, čiji su rezultati prikazani u obliku dendrograma.

3.2.8.1.2. Detekcija gena koji kodiraju za S-proteine PCR metodom

Reakcijska smjesa za provjeru prisutnosti gena koji kodiraju za S-proteine u DNA izolata iz majčinog mlijeka PCR metodom, sadržavala je 1x GoTaq Flexi pufera bez $MgCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP-a, 0,2 µM početnica Usl-1 (5'-GAATYGTKAGCGCTSCTGCTGC-3' i Usl-2 (5'-GTAAACGTAWGCGTTGTGCTTC-3'), 0,025 U $µl^{-1}$ Taq polimeraze i 10 ng $µL^{-1}$ DNA. Kao kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije početnica korišten je uzorak koji ne sadrži DNA. PCR reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u tablici 2, a dobiveni PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na agaroznom gelu (1 % (w v^{-1})) pri 100 V, pri čemu je kao standard korištena smjesa 0,25 µL λ DNA HindIII i 0,5 µL 100 bp DNA Ladder. Nakon završetka elektroforeze, gel je obojen etidijevim bromidom koncentracije

0,5 µg mL^{-1} i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru MiniBIS Pro pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture verzije 7.1.

Tablica 2. Uvjeti provođenja PCR reakcije s početnicama za S-proteine

Broj ponavljanja	T (^oC)	Vrijeme
1	94	5 min
	94	30 s
2	63	30 s
	72	1 min
	94	30 s
2	62	30 s
	72	1 min
	94	30 s
2	61	30 s
	72	1 min
	94	30 s
30	60	30 s
	72	1 min
1	72	7 min

3.2.8.2. Detekcija proizvodnje bakteriocina kod bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka

3.2.8.2.1. Detekcija gena uključenih u biosintezu bakteriocina PCR metodom

DNA bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka korištena je kao kalup za PCR reakciju sa svrhom detekcije gena za biosintezu bakteriocina pomoću specifičnih početnica navedenih u tablici 3. Reakcijska smjesa volumena 20 µL sadržavala je 10 µL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix 2x Premix, po 0,04 µL početnica, 1 µL kalupa te vodu. Kao kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije početnica korišten je uzorak koji ne sadrži DNA. PCR reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u literaturi uz svaku početnicu u tablici 3, a dobiveni PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na agaroznom gelu (2 % (w v^{-1})) pri 100 V, pri čemu je kao standard korištena smjesa 0,25 µL λ DNA HindIII i 0,5 µL 100 bp DNA Ladder. Gel je nakon završetka elektroforeze obojen etidijevim bromidom koncentracije 0,5 µg mL^{-1} i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru MiniBIS Pro pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture verzije 7.1.

Tablica 3. Specifične početnice za gene uključene u biosintezu bakteriocina

Ciljani gen	Početnice (5'-3')	Veličina PCR produkta (pb)	Referenca
plnJ	TAACGACGGATTGCTCTG AATCAAGGAATTATCACATTAGTC	475	Diep i sur. (1996)
plnA	GTACAGTACTAATGGGAG CTTACGCCAATCTATACG	450	Diep i sur. (1996)
plnW	TCACACGAAATATTCCA GGCAAGCGTAAGAAATAAATGAG	165	Holo i sur. (2001)
plnEF	GGCATAGTTAAAATTCCCCCC CAGGTTGCCGCAAAAAAAG	428	Diep i sur. (1996)
plnS	GCCTTACCAGCGTAATGCCC CTGGTGATGCAATCGTTAGTTT	320	Stephens i sur. (1998)
plnNC8	GGTCTGCGTATAAGCATCGC AAATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTCC	207	Maldonado i sur. (2004)

3.2.8.2.2. Određivanje antimikrobnog djelovanja bakterija metodom difuzije s rupama u agaru (engl. agar well-diffusion method)

Antimikrobno djelovanje bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka prema *S. aureus* 3048, *L. monocytogenes* ATCC®19111™, *E. coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1 ispitano je metodom difuzije u agar. 100 µL bakterijske kulture test-mikroorganizma optičke gustoće OD_{620}=2 nacijepljeno je u 12 mL sterilnog hranjivog agara (1,5 % (w v^{-1})) prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 °C. Nakon skrutnjavanja, sterilnim bušačem promjera 7 mm izbušene su rupe u agaru u koje je dodano 40 µL supernatanta kulture čije se antimikrobno djelovanje ispituje. Nakon 18 h inkubacije pri 37 °C, izmjereni su promjeri zona inhibicije.

3.2.8.2.3. Određivanje antimikrobnog djelovanja bakterija metodom s dvostrukim slojem agara (engl. agar spot-test method)

Antimikrobno djelovanje bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka prema srodnim BMK (*Lactobacillus brevis* SF9B, *Lactococcus lactis* LMG 9450, *Enterococcus faecium* L3) te prema patogenim test-mikroorganizmima (*Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* ATCC®19111™, *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1) ispitano je metodom s dvostrukim slojem agara. Bakterijska kultura čije se antimikrobno djelovanje ispituje nacijepljena je u obliku kapi od 5 µL na optimalnu krutu hranjivu podlogu. Nakon prekonoćne inkubacije pri 37 °C, preko poraslih kolonija preliveno je 10 mL soft agar (0,75 % (w v^{-1})) hranjive podloge inokulirane sa 100 µL test-mikroorganizma, odnosno srodne BMK optičke gustoće OD_{620}=2. Nakon 24 h aerobne inkubacije pri 37 °C, izmjeren je promjer porasle kulture

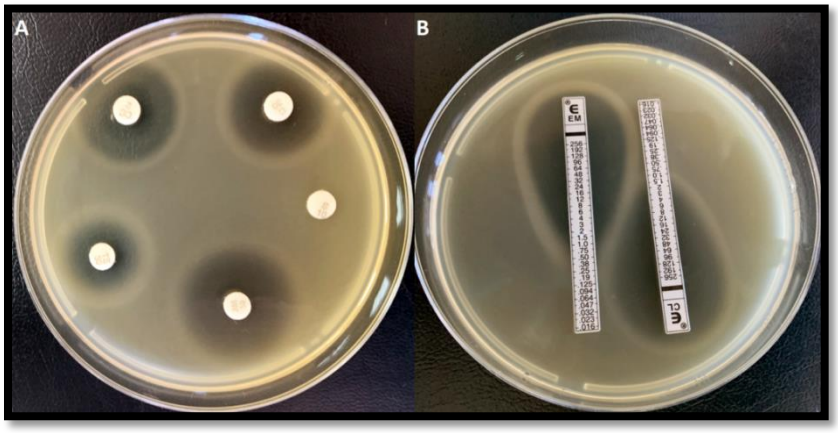
(*engl.* Culture diameter, CD) i bistrih zona inhibicije (*engl.* Inhibition diameter, ID) te je izračunat efektivni inhibicijski odnos (*engl.* Effective inhibition ratio, EIR):

$$\mathrm{EIR} = \frac{\mathrm{ID} - \mathrm{CD}}{\mathrm{CD}}$$

3.2.9. Ispitivanje osjetljivosti bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka na antibiotike

3.2.9.1. Ispitivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike E-testom i disk-difuzijskom metodom

U disk-difuzijskoj metodi, 100 µL bakterijske kulture optičke gustoće vrijednosti OD_{620}=2, inokulirano je u 12 mL MRS agara prethodno otopljenog i ohlađenog na 50 ºC. Tako inokulirana hranjiva podloga izlivena je u Petrijeve zdjelice. Nakon skrutnjavanja, na površinu podloge su sterilnom pincetom postavljeni BD BBL™ Sensi-Disc™ filter diskovi promjera 6 mm poznatog sadržaja antibiotika (ampicilin 10 µg, eritromicin 15 µg, gentamicin 10 µg, klindamicin 2 µg, kloramfenikol 30 µg, kanamicin 30 µg, streptomicin 10 µg, tetraciklin 30 µg, vankomicin 30 µg). Nakon prekonoćne inkubacije pri 37 ºC, izmjeren je promjer zona inhibicije, uključujući i promjer diska (slika 10A). Osjetljivost sojeva na navedene antibiotike ispitana je i primjenom M.I.C.E. Evaluators™ E-testa, tako što su na podlogu pripremljenu na isti način kao u disk-difuzijskoj metodi, sterilnom pincetom nanesene vrpce E-testa koje sadrže ampicilin, eritromicin, gentamicin, klindamicin, kloramfenikol, kanamicin, tetraciklin ili vankomicin u gradijentu koncentracije 0,016-256 µg mL^{-1}, odnosno streptomicin u gradijentu koncentracije 0,064-1026 µg mL^{-1}. Nakon 24 h inkubacije pri 37 ºC, očitane su minimalne inhibicijske koncentracije (*engl.* Minimal inhibitory concentration, MIC) na vrhu zone inhibicije oko vrpce, prema uputama proizvođača (slika 10B).



Slika 10. Zone inhibicijskog djelovanja antibiotika prema soju *Lb. plantarum* MB7 dobivene **A** disk-difuzijskom metodom **B** primjenom E-testa

3.2.9.2. Detekcija gena za rezistenciju na antibiotike PCR metodom

DNA odabranih bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka korištena je kao kalup za PCR reakciju sa svrhom detekcije potencijalno prijenosnih gena za rezistenciju na antibiotike pomoću specifičnih početnica navedenih u tablici 4. Reakcijska smjesa volumena 20 µL sadržavala je 10 µL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix 2x Premix, po 0,04 µL početnica, 1 µL kalupa te vodu. Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije početnica korišten je uzorak koji ne sadrži DNA. PCR reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u literaturi uz svaku početnicu u tablici 4. Dobiveni PCR produkti razdvojeni su elektroforezom na agaroznom gelu (2 % (w v^{-1})) pri naponu od 100 V. Standard se sastojao od 0,25 µL λ DNA HindIII i 0,5 µL 100 bp DNA Ladder. Gel je nakon završetka elektroforeze obojen u etidijevom bromidu koncentracije γ=0,5 µg mL^{-1} i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru MiniBIS Pro, pri valnoj duljini od 254 nm, upotrebom programa Gel Capture verzije 7.1.

Tablica 4. Specifične početnice za gene za rezistenciju na antibiotike uvjeti PCR reakcije

Antibiotik	Ciljani gen	Početnice (5'-3')	Temp. vezanja početnica	Veličina PCR produkta	Referenca
gentamicin	*aac(6')Ie-aph(2'')Ia*	CACTATCATAACCACTACCG CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG	58 °C	348 pb	Bujnakova i sur. (2014)
streptomicin	*aadE*	GCAGCGCAATGACATTCTTG ATGGAATTATTCCCACCTGA	50 °C	565 pb	Ouoba i sur. (2008)
kanamicin	*aph(3'')-III*	GCCTTTCCGCCACCTCACCG GCCGATGTGGATTGCGAAAA	52 °C	292 pb	Ouoba i sur. (2008)
tetraciklin	*tet(W)*	CAGCAGATCCTACTCCTT GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	64 °C	168 pb	Kastner i sur. (2006)
eritromicin	*erm(B)*	GGGCGTATCCACAATGTTAAC GAAAAGGTACTCAACCAAATA	54 °C	639 pb	Aquilanti i sur. (2007)
klindamicin	*lnu(B)*	GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTTCGATC CCTACCTATTGTTTGTGGAA	54 °C	925 pb	Liu i sur. (2009)
kloramfenikol	*catA*	ATAACGTTACTCTCCTATTTC GGATATGAAATTTATCCCTC	50 °C	486 pb	Rojo-Bezares i sur. (2006)
ampicilin	*bla*	TAGGTTCAGATTGGCCCTTAG CATARTTCCGATAATASMGCC	51 °C	297 pb	Hummel i sur. (2007)
vankomicin	*vanE*	GTCGATTCTCGCTAATCC TCGCGGTAGTCCCACCATTCGTT AAATCATCGTTGACCTGCGTTAT	52 °C	513 pb	Kastner i sur. (2006)

3.2.10. Preživljavanje sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) izoliranih iz majčinog mlijeka

3.2.10.1. Preživljavanje BMK tijekom postupka liofilizacije

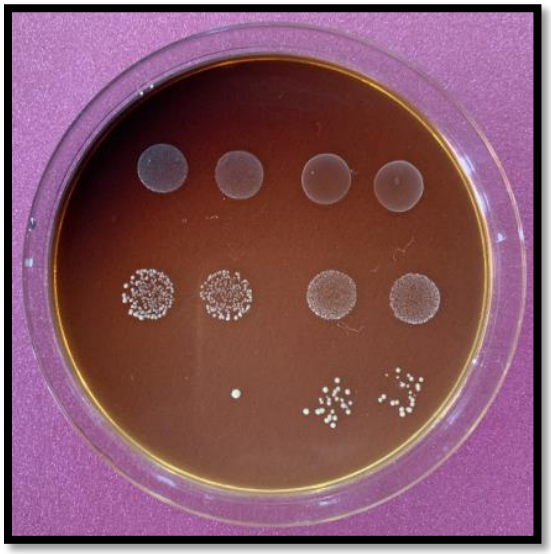
3.2.10.1.1. Liofilizacija bakterijskih stanica

Bakterijske stanice uzgojene u optimalnoj tekućoj hranjivoj podlozi do kasne eksponencijalne faze prikupljene su centrifugiranjem (3500 o min^{-1}), dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom i resuspendirane u fosfatnom puferu (pH=7) s ili bez dodatka obranog mlijeka (10 % (w v^{-1})) kao lioprotektora. Priređene suspenzije stanica su zatim smrznute preko noći na -80 °C i liofilizirane 24 h u liofilizatoru CHRIST Alpha 1–2 LDplus.

Broj živih stanica (CFU mL^{-1}) određen je prije i nakon liofilizacije indirektnom metodom prema postupku opisanom u 3.2.10.1.2.

3.2.10.1.2. 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 MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C izbrojane su porasle kolonije (slika 11) i izračunat je broj živih stanica (*engl.* Colony-forming units, CFU) po mililitru uzorka (CFU mL^{-1}).



Slika 11. Određivanje broja živih bakterija indirektnom metodom

3.2.10.2. Preživljavanje BMK izoliranih iz majčinog mlijeka u simuliranim uvjetima GIT-a

3.2.10.2.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

Simulirani sokovi gastrointestinalnog sustava pripremljeni su prema Kos (2001). Simulirani želučani sok pripravljen je suspendiranjem 3 g L^{-1} pepsina u 0,5 % (w v^{-1}) sterilnoj otopini natrijevog klorida, pH vrijednosti 2,0. Simulirani sok tankoga crijeva pripravljen je suspendiranjem 1 g L^{-1} pankreatina i 3,0 mg mL^{-1} žučnih soli u 0,5 % (w v^{-1}) otopini natrijeva klorida, pH vrijednosti 8,0.

3.2.10.2.2. Inkubiranje bakterijskih stanica u simuliranim sokovima GI sustava

Ispitivanje preživljavanja BMK u simuliranim uvjetima GIT-a provedeno je prema Kos (2001). Stanice odabranih sojeva prikupljene su centrifugiranjem 5 min pri 3500 o min^{-1} i dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom. Potom su resuspendirane u simuliranom želučanom soku te inkubirane 2 h pri 37 °C, nakon čega je broj živih bakterija određen indirektnom metodom (poglavlje 3.2.10.1.2). Stanice prikupljene centrifugiranjem 5 min pri 3500 o min^{-1} su potom resuspendirane i inkubirane u simuliranom soku tankog crijeva 4 h pri 37 °C, nakon čega je broj preživjelih bakterija ponovno određen indirektnom metodom (poglavlje 3.2.10.1.2).

3.2.10.3. Mikrobna adhezija na otapala (engl. Microbial adhesion to solvents, MATS)

Bakterijske stanice uzgojene do stacionarnog stanja u optimalnoj tekućoj hranjivoj podlozi prikupljene su centrifugiranjem, dva puta isprane sterilnom destiliranom vodom i resuspendirane u 10 mL 0,1 mol L^{-1} KNO_3 (pH = 6,2). Priređenim suspenzijama stanica (V= 3mL) koncentracije približno 10^8 CFU mL^{-1}, izmjerena je apsorbancija pri 600 nm (A_0), a zatim im je dodano nepolarno otapalo heksan (V=1 mL). Tako pripremljena suspenzija je inkubirana na sobnoj temperaturi 15-20 min, nakon čega je izmjerena apsorbancija vodene faze (A) te je postotak adhezije izračunat prema formuli:

$$\text{Adhezija (\%)} = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \cdot 100$$

3.2.11. Ispitivanje svojstava agregacije i adhezije BMK izoliranih iz majčinog mlijeka

3.2.11.1. Ispitivanje svojstava autoagregacije bakterijskih stanica

Bakterijske stanice uzgojene u optimalnoj tekućoj hranjivoj podlozi prikupljene su centrifugiranjem, isprane dva puta, te resuspendirane u fosfatnom puferu pH=7,4 do

koncentracije od približno 10^9 CFU mL^{-1}. 4 mL tako pripremljene suspenzije, dodano je u penicilinke te homogenizirano na vibromješaču. Izmjerena je apsorbancija uzoraka u nultom satu pri 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica Infinite® F Plex te je nakon 5 h inkubacije uzoraka pri sobnoj temperaturi, ponovno izmjerena apsorbancija uzoraka uzetih s površine na isti način. Postotak autoagregacije je izračunat iz formule:

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

gdje je:

A_t - apsorbancija u vremenu (nakon 5 sati)

A_0 - apsorbancija u vremenu 0

3.2.11.2. Ispitivanje svojstava koagregacije bakterijskih stanica

Suspenzije bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka te patogenih test-mikroorganizama (*S. aureus* 3048, *L. monocytogenes* ATCC®19111™, *E. coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1) korištenih u eksperimentu, priređene su na isti način kao u postupku ispitivanja svojstava autoagregacije (poglavlje 3.2.11.1). Koagregacija sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka s patogenim sojevima određena je iz uzoraka koji se sastoje od 2 mL suspenzije stanica pojedinog soja izoliranog iz majčinog mlijeka i 2 mL suspenzije stanica pojedinog test-mikroorganizma. Postupak mjerenja istovjetan je postupku korištenom kod ispitivanja autoagregacije (poglavlje 3.2.11.1). Uspješnost koagregacije izračunata je pomoću formule:

$$\text{Koagregacija (\%)} = \frac{\frac{A_x + A_y}{2} - A(x+y)}{\frac{A_x + A_y}{2}} \cdot 100$$

3.2.11.3. In vitro adhezija na mucin

Adhezija bakterijskih stanica na mucin ispitana je na polistirenskim pločicama s 96 jažica. 100 µL otopine mucina (10 mg mL^{-1}) u karbonatnom/bikarbonatnom puferu (50 mmol L^{-1}, pH=9,6) dodano je u svaku jažicu te je pločica inkubirana preko noći na 4 °C. Jažice su isprane tri puta fosfatnim puferom (pH=7) i blokirane tijekom 1 h fosfatnim puferom s dodatkom 1 % Tween 20. Bakterijske stanice uzgojene do kasne eksponencijalne faze su prikupljene centrifugiranjem, isprane i resuspendirane u fosfatnom puferu do postizanja koncentracije koja odgovara OD_{620}=1. 100 µL tako priređenih suspenzija pojedinih bakterijskih kultura dodano je u jažice i inkubirano preko noći pri 4 °C. Nakon inkubacije, neadhezirane stanice su uklonjene

ispiranjem tri puta s 200 µl fosfatnog pufera koji sadrži 0,05 % Tween 20 te su pločice ostavljene 1 h na sobnoj temperaturi da se osuše. Adhezirane bakterijske stanice su detektirane bojanjem kristal-violetom (1 mg mL^{-1}) tijekom 45 min. Nakon ispiranja, bojilo je otpušteno dodatkom 100 µL citratnog pufera (50 mmol L^{-1}, pH 4,0) u svaku jažicu. Apsorbancija je izmjerena pri 620 nm čitačem mikrotitarskih pločica Infinite® F Plex. Jažice u koje je dodan čisti fosfatni pufer služile su kao slijepa proba čije su vrijednosti apsorbancije oduzimane od vrijednosti apsorbancije jažica s adheziranim bakterijskim stanicama.

Učinak proteaze ispitan je inkubacijom bakterijskih stanica koncentracije koja odgovara OD_{620}=1 u fosfatnom puferu s dodatkom 100 µg mL^{-1} proteinaze K pri 37 °C tijekom 1 h. Nakon inkubacije, proteinaza je inaktivirana dodatkom 1 mmol L^{-1} fenilmetilsulfonil fluorida te su stanice isprane tri puta fosfatnim puferom koji sadrži 1 mmol L^{-1} fenilmetilsulfonil fluorida. Ispitivanje adhezije tako tretiranih stanica na mucin, provedeno je na isti način kao u pokusu bez dodatka proteinaze K.

3.2.11.4. Adhezija bakterijskih stanica na Caco-2 stanice

Smrznuta Caco-2 stanična linija otopljena je u vodenoj kupelji pri 37 °C te je centrifugiranjem uklonjen supernatant s ostacima medija i glicerola. Biomasa stanica je potom isprana s 1 mL svježeg EMEM medija prethodno zagrijanog na 37 °C, te su stanice nacijepljene u Petrijeve zdjelice promjera 5 cm. Nakon 24 h propagacije, stanice su nacijepljene u T-bocu volumena 25 cm^3 i održavane pri 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO_2, u EMEM mediju s dodatkom 10 % (v v^{-1}) toplinom inaktiviranog (56 °C tijekom 30 min) fetalnog goveđeg seruma, uz izmjenu medija svakih 48 h. U T-boci su stanice uzgajane do subkonfluentnog stanja i potom isprane fosfatnim puferom (pH=7,4) kako bi se uklonili ostaci medija koji zbog α_2-makroglobulina prisutnog u serumu ima antitripsinsku aktivnost. Zatim su stanice inkubirane u 1-2 mL 0,25 % (w v^{-1}) tripsina pri 37 °C kako bi se odlijepile od podloge. Odlijepljivanje stanica se detektira pod mikroskopom prelaskom stanica iz vretenastog u okrugli oblik i pokretanjem u smjeru tripsina. Zatim je uklonjen tripsin te su stanice resuspendirane u mediju sa serumom kako bi se zaustavilo proteolitičko djelovanje tripsina. Stanice su izbrojane u Bürken-Türk komorici volumena 10^{-4} mL i priređena je suspenzija koncentracije 10^5 stanica mL^{-1}. 1 mL suspenzije dodan je u svaku od 24 jažice na pločici. Stanice su potom inkubirane tjedan dana pri 37 °C u 5 %-tnoj atmosferi CO_2, u mediju sa serumom uz izmjenu medija svakih 48 h. Prije eksperimenta adhezije, Caco-2 stanice

su isprane tri puta fosfatnim puferom. Stanice prekonoćnih kultura bakterijskih sojeva čija se adhezija na Caco-2 stanice ispituje, prikupljene su centrifugiranjem (5 min pri 4200 o min^{-1}) i isprane dva puta u fosfatnom puferu (pH=7,4). Isprana biomasa bakterijskih stanica resuspendirana je u EMEM mediju do postizanja vrijednosti OD_{620}=1 te je broj živih bakterija u priređenim suspenzijama određen indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.10.1.2. 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^{-1}) 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 jedinicama) provjeren indirektnom metodom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.10.1.2. Postotak adhezije je izračunat prema sljedećoj jednadžbi:

$$\%\ \text{adhezije} = \left(\frac{\text{CFU mL}^{-1}\ \text{adheziranih bakterija}}{\text{CFU mL}^{-1}\ \text{dodanih bakterija}}\right) \cdot 100$$

gdje su x i y pojedinačne bakterijske suspenzije ispitivanog bakterijskog para, a (x + y) predstavlja suspenziju ispitivanog para bakterija.

3.2.11.5. Adhezija bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa

Adhezija bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa ispitana je na Corning®BioCoat™ pločicama s 96 jažica presvučenih lamininom, kolagenom, odnosno fibronektinom. Jažice su isprane tri puta fosfatnim puferom (pH=7) i blokirane tijekom 1 h fosfatnim puferom s dodatkom 1 % Tween 20. Bakterijske stanice uzgojene do kasne eksponencijalne faze su prikupljene centrifugiranjem, isprane i resuspendirane u fosfatnom puferu do postizanja koncentracije koja odgovara OD_{620}=1. 100 µL tako priređenih suspenzija pojedinih bakterijskih kultura dodano je u jažice i inkubirano preko noći pri 4 °C. Nakon inkubacije, neadhezirane stanice su uklonjene ispiranjem tri puta s 200 µl fosfatnog pufera koji sadrži 0,05 % Tween 20 te su pločice ostavljene 1 h na sobnoj temperaturi da se osuše. Adhezirane bakterijske stanice su detektirane bojanjem kristal-violetom (1 mg mL^{-1}) tijekom 45 min. Nakon ispiranja, bojilo je otpušteno dodatkom 100 µL citratnog pufera (50 mmol L^{-1}, pH 4,0). Apsorbancija je izmjerena pri 620 nm čitačem mikrotitarskih pločica Infinite® F Plex.

Jažice u koje je dodan čisti fosfatni pufer služile su kao slijepa proba čije su vrijednosti apsorbancije oduzimane od vrijednosti apsorbancije jažica s adheziranim bakterijskim stanicama.

Učinak proteaze ispitan je inkubacijom bakterijskih stanica koncentracije koja odgovara OD_{620}=1 u fosfatnom puferu s dodatkom 100 µg mL^{-1} proteinaze K pri 37 °C tijekom 1 h. Nakon inkubacije, proteinaza je inaktivirana dodatkom 1 mmol L^{-1} fenilmetilsulfonil fluorida te su stanice isprane tri puta fosfatnim puferom koji sadrži 1 mmol L^{-1} fenilmetilsulfonil fluorida. Ispitivanje adhezije tako tretiranih stanica na proteine ECM-a, provedeno je na isti način kao u pokusu bez dodatka proteinaze K.

3.2.12. Analiza sekvence cijelog genoma producenata potencijalnih terapijskih biomolekula

Genomi sojeva producenata bakteriocina (*Lb. plantarum* SF9C) i S-proteina (*Lb. brevis* SF9B), sekvencirani su u IGA Technology servisu (Udine, Italija). Za pripremu knjižnice, korišten je Nextera DNA Library Preparation Kit. Kvaliteta i koncentracija DNA su provjerene korištenjem Qubit 2.0 fluorometra i Agilent 2100 Bioanalyzer uređaja te je potom provedeno sekvenciranje je na MiSeq 2500 uređaju prema postupku opisanom u Banić i sur. (2018).

Sirovi podaci dobiveni sekvenciranjem su obrađeni pomoću CASAVA 1.8.2, a dobivene genomske sekvence su pohranjene u Genbank genskoj banci NCBI baze podataka.

Anotacija gena provedena je primjenom RAST (*engl.* Rapid Annotations using Subsystems Technology) servera, a genomski atlasi sojeva, konstruirani su primjenom Java aplikacije DNA Plotter (https://www.sanger.ac.uk/science/tools/dnaplotter).

Klaster gena koji sudjeluju u biosintezi bakteriocina, konstruiran je primjenom BAGEL 4 servera (http://bagel4.molgenrug.nl).

3D-struktura plantaricina soja *Lb. plantarum* SF9C, pretpostavljena je primjenom SWISS-MODEL servera (https://swissmodel.expasy.org), a fizikalno-kemijska svojstva α-uzvojnica plantaricina određena su pomoću HeliQuest servera (https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParams.py) (Butorac i sur., 2020).

3.2.13. Analiza S-proteina soja *Lb. brevis* SF9B

3.2.13.1. Izolacija S-proteina

Uklanjanje S-proteina provedeno je prema postupku opisanom u Uroić i sur. (2016). Stanice prekonoćno uzgojene bakterijske kulture su prikupljene centrifugiranjem, isprane i resuspendirane u 5 mol L^{-1} gvanidin hidrokloridu. Nakon 2 h inkubacije pri sobnoj temperaturi, stanice su isprane kako bi se uklonio višak GHCl-a. Netretirane stanice, korištene kao kontrola u eksperimentima ispitivanja utjecaja S-proteina na probiotička svojstva stanice, pripremljene su na isti način, samo je umjesto GHCl-a korištena destilirana voda

3.2.13.2. Identifikacija i karakterizacija S-proteina

SDS-PAGE analiza uzorka izoliranog S-proteina soja *Lb. brevis* SF9B, provedena je kako je opisano u poglavlju 3.2.8.1.1., a 2D elektroforeza istog uzorka prema Jakava-Viljanen i Palva (2007). Proteinske vrpce koje su veličinom i pI vrijednošću odgovarale S-proteinima laktobacila, izrezane su iz gela i tripsinizirane. Dobiveni triptički peptidi su analizirani LC-MS analizom, čiji su rezultati uspoređeni s Mascot bazom podataka. Sekundardna struktura izoliranog S-proteina soja *Lb. brevis* SF9B, pretpostavljena je PSIPRED metodom implementiranom u Phyre2 serveru, a tercijarna struktura I-TASSER serverom.

3.2.14. Ispitivanje utjecaja združene kulture sojeva producenata potecijalnih terapijskih biomolekula na sastav crijevnog mikrobioma eksperimentalnih životinja

Kulture sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C, uzgojene u MRS bujonu do optičke gustoće OD_{620}=1, pomiješane su u omjerima 1:1 (v v^{-1}) i inokulirane (4 %) u 50 mL MRS bujona. Nakon prekonoćne inkubacije, stanice su prikupljene centrifugiranjem, isprane u fiziološkoj otopini, te je prisutnost oba soja potvrđena mikroskopiranjem.

U eksperimentu *in vivo* adhezije su korišteni štakori soja Y59, muškog spola, stari 3 mjeseca i teški 200-250 g (http://www.informatics.jax.org/external/festing/rat/docs/Y59.shtml), uzgojeni na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Životinje su uzgajane pri standardnim uvjetima temperature od 25 °C, vlažnosti 60 %, izmjene ciklusa 12 h svjetla i tame, te sa slobodnim pristupom vodi i hrani. Hranjene su standardnom laboratorijskom hranom (4 RF 21, Mucedola, Italija) i vodom iz slavine. Briga o svim eksperimentalnim životinjama se provodila prema Zakonu o zaštiti

životinja NN135/06 i NN37/13 Republike Hrvatske te u skladu s EU Direktivom 2010/63/EU. Rad s eksperimentalnim životinjama odobren je od strane Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te od strane Ministarstva poljoprivrede (br. odobrenja HR-POK-012; klasa UP/I-322-01/16-01/87; UR broj: 525-10/0529-17-3). Štakori su nasumično raspoređeni u 2 skupine iste veličine, pri čemu su po 3 štakora smještena u jedan kavez. Jednu skupinu su činili štakori kojima su intraperitonealno ubrizavani $AlCl_3$ (10 mg kg^{-1}) i D-galaktoza (60 mg kg^{-1}), a drugu štakori kojima je na isti način ubrizgavana fiziološka otopina. 24 h nakon zadnjeg tretmana, započelo je kaniliranje štakora probiotičkom suspenzijom. Štakori iz obje skupine su 5 uzastopnih dana kanilirani jednom dozom ($3 \cdot 10^9$ CFU mL^{-1}) suspenzije stanica *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C u fiziološkoj otopini. Kako bi se procijenila aktivnost acetilkolinesteraze (*engl.* acetylcholinesterase, AChE), za što je potreban uzorak mozga, štakori su eutanizirani. Prije eutanazije, anestezirani su smjesom ketamina (75 mg kg^{-1}, Narketan®10) i ksilazina (10 mg kg^{-1}, Xylapan®). Mozak svakog štakora je smrznut na -80 °C do analize.

Kolorimetrijskom metodom je iz homogenata mozga određena AChE aktivnost izražena u mol min^{-1} g^{-1}. Promjene povezane s Alzheimerovom bolešću kod štakora tretiranih s $AlCl_3$ i D-galaktozom potvrđene su imunohistokemijskom analizom korištenjem primarnih pročišćenih β-amiloidnih antitijela (4G8) razrijeđenih 1:2000, Phospho-PHF-Tau monoklonalnih antitijela (pSer202+Tr205) razrijeđenih 1:500 i Iba1 antitijela razrijeđenih 1:250. Fotomikrografovi su snimljeni digitalnom kamerom AxioCam ERc5 i obrađeni programom za morfometričku analizu AxioCam ERc5s-ZEN2. Uzorci fecesa su prikupljeni s čiste stelje prije kaniliranja te treći i deseti dan nakon kaniliranja štakora probiotičkom suspenzijom, te su pohranjeni na -80 °C do daljnjih analiza.

Ukupna genomska DNA svih prikupljenih uzoraka ekstrahirana je pomoću Maxwell uređaja kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Uzorci DNA su poslani u Molecular Research, gdje je provedena amplifikacija hipervarijabilne V3 regije 16S rRNA gena pomoću 341F (5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′) i 518R (5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′) primera te sekvenciranje produkata PCR reakcije pomoću Illumina MiSeq platforme prema uputama proizvođača. Sirovi podaci u FASTQ formatu dobiveni sekvenciranjem, analizirani su korištenjem QIIME 2 (https://qiime2.org) programskog paketa kako je opisano u poglavlju 3.2.5.

3.2.15. PCR-DGGE analiza

PCR-DGGE analiza je provedena prema Leboš Pavunc i sur. (2012) s malim izmjenama. Iz bakterijskih kolonija poraslih na MRS krutoj hranjivoj podlozi iz uzoraka fecesa prikupljenih prije i nakon kaniliranja štakora probiotičkom suspenzijom, ekstrahirana je DNA Maxwell uređajem prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. Potom je iz uzoraka DNA amplificirana V2-V3 regija 16S rRNA gena korištenjem HDA1 (5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3′) i HDA2 (5′-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3′) početnica te je provedena PCR reakcija sastavljena od 3 min početne denaturacije pri 95 °C, 35 ciklusa po 30 s pri 95 °C, 30 s pri 58 °C i 40 s pri 72 °C, te 5 min završne elongacije pri 72 °C. Kao standard su korišteni združeni PCR produkti DNA sojeva *Lb. brevis* i *Lb. plantarum*. DGGE elektroforeza provedena je u 30-70 %-tnom gradijentu denaturirajućeg agensa u TAE puferu tijekom 5 h pri 70 V. Nakon elektroforeze, gel je obojen etidijevim bromidom koncentracije 0,5 μg mL^{-1} i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru MiniBIS Pro pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture verzije 7.1. Vrpce koje nisu pripadale sojevima *Lb. brevis* i *Lb. plantarum* su izrezane, te je izolirana DNA sekvencirana Sangerovim sekvenciranjem kako je opisano u poglavlju 3.2.7.2.2. Rezultati sekvenciranja uspoređeni su sa sekvecama pohranjenim u GenBank banci podataka Američkog centra za biotehnologiju korištenjem BLASTn algoritma.

3.2.16. Statistička analiza i prikaz rezultata

Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri nezavisna uzorka ± standardna devijacija (SD). Statistička značajnost je procijenjena jednosmjernom analizom varijance (*engl*. One-way analysis of variance, One-way ANOVA) i Tukey HSD (engl. Honestly significant difference) testom VassarStats računalnog programa (http://vassarstats.net/test). Statističke razlike između skupina će se smatrati značajnim ako je $P < 0,05$. Svi grafički prikazi rezultata, pripremljeni su korištenjem GraphPad Prism 9.0 softvera (GraphPad Software, SAD).

4. REZULTATI

4.1. Analiza sastava mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

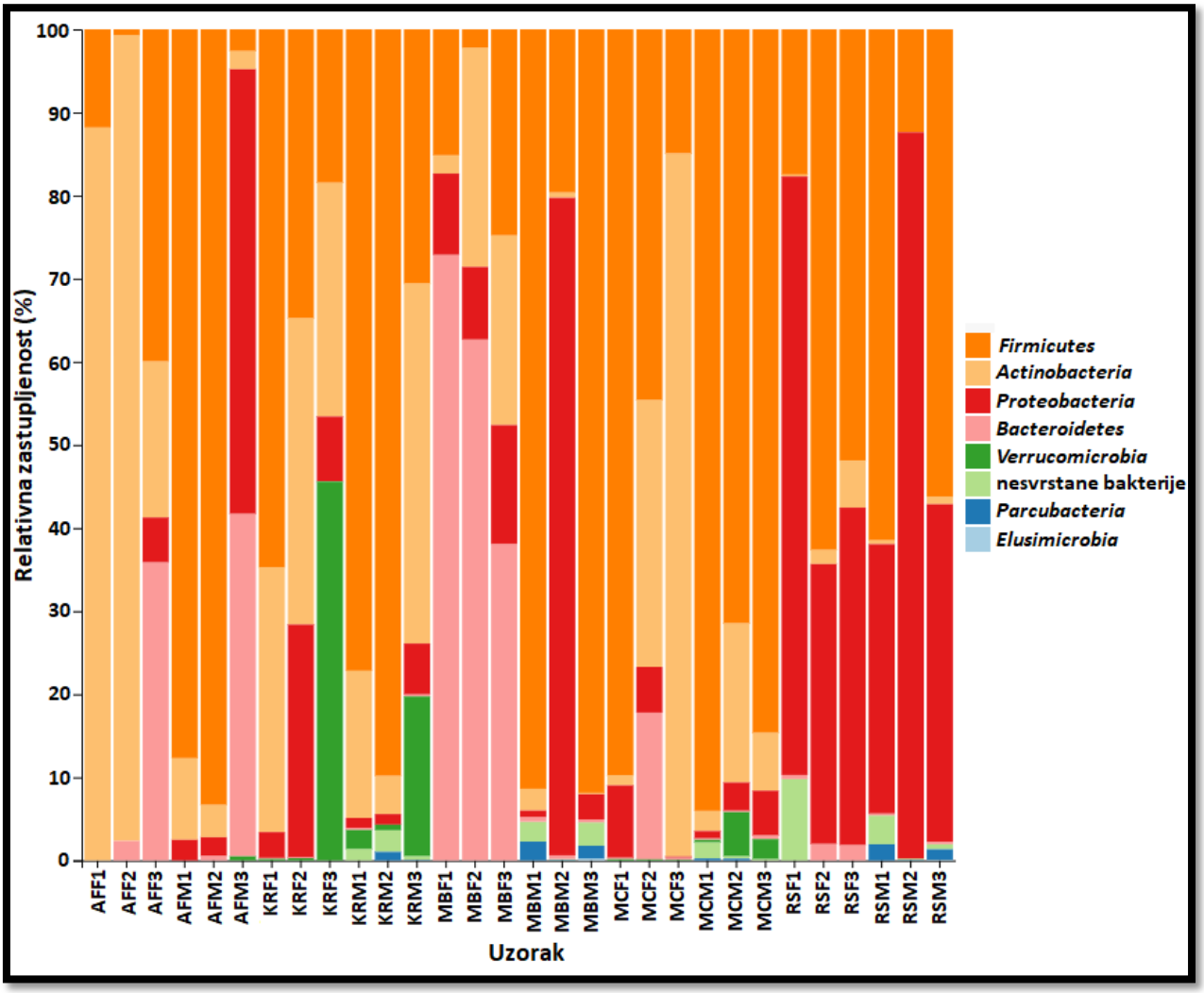
Iz 30 prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, ekstrahirana je DNA pomoću Maxwell 16 Research System uređaja. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije izolirane DNA, prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz rezultata mjerenja koncentracije dsDNA BioSpec-Nano uređajem

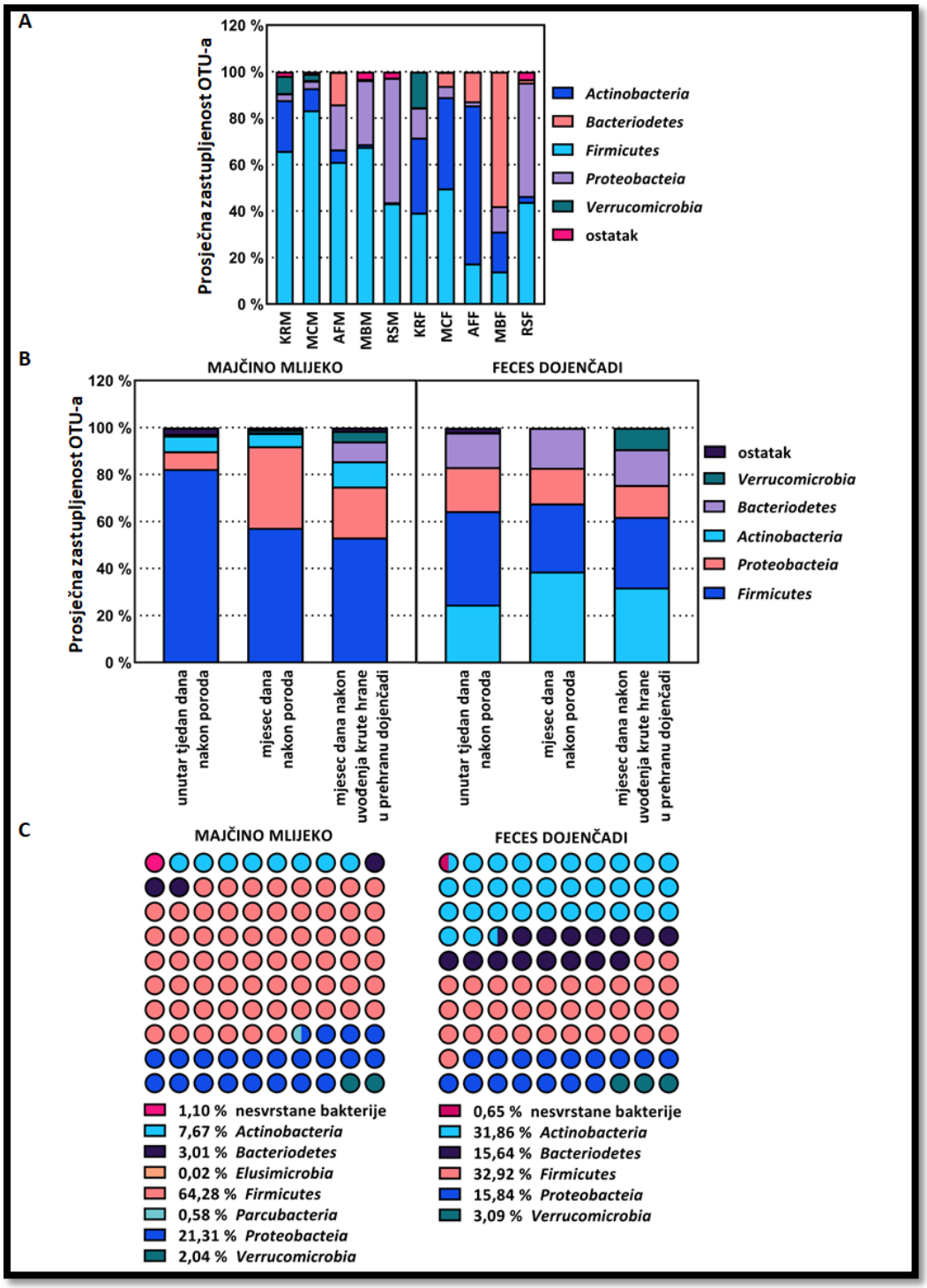
Uzorak majčinog mlijeka	Koncentracija dsDNA (ng μL^{-1})	Uzorak fecesa dojenčadi	Koncentracija dsDNA (ng μL^{-1})
KRM1	2,61	KRF1	204,70
KRM2	8,58	KRF2	158,12
KRM3	83,26	KRF3	420,82
MCM1	14,67	MCF1	36,13
MCM2	15,05	MCF2	102,56
MCM3	6,68	MCF3	49,94
AFM1	7,11	AFF1	20,12
AFM2	8,12	AFF2	17,23
AFM3	46,60	AFF3	132,15
MBM1	29,26	MBF1	71,69
MBM2	30,37	MBF2	120,41
MBM3	33,86	MBF3	98,36
RSM1	32,31	RSF1	85,64
RSM2	44,91	RSF2	65,84
RSM3	27,76	RSF3	66,85

Uzorci DNA potom su poslani na sekvenciranje u Molecular Research, gdje je najprije provedena amplifikacija V1-V3 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena, a nakon toga i sekvenciranje korištenjem Illumina MiSeq platforme. Sirovi podaci dobiveni sekvenciranjem, obrađeni su korištenjem QIIME 2 platforme za analizu mikrobioma. Kako bi se omogućila analiza prisutnosti bakterija u svakom uzorku majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, pomoću QIIME 2 programa su najprije generirane tablice zastupljenosti varijanti amplikonskih sekvenci (ASV) s pripadajućom taksonomskom identifikacijom određenom korištenjem Greengenes 13 8 99 % OTU referentne taksonomske baze podataka. Na grafovima generiranim pomoću QIIME 2 platforme, slovom „p“ je označeno koljeno (*lat.* phylum), slovom „c“ razred (*lat.* classis); slovom „o“ red (*lat.* ordo), slovom „f“ porodica (*lat.* familia), slovom „g“ rod (*lat.* genus), a slovom „s“ vrsta (*lat.* species).

Na slici 12, prikazana je relativna zastupljenost OTU-a na razini koljena u pojedinačnim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi. Prosječna zastupljenost OTU-a na razini koljena unutar tri uzorka mlijeka iste majke, odnosno fecesa istog djeteta, prikazana je na slici 13A. U svrhu praćenja promjena u sastavu mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi tijekom perioda laktacije, odnosno sazrijevanja djeteta, na slici 13B je prikazana prosječna zastupljenost taksonomskih koljena u uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikupljenim unutar tjedan dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi. Razlike u sastavu mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikazani su u obliku dijagrama prosječne zastupljenosti OTU-a na razini koljena u svim prikupljenim uzorcima mlijeka i fecesa (slika 13C).

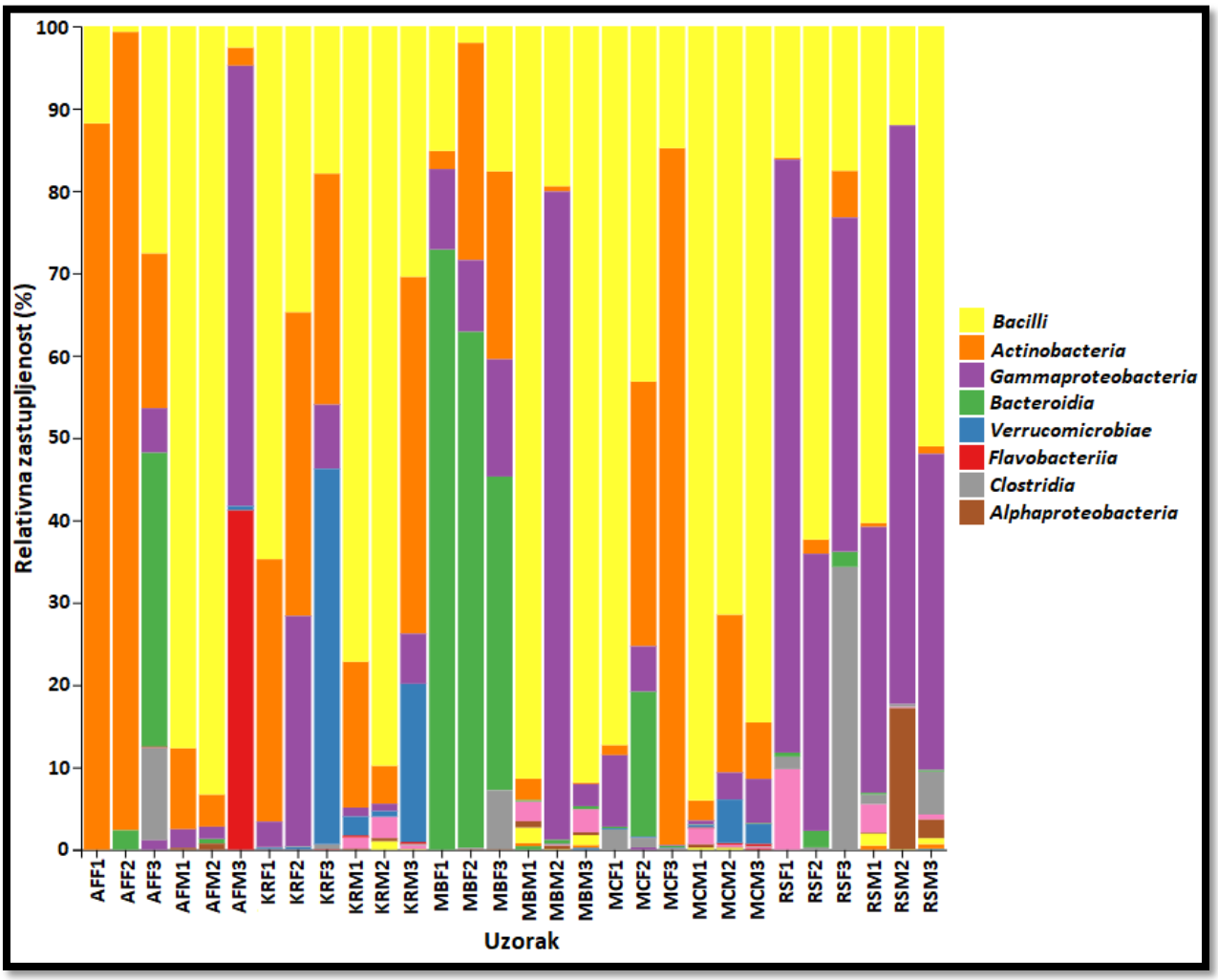


Slika 12. Relativna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica na razini koljena u pojedinačnim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

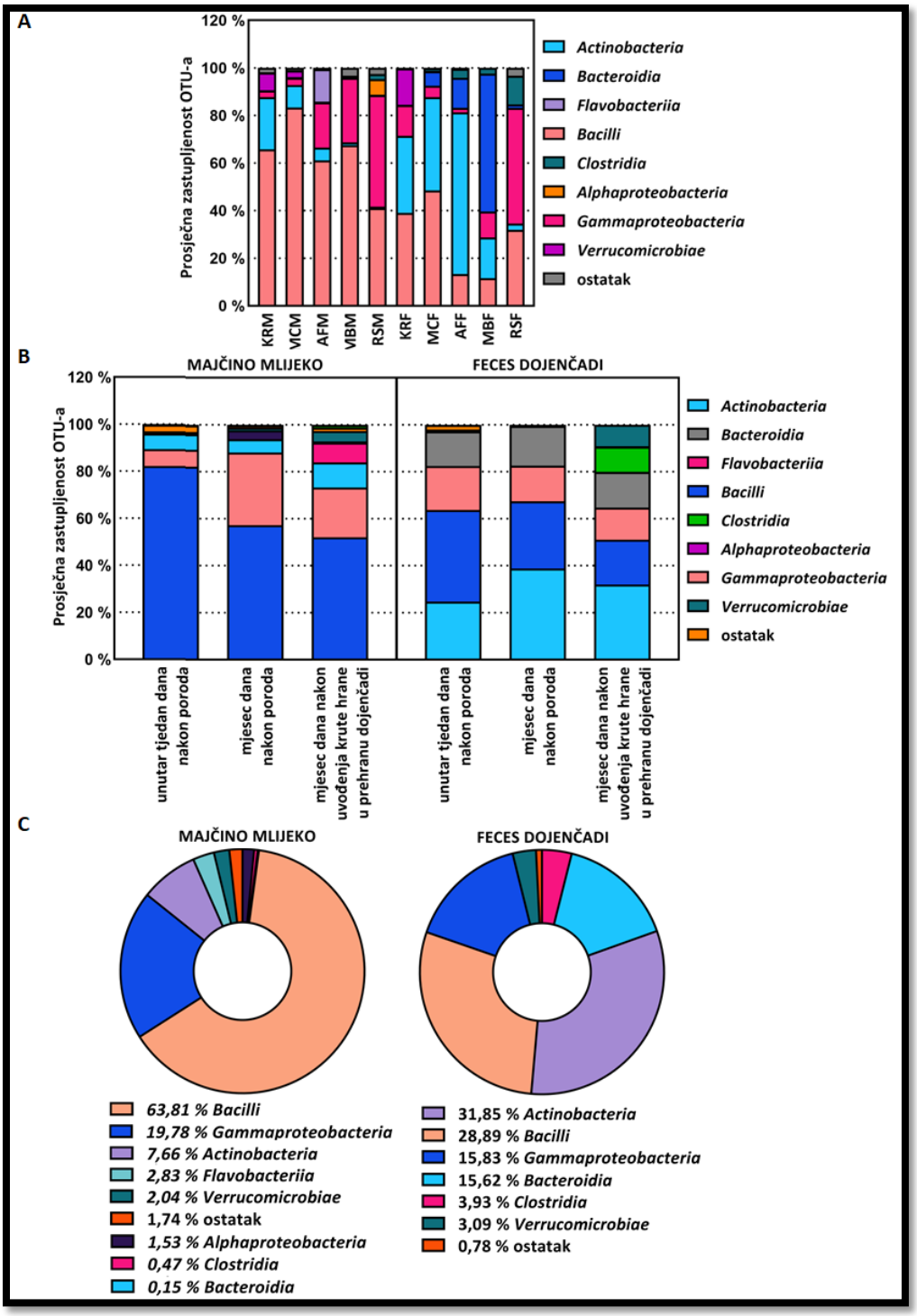


Slika 13. Prosječna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica (OTU-a) na razini koljena u: **A** 3 uzorka mlijeka iste majke, odnosno fecesa istog djeteta **B** uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikupljenim unutar tjedan dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi. OTU-i prosječne zastupljenosti manje od 2 %, svrstani su pod ostatak **C** svim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

Na slici 14, prikazana je relativna zastupljenost OTU-a na razini razreda u pojedinačnim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi. Također je prikazana prosječna zastupljenost OTU-a na razini razreda unutar tri uzorka mlijeka iste majke, odnosno fecesa istog djeteta (slika 15A) te prosječna zastupljenost taksonomskih razreda u uzorcima mlijeka i fecesa prikupljenim unutar tjedan dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi (slika 15B), dok su razlike u prosječnom sastavu mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi na razini razreda, prikazani su na slici 15C.

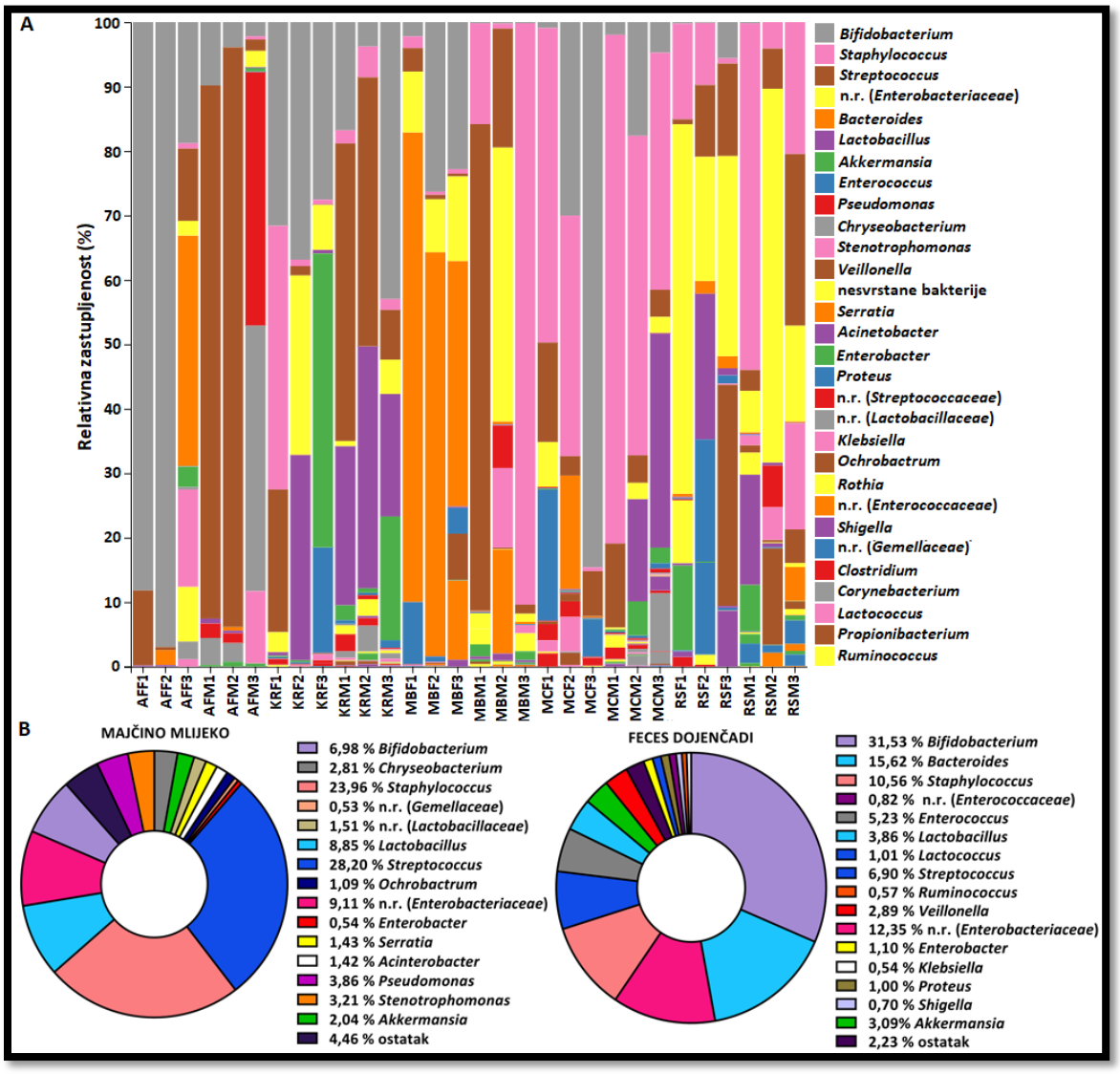


Slika 14. Relativna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica na razini razreda u pojedinačnim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

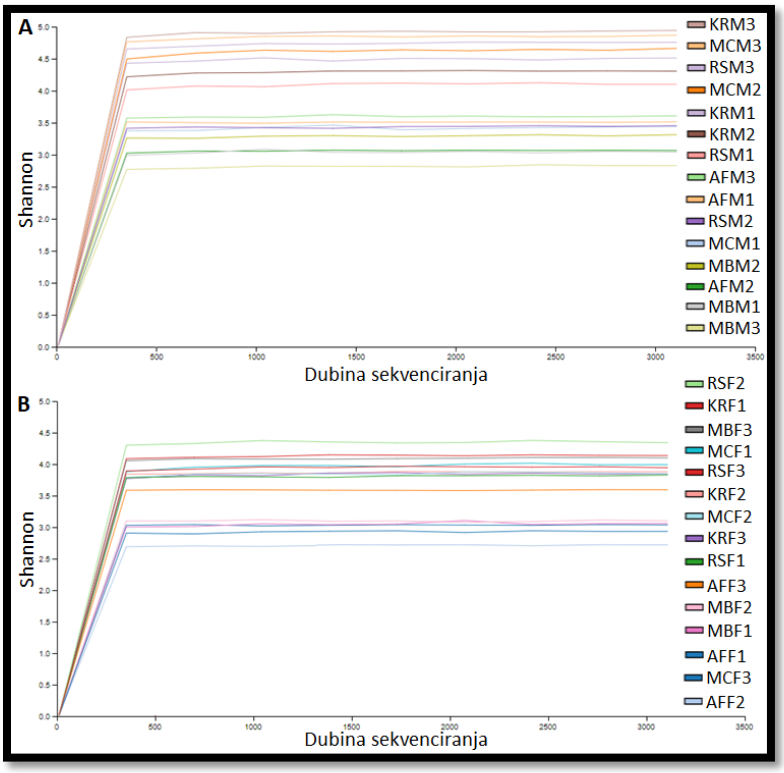


Slika 15. Prosječna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica (OTU-a) na razini razreda u: **A** 3 uzorka mlijeka iste majke, odnosno fecesa istog djeteta **B** uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikupljenim unutar tjedan dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi **C** svim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi. OTU-i prosječne zastupljenosti manje od 0,1 %, svrstani su pod ostatak

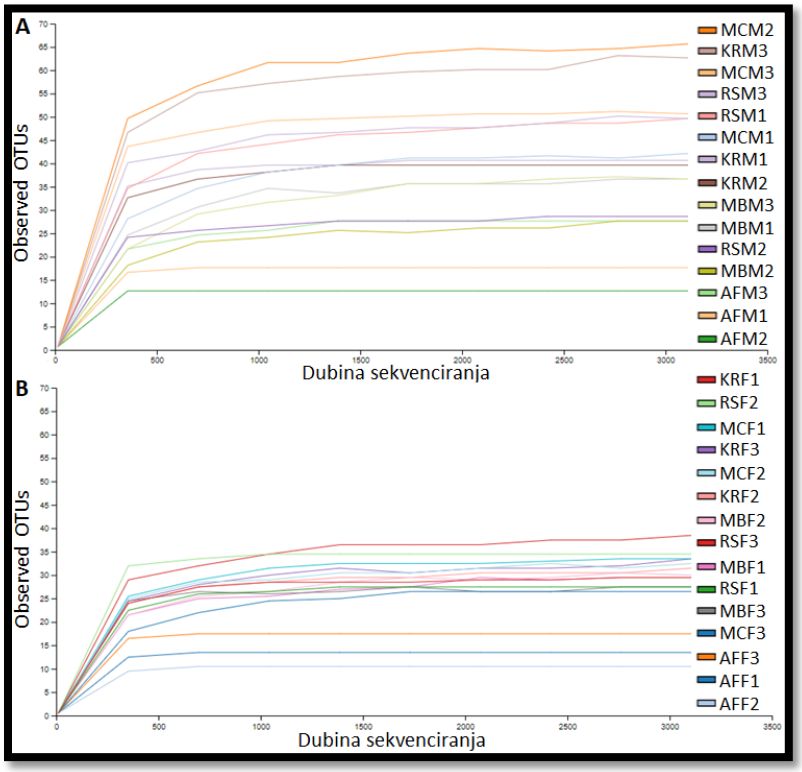
Na slici 16A, prikazana je relativna zastupljenost OTU-a na razini roda u pojedinačnim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, a na slici 16B, usporedba prosječnog sastava mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi na razini roda. Prikazana je α- i β-raznolikost sastava mikrobioma pomoću QIIME 2 platforme. Za određivanje α-raznolikosti korištene su „Shannon“ (slika 17), „Observed OTUs“ (slika 18) i „Faith's pd“ (slika 19) metrike. Za određivanje β-raznolikosti je korištena netežinska UniFrac metrika, čiji su rezultati vizualizirani PCoA analizom (slika 20).



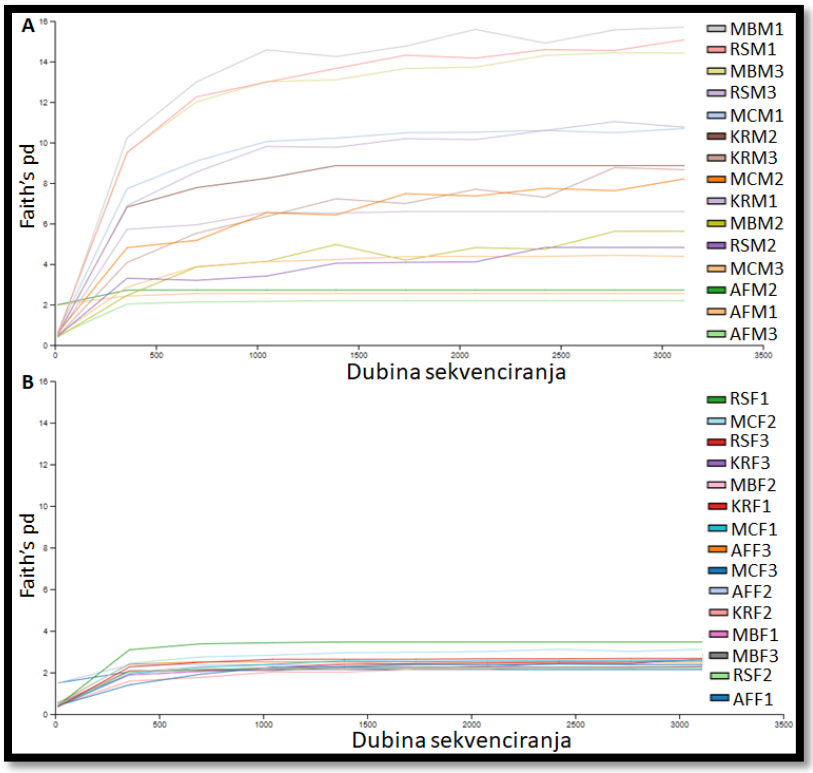
Slika 16. A Relativna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica (OTU-a) na razini roda u pojedinačnim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi **B** Prosječna zastupljenost OTU-a na razini roda u svim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi. OTU-i prosječne zastupljenosti manje od 0,5 %, svrstani su pod ostatak. **n.r.** neidentificirani rod iz porodice navedene u zagradi



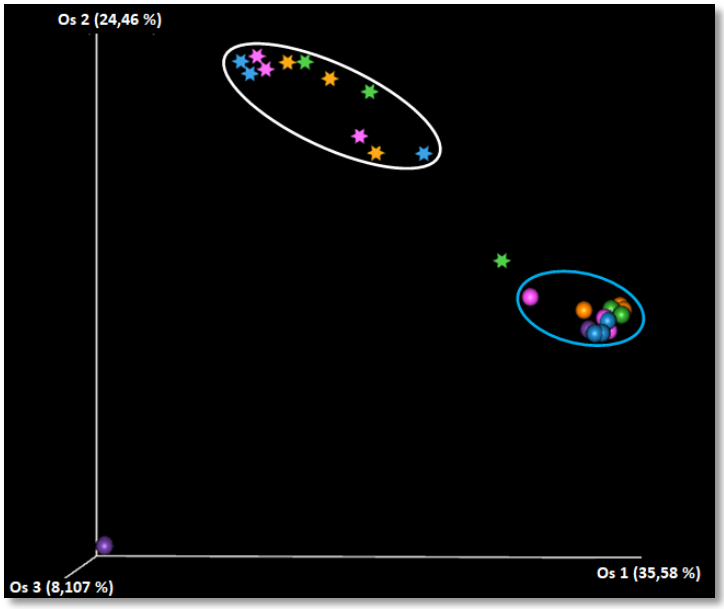
Slika 17. α-raznolikost majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikazana "Shannon" metrikom



Slika 18. α-raznolikost majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikazana "Observed OTUs" metrikom



Slika 19. α-raznolikost mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikazana "Faith's phylogenetic diversity" metrikom



Slika 20. PCoA analiza β-raznolikosti mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi izračunate netežinskom UniFrac metrikom. Uzorci majčinog mlijeka prikazani su zvjezdicom, a fecesa kružićem. Uzorci istog para majke i djeteta označeni su istom bojom. Bijelom elipsom je obuhvaćen klaster uzoraka majčinog mlijeka, a plavom klaster uzoraka fecesa dojenčadi

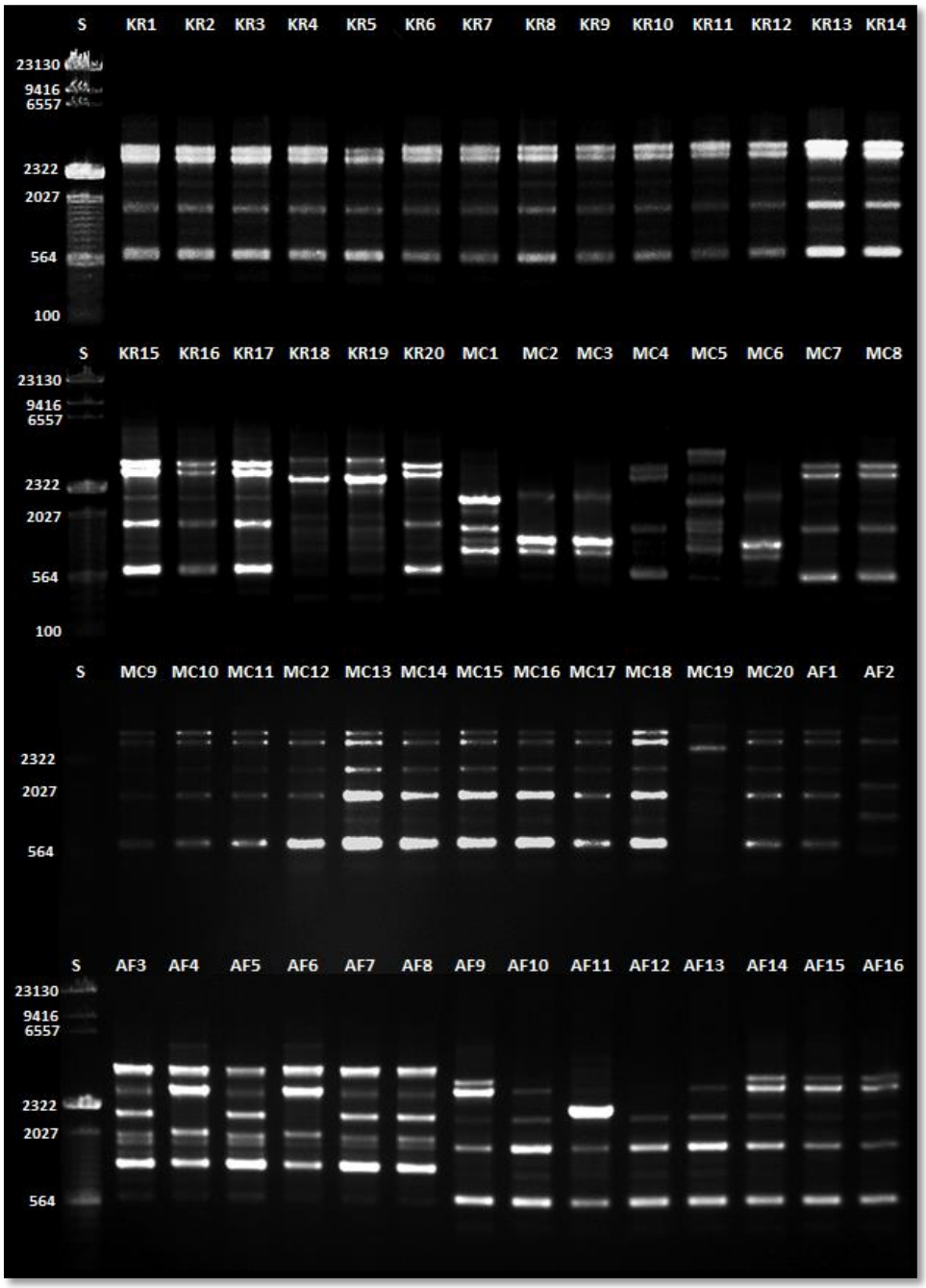
4.2. Izolacija i identifikacija bakterija iz majčinog mlijeka te odabir sojeva BMK-potencijalnih probiotika nove generacije

Iz uzoraka mlijeka svake majke (n=5), izolirano je po 20 bakterijskih sojeva poraslih na MRS krutoj hranjivoj podlozi, koji su postali dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Iz ukupno 100 novoizoliranih sojeva, imenovanih oznakom dojilje te brojem od 1-20, ekstrahirana je DNA kojoj je zatim spektrofotometrijski određena koncentracija (tablica 6).

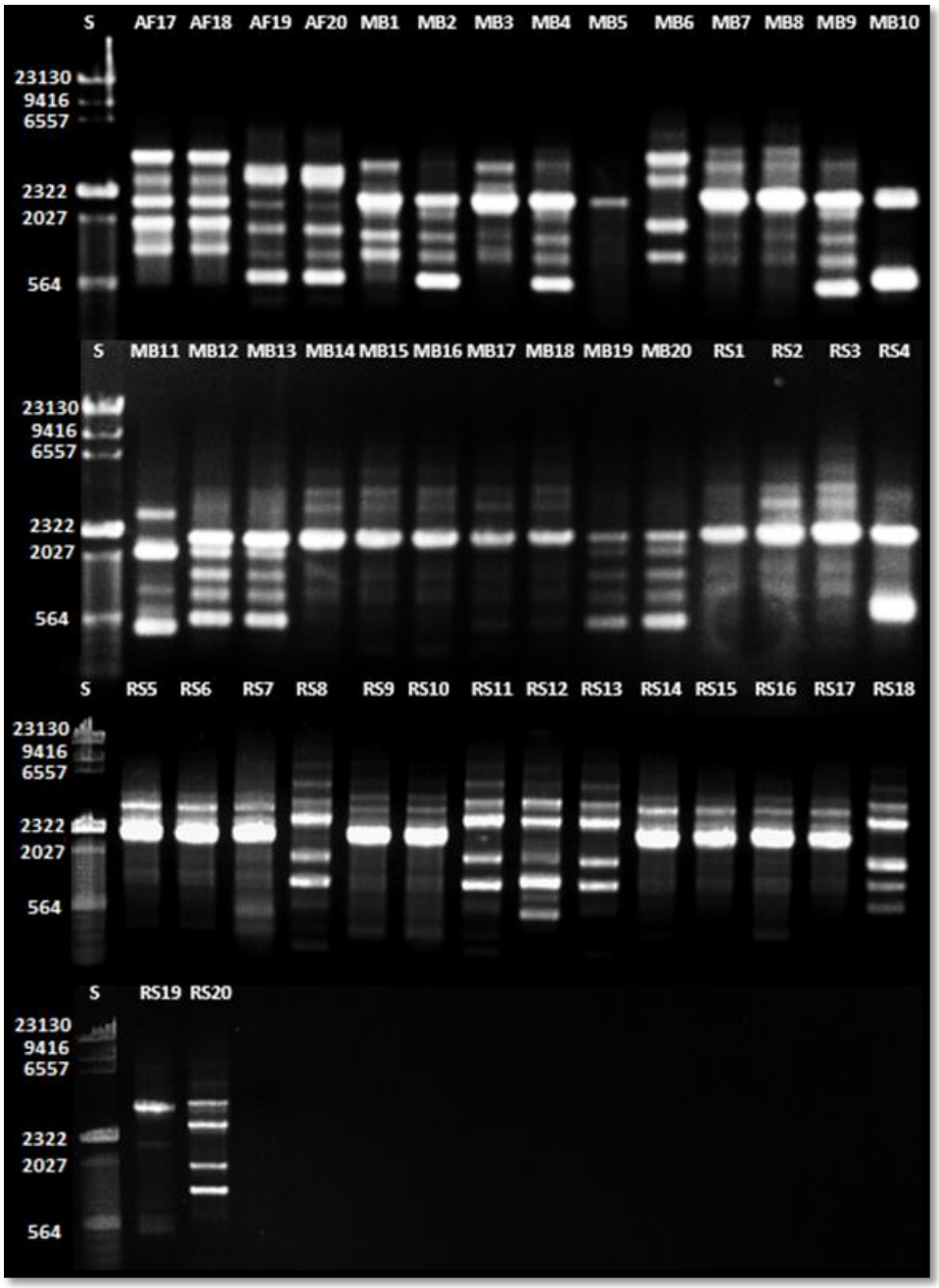
Tablica 6. Koncentracije DNA sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka

Sojevi 1. majke		**Sojevi 2. majke**		**Sojevi 3. majke**		**Sojevi 4. majke**		**Sojevi 5. majke**	
Soj	**DNA (ng μL^{-1})**	**Soj**	**DNA (ng μL^{-1})**	**Soj**	**DNA (ng μL^{-})**	**Soj**	**DNA (ng μL^{-})**	**Soj**	**DNA (ng μL^{-})**
KR1	517,85	MC1	266,76	AF1	574,81	MB1	10,20	RS1	291,16
KR2	637,39	MC2	444,77	AF2	27,60	MB2	218,59	RS2	37,59
KR3	1042,59	MC3	458,61	AF3	5,68	MB3	11,60	RS3	304,75
KR4	972,51	MC4	555,16	AF4	32,19	MB4	128,35	RS4	911,06
KR5	615,45	MC5	18,73	AF5	15,25	MB5	575,20	RS5	31,00
KR6	640,64	MC6	480,58	AF6	25,54	MB6	10,9	RS6	34,00
KR7	578,92	MC7	822,17	AF7	1,69	MB7	307,92	RS7	119,74
KR8	580,27	MC8	616,60	AF8	11,18	MB8	282,13	RS8	81,02
KR9	565,58	MC9	446,25	AF9	437,92	MB9	129,41	RS9	207,74
KR10	512,36	MC10	340,12	AF10	334,42	MB10	16,52	RS10	126,36
KR11	585,02	MC11	462,80	AF11	491,16	MB11	171,09	RS11	54,92
KR12	658,52	MC12	391,55	AF12	276,60	MB12	144,87	RS12	10,66
KR13	322,19	MC13	533,81	AF13	370,92	MB13	186,78	RS13	10,49
KR14	347,63	MC14	854,42	AF14	294,65	MB14	32,36	RS14	63,25
KR15	439,82	MC15	651,78	AF15	408,47	MB15	258,03	RS15	45,85
KR16	681,52	MC16	673,75	AF16	391,34	MB16	246,05	RS16	79,40
KR17	490,25	MC17	658,13	AF17	6,13	MB17	22,76	RS17	48,62
KR18	664,60	MC18	573,59	AF18	4,10	MB18	236,85	RS18	6,07
KR19	640,01	MC19	605,28	AF19	542,26	MB19	208,30	RS19	685,8
KR20	549,81	MC20	669,36	AF20	283,84	MB20	197,36	RS20	13,87

U svrhu detekcije i eliminacije istovjetnih bakterijskih sojeva, izoliranih iz uzoraka mlijeka pojedine majke, provedena je RAPD-PCR reakcija u kojoj je kao kalup korištena DNA bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka. Agaroznom elektroforezom RAPD-PCR produkata dobiveni su jedinstveni genetički profili svakog bakterijskog soja izoliranog iz majčinog mlijeka (slike 21 i 22).

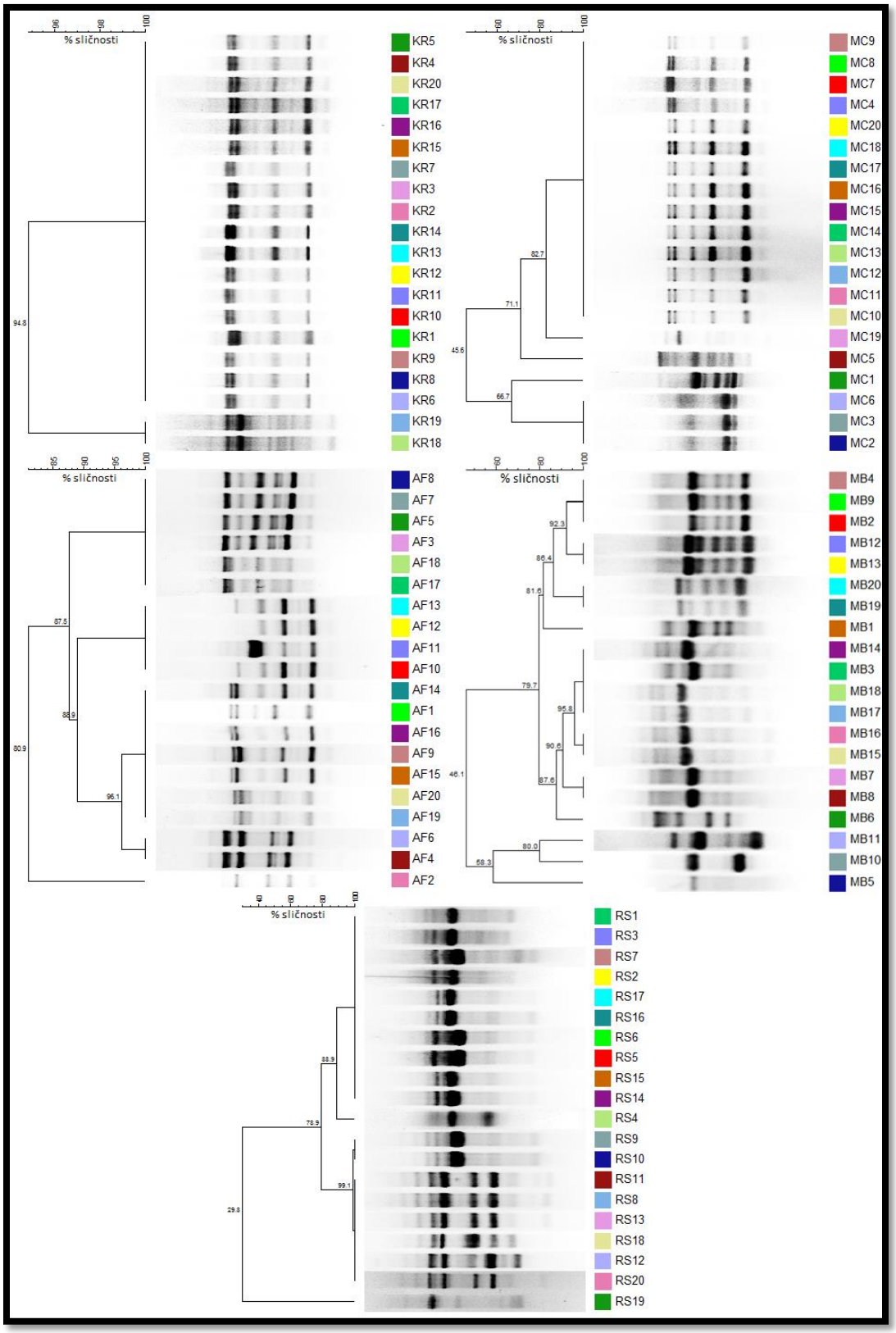


Slika 21. Elektroforetska analiza RAPD PCR-produkata DNA bakterijskih sojeva izoliranih iz uzoraka majčinog mlijeka triju dojilja (KR, MC i AF)



Slika 22. Elektroforetska analiza RAPD PCR-produkata DNA bakterijskih sojeva izoliranih iz uzoraka majčinog mlijeka triju dojilja (AF, MB i RS)

Dobiveni elektroforetski profili RAPD-PCR uzoraka, međusobno su uspoređeni hijerarhijskom klaster analizom pomoću GelCompar II softvera. Sojevi su na temelju sličnosti RAPD-PCR elektroforetskih profila grupirani u klastere unutar pet zasebnih dendrograma sojeva izoliranih iz uzoraka mlijeka pojedine majke. Potom te je odabran po jedan predstavnik svakog klastera generiranog dendrogramom za daljnje analize (slika 23).



Slika 23. Dendrogrami elektroforetskih profila RAPD-PCR produkata DNA bakterijskih sojeva izoliranih iz uzoraka majčinog mlijeka

28 genetički različitih sojeva, odabranih analizom dendrograma, potom je fenotipski okarakterizirano KOH metodom, katalaza testom i mikroskopiranjem obojenog preparata, u svrhu određivanja pripadnosti po Gramu, morfološkog oblika bakterijskih stanica te provjere čistoće kulture. Rezultati svih navedenih analiza, prikazani su tablici 7. Provedena je fenotipska identifikacija API 50 CHL metodom, čiji su rezultati prikazani u tablicama 8 i 9.

Osim fenotipske, provedena je i genotipska identifikacija 28 odabranih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka Sangerovim sekvenciranjem produkata PCR-amplifikacije 16S rRNA gena. Rezultati sekvenciranja su uspoređeni s poznatim sekvencama pohranjenim u NCBI bazi podataka primjenom BLASTn algoritma (tablica 10), te uspoređeni s rezultatima hijerarhijske klaster analize RAPD-PCR elektroforetskih profila svih 100 sojeva kako bi se utvrdila zastupljenost pojedinih taksonomskih rodova unutar svih bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka (slika 24).

Tablica 7. Rezultati fenotipske karakterizacije 28 odabranih bakterijskih izolata iz majčinog mlijeka, provedene bojanjem po Gramu, mikroskopiranjem, KOH metodom i katalaza testom

Soj	Bojanje po Gramu	KOH metoda	Katalaza test
KR19	Gram + bacili	Gram +	-
KR20	Gram + koki	Gram +	-
MC1	Gram + bacili	Gram +	-
MC2	Gram + koki	Gram +	-
MC5	Gram + koki	Gram +	+
MC13	Gram + koki	Gram +	-
MC19	Gram + bacili	Gram +	-
AF2	Gram + koki	Gram +	+
AF4	Gram + koki	Gram +	+
AF5	Gram + koki	Gram +	+
AF12	Gram + koki	Gram +	-
AF16	Gram + koki	Gram +	-
MB1	Gram + bacili	Gram +	-
MB2	Gram + bacili	Gram +	-
MB5	Gram + koki	Gram +	-
MB6	Gram + koki	Gram +	+
MB7	Gram + bacili	Gram +	-
MB10	Gram + koki	Gram +	-
MB11	Gram + koki	Gram +	-
MB13	Gram + bacili	Gram +	-
MB15	Gram + bacili	Gram +	-
MB18	Gram + bacili	Gram +	-
MB20	Gram + bacili	Gram +	-
RS4	Gram + koki	Gram +	-
RS8	Gram + koki	Gram +	+
RS10	Gram + bacili	Gram +	-
RS17	Gram + koki	Gram +	+
RS19	Gram + koki	Gram +	-

Tablica 8. Fermentacijski profile bakterijskih izolata iz majčinog mlijeka oznaka KR, MC i AF dobiveni API 50 CHL testom

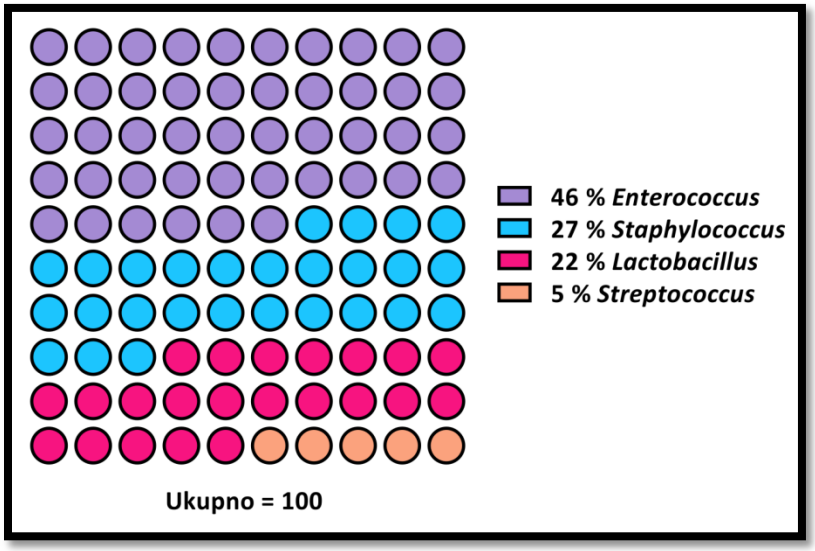
Ugljikohidrati	KR19	KR20	MC1	MC2	MC5	MC13	MC19	AF2	AF4	AF5	AF12	AF16	MB1	MB2
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritriol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinoza	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Riboza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ksiloza	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
L-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-metil-ksilozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorboza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inozitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
α-metil-D-manozid	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+	+
α-metil-D-glukozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
N-acetil glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalin	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-keto-glukonat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoza	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoza	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saharoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Melezitoza	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-rafinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ksilitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-gentobioza	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
D-turanoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-liksoza	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
D-tagatoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+	-	-	+	-	+	+
Glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-keto-glukonat	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablica 9. Fermentacijski profili bakterijskih izolata iz majčinog mlijeka oznaka MB i RS dobiveni API 50 CHL testom

Ugljikohidrati	MB5	MB6	MB7	MB10	MB11	MB13	MB15	MB18	MB20	RS4	RS8	RS10	RS17	RS19
Kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritriol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinoza	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Riboza	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ksiloza	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-metil-ksilozid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaktoza	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manoza	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorboza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inozitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-metil-D-manozid	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
α-metil-D-glukozid	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalin	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-keto-glukonat	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Eskulin	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoza	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Melibioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saharoza	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitoza	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
D-rafinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ksilitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-gentobioza	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-turanoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-liksoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-keto-glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablica 10. Rezultati sekvenciranja 16S rRNA gena 28 odabranih bakterijskih izolata iz majčinog mlijeka

Šifra izolata iz majčinog mlijeka	Sličnosti sa sekvencama pohranjenim u NCBI banci gena			
	Rezultat identifikacije	% sličnosti	Pristupni broj u NCBI banci gena	E-vrijednost
KR19	*Lactobacillus plantarum*	98	MG550988.1	0.0
KR20	*Enterococcus faecium*	98	MN566092.1	0.0
MC1	*Lactobacillus fermentum*	98	KY435712.1	0.0
MC2	*Enterococcus faecalis*	98	KC113205.1	0.0
MC5	*Staphylococcus epidermis*	98	CP035643.1	0.0
MC13	*Enterococcus faecium*	97	CP014529.1	0.0
MC19	*Lactobacillus plantarum*	97	HM130542.1	0.0
AF2	*Staphylococcus epidermidis*	96	AY030340.1	0.0
AF4	*Staphylococcus epidermidis*	97	CP014119.1	0.0
AF5	*Staphylococcus epidermis*	98	CP043804.1	0.0
AF12	*Enterococcus durans*	97	MF405179.1	0.0
AF16	*Enterococcus faecium*	98	JN560856.1	0.0
MB1	*Lactobacillus brevis*	85	MK774569.1	0
MB2	*Lactobacillus brevis*	84	CP031208.1	3e-107
MB5	*Streptococcus oralis* subsp. *dentisani*	83	CP034442.1	0.0
MB6	*Staphylococcus epidermis*	98	CP043804.1	0.0
MB7	*Lactobacillus plantarum*	95	MF197402.1	0.0
MB10	*Streptococcus salivarius*	97	CP014144.1	0.0
MB11	*Streptococcus oralis*	98	LR134336.1	0.0
MB13	*Lactobacillus brevis*	88	MT512175.1	0.0
MB15	*Lactobacillus plantarum*	97	JQ801725.1	0.0
MB18	*Lactobacillus plantarum*	90	MT604681.1	0.0
MB20	*Lactobacillus brevis*	88	JQ805655.1	0.0
RS4	*Streptococcus oralis*	92	CP019562.1	0.0
RS8	*Staphylococcus epidermis*	98	AP019721.1	0.0
RS10	*Lactobacillus plantarum*	98	AB362728.1	0.0
RS17	*Staphylococcus epidermidis*	89	MG557813.1	0.0
RS19	*Streptococcus mitis*	98	KX880968.1	0.0



Slika 24. Zastupljenost rodova unutar 100 bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka

4.3. Detekcija sojeva producenata potencijalnih terapijskih biomolekula, S-proteina i bakteriocina, među BMK izoliranim iz majčinog mlijeka

U svrhu detekcije producenata S-proteina, provedena je ekstrakcija površinskih proteina 100 bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka te njihovo elektroforetsko razdvajanje (slika 25). Pritom je kao pozitivna kontrola korišten soj *Lb. helveticus* M92 koji proizvodi S-proteine, a kao negativna kontrola soj *Lb. plantarum* D13 koji ih ne proizvodi. Proteinski profili sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, dobiveni SDS-PAGE elektroforezom, potom su međusobno uspoređeni hijerarhijskom klaster analizom (slika 26).

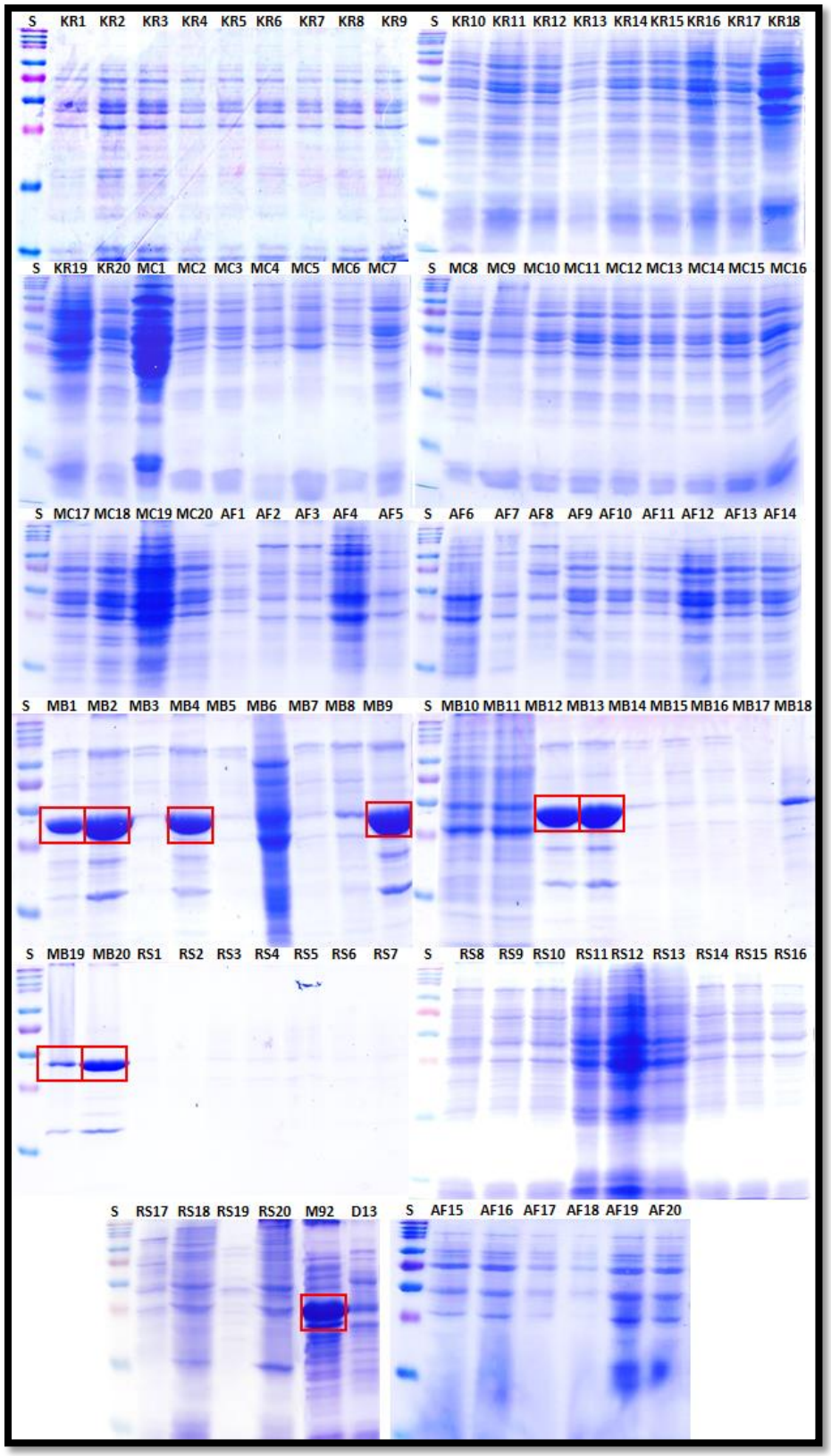
Prisutnost gena koji kodiraju za S-proteine ispitana je PCR-analizom s Usl početnicama (slika 27), pri čemu je kao pozitivna kontrola korištena DNA referentnog soja koji proizvodi S-proteine (*L. helveticus* M92), a kao negativna kontrola, DNA referentnog soja koji ih ne sadrži (*L. plantarum* D13).

Kao prvi korak u detekciji producenata bakteriocina, ispitana je prisutnost gena za biosintezu bakteriocina u genomima odabranih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, pomoću PCR analize sa 6 različitih parova početnica (slika 28).

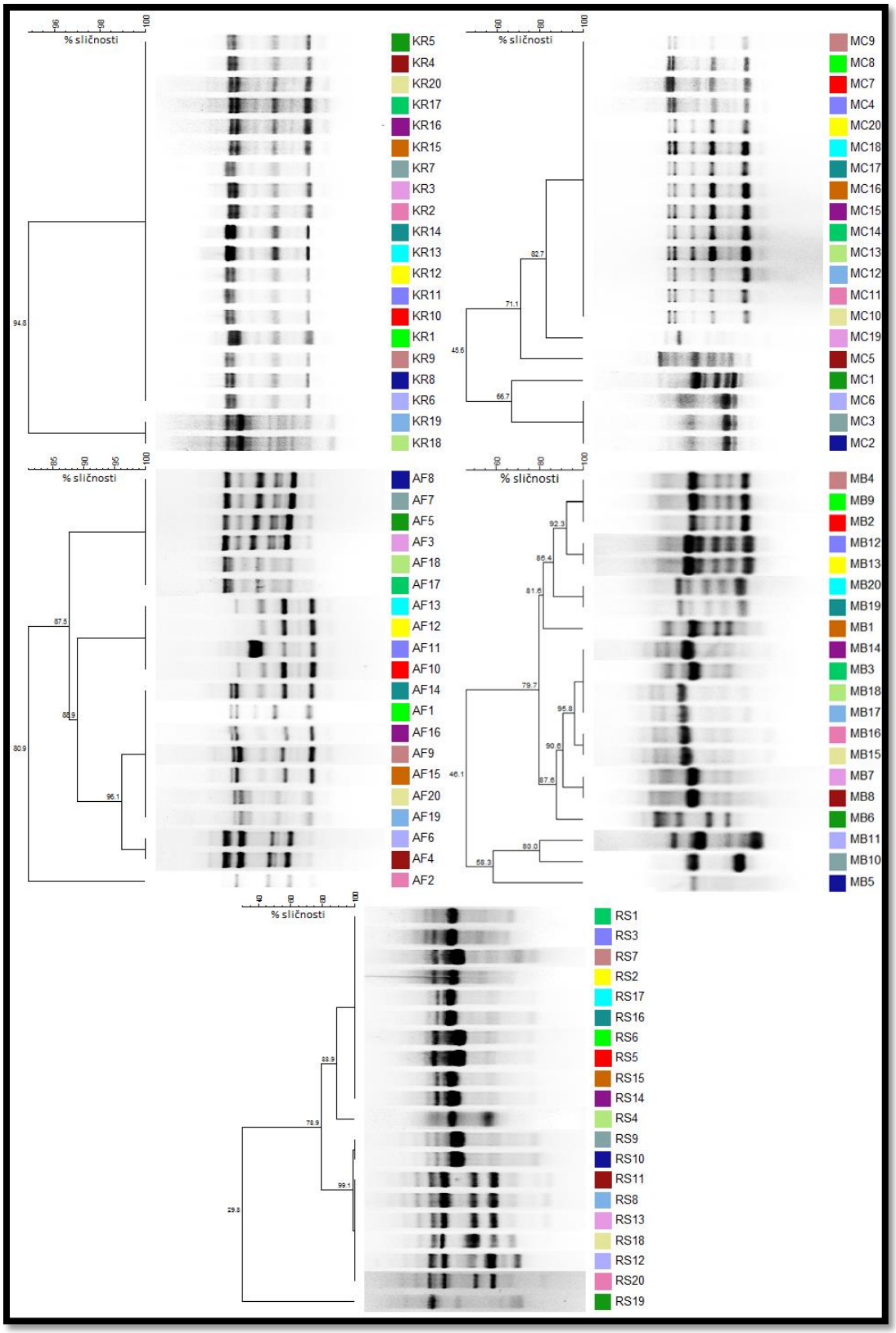
Zatim je ispitano antagonističko djelovanje bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka metodom difuzije s rupama u agaru prema 4 patogena mikroorganizma: *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111™, *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1. Rezultati navedene analize, prikazani su u tablici 11.

Osim metodom difuzije s rupama u agaru, antimikrobno djelovanje bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka, prema patogenim test-mikroorganizmima *S. aureus* 3048, *L. monocytogenes* ATCC® 19111™, *E. coli* 3014 i *S.* Typhimurium FP1, ispitano je i metodom dvostrukog sloja čiji su rezultati prikazani u tablici 12.

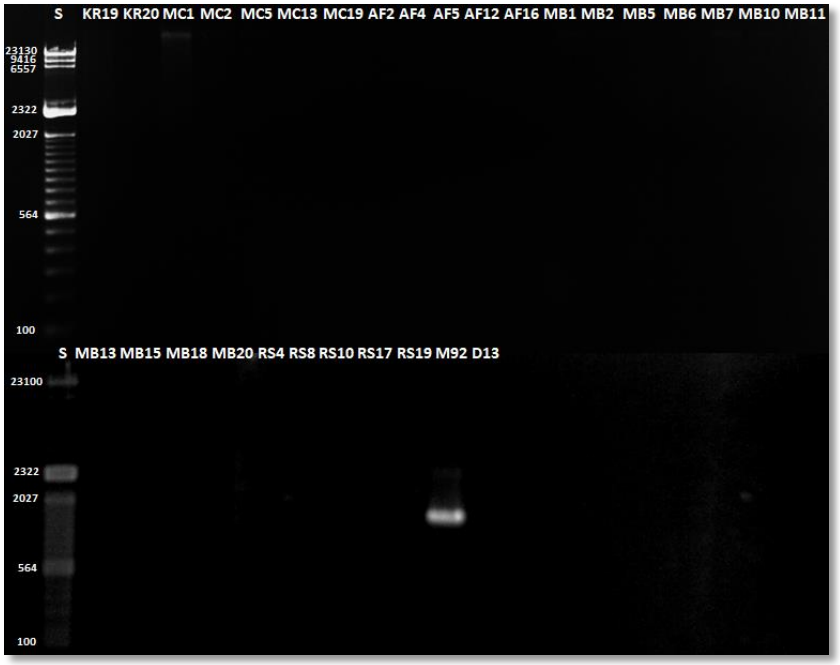
Također, metodom dvostrukog sloja, ispitano je i antimikrobno djelovanje bakterija iz majčinog mlijeka prema srodnim BMK iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Enterococcus.* Rezultati su prikazani u tablici 13.



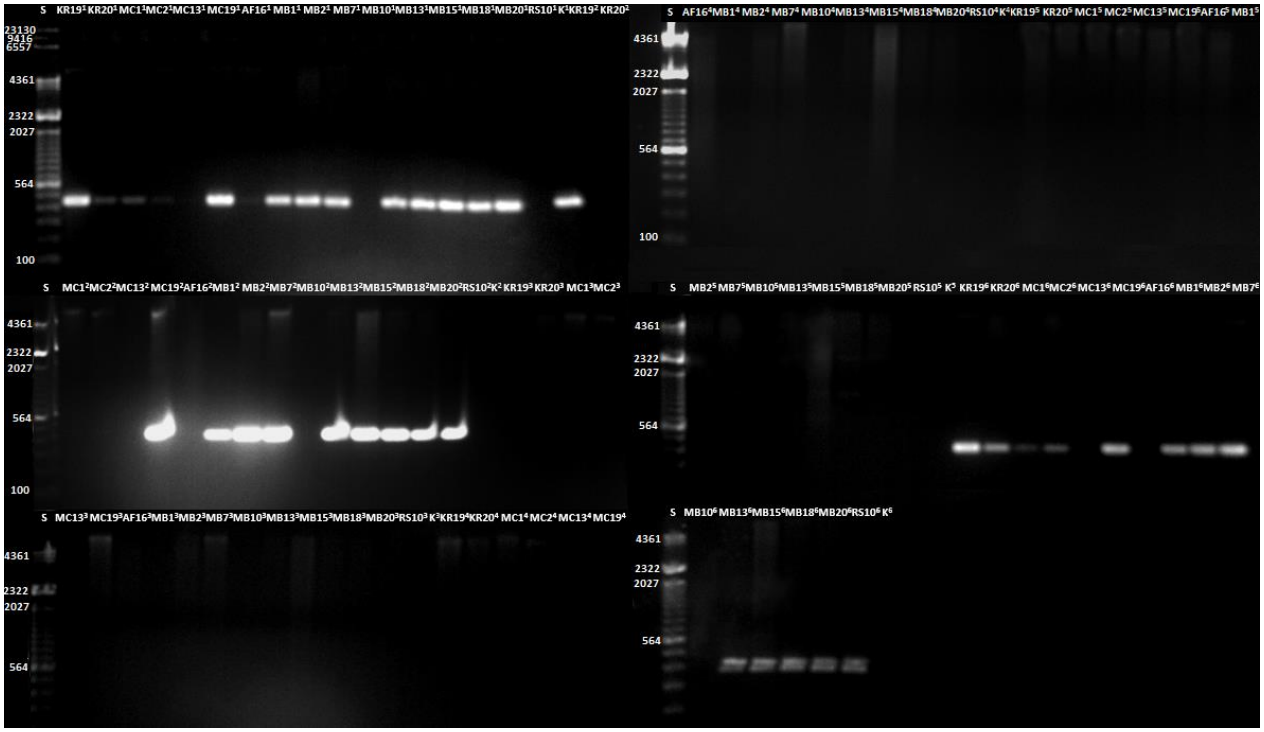
Slika 25. SDS-PAGE površinskih proteina svih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka. Proteinske vrpce karakteristične za S-proteine, označene su crvenim pravokutnikom



Slika 26. Dendrogrami SDS-PAGE elektroforetskih profila proteina svih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka



Slika 27. Elektroforetska analiza produkata PCR reakcije DNA bakterijskih sojeva iz majčinog mlijeka s Usl početnicama specifičnim za gene S-proteina



Slika 28. Agarozna gel elektroforeza produkata PCR reakcije DNA bakterijskih sojeva iz majčinog mlijeka s početnicama za gene plantaricina *plnA* ([1]), *plnJ* ([2]), *plnW* ([3]), *plnNC8* ([4]), *plnS* ([5]) i *plnEF* ([6])

Tablica 11. Promjeri zona inhibicije rasta test-mikroorganizama *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111™, *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1, nastali djelovanjem supernatanata kultura bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka, metodom difuzije s rupama u agaru

SOJ	*S. aureus* 3048	*L. monocytogenes* ATCC®19111™	*E. coli* 3014	*S.* Typhimurium FP1
	Promjer zona inhibicije (mm)			
KR19	16	16	14	14
KR20	10	11	10	14
MC1	13	14	13	15
MC2	10	12	12	13
MC13	9	12	9	13
MC19	16	15	15	15
AF16	14	13	13	12
MB1	17	30	16	15
MB2	20	30	15	16
MB7	13	11	12	12
MB10	/	/	/	/
MB13	17	30	16	18
MB15	10	14	14	15
MB18	22	30	14	15
MB20	23	30	13	16
RS10	14	14	13	12

Tablica 12. Antagonističko djelovanje bakterijskih izolata iz majčinog mlijeka prema *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111™, *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1, određeno metodom s dvostrukim slojem agara

SOJ	*S. aureus*			*L. monocytogenes*			*E. coli*			*S.* Typhimurium		
	CD (mm)	ID (mm)	EIR	CD (mm)	ID (mm)	EIR	CD (mm)	ID (mm)	EIR	CD (mm)	ID (mm)	EIR
KR19	8	45	4,63	8	31	2,88	8	28	2,50	8	40	4,00
KR20	8	22	1,75	8	21	1,63	8	20	1,50	8	40	4,00
MC1	8	28	2,50	8	24	2,00	8	19	1,38	8	40	4,00
MC2	8	28	2,50	8	20	1,50	8	20	1,50	8	35	3,38
MC13	8	20	1,50	8	15	0,88	8	19	1,38	8	26	2,25
MC19	8	40	4,00	8	35	3,38	8	40	4,00	8	35	3,38
AF16	8	40	4,00	8	28	2,50	8	20	1,50	8	32	3,00
MB1	8	17	1,13	8	30	2,75	8	16	1,00	8	15	0,88
MB2	8	20	1,50	8	30	2,75	8	14	0,75	8	15	0,88
MB7	8	25	2,13	8	15	0,88	8	19	1,38	8	19	1,38
MB10	8	14	0,75	8	12	0,50	8	12	0,50	8	13	0,63
MB13	8	17	1,13	8	30	2,75	8	15	0,88	8	13	0,63
MB15	8	17	1,13	8	25	2,13	8	33	3,13	8	30	2,75
MB18	8	22	1,75	8	30	2,75	8	13	0,63	8	15	0,88
MB20	8	23	1,88	8	30	2,75	8	15	0,88	8	15	0,88
RS10	8	20	1,50	8	20	1,50	8	18	1,25	8	15	0,88

EIR: jako inhibicijsko djelovanje; srednje jako inhibicijsko djelovanje; slabo inhibicijsko djelovanje

Tablica 13. Antagonističko djelovanje bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka prema mikroorganizmima iz rodova *Enterococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus*, izraženo kao EIR, određen metodom s dvostrukim slojem agara

SOJ	*Enterococcus*			*Lactococcus*			*Lactobacillus*		
	CD (mm)	ID (mm)	EIR	CD (mm)	ID (mm)	EIR	CD (mm)	ID (mm)	EIR
KR19	8	15	0,88	8	21	1,63	8	12	0,50
KR20	8	9	0,13	8	9	0,13	8	0	/
MC1	8	14	0,75	8	12	0,25	8	12	0,50
MC2	8	10	0,25	8	10	0,25	8	/	/
MC13	8	9	0,13	8	/	/	8	/	/
MC19	8	32	3,00	8	25	2,13	8	13	0,50
AF16	8	/	/	8	/	/	8	/	/
MB1	8	32	3,00	8	30	2,75	8	14	0,75
MB2	8	15	0,88	8	20	1,50	8	18	1,25
MB7	8	12	0,50	8	12	0,50	8	/	/
MB10	8	/	/	8	/	/	8	/	/
MB13	8	15	0,88	8	20	1,50	8	20	1,50
MB15	8	14	0,75	8	12	0,50	8	12	0,50
MB18	8	14	0,75	8	19	1,38	8	17	1,13
MB20	8	20	1,50	8	24	2,00	8	20	1,50
RS10	8	14	0,75	8	12	0,50	8	12	0,50

EIR: jako inhibicijsko djelovanje; srednje jako inhibicijsko djelovanje; slabo inhibicijsko djelovanje

4.4. Probiotički potencijal sojeva producenata S-proteina i bakteriocina izoliranih iz majčinog mlijeka

Osjetljivost bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka na 9 antibiotika (ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomicin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol), na čiju je osjetljivost, prema smjernicama EFSA-e iz 2012., nužno ispitati probiotičke sojeve namijenjene za primjenu kod ljudi i životinja, ispitana je disk-difuzijskom metodom (tablica 14) i E-testom (tablica 15). Vrijednosti promjera zona inhibicije dobivenih disk-difuzijskom metodom, uspoređeni su sa standardima Instituta za kliničke i laboratorijske studije (*engl.* Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI). Prema CLSI standardima, bakterijski sojevi sa zonama inhibicije većim ili jednakim 20 mm se smatraju osjetljivim (*engl.* Sensitive, S); oni sa zonama inhibicije od 15-19 mm se smatraju umjereno osjetljivim (*engl.* Intermediate, I); a oni sa zonama manjim ili jednakim 14 mm se smatraju rezistentnim na antibiotik prisutan u filter disku.

Kako bi se utvrdila minimalna inhibitorna koncentracija, potrebna za inhibiciju rasta bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka pomoću 9 antibiotika propisanih od strane EFSA-e,

provedena je metoda fenotipskog određivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike metodom difuzije u agar pomoću E-testa. Rezultati E-testa izraženi pomoću MIC vrijednosti (tablica 15), uspoređeni su sa službenim graničnim vrijednostima (*engl.* Cut-off values; Critical breakpoints) za antibiotičku osjetljivost, koje je propisala EFSA.

S ciljem ispitivanja prisutnosti gena za rezistenciju na antibiotike podložne horizontalnom transferu, proveden je niz PCR reakcija u kojima je korišteno 9 specifičnih parova početnica za gene za rezistenciju smještene na pokretnim genetičkim elementima (plazmidima i transpozonima). Budući da su pozitivni signali za prisutnost gena podložnih horizontalnom transferu uočeni samo korištenjem početnica za gene koji osiguravaju rezistenciju na gentamicin (slika 29), slike elektroforetskih razdvajanja PCR-produkata dobivenih korištenjem ostalih 8 parova početnica nisu prikazane.

Tablica 14. Osjetljivost bakterijskih izolata iz majčinog mlijeka na 9 antibiotika (ampicillin (AM), klindamicin (CC), kloramfenikol (C), eritromicin (E), vankomicin (VA), tetraciklin (TE), kanamicin (K), gentamicin (CN) i streptomicin (S)), ispitana disk-difuzijskom metodom

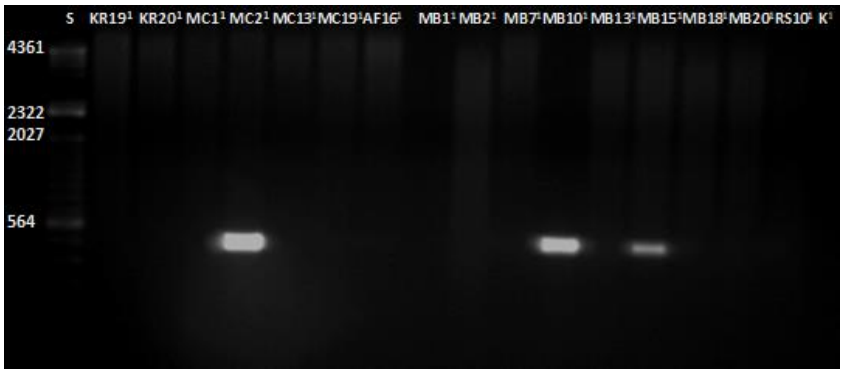
SOJ	Antibiotički disk								
	AM	**CC**	**C**	**E**	**VA**	**TE**	**K**	**CN**	**S**
KR19	S	I	S	I	R	I	R	R	R
MC1	S	S	S	I	R	I	R	R	R
MC19	I	I	S	I	R	I	R	R	R
MB1	S	S	S	S	R	S	R	R	R
MB2	S	S	S	S	R	S	R	R	R
MB7	S	S	S	S	R	I	R	R	R
MB13	S	S	S	S	R	S	R	R	R
MB15	S	S	S	I	R	S	R	R	R
MB18	S	S	S	S	R	S	R	R	R
MB20	S	S	S	S	R	S	R	R	R
RS10	S	I	S	I	R	I	R	R	R
KR20	I	I	I	I	I	S	R	R	R
AF16	I	I	I	I	I	S	R	R	R
MC2	I	R	I	I	I	I	R	R	R
MC13	I	I	I	I	I	S	R	R	R
MB10	S	S	S	S	S	S	R	R	S

Lactobacillus; *Enterococcus*; *Streptococcus*. S-osjetljiv; I-umjereno osjetljiv; R-rezistentan

Tablica 15. E-testom određene vrijednosti MIC (µg mL^{-1}) antibiotika (ampicillin (AM), klindamicin (CM), kloramfenikol (CL), eritromicin (EM), vankomicin (VA), tetraciklin (TC), kanamicin (KM), gentamicin (GM) i streptomicin (SM)), potrebne za inhibiciju rasta bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka

SOJ	MIC (µg mL^{-1})								
	AM	CM	CL	EM	VA	TC	KM	GM	SM
KR19	0,125 (S)	0,19 (S)	1,5 (S)	0,75 (S)	/ (n.r.)	1 (S)	/ (R)	24 (R)	64 (n.r.)
MC1	0,032 (S)	0,016 (S)	1,5 (S)	0,19 (S)	/ (n.r.)	1 (S)	96 (R)	6 (S)	32 (S)
MC19	1 (S)	0,38 (S)	2 (S)	0,75 (S)	/ (n.r.)	1,5 (S)	/ (R)	64 (R)	/ (n.r.)
MB1	0,032 (S)	0,047 (S)	1 (S)	1 (S)	/ (n.r.)	1,5 (S)	/ (R)	32 (R)	256 (R)
MB2	0,023 (S)	0,016 (S)	1 (S)	0,25 (S)	/ (n.r.)	3,0 (S)	/ (R)	24 (R)	512 (R)
MB7	0,016 (S)	0,016 (S)	1,5 (S)	0,75 (S)	/ (n.r.)	1,5 (S)	/ (R)	48 (R)	192 (n.r.)
MB13	0,016 (S)	0,016 (S)	1,5 (S)	0,25 (S)	/ (n.r.)	8 (S)	/ (R)	24 (R)	256 (R)
MB15	0,032 (S)	0,047 (S)	2 (S)	0,75 (S)	/ (n.r.)	1,5 (S)	/ (R)	48 (R)	256 (n.r.)
MB18	0,032 (S)	0,047 (S)	1 (S)	1 (S)	/ (n.r.)	1,5 (S)	/ (R)	128 (R)	/ (n.r.)
MB20	0,032 (S)	0,032 (S)	1 (S)	0,38 (S)	/ (n.r.)	1 (S)	/ (R)	96 (R)	512 (R)
RS10	0,047 (S)	0,094 (S)	2 (S)	0,25 (S)	/ (n.r.)	4 (S)	/ (R)	24 (R)	96 (n.r.)
KR20	0,125 (S)	0,25 (S)	2 (S)	3 (S)	0,75 (S)	0,094 (S)	/ (R)	24 (S)	64 (S)
AF16	0,25 (S)	0,38 (S)	1,5 (S)	3 (S)	1 (S)	0,094 (S)	/ (R)	24 (S)	192 (R)
MC2	0,19 (S)	/ (R)	2 (S)	/ (R)	2 (S)	12 (R)	/ (R)	/ (R)	256 (S)
MC13	/ (R)	0,5 (S)	2 (S)	3 (S)	1,5 (S)	0,125 (S)	/ (R)	/ (R)	/ (R)
MB10	0,75 (S)	0,016 (S)	0,38 (S)	0,5 (S)	0,75 (S)	6 (R)	/ (R)	128 (R)	3 (S)

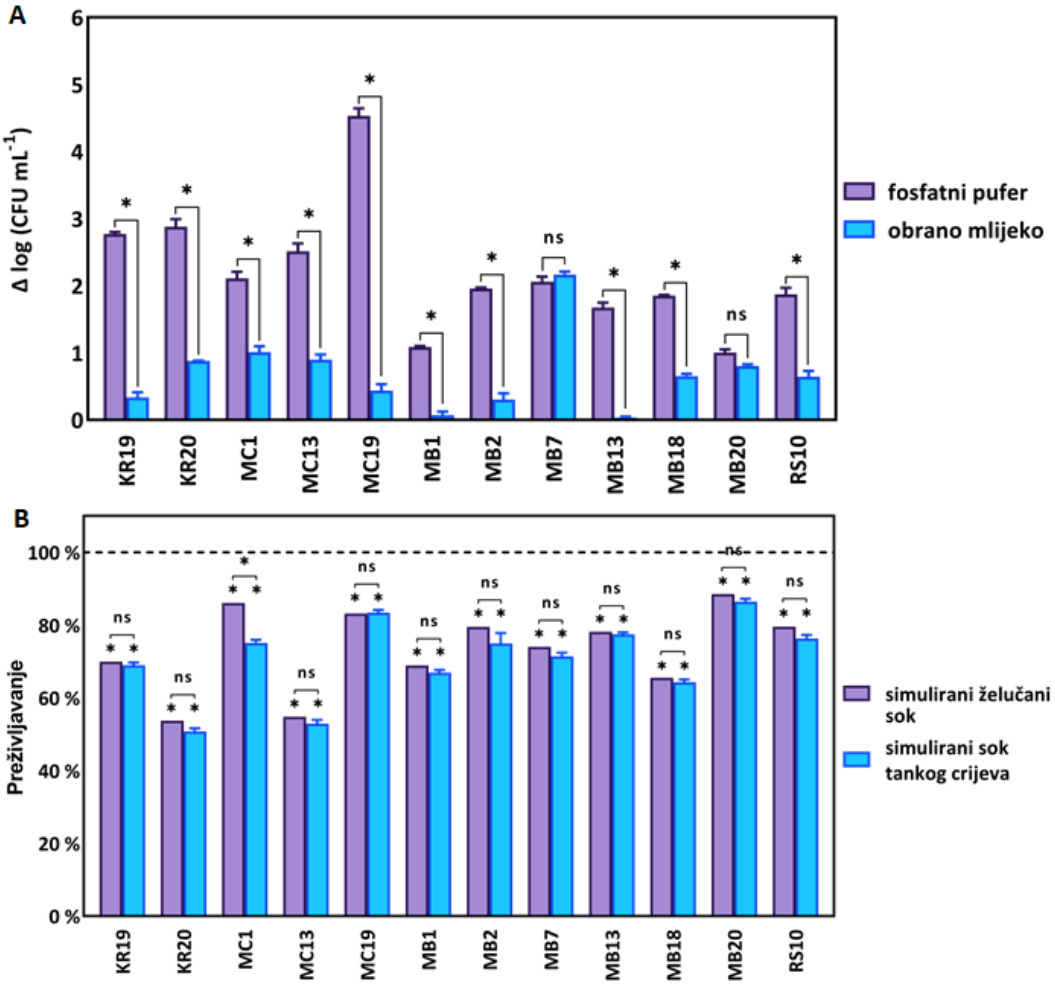
Lactobacillus; *Enterococcus*; *Streptococcus*. S-osjetljiv; I-umjereno osjetljiv; R-rezistentan; n.r.-*engl.* not required (osjetljivost nije potrebno ispitati prema EFSA-i)



Slika 29. Elektroferogram produkata PCR reakcije DNA bakterijskih sojeva iz majčinog mlijeka sa specifičnim početnicama za gene koji kodiraju za rezistenciju na gentamicin (1)

Budući da se u pripravi suhih aktivnih pripravaka probiotičkih sojeva dostupnih na tržištu najčešće primjenjuje postupak liofilizacije, bilo je nužno ispitati preživljavanje BMK izoliranih iz majčinog mlijeka tijekom tog postupka s i bez dodatka obranog mlijeka kao lioprotektora. Broj živih bakterijskih stanica određen je indirektnom metodom, te je njihova smrtnost izražena kao razlika logaritama koncentracije živih stanica prije i nakon liofilizacije (Δlog CFU mL^{-1}) i

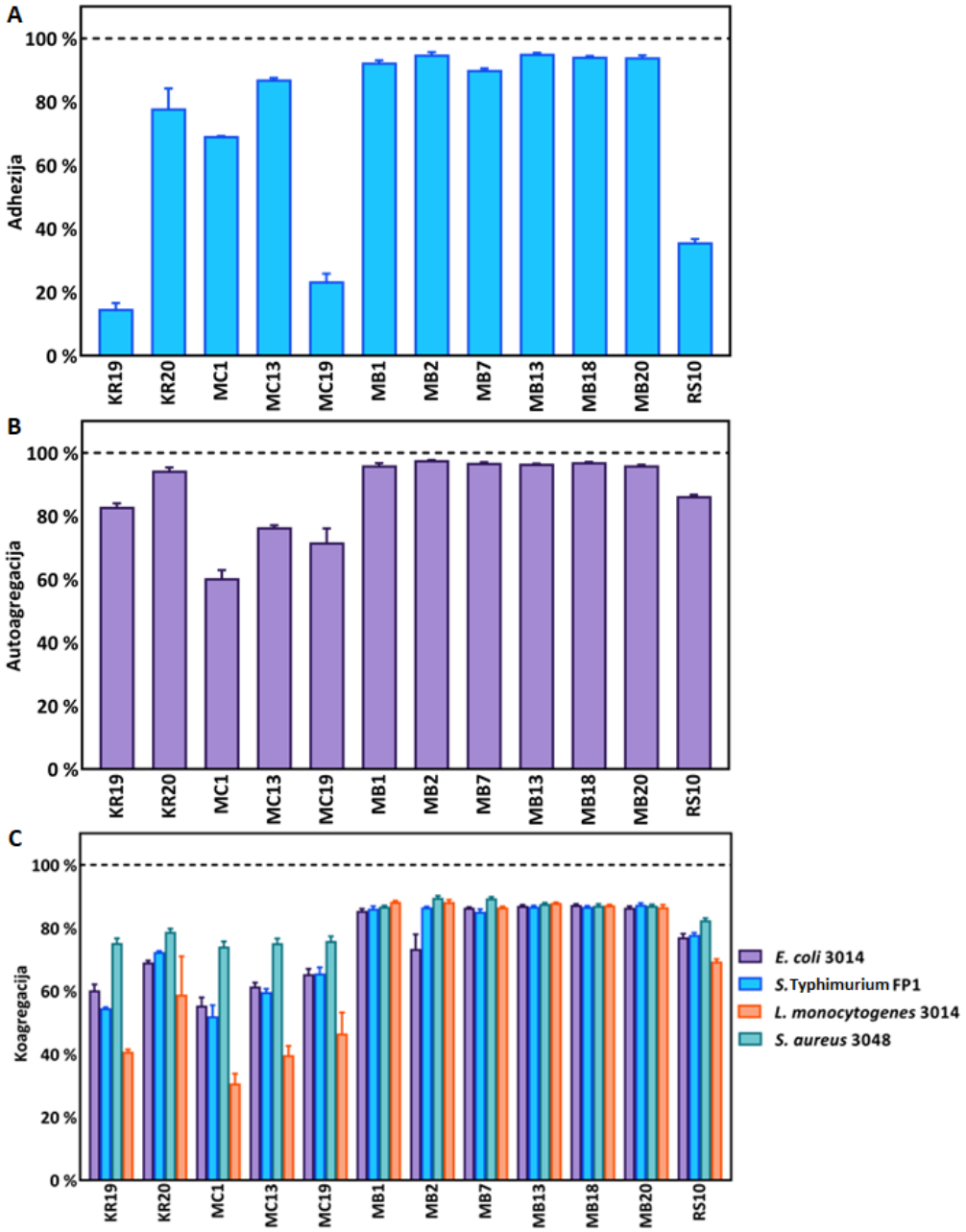
prikazana na slici 30A. Zatim je ispitano preživljavanje potencijalnih probiotičkih sojeva tijekom direktnog prijelaza iz simuliranog soka želuca u simulirani sok tankog crijeva. Rezultati su prikazani kao postotak preživjelih BMK nakon inkubacije u simuliranom soku želuca i tankog crijeva, u usporedbi s početnim brojem stanica prije inkubacije svedenim na 100 % (slika 30B).



Slika 30. A Smrtnost sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka, izražena kao Δ log (CFU mL^{-1}), tijekom liofilizacije u fosfatnom puferu i obranom mlijeku **B** Postotak preživjelih sojeva BMK nakon inkubacije u simuliranim sokovima GIT-a, u odnosu na početni broj stanica (sveden na 100 % i prikazan isprekidanom linijom). *Statistički značajna ($P<0,05$) razlika

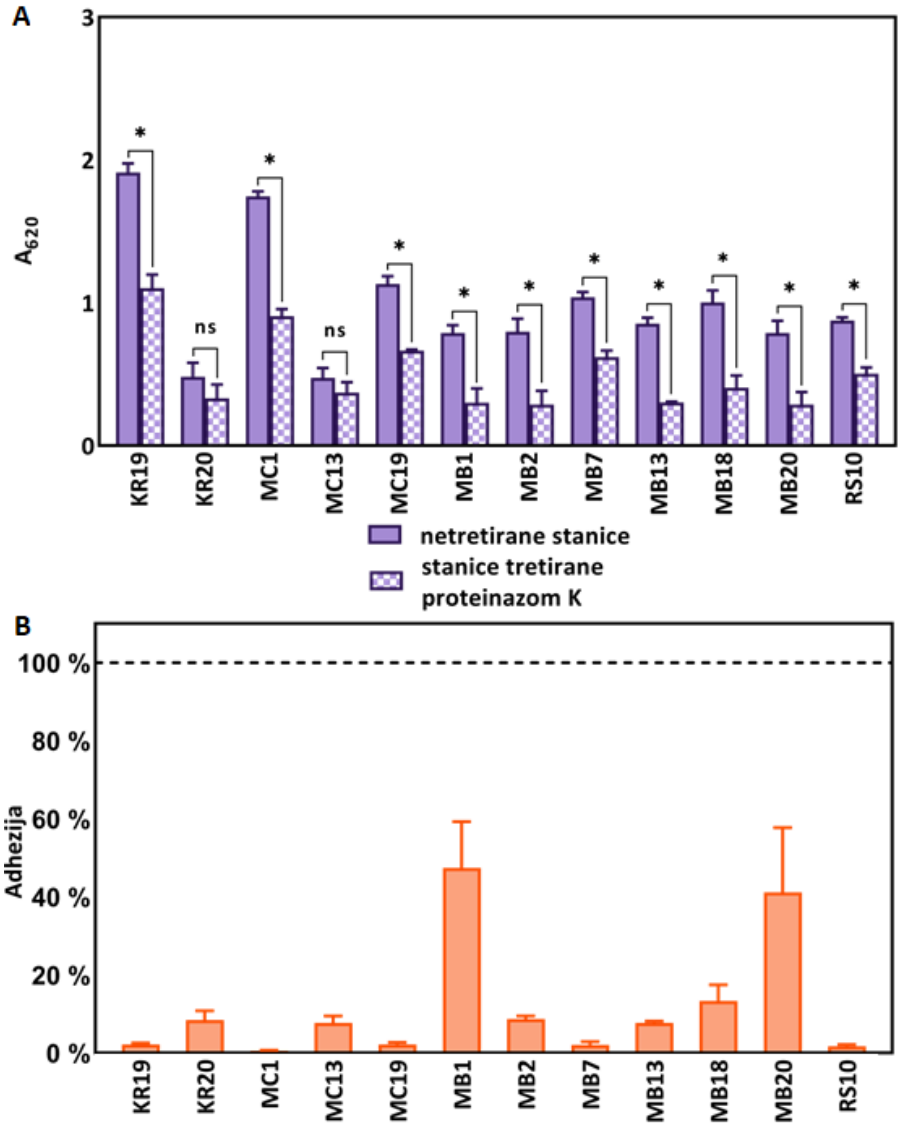
U svrhu procjene hidrofobnosti površine stanica sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka, ispitana je njihova adhezija na nepolarno otapalo heksan, pri čemu je veći postotak adhezije ukazivao na jaču hidrofobnost površine bakterijskih stanica (slika 31A). Ispitana je i autoagregacija BMK izoliranih iz majčinog mlijeka, te njihova koagregacija s test-mikroorganizmima *S. aureus* 3048, *L. monocytogenes* ATCC® 19111™, *E. coli* 3014 i *S. enterica*

serotip Typhimurium FP1. Rezultati autoagregacijskog testa su prikazani kao postotak autoagregiranih stanica nakon 5 h inkubacije (slika 31B), a rezultati koagregacijskog testa kao postotak stanica koje su koagregirale sa svakim patogenom u usporedbi s početnim brojem stanica BMK prije agregacijskog eksperimenta, koji je sveden na 100 % (slika 31C).



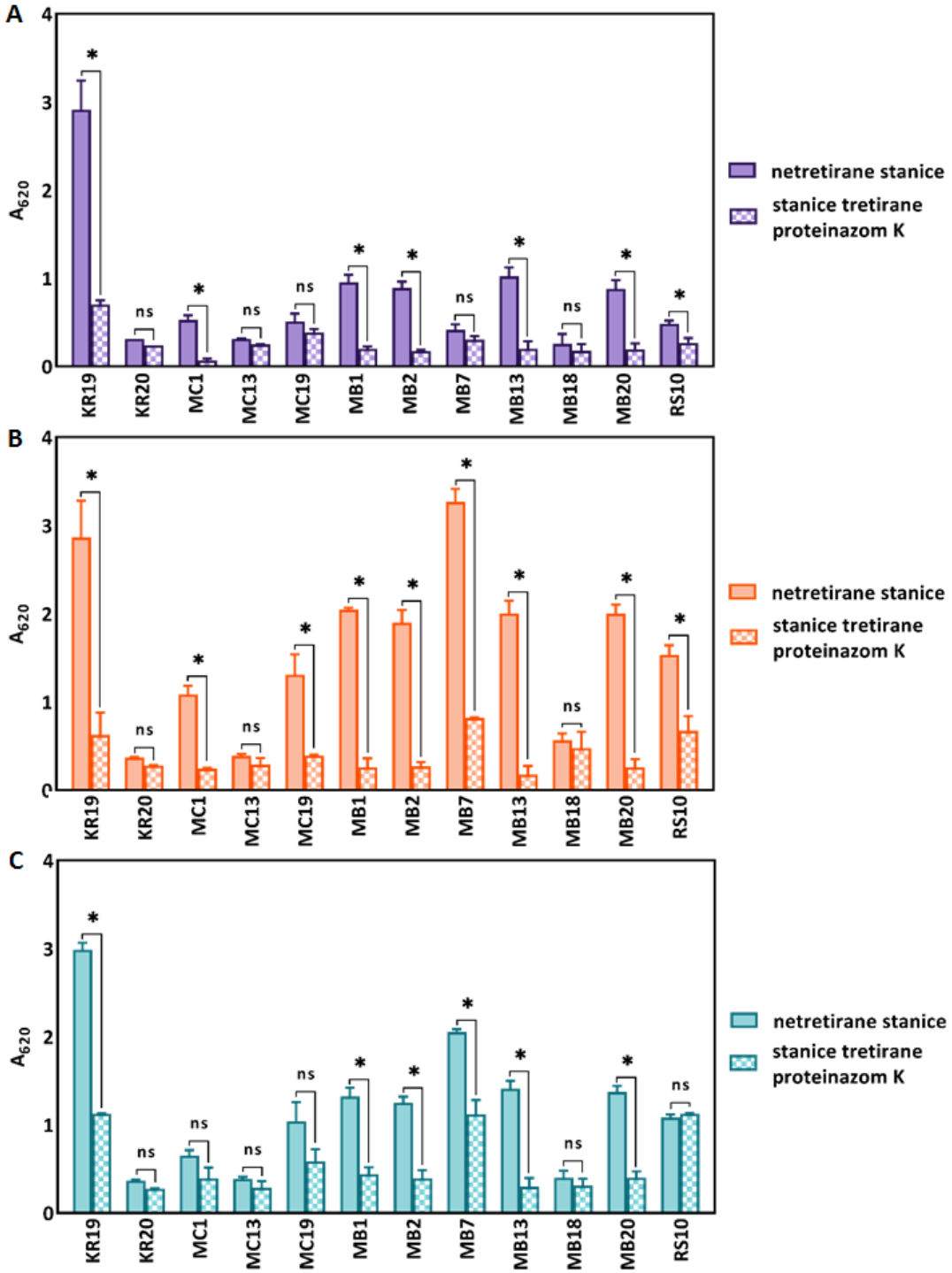
Slika 31. A Postotak adhezije sojeva BMK iz majčinog mlijeka na heksan **B** Postotak autoagregacije sojeva BMK iz majčinog mlijeka nakon 5 h inkubacije **C** Postotak koagregacije sojeva BMK iz majčinog mlijeka s patogenim mikroorganizmima nakon 5 h inkubacije. Isprekidana linija na sve tri slike označava početni broj stanica BMK sveden na 100 %

Kako bi se utvrdio utjecaj proteina na adhezijski kapacitet svakog soja prema mucinu, provedeno je ispitivanje adhezije bakterijskih stanica prije i nakon tretmana proteinazom K (slika 32A). Budući da je adhezija probiotičkih sojeva na crijevni epitel preduvjet njihove interakcije i iskazivanja korisnih učinaka na zdravlje domaćina, proveden je i eksperiment *in vitro* adhezije BMK izoliranih iz majčinog mlijeka na humanu Caco-2 staničnu liniju crijevnih epitelnih stanica. Rezultati su prikazani kao postotak adhezije ispitanih sojeva BMK na Caco-2 stanice, u odnosu na početni broj stanica korištenih u eksperimentu adhezije, koji je sveden na 100 % (slika 32B).



Slika 32. A Utjecaj proteinaze K na adheziju sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka na mucin **B** Postotak adhezije sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka na Caco-2 stanice u odnosu na početni broj stanica BMK (sveden na 100 % i prikazan isprekidanom linijom). *Statistički značajna ($P<0,05$) razlika

Potom je spektrofotometrijski ispitana i *in vitro* adhezija BMK izoliranih iz majčinog mlijeka na polistirenske pločice presvučene humanim fibronektinom, kolagenom i lamininom, prije i nakon tretiranja stanica proteinazom K (slika 33).



Slika 33. Adhezija sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka na proteine ECM-a: **A** fibronektin **B** laminin **C** kolagen. *Statistički značajna (P<0,05) razlika

4.5. Genomička i proteomička karakterizacija S-proteina i bakteriocina probiotičkih sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C

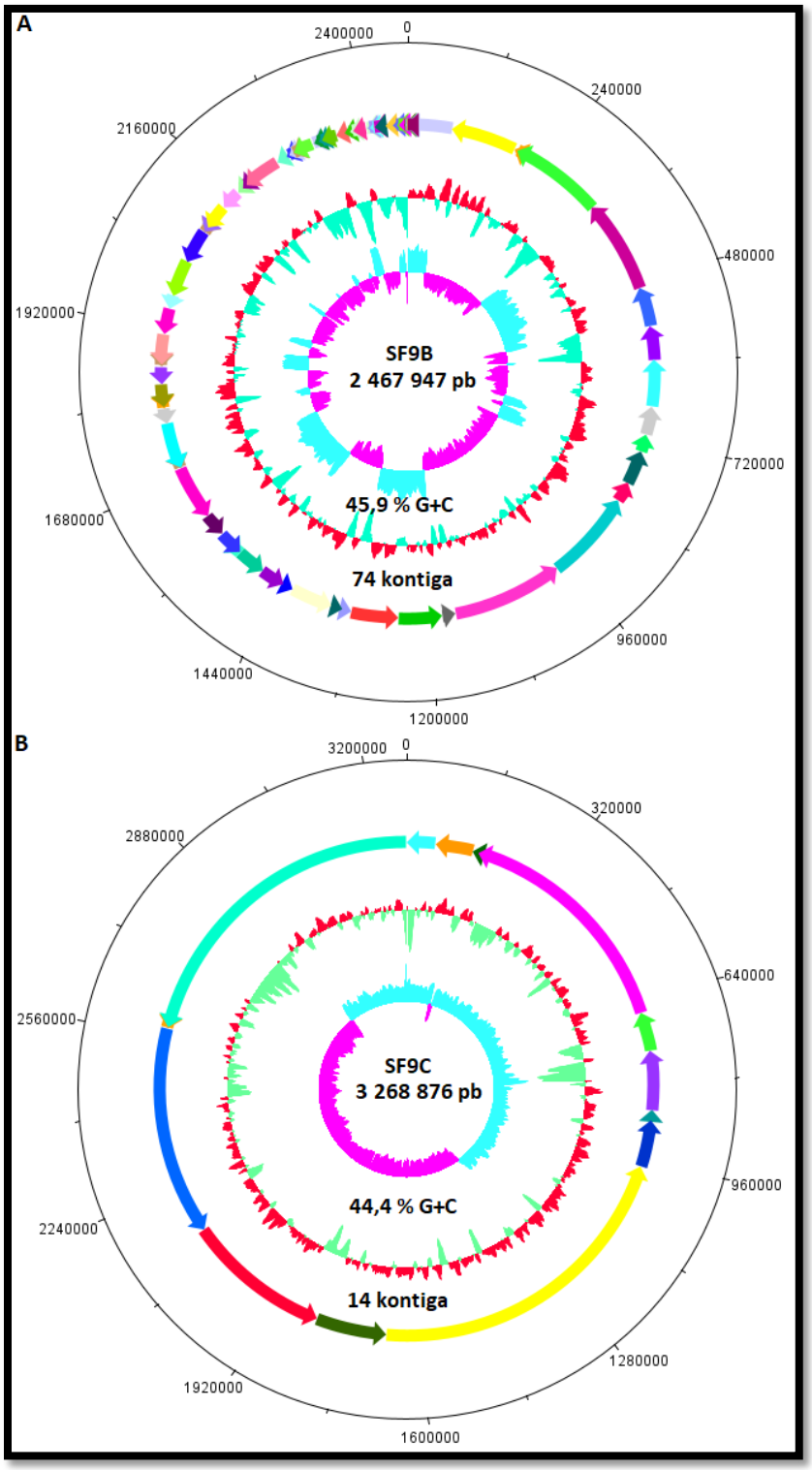
Osim sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, u ovom radu su detaljno okarakterizirani i probiotički sojevi producenti potencijalnih terapijskih biomolekula, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C, ranije izolirani iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa u našem Laboratoriju.

Provedena je identifikacija oba soja sekvenciranjem cijelih genoma u IGA Technology servisu te su dobivene sekvence pohranjene u GenBank genskoj banci NCBI baze podataka pod pristupnim brojevima NIGJ00000000 (*Lb. brevis* SF9B) i RHLZ01000000 (*Lb. plantarum* SF9C).

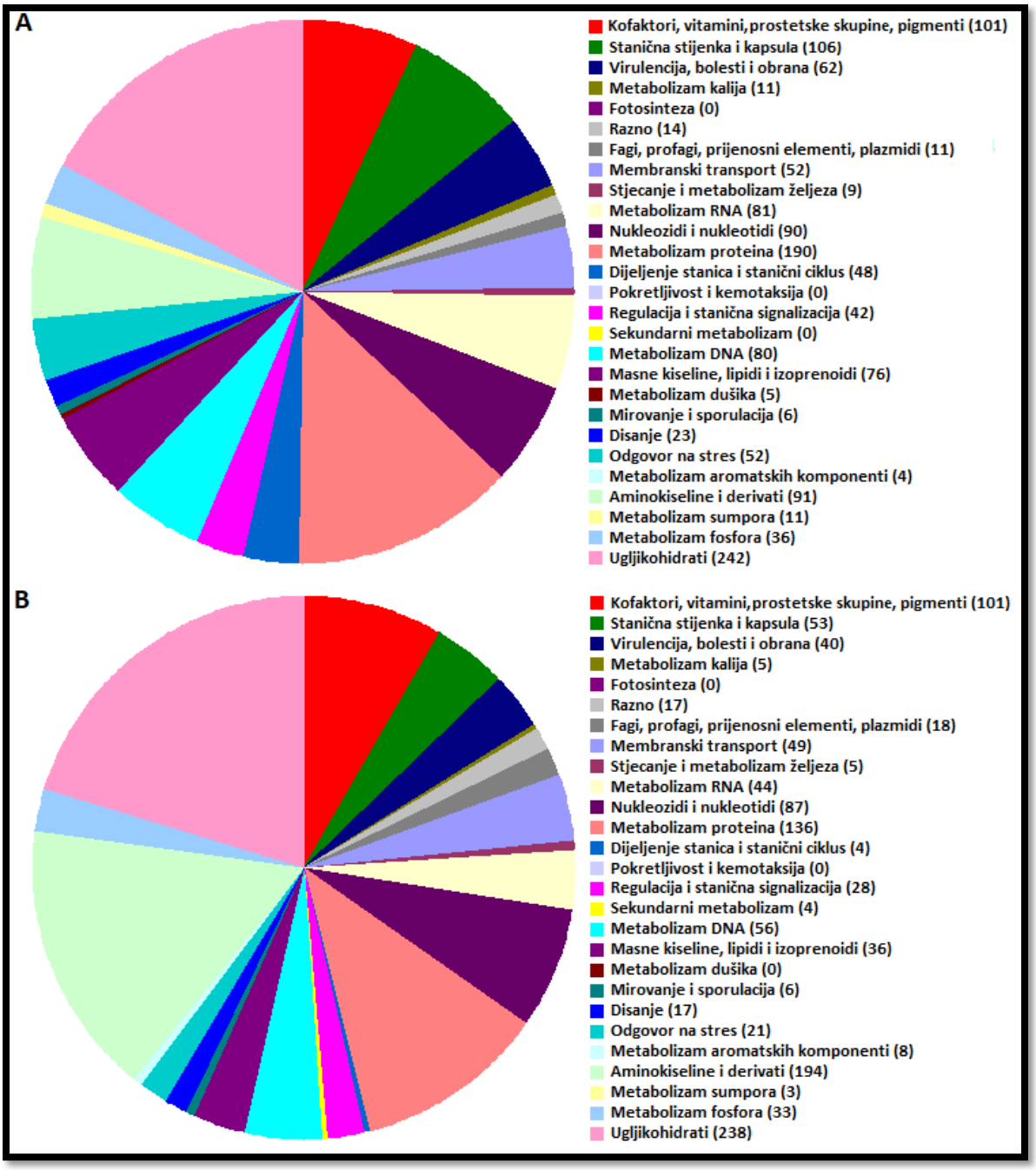
Usporedba podataka dobivenih sekvenciranjem cijelih genoma sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C, prikazana je u tablici 16. Na temelju sekvence cijelog genoma, konstruirani su genomski atlasi sojeva SF9B (slika 34A) i SF9C (slika 34B) primjenom Java aplikacije DNA Plotter, a zatim je provedena i funkcionalna anotacija i kategorizacija gena oba soja primjenom RAST servera (slika 35).

Tablica 16. Usporedba genomskih podataka sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C

Podaci o genomu	**SOJ**	
	***Lb. brevis* SF9B**	***Lb. plantarum* SF9C**
Pristupni broj u GenBank	NIGJ00000000	RHLZ01000000
Duljina genoma (pb)	2,467,947	3,268,876
% GC	45,9	44,4
N50	67337	444710
L50	12	3
Broj kontiga	74	14
Broj genskih podsustava	311	244
Broj kodirajućih sekvenci	2411	3229
Broj RNA molekula	72	68



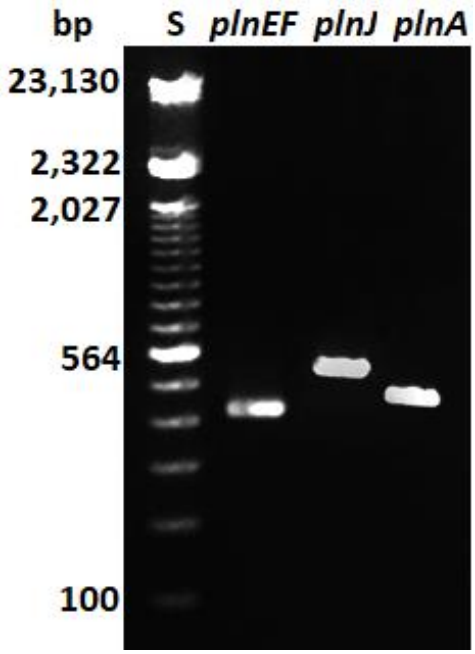
Slika 34. Genomski atlasi sojeva **A** *Lb. brevis* SF9B i **B** *Lb. plantarum* SF9C konstruirani pomoću aplikacije DNA Plotter. Počevši izvana, 1. krug predstavlja bakterijski kromosom, 2. krug raspored kontiga, 3. krug-udio G+C parova baza, a 4. krug distribuciju gvaninskih i citozinskih nukleotida u genomu



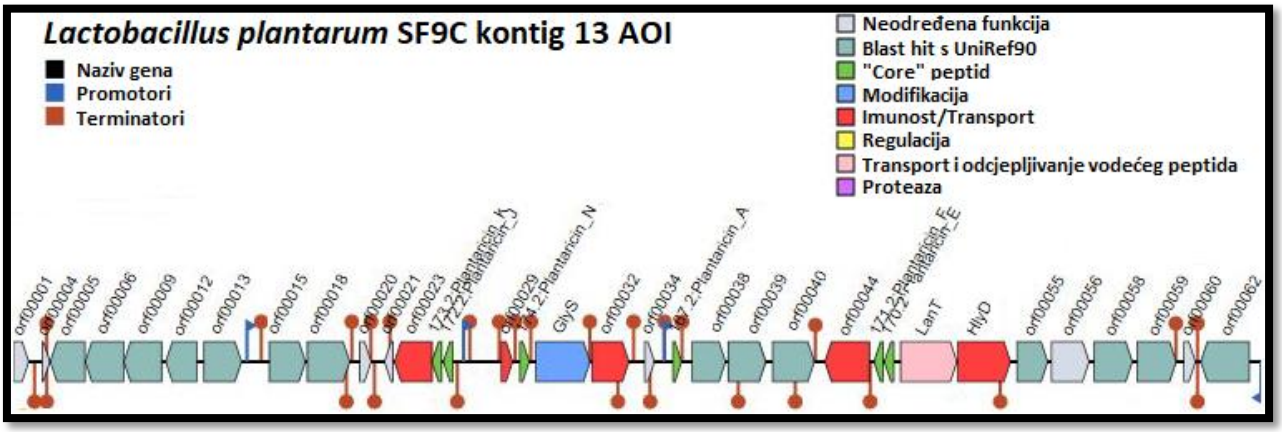
Slika 35. Funkcionalna anotacija gena sojeva **A** *Lb. brevis* SF9B i **B** *Lb. plantarum* SF9C provedena pomoću RAST servera

Prisutnost gena koji sudjeluju u biosintezi plantaricina soja *Lb. plantarum* SF9C, potvrđena je PCR-analizom sa specifičnim početnicama (slika 36). Kako bi se ispitalo sadrži li navedeni soj još gena koji sudjeluju u biosintezi plantaricina, čija pristunost nije potvrđena PCR-analizom, provedena je *in silico* identifikacija klastera gena uključenih u biosintezu plantaricina pomoću BAGEL4 servera (slika 37).

Rezultati usporedbe translatirane nukleotidne sekvence gena povezanih s biosintezom, funkcijom i transportom plantaricina soja SF9C, s proteinima pohranjenim u NCBI bazi podataka, prikazani su u tablici 17. 3D-struktura plantaricina PlnJK i PlnEF je pretpostavljena pomoću SWISS-MODEL servera (slika 38A), dok su aminokiselinski sastav, hidrofobnost (H), hidrofobni moment (μH) i *netto* naboj (z) određeni promoću HeliQuest servera (slika 38B).



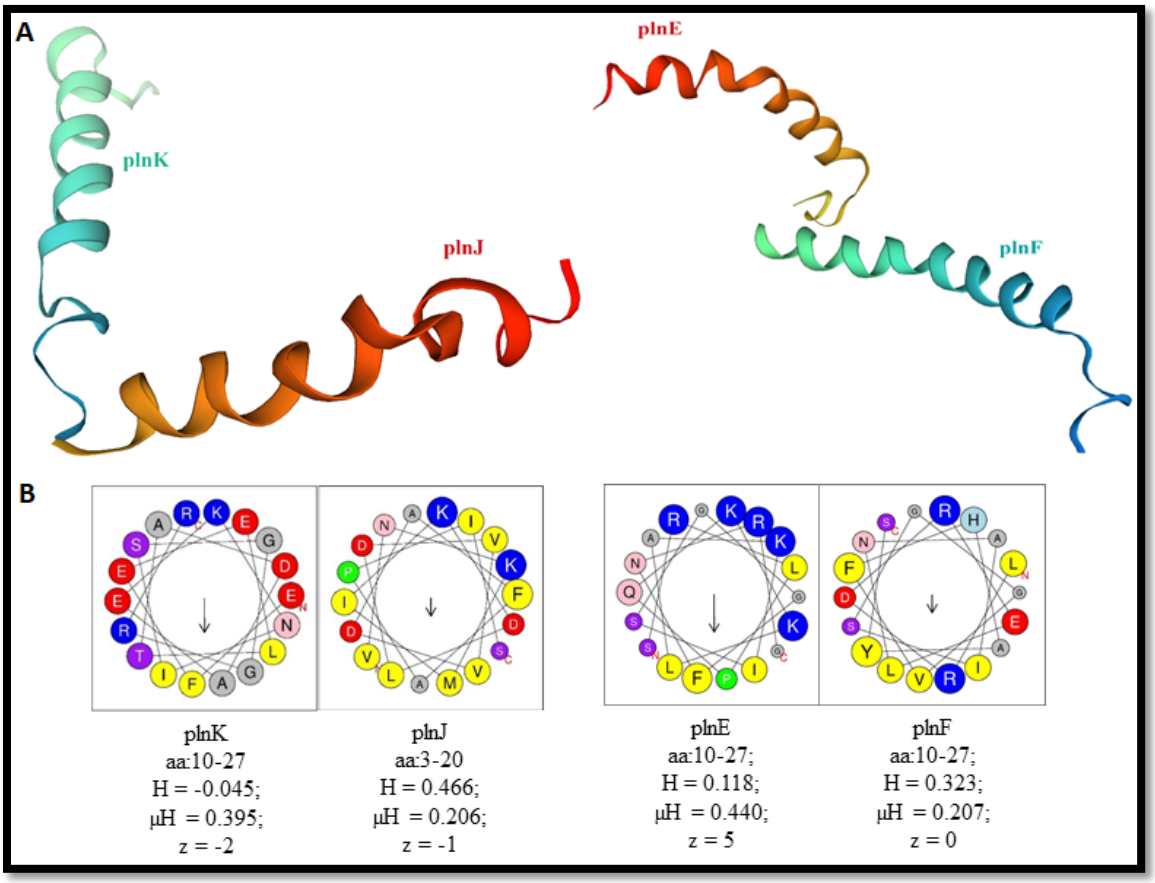
Slika 36. Elektroforetska analiza produkata PCR reakcije DNA soja *Lb. plantarum* SF9C s početnicama specifičnim za gene koji sudjeluju u biosintezi plantaricina



Slika 37. Klaster gena koji sudjeluju u biosintezi plantaricina soja *Lb. plantarum* SF9C, lociran na 13. kontigu

Tablica 17. Sličnost translatirane nukleotidne sekvence gena koji sudjeluju u biosintezi i transportu plantaricina te imunosti soja producenta *Lb. plantarum* SF9C, s proteinima pohranjenim u NCBI bazi podataka

naziv gena	% identifikacije	e-vrijednost	Funkcija
GENI KOJI KODIRAJU ZA PLANTARICINE			
Plantaricin_K	100,00 %	2e-37	ComC; Bacteriocin_IIc; 173.2; Plantaricin_K
Plantaricin_J	100,00 %	6e-37	172.2; Plantaricin_J
Plantaricin_N	100,00 %	3e-35	Bakteriocin_IIc; 174.2; Plantaricin_N
GlyS	100,00 %	0,0	PlnO
Plantaricin_A	100,00 %	3e-29	Antimikrobno djelovanjel17; Bakteriocin_IIc; 167.2; Plantaricin_A
orf00038	26,83 %	3e-17	Histidin kinaza povezana s proizvodnjom bakteriocina
orf00039	99,55 %	7e-162	Regulator odgovora PlnC, aktivator
orf00040	99,19 %	7e-180	Regulator odgovora PlnD
Plantaricin_F	100,00 %	6e-35	ggmotiv; Laktokocin; Bakteriocin_IIc; 171.2; Plantaricin_F
Plantaricin_E	100,00 %	7e-37	170.2; Plantaricin_E
orf00058	31,75 %	3e-04	PlnS
orf00059	38,89 %	3e-09	PlnS
GENI UKLJUČENI U BIOSINTEZU PROTEINA IMUNOSTI NA PROIZVEDENI BAKTERIOCIN			
orf00023	32,02 %	4e-20	Navodni protein imunosti na bakteriocine
orf00029	100,00 %	2e-40	P71462_LACPL PlnM imunosni protein
orf00032	29,86 %	5e-07	P71468_LACPL PlnI (imunosni protein PlnI, proteaza vezana na membranu CAAX porodice)
orf00044	99,61 %	6e-179	P71468_LACPL PlnI (imunosni protein PlnI, proteaza vezana na membranu CAAX porodice)
GENI UKLJUČENI U TRANSPORT PROIZVEDENIH PLANTARICINA VAN STANICE			
LanT	100,00 %	0,0	ABC-transporter za bakteriocine, ATP-vezujući i permeazni protein PlnG
HlyD	100,00 %	0,0	Dodatni faktor za ABC-transporter PlnH
OSTALI GENI			
orf00001			Neodređena funkcija
orf00004			Neodređena funkcija
orf00005	58,25 %	3e-77	Galaktozid O-acetiltransferaza
orf00006	23,57 %	2e-05	Kinolon rezistentni protein NorA
orf00009	41,29 %	1e-63	5-amino-6-(5-fosfo-D-ribitilamino)uracil fosfataza YbjI
orf00012	28,30 %	9e-16	HTH-tip activator transkripcije RhaR
orf00013	36,90 %	1e-49	Šećerna fosfataza YidA n=158 RepID=YIDA_ECOL6
orf00015	41,24 %	2e-83	Protein nosač transportnog sustava za razgranate aminokiseline
orf00018	50,13 %	8e-117	Na(+)/H(+) antiporter
orf00020			Neodređena funkcija
orf00021			Neodređena funkcija
orf00034			Neodređena funkcija
orf00055	35,78 %	1e-05	Navodna membranska peptidaza YdiL
orf00056			Neodređena funkcija
orf00060			Neodređena funkcija
orf00062	34,41 %	8e-150	DNA helikaza IV

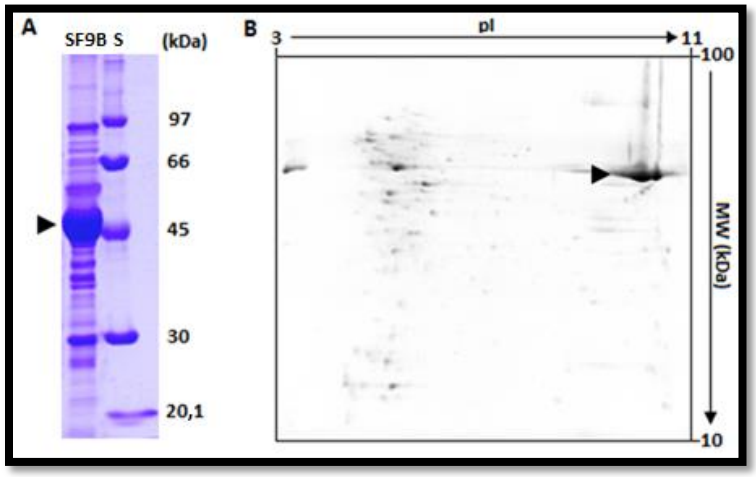


Slika 38. A 3D-struktura plantaricina PlnJK i PlnEF soja *Lb. plantarum* SF9C određena pomoću SWISS-MODEL servera **B** Prikaz svojstava α-uzvojnica analiziranih primjenom HeliQuest servera: aa-aminokiseline; žuta-hidrofobne, ljubičasta-serinske i treoninske; tamnoplava-bazične; crvena-kisele; roza-aparaginske i glutaminske; siva-alaninske i glicinske; svijetloplava-histidinske; zelena-prolinske; H-hidrofobnost; μH-hidrofobni moment; z-*netto* naboj (izračunat pri pH=7,4, pod pretpostavkom da je histidin neutralan i da su N-terminalna amino- i C-terminalna karboksi-skupina nenabijene)

Translatirana nukleotidna sekvenca soja *Lb. brevis* SF9B, uspoređena je sa S-proteinima pohranjenim u NCBI bazi podataka korištenjem BLASTx algoritma. Tako je otkriveno da soj SF9B sadrži čak 3 gena koji kodiraju za S-proteine homologne SlpB, SlpC i SlpD proteinima soja *Lb. brevis* ATCC 14869 (rezultati nisu prikazani). Kako bi se utvrdilo dolazi li do njihove ekspresije, provedeno je elektroforetsko razdvajanje površinskih proteina soja SF9B SDS-PAGE i 2D elektroforezom (slika 39). Dominantna vrpca SDS-PAGE elektroforeze i točka 2D-elektroforeze 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 (slika 40).

Sekundarna struktura izoliranog S-proteina je pretpostavljena PSIPRED metodom implementiranom u Phyre2 serveru (slika 41A), a tercijarna struktura homolognim modeliranjem pomoću I-TASSER servera (Slika 41B).



Slika 39. A SDS-PAGE i **B** 2D elektroforetska analiza površinskih proteina soja *Lb. brevis* SF9B. Položaj proteinske vrpce pretpostavljenog S-proteina označen je strelicom

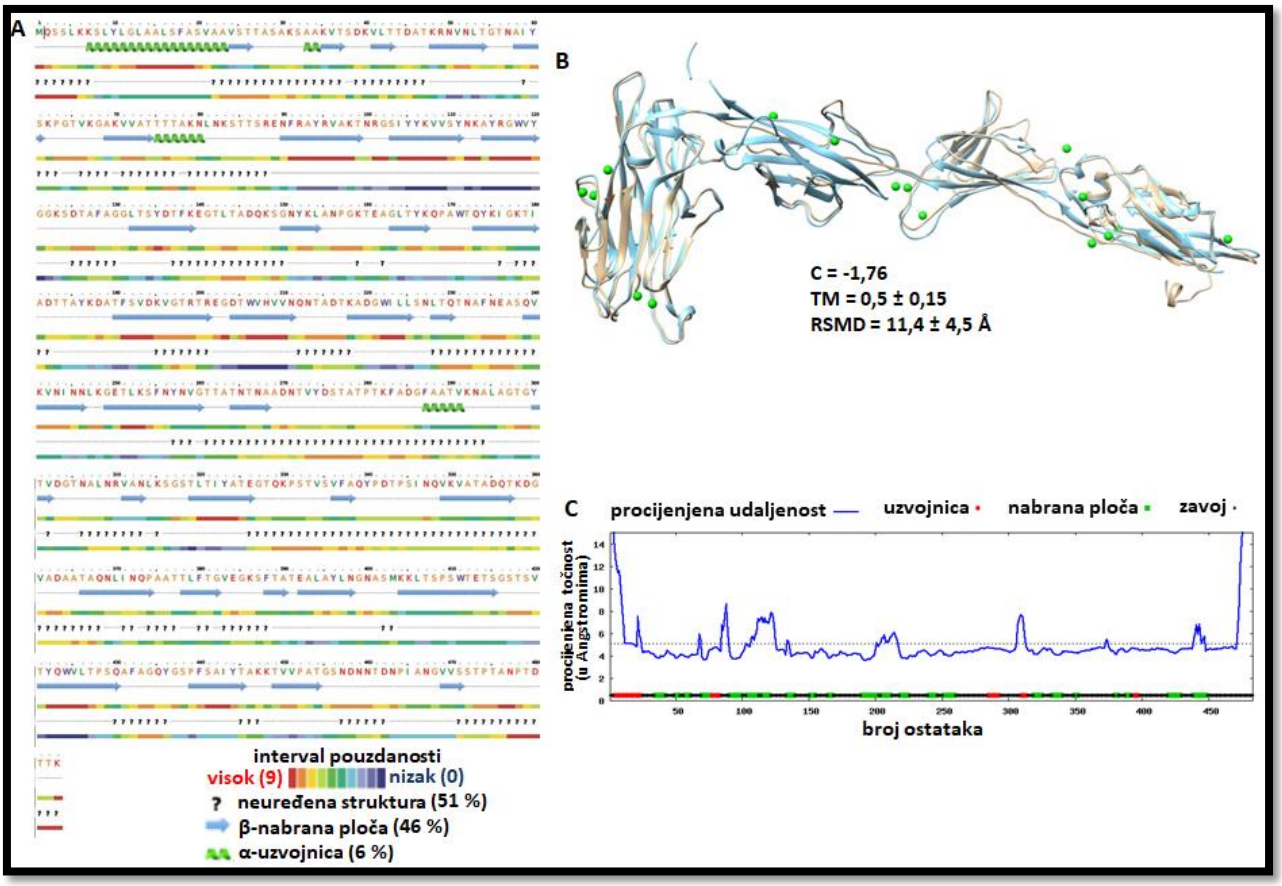
A 1::gi|25989136 **Mass:** 50894 **Score:** 282 **Matches:** 6(3) **Sequences:** 5(3) **emPAI:** 0.21
surface layer protein SlpB [Lactobacillus brevis ATCC 14869 = DSM 20054]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
213	511.2300	1020.4454	1020.5029	-0.0574	0	25	5.7e+002	8	U	K.QPAWTQYK.I
436	731.8300	1461.6454	1461.7827	-0.1373	1	81	0.0011	1	U	K.LANPGKTEAGLTYK.Q
574	923.8800	1845.7454	1845.8996	-0.1542	1	76	0.0031	1	U	K.TIADTTAYKDATFSVDK.V
607	638.5700	1912.6882	1912.8915	-0.2034	0	39	14	4	U	R.EGDTWVHVVNQNTADTK.A
735	724.2600	2169.7582	2170.0403	-0.2822	1	(58)	0.14	1	U	R.TREGDTWVHVVNQNTADTK.A
737	724.3000	2169.8782	2170.0403	-0.1622	1	64	0.046	1	U	R.TREGDTWVHVVNQNTADTK.A

B 1::gi|25989136 **Mass:** 50894 **Score:** 315 **Matches:** 11(3) **Sequences:** 6(2) **emPAI:** 0.13
surface layer protein SlpB [Lactobacillus brevis ATCC 14869 = DSM 20054]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
112	441.7300	881.4454	881.4494	-0.0040	0	42	4	2	U	K.TEAGLTYK.Q
119	446.2700	890.5254	890.5073	0.0181	0	48	1.2	1	U	K.VVATTTTAK.N
143	481.7400	961.4654	961.4716	-0.0062	0	43	3.8	5	U	K.EGTLTADQK.S
153	492.2600	982.5054	982.4971	0.0083	0	40	6.1	4	U	K.TIADTTAYK.D
441	731.8900	1461.7654	1461.7827	-0.0173	1	86	0.00013	1	U	K.LANPGKTEAGLTYK.Q
442	488.2700	1461.7882	1461.7827	0.0055	1	(41)	4.5	3	U	K.LANPGKTEAGLTYK.Q
549	923.9200	1845.8254	1845.8996	-0.0742	1	(59)	0.054	1	U	K.TIADTTAYKDATFSVDK.V
550	923.9300	1845.8454	1845.8996	-0.0542	1	61	0.036	1	U	K.TIADTTAYKDATFSVDK.V
551	616.2900	1845.8482	1845.8996	-0.0515	1	(59)	0.058	1	U	K.TIADTTAYKDATFSVDK.V
552	616.2900	1845.8482	1845.8996	-0.0515	1	(36)	11	6	U	K.TIADTTAYKDATFSVDK.V
553	616.2900	1845.8482	1845.8996	-0.0515	1	(35)	13	7	U	K.TIADTTAYKDATFSVDK.V

Slika 40. Identifikacija S-proteina prisutnih u vrpcama dobivenim **A** SDS-PAGE i **B** 2D elektroforetskim razdvajanjem površinskih proteina soja *Lb. brevis* SF9B usporedbom rezultata njihove LC-MS analize s proteinima pohranjenima u Mascot bazi podataka



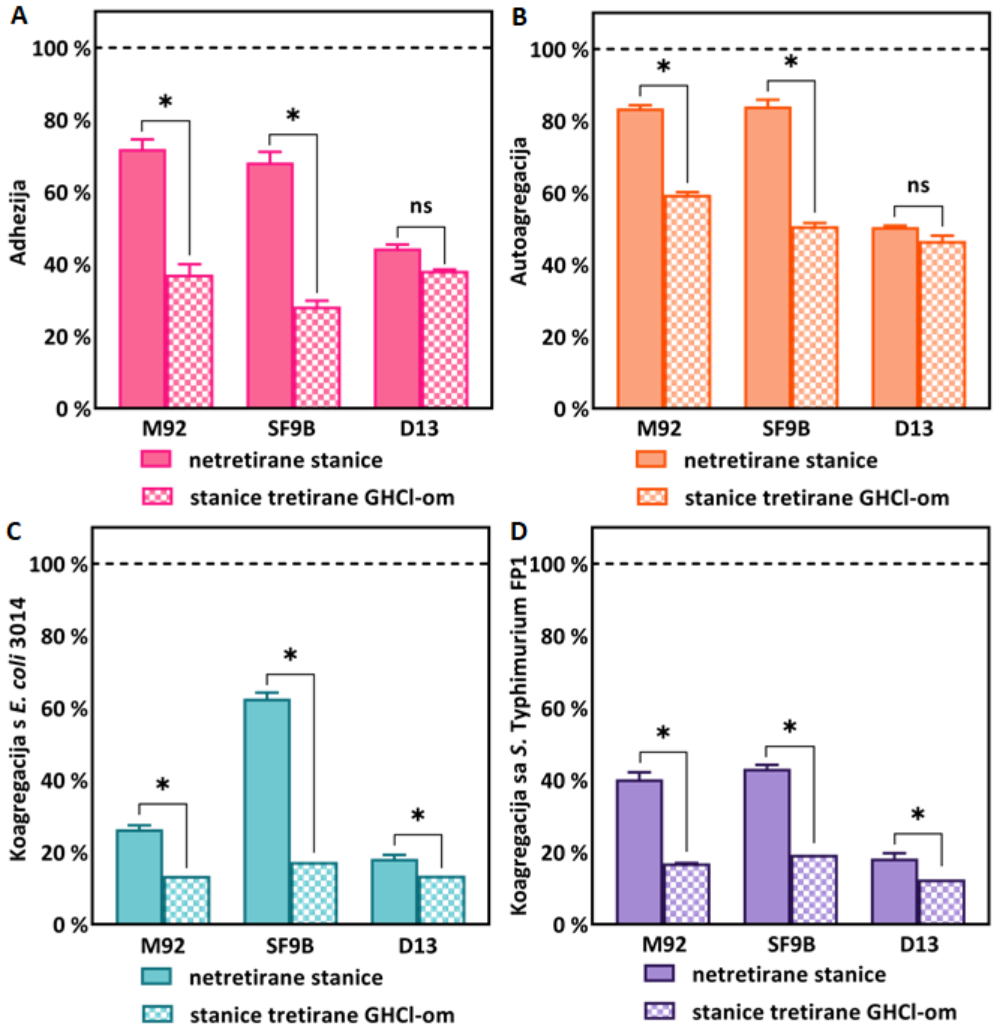
Slika 41. A Sekundardna struktura SlpB proteina pretpostavljena PSIPRED metodom impelentiranom u Phyre2 serveru **B** Tercijarna struktura SlpB proteina pretpostavljena homolognim modeliranjem pomoću I-TASSER servera **C** Ukupna točnost tercijarne strukture je predstavljena s C=-1,76 a lokalna točnost je prikazana kao odstupanje udaljenosti između ostataka u strukturi modela i izvornoj strukturi određenoj ResQ algoritmom

Nakon detaljne karakterizacije S-proteina soja *Lb. brevis* SF9B, ispitana je i njegova uloga u preživljavaju, hidrofobnosti, agregaciji i adheziji soja producenta. Pritom je u svim eksperimentima kao pozitivna kontrola korišten producent S-proteina *Lb. helveticus* M92, a kao negativna kontrola soj *Lb. plantarum* D13, koji ih ne proizvodi. Najprije je ispitana uloga S-proteina u preživljavanju soja *Lb. brevis* SF9B u simuliranim sokovima GIT-a te tijekom liofilizacije s i bez dodatka obranog mlijeka kao lioprotektora (tablica 18). Potom je ispitan utjecaj S-proteina na hidrofobnost (slika 42A), autoagregaciju (slika 42B), koagregaciju (slike 42C i 42D) te adheziju soja *Lb. brevis* SF9B na mucin (slika 43A), Caco-2 stanice (slika 43B) i proteine ECM-a (tablica 19).

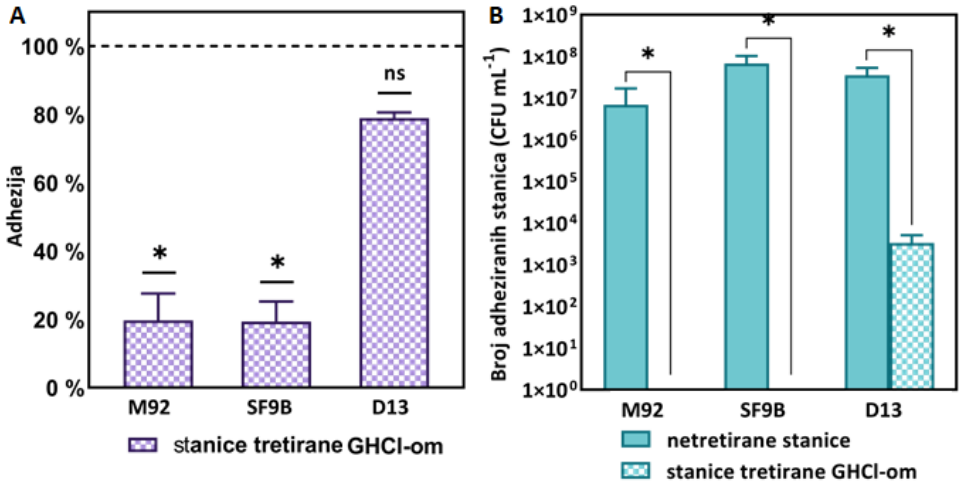
Tablica 18. Smrtnost (Δlog CFU mL^{-1}) sojeva *Lb. helveticus* M92, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* D13 tijekom prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a i tijekom liofilizacije u fosfatnom puferu i obranom mlijeku, prije i nakon tretmana GHCl-om

Soj	Simulirani uvjeti GIT-a		Liofilizacija u fosfatnom puferu		Liofilizacija u obranom mlijeku	
	Bez tretmana	GHCl	Bez tretmana	GHCl	Bez tretmana	GHCl
M92	$3,40 \pm 0,26^{aw}$	$7,18 \pm 0,22^{ax}$	$0,66 \pm 0,17^{ay}$	$3,10 \pm 0,17^{awz}$	$0,54 \pm 0,21^{ay}$	$2,72 \pm 0,16^{az}$
SF9B	$2,04 \pm 0,15^{bw}$	$8,66 \pm 0,28^{bx}$	$1,03 \pm 0,16^{by}$	$3,03 \pm 0,22^{az}$	$1,03 \pm 0,19^{ay}$	$1,92 \pm 0,18^{bw}$
D13	$7,40 \pm 0,48^{cx}$	$7,38 \pm 0,37^{ax}$	$2,91 \pm 0,17^{cy}$	$3,21 \pm 0,13^{ay}$	$1,92 \pm 0,18^{bz}$	$2,96 \pm 0,19^{ay}$

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



Slika 42. A Adhezija na heksan **B** Autoagregacija **C** Koagregacija s *E. coli* 3014 te **D** Koagregacija sa *S.* Typhimurim FP1 sojeva *Lb. helveticus* M92, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* D13 u odnosu na početni broj stanica (sveden na 100 % i prikazan isprekidanom linijom) prije i nakon tretmana stanica GHCl-om



Slika 43. Adhezija sojeva *Lb. helveticus* M92, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* D13 **A** na mucin nakon tretmana GHCl-om u odnosu na adheziju netretiranih stanica (svedenu na 100 % i prikazanu isprekidanom linijom **B** na Caco-2 stanice prije i nakon tretmana GHCl-om

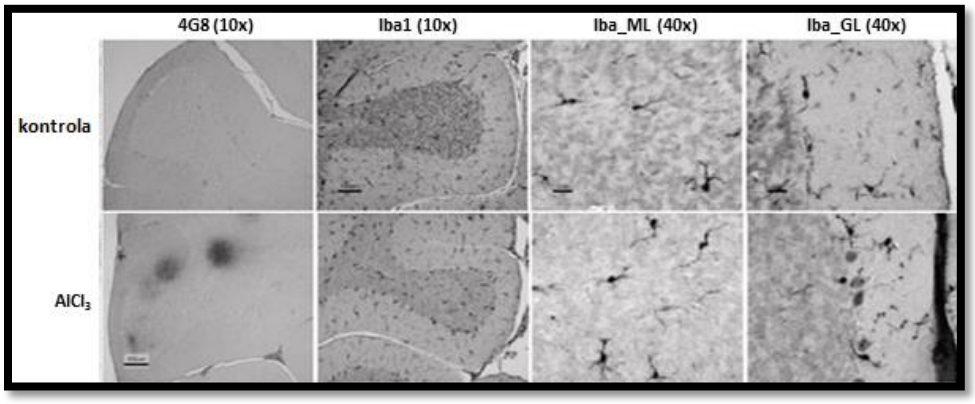
Tablica 19. Utjecaj GHCl-a i proteinaze K na adheziju sojeva *Lb. helveticus* M92, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* D13 na fibronektin, laminin i kolagen

Soj	fibronektin		kolagen		laminin	
	GHCl	Proteinaza K	GHCl	Proteinaza K	GHCl	Proteinaza K
M92	72,64 ± 10,62^{ax}	6,17 ± 4,23^{ay}	44,57 ± 15,02^{az}	17,99 ± 2,98^{ay}	59,20 ± 4,33^{axz}	18,35 ± 6,24^{ay}
SF9B	67,33 ± 4,87^{ay}	19,26 ± 4,56^{az}	80,79 ± 15,73^{ay}	19,07 ± 7,57^{az}	72,18 ± 27,54^{ay}	52,71 ± 8,80^{byz}
D13	101,76 ± 2,11^{bx}	9,86 ± 9,72^{ay}	91,88 ± 15,66^{ax}	25,95 ± 7,87^{ayz}	57,59 ± 48,20^{axy}	82,91 ± 10,80^{cxz}

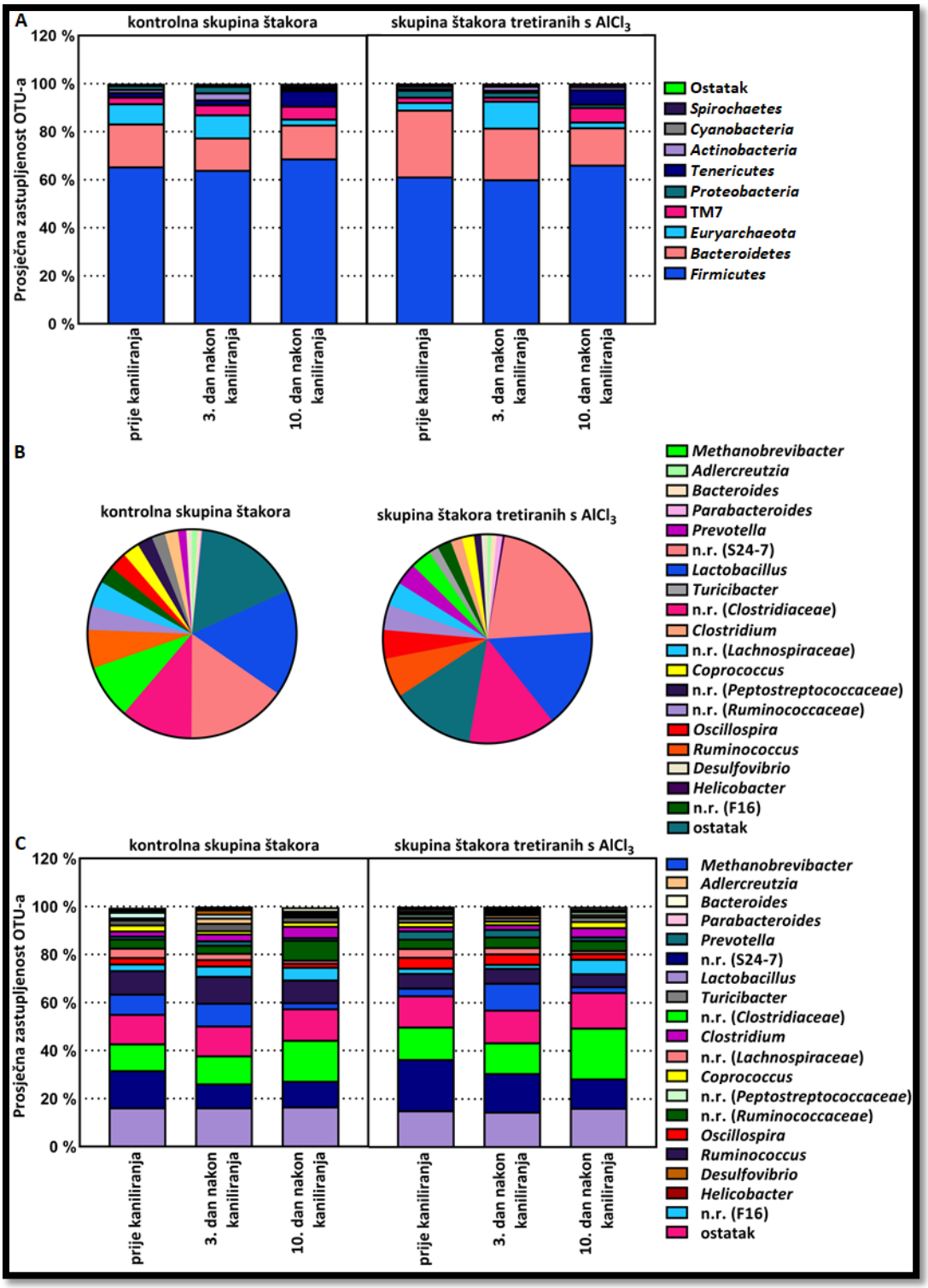
Podaci u tablici predstavljaju adhezijski omjer (test/kontrola) x 100 (%), gdje je kontrola postotak adhezije stanica koje nisu tretirane GHCl-om niti proteinazom K. ^{abc} Različito slovo označava statistički značajnu ($P<0,05$) razliku unutar istog stupca. ^{xyz} Različito slovo označava statistički značajnu ($P<0,05$) razliku unutar istog retka

Potom je ispitan utjecaj združene kulture sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C producenata potencijalnih terapijskih biomolekula, na sastav crijevnog mikrobioma štakora. U tu svrhu, 18 laboratorijskih štakora je podijeljeno u 2 skupine od kojih je jedna skupina predstavljala model crijevne disbioze nastale uslijed intraperitonealnog ubrizganja $AlCl_3$ i D-galaktoze, a druga kontrolnu skupinu kojoj je na isti način ubrizgana fiziološka otopina. Svi štakori su tijekom 5 dana kanilirani jednom dozom ($3 \cdot 10^9$ CFU mL^{-1}) probiotičke suspenzije sojeva SF9B i SF9C u omjeru 1:1. Prije samog eksperimenta, te 3 odnosno 10 dana nakon završetka eksperimenta, iz kaveza su s čiste stelje prikupljeni uzorci fecesa štakora. Štakori su potom eutanazirani te su prikupljeni uzorci tkiva mozga svake jedinke. Iz homogenata tkiva malog mozga je

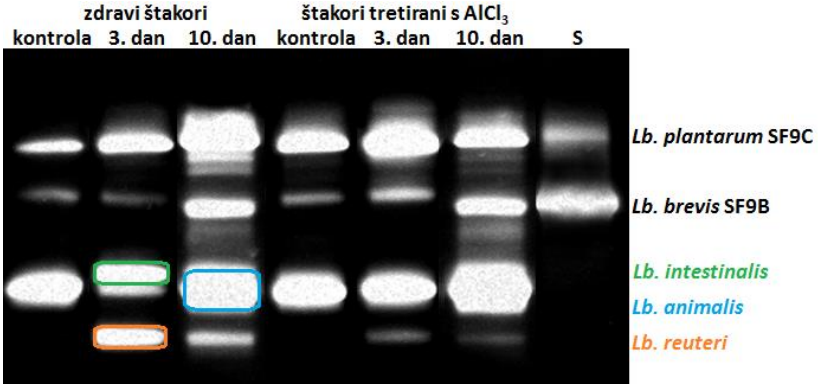
kolorimetrijskom metodom određena AChE aktivnost, a promjene povezane s Alzheimerovom bolešću kod štakora tretiranih s $AlCl_3$ i D-galaktozom potvrđene su imunohistokemijskom analizom korištenjem primarnih pročišćenih β-amiloidnih antitijela (4G8) i Iba1 antitijela (slika 44). Zatim je iz prikupljenih uzoraka fecesa izolirana DNA te je provedeno sekvenciranje hipervarijabilne V3 regije 16S rRNA gena pomoću Illumina MiSeq platforme. Podaci dobiveni sekvenciranjem su analizirani pomoću QIIME 2 programa. Na slici 45A, prikazana je prosječna zastupljenost OTU-a na razini koljena u fekalnom mikrobiomu štakora prije kaniliranja, te 3 odnosno 10 dana nakon završetka kaniliranja. Slika 45B prikazuje prosječnu zastupljenost OTU-a na razini roda u fekalnom mikrobiomu obje skupine štakora, a slika 45C prosječnu zastupljenost OTU-a na razini roda u uzorcima fecesa prikupljenim prije kaniliranja, te 3 odnosno 10 dana nakon završetka kaniliranja. Na krute MRS hranjive podloge, potom su nacijepljeni uzorci fecesa zdravih štakora i štakora izloženih $AlCl_3$, prikupljeni prije početka kaniliranja, te treći odnosno deseti dan nakon završetka kaniliranja štakora probiotičkom suspenzijom sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C. Iz kolonija prikupljenih nakon prekonoćne inkubacije, izolirana je DNA pomoću Maxwell uređaja te je PCR-reakcijom amplificirana V2-V3 regija 16S rRNA gena. Provedena je DGGE analiza dobivenih PCR produkata (slika 46), a vrpce koje ne pripadaju vrstama *L. brevis* i *L. plantarum* su izrezane te je provedena ekstrakcija DNA iz gela i njihova identifikacija sekvenciranjem 16S rRNA gena.



Slika 44. Fotomikrografovi sagitalnog presjeka malog mozga štakora kontrolne skupine i skupine tretirane s $AlCl_3$, snimljeni kamerom AxioCam ERc5 i obrađeni programom za morfometričku analizu AxioCam ERc5s-ZEN2. Na slikama Purkinje stanica obojenih srebrnom Bielschowsky bojom, vidljivi su difuzni plakovi (4G8) pri povećanju 10x, ekspresija Iba1 markera za mikroglija stanice pri povećanju 10x, te ekspresija Iba1 markera u molekularnom sloju (*engl.* Molecular Layer, ML) i granularnom sloju (*engl.* Granular Layer, GL) malog mozga pri povećanju 40x



Slika 45. Prosječna zastupljenost operativnih taksonomskih jedinica (OTU-a) u fekalnom mikrobiomu štakora **A** na razini koljena: prije kaniliranja te 3 odnosno 10 dana nakon završetka kaniliranja **B** na razini roda: u kontrolnoj skupini štakora i skupini štakora tretiranih s $AlCl_3$ **C** na razini roda: prije kaniliranja te 3 odnosno 10 dana nakon završetka kaniliranja



Slika 46. DGGE analiza V2-V3 regije 16S rRNA gena bakterija poraslih na MRS podlozi iz uzoraka fecesa zdravih štakora i štakora izloženih $AlCl_3$, kaniliranih probiotičkom suspenzijom sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C. Analizirani uzorci fecesa su prikupljeni: kontrola-prije početka kaniliranja; 3.dan-treći dan nakon završetka kaniliranja; 10. dan-10. dan nakon završetka kaniliranja. S-pomiješani PCR produkti 16S rRNA gena sojeva *Lb. plantarum* SF9C i *Lb. brevis* SF9B. Iz vrpci označenih zelenom, narančastom i plavom bojom je izolirana DNA te je provedena identifikacija sekvenciranjem 16S rRNA gena

5. RASPRAVA

5.1. Analiza sastava mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi

Brojnim istraživanjima, potvrđena je prisutnost mikroorganizama ili njihove DNA u placenti, pupčanoj vrpci, amnionskoj tekućini i mekoniju novorođenčadi (Aagaard i sur., 2014; Jiménez i sur., 2005). Crijevna mikrobiota se počinje formirati već u prenatalnom periodu pod utjecajem prehrambenih navika i zdravstvenog stanja majke, te stresa kojem je izložena tijekom trudnoće (Navarro-Tapia i sur., 2020). Kolonizacija probavnog trakta se nastavlja tijekom vaginalnog poroda mikrobiotom prisutnom u porođajnom kanalu, odnosno bolničkim mikroorganizmima tijekom carskog reza, zatim kontaktom „koža na kožu“, boravkom u bolničkom okruženju te dojenjem. Majčino mlijeko predstavlja važan izvor nutrijenata, imunosnih stanica i bioaktivnih spojeva s protuupalnim, antiinfektivnim i probiotičkim djelovanjem, koji imaju važnu ulogu u rastu i razvoju dojenčeta (Zimmermann i Curtis, 2020; Bardanzelllu, 2017). Mikrobiota majčinog mlijeka je jedinstvena i razlikuje se od svih ostalih mikrobnih zajednica prisutnih u ljudskom tijelu (Gómez-Gallego i sur., 2016). Osim probiotičkih mikroorganizama, majčino mlijeko sadrži i 200 strukturno različitih neprobavljivih oligosaharida koji djeluju kao prebiotički supstrati i potiču rast korisnih mikroorganizama, moduliraju imunosni sustav, utječu na apoptozu, proliferaciju i diferencijaciju crijevnih epitelnih stanica, te sprečavaju adheziju patogena (Kuntz i sur., 2008). Majčino mlijeko ima najveći utjecaj na oblikovanju crijevne mikrobiote djeteta u postpartalnom periodu.

Stoga je u svrhu ispitivanja utjecaja sastava mikrobioma majčinog mlijeka na mikrobiom fecesa dojenčadi, pet majki prikupljalo uzorke mlijeka te uzorke fecesa dojenčadi, isti dan u zasebne sterilne posudice u tri odvojena termina; unutar 7 dana nakon poroda, mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta. Ukupno je prikupljeno 15 uzoraka majčinog mlijeka i 15 uzoraka fecesa dojenčadi, navedenih u tablici 1, iz kojih je provedena automatizirana ekstrakcija ukupne DNA pomoću Maxwell 16 Research System uređaja. Uzorci su prije ekstrakcije DNA tretirani lizozimom; enzimom koji cijepa β-1,4-glikozidnu vezu između N-acetilglukozamina i N-acetilmuraminske kiseline peptidoglikana prisutnog u staničnoj stijenci bakterija. Kako bi se dodatno pospješilo razaranje stanične stijenke, svaki uzorak je podvrgnut tretmanu ultrazvukom visokog intenziteta pomoću sonikatora. Iz rezultata spektrofotometrijskog mjerenja koncentracije DNA, prikazanih u tablici 5, vidljivo je da

su prinosi DNA izolirane iz fecesa uglavnom bili viši od prinosa DNA izolirane iz majčinog mlijeka, što je i očekivano zbog veće brojnosti bakterija u fekalnim uzorcima.

Za razlikovanje i identifikaciju bakterija prisutnih u kompleksnim uzorcima, koriste se različiti molekularni markeri poput 16S i 23S rRNA gena, *rpoB*, *gyrB*, *dnaK*, *dsrAB*, *amoA*, *amoB*, *mip*, *horA*, *hitA*, *recA*, *ica*, *frc*, *oxc*, itd. (Liu i sur., 2012). To su uglavnom "housekeeping geni" koji zbog visokog sadržaja polimorfizama omogućuju identifikaciju i razlikovanje bakterija, a istovremeno su u određenim regijama visokokonzervirani, zbog čega je lako dizajnirati početnice za njihovu amplifikaciju PCR-om.

U ovom radu je kao molekularni marker korišten gen veličine 1500 pb koji kodira za 16S rRNA, važnu komponentu male podjedinice ribosoma prokariota, koja je neophodna za funkcioniranje ribosoma, tj. translaciju mRNA. Shodno tome, 16S rRNA geni su esencijalni i visokokonzervirani, te se nalaze u svim mikroorganizmima, što ih čini pogodnim za filogenetičke studije. Osim visokokonzerviranih regija, 16S rRNA geni sadrže i 9 hipervarijabilnih regija (V1-V9), dužine 30-100 pb, koje su specifične za svaku vrstu i omogućuju njihovo razlikovanje. Uzorci genomske DNA izolirani iz fecesa i majčinog mlijeka, poslani su na Illumina MiSeq sekvenciranje u Molecular Research laboratorij, gdje je najprije provedena amplifikacija V1-V3 hipervarijabilnih regija 16S rRNA gena, a nakon toga i sekvenciranje korištenjem Illumina MiSeq platforme.

Sirovi podaci u FASTQ formatu, dobiveni sekvenciranjem, obrađeni su korištenjem QIIME 2 programa za analizu mikrobioma u suradnji s Laboratorijem za bioinformatiku Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pomoću QIIME 2 programa, dobivene sekvence su klasterirane u filotipove i generirane su tablice zastupljenosti OTU-a s pripadajućom taksonomskom identifikacijom, koje predstavljaju skupine bakterija kod kojih sličnost u sekvenci 16S rRNA gena označava pripadnost istoj vrsti. Na taj način je omogućena identifikacija mikroorganizama prisutnih u uzorcima te taksonomska analiza sastava mikrobiote prisutne u svakom uzorku. Analizom relativne zastupljenosti OTU-a na razini koljena u mikrobiomu svakog pojedinačnog uzorka majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, jasno je vidljivo da je mikrobiom mlijeka svake majke, baš kao i fekalni mikrobiom svakog djeteta, jedinstven (slika 12).

Prosječna zastupljenost pojedinih taksonomskih koljena mikrobiote u tri prikupljena uzorka majčinih mlijeka se vidljivo razlikovala od osobe do osobe (slika 13A). Tako se prosječan udio *Actinobacteria* kretao od 0,46 % do 21,89 %, *Bacteroidetes* od 0,17 % do 13,94 %, *Firmicutes* od 43,36 % do čak 83,37 %, *Proteobacteria* od 2,86 % do 53,46 %, a *Verrucomicrobia* od 0 % do 7,38 %. Istraživanja su pokazala da crijevni mikrobiom novorođenčeta posjeduje manju bakterijsku raznolikost od mikrobioma odrasle osobe, ali su zabilježena puno veća odstupanja u njegovom sastavu između različitih pojedinaca (Yatsunenko i sur., 2012). Rezultati analiza provedenih u ovom radu su u skladu s tom tvrdnjom, budući da se prosječan udio *Actinobacteria* kretao od 2,54 % do čak 67,98 %, *Bacteroidetes* od 0,08 % do 57,89 %, *Firmicutes* od 14,05 % do 49,75 %, *Proteobacteria* od 1,79 % do 48,74 %, a *Verrucomicrobia* od 0 % do 15,35 % (slika 13A). Također, iz navedenih rezultata je jasno uočljiva i korelacija sastava mikrobioma mlijeka majki i fecesa njihove dojenčadi, koju su ranije uočili i drugi autori (Łubiech i Twaruzek 2020; Gómez-Gallego i sur., 2016). Tako je među svim uzorcima fecesa, najmanje bakterija iz koljena *Actinobacteria, Verrucomicrobia* i *Bacteroidetes* uočeno u fecesu dojenčadi hranjene mlijekom u kojem je udio tih bakterija bio također najniži. Najviši prosječni udio bakterija iz koljena *Proteobacteria, Firmicutes* i *Veruccomicrobia*, također je zabilježen u uzorcima mlijeka i fecesa istih parova majki i njihove dojenčadi. Budući da dojenče koje konzumira oko 800 mL majčinog mlijeka dnevno unese oko 10^5-10^7 komensalnih bakterija, jasno je zašto je sastav mikrobioma majčinog mlijeka vrlo često u korelaciji s neonatalnim mikrobiomom dojenčeta (Heikkilä i Saris, 2003).

Također, prikazana je zastupljenost pojedinih taksonomskih koljena u uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi s obzirom na vrijeme uzorkovanja (slika 13B). Naime, istraživanja su pokazala da se tijekom perioda laktacije, osim nutritivnog i imunološkog sastava, mijenja i sastav mikrobiote majčinog mlijeka. Prvo mlijeko, koje se proizvodi tijekom trudnoće i unutar nekoliko dana od poroda, naziva se kolostrum. Nakon 2-5 dana, počinje sekrecija prijelaznog mlijeka koja traje oko dva tjedna, dok se 4-6 tjedana nakon poroda, mlijeko smatra potpuno zrelim (Ballard i Morrow, 2013). Wan i sur. (2020) su pokazali da tijekom laktacije raste udio *Proteobacteria*, dok se udio *Firmicutes* smanjuje, što je potvrđeno i u ovom istraživanju. Na slici 13B, vidljivo je da je udio *Proteobacteria* bio najniži u uzorcima mlijeka prikupljenim unutar tjedan dana nakon poroda (7,54 %), dok je u uzorcima prikupljenim mjesec dana nakon poroda i mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta, iznosio 34,67 %, odnosno 21,79 %. Pritom se prosječan

udio bakterija iz koljena *Firmicutes* u uzorcima prikupljenim u istom vremenskom razdoblju snižavao sa 82,35 %, preko 57,32 %, na 53,18 %. Nasuprot tome, udio bakterija iz koljena *Bacteroidetes*, koje razgrađuju kompleksne biljne polisaharide, porastao je s 0,25 %, u uzorku prikupljenom unutar tjedan dana nakon poroda, na čak 8,5 % u uzorcima prikupljenim mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta. Udio bakterija iz koljena *Verrucomicrobia* se također povećavao tijekom perioda laktacije s 0,51 %, preko 1,19 %, na 4,41 % u zadnjim prikupljenim uzorcima. Osim sastava mikrobioma majčinog mlijeka, mikrobiom fecesa dojenčadi se također mijenjao sa starošću djeteta (slika 13B). Prema Pannaraj i sur. (2017), udio *Proteobacteria* u fecesu se smanjuje sa starošću dojenčadi, što je potvrđeno i u ovom radu, jer je njihov udio u prvim prikupljenim uzorcima prosječno iznosio 18,71 %, u drugim 15,18 %, a u posljednjim 13,67 %. Udio bakterija iz koljena *Firmicutes* u fecesu, baš kao i u majčinom mlijeku, bio je najviši u uzorcima prikupljenim unutar tjedan dana nakon poroda (39,78 %), dok je u posljednjem uzorku, prikupljenom mjesec dana nakon uvođenja krute hrane u prehranu djeteta, iznosio 30,00 %. Prema Pannaraj i sur. (2017), dojenje nastavljeno nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi, smanjuje udio producenata butirata iz koljena *Firmicutes* u crijevnom mikrobiomu dojenčadi, koji se često povezuju s pretilim fenotipom u miševima i ljudima. Najviši udio bakterija iz koljena *Proteobacteria* i *Firmicutes* u prvim prikupljenim uzorcima fecesa, može se objasniti i činjenicom da one čine dominantnu mikrobiotu placente (Gil i sur., 2020) te predstavljaju prve kolonizatore crijeva dojenčadi (Milani i sur., 2017). Nasuprot tome, udio *Actinobacteria* prema literaturi raste sa starošću djeteta (Milani i sur., 2017), što je također potvrđeno u ovom radu, jer je njihova prosječna zastupljenost bila najniža (24,75 %) u uzorcima fecesa prikupljenim unutar tjedan dana nakon poroda. Zastupljenost *Verrucomicrobia* u fecesu dojenčadi se povećala s vremenom, baš kao i u majčinom mlijeku.

Sekvenciranjem 16S rRNA gena je ustanovljeno da je mikrobiota majčinog mlijeka raznolikija od crijevne mikrobiote (Biagi i sur., 2017; Murphy i sur., 2017), što je potvrdila i usporedba prosječne zastupljenosti taksonomskih koljena u uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikupljenih u ovom istraživanju (slika 13C). Tako je u uzorcima majčinog mlijeka uočena prisutnost bakterija iz 7, a u uzorcima fecesa iz samo 5 taksonomskih koljena. Pritom je u majčinom mlijeku bilo najviše bakterija iz koljena *Firmicutes* (64,28 %) i *Proteobacteria* (21,31 %), što je u skladu s literaturom (Urbaniak i sur., 2016), nakon čega su slijedile bakterije iz koljena *Actinobacteria* (7,67 %), *Bacteroidetes* (3,01 %), *Verrucomicrobia* (2,04 %),

Parcubacteria (0,58 %) i *Elusimicrobia* (0,02 %). Istraživanja su pokazala da su u fecesu novorođenčadi najzastupljenije bakterije iz koljena *Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria* i *Bacteroidetes* (Chin i sur., 2021; Lackey i sur., 2019), što je potvrđeno i u ovom radu. Naime, analizom prosječne zastupljenosti koljena u prikupljenim fecesima, detektirano je 32,92 % *Firmicutes,* 31,86 % *Actinobacteria,* 15,84 % *Proteobacteria,* 15,64 % *Bacteroidetes* i samo 3,09 % bakterija iz koljena *Verrucomicrobia* (slika 13C). Prema literaturi, u fecesu dojenčadi su zastupljenije bakterije iz koljena *Actinobacteria* i *Bacteroidetes,* dok su bakterije iz koljena *Proteobacteria* zastupljenije u majčinom mlijeku nego u fecesu dojenčadi (Corona-Cervantes i sur., 2020), što je također potvrđeno rezultatima ovog rada.

Analizom zastupljenosti operativnih taksonomskih jedinica na razini razreda, u pojedinačnim uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, potvrđeno je da je mikrobiom mlijeka svake majke i fecesa svakog djeteta jedinstven (slika 14). Također je potvrđeno postojanje korelacije između sastava mlijeka svake majke i fecesa njihove dojenčadi (slika 15A). Tako je među svim uzorcima fecesa, prosječno najmanje bakterija iz razreda *Actinobacteria, Bacteroidia, Flavobacteria* i *Verrucomicrobiae* bilo u fecesu dojenčadi hranjene mlijekom u kojem je udio tih bakterija bio također najniži. Najviši prosječni udio bakterija iz razreda *Bacteroidia, Flavobacteriia, Bacilli, Clostridia, Gammaproteobacteria* i *Verrucomicrobiae,* također je zabilježen u istim uzorcima mlijeka majki i fecesa dojenčadi hranjene tim mlijekom.

Na slici 15B, vidljivo je da se udio bakterija iz razreda *Bacilli* u majčinom mlijeku smanjivao tijekom trajanja laktacije s čak 82,12 %, preko 57,21 %, na samo 52,10 % u zadnjem prikupljenom uzorku. Isti trend je uočen i kod dojenčadi, gdje se udio bakterija iz razreda *Bacilli* u fecesu smanjivao sa starošću djeteta od 38,99 %, preko 28,60 % na 19,10 %. Prosječan udio *Clostridia* u majčinom mlijeku je u svim uzorcima bio neznatan, ali je lagano rastao tijekom laktacije s 0,03 %, preko 0,11 %, na 1,10 %. Udio *Clostridia* u fecesu dojenčadi je također bio vrlo nizak dok su djeca bila isključivo dojena. U uzorcima prikupljenim unutar tjedan dana i mjesec dana nakon poroda, njihov udio je iznosio samo 0,78 %, odnosno 0,32 %, dok je nakon uvođenja krute hrane u prehranu dojenčadi porastao na čak 10,67 %. Dobiveni rezultati potvrđuju premisu prema kojoj su bakterije iz razreda *Clostridia* kasni kolonizatori crijeva djece (Avershina i sur., 2016). Dokazano je da je udio *Clostridia* značajno viši u uzorcima fecesa djece rođene carskim rezom, u odnosu na djecu rođenu vaginalnim putem (Hill i sur., 2017). U rezultatima je

također primjetno da se udio bakterija iz razreda *Actinobacteria* i *Verrucomicrobiae* s vremenom povećao i u uzorcima majčinog mlijeka i u uzorcima fecesa dojenčadi (slika 15B).

Usporedba prosječne zastupljenosti taksonomskih razreda u uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi prikupljenih u ovom istraživanju, također je potvrdila da je mikrobiota majčinog mlijeka raznolikija od crijevne mikrobiote (slika 15C). Tako je u uzorcima majčinog mlijeka uočena prisutnost bakterija iz 14, a u uzorcima fecesa iz samo 11 taksonomskih razreda. Pritom je u majčinom mlijeku bilo najviše bakterija iz razreda *Bacilli* (63,81 %) i *Gammaproteobacteria* (19,78 %), nakon čega su slijedile bakterije iz koljena *Actinobacteria* (7,66 %), *Flavobacteriia* (2,83 %), *Verrucomicrobiae* (2,04 %), *Alphaproteobacteria* (1,53 %), *Clostridia* (0,47 %) *i Bacteroidia* (0,15 %). U uzorcima fecesa, najzastupljenije su bile bakterije iz razreda *Actinobacteria* (31,85 %), *Bacilli* (28,89 %), *Gammaproteobacteria* (15,83 %), *Bacteroidia* (15,62 %), *Clostridia* (3,93 %) i *Verrucomicrobiae* (3,09 %). Dobiveni rezultati su u skladu s Pärnänen i sur. (2018), koji su utvrdili da u majčinom mlijeku prevladavaju bakterije iz razreda *Bacilli*, a u fecesu bakterije iz razreda *Actinobacteria*.

Iako je porijeklo bakterija u majčinom mlijeku još uvijek nerazjašnjeno, smatra se da potječu iz crijeva majke (Zimmermann i Curtis, 2020), jer je dokazana translokacija bakterija iz rodova *Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Enterococcus, Blautia, Lactobacillus, Escherichia, Collinsella, Parabacteroides, Staphylococcus, Pediococcus, Streptococcus, Veillonella* i *Cutibacterium* iz crijeva majke u majčino mlijeko i zatim u crijeva djeteta (Jost i sur., 2014). Iz prosječne zastupljenosti pojedinih taksonomskih rodova u uzorcima majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, analiziranim u ovom radu, jasno je uočljiva unikatnost mikrobioma svakog uzorka, kao i korelacija sastava mikrobioma mlijeka majki s mikrobiomom fecesa njihove dojenčadi (slika 16A). Tako je prosječan udio bakterija iz rodova *Bifidobacterium, Bacteroides, Staphylococcus, Enterococcus, Lactobacillus* i *Stenotrophomonas* bio najniži u uzorcima fecesa dojenčadi hranjene mlijekom u kojem je također uočen najniži udio tih bakterija. Najviši prosječan udio bakterija iz rodova *Bacteroides, Chryseobacterium, Staphylococcus, Lactobacillus, Clostridium, Enterobacter, Proteus, Serratia, Acintetobacter* i *Akkermansia* također je zabilježen u uzorcima mlijeka i fecesa dojenčadi hranjene tim mlijekom.

Prema rezultatima prikazanim na slici 16B, u uzorcima majčinog mlijeka analiziranim u ovom radu, prosječno je bilo najviše bakterija iz rodova *Streptococcus* (28,20 %) i *Staphylococcus* (23,96 %), što je u skladu sa Zimmermann i Curtis (2020), prema kojima

najzastupljenije bakterije u majčinom mlijeku potječu iz rodova *Staphylococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Pseudomonas, Bifidobacterium, Corynebacterium, Enterococcus, Acinetobacter, Rothia, Cutibacterium, Veillonella* i *Bacteroides.* U prikupljenim uzorcima fecesa dojenčadi, prosječno najzastupljenije su bile bakterije iz rodova *Bifidobacterium* (31,53 %) i *Bacteroides* (15,62 %). Bakterije iz roda *Bifidobacterium* su i po literaturi najzastupljenije u fecesu dojenčadi, jer su visokoprilagođene razgradnji kompleksnih oligosaharida prisutnih u majčinom mlijeku (Sela i sur., 2008). Rod *Bacteroides* čine korisne bakterije, visokozastupljene u neonatalnom mikrobiomu, koje imaju važnu funkciju u razvoju crijevnog imunosnog sustava (Walker i Iyengar, 2015), te zajedno s bakterijama iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, jačaju funkciju crijevne barijere poticanjem proizvodnje mucina i smanjenjem crijevne permeabilnosti, što je posebno važno u nezrelim crijevima novorođenčadi (Džidić i sur., 2018).

Provedeno je određivanje α- i β-raznolikosti mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi pomoću QIIME 2 platforme (slike 17-20). Za određivanje α-raznolikosti korištene su „Observed OTUs“, „Shannon“ i „Faith's pd“ metrike. Pritom je nizom naredbi kreiran graf krivulja razrjeđenja koje služe za vizualizaciju rezultata, tj. utvrđivanje bioraznolikosti bakterijskih vrsta prisutnih u uzorku i omogućuju da se utvrdi je li dubina sekvenciranja bila dovoljna za pojedini uzorak. Dubina sekvenciranja određuje broj očitanih sekvenci (*engl.* reads) po uzorku koje se koriste u analizi α- i β-raznolikosti, pri čemu je važno odabrati vrijednost koja je dovoljno visoka da prikaže stvarnu bioraznolikost uzorka, a da broj uzoraka isključenih iz analize bude što manji, jer se uzorci koji sadrže broj sekvenci manji od traženog, izostavljaju iz rezultata. Dubina sekvenciranja, predočena na x-osi grafova krivulja generiranih korištenjem sve tri metrike (slike 17-19), iznosila je 3100, što znači da je u jednom od 30 analiziranih uzoraka mikrobioma majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi maksimalan broj sekvenci iznosio 3100, te su svi ostali uzorci poduzorkovani na taj broj sekvenci kako bi bili jednako zastupljeni. Iz grafova je također vidljivo da su sve krivulje postigle plato, odnosno da su se ustalile i dosegnule asimptotu, što govori da je dubina sekvenciranja bila dovoljna, te da veći broj sekvenci po uzorku ne bi dao pouzdanije podatke i rezultirao većim brojem vrsta. Osim dubine sekvenciranja, grafovi α-raznolikosti daju i procjenu raznolikosti, odnosno bogatstva vrsta u pojedinom uzorku. Korištenjem sve 3 metrike, vidljivo je da je α-raznolikost mikrobioma majčinog mlijeka veća od one fecesa dojenčadi, odnosno da je mikrobiota majčinog mlijeka raznolikija, tj. bogatija brojem vrsta od crijevne mikrobiote, što su sekvenciranjem 16S rRNA gena ustanovili i drugi autori

(Biagi i sur., 2017; Murphy i sur., 2017). Na grafu krivulja generiranih korištenjem „observed OTUs“ metrike, na y-osi je predočen broj opaženih OTU-a (*engl.* observed OTUs), kojim se uzima u obzir samo prisutnost određenih taksonomskih jedinica u uzorku (u ovom radu OTU odgovara taksonomskom nivou vrste), ali ne i koliko su se puta pojavile u tom uzorku (slika 18). Korištenjem ove metrike, najniža α-raznolikost primijećena je u uzorku fecesa djeteta prikupljenom mjesec dana nakon poroda, dok je među uzorcima majčinog mlijeka, raznolikost vrsta bila najmanja u uzorku mlijeka majke tog djeteta koje je prikupljeno isti dan. Iz grafa metrike „Shannon“, prikazanom na slici 17, vidljivo je da je najmanju bioraznolikost, kao i na prethodnom grafu, pokazao isti uzorak fecesa dojenčeta. Na grafu krivulja generiranih korištenjem “Faith’s pd” metrike, također je uočena korelacija u bioraznolikosti sastava majčinog mlijeka i fecesa dojenčadi, jer je najmanja α-raznolikost uočena u uzorku mekonija djeteta i uzorku mlijeka njegove majke (slika 19).

Dok α-raznolikost pruža procjenu raznolikosti vrsta prisutnih u pojedinom uzorku, a pritom ne pokazuje koliko su ti uzorci međusobno slični, β-raznolikost predstavlja usporedbu mikrobne zajednice svih uzoraka u analizi temeljenu na njezinom sastavu kako bi se dobio prikaz sličnosti mikrobnih zajednica. Za računanje β-raznolikosti u ovom radu, korištena je kvalitativna Unweighted UniFrac metrika, koja uzima u obzir samo prisutnost, ali ne i zastupljenost pojedine taksonomske jedinice u uzorku. Temeljni rezultat određivanja β-raznolikosti je kvadratni, šuplji matriks u kojem je izračunata udaljenost, tj. različitost svakog uzorka, pri čemu uzorke koji imaju sličan sastav bakterijskih zajednica koje su evolucijski bliske, karakterizira mala UniFrac udaljenost. PCoA analizom su uzorci na temelju udaljenosti izračunate Unweighted UniFrac metrikom, smješteni u trodimenzionalni okvir, pri čemu je došlo do formiranja dva klastera (slika 20). Unutar jednog klastera su grupirani uzorci majčinog mlijeka, a unutar drugog, uzorci fecesa dojenčadi. Iz rezultata PCoA analize je također vidljivo da je najmanja udaljenost između uzoraka mlijeka koji pripadaju istoj majci te fecesa koji pripadaju istoj dojenčadi, što implicira da je mikrobiom svake osobe jedinstven.

5.2. Izolacija i identifikacija bakterija iz majčinog mlijeka te odabir sojeva BMK-potencijalnih probiotika nove generacije

Istraživanja su pokazala da probiotici dostupni na tržištu imaju ograničene funkcionalne učinke na domaćina i da je potrebna dodatna selekcija i formulacija probiotičkih sojeva (Žučko i sur., 2020; Hage i sur., 2017). Stoga su najnovija istraživanja na području probiotičkog koncepta usmjerena na razvoj probiotika nove generacije, namijenjenih za terapijsko liječenje i prevenciju bolesti, koji su 2019. službeno prihvaćeni kao nova kategorija medicinskih proizvoda za tržište Europe. Pri razvoju probiotika nove generacije, prepoznate su tri različite strategije (Douillard i de Vos, 2019). Jedna od njih uključuje identifikaciju, karakterizaciju i selekciju probiotičkih sojeva BMK i bifidobakterija iz novih izvora (Sornplang i Piyadeatsoontorn, 2016), poput majčinog mlijeka. Pri odabiru probiotika nove generacije, koristi se moderan pristup baziran na omičkim tehnologijama te *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima probiotičkog potencijala i potencijalnih terapeutskih i funkcionalnih svojstava tih bakterija (Douillard i de Vos, 2019). Iako je izoliran i identificiran značajan broj pripadnika mikrobiote majčinog mlijeka, zbog svoje kompleksnosti i bioraznolikosti, ono i dalje predstavlja jedan od najzanimljivijih izvora potencijalnih probiotika nove generacije. Stoga je u svrhu odabira novih sojeva, potencijalnih probiotika nove generacije, iz prikupljenih uzoraka majčinog mlijeka izolirano 100 bakterijskih sojeva, po 20 iz uzoraka mlijeka svake majke. Svim izoliranim sojevima, imenovanim oznakom dojilje te brojem od 1-20, uspješno je ekstrahirana DNA (tablica 6) te su pohranjeni na -80 °C u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prije daljnjih analiza, bilo je potrebno provesti redukciju broja izolata eliminacijom istovjetnih bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka svake majke. U tu svrhu, provedena je genotipizacija sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka pomoću RAPD-PCR metode, koja omogućuje tzv. DNA "fingerprinting", odnosno detekciju polimorfizama prisutnih u sekvencama DNA različitih bakterija zahvaljujući varijacijama u mjestima vezanja početnica i razlikama u duljinama amplificiranih fragmenata. Elektroforetskim razdvajanjem RAPD-PCR produkata, dobiveni su jedinstveni genetički profili svakog soja (slike 21 i 22), koji su pomoću GelCompar II softvera na temelju sličnosti svrstani u 28 klastera, što je omogućilo razlikovanje genetički različitih sojeva bez poznavanja njihove genomske sekvence. Rezultati hijerarhijske klaster analize prikazani su u obliku 5 zasebnih dendrograma sojeva izoliranih iz mlijeka pojedine majke (slika 23).

Budući da su bakterije identičnih RAPD-PCR profila izolirane iz istog izvora jednake (Nowrouzian i sur., 2019), za daljnje analize je odabran po jedan predstavnik (KR19, KR20, MC1, MC2, MC5, MC13, MC19, AF2, AF4, AF5, AF12, AF16, MB1, MB2, MB5, MB6, MB7, MB10, MB11, MB13, MB15, MB18, MB20, RS4, RS8, RS10, RS17, RS19) svakog klastera generiranog dendrogramom. Pritom je uočeno da su sojevi identifikacijske oznake KR genetički najsličniji, jer su grupirani u samo dva klastera visoke međusobne sličnosti (94,8 %), dok je najveća genetička raznolikost uočena kod sojeva oznake RS, kod kojih je sličnost najudaljenijih klastera bila 29,8 %. 28 genetički različitih izolata, odabranih analizom dendrograma, fenotipski je okarakterizirano nizom metoda kako bi se ustanovilo pripadaju li skupini Gram-pozitivnih, nesporogenih, katalaza-negativnih BMK. KOH metoda je korištena kao brzi test za otkrivanje pripadnosti bakterija po Gramu, kojom je ustanovljeno da su sve bakterije izolirane iz majčinog mlijeka Gram-pozitivne. Dodatno je provedeno bojanje po Gramu kojim se bakterije razlikuju na osnovi građe stanične stijenke. Mikroskopiranjem obojenog preparata, potvrđeno je da su svi izolirani sojevi Gram-pozitivni te je ustanovljeno da je 11 bakterijskih sojeva štapićastog oblika, dok su preostali izolati koki (tablica 7). Zatim je katalaza-testom utvrđeno da je 21 izolat katalaza-negativan, a da ih je 7 katalaza-pozitivno, što znači da se potonji ne ubrajaju u BMK (tablica 7). API 50 CHL testom, koji se koristi za identifikaciju bakterija iz roda *Lactobacillus*, dobiveni su fermentacijski profili svakog izolata (tablice 8 i 9), čijom su analizom sojevi KR19, MC19, MB7, MB15 i RS10 identificirani kao *Lb. plantarum* s točnošću ≥ 99,8 %, dok za ostale sojeve identifikacija API 50 CHL testom nije bila dovoljno pouzdana. Stoga je provedena genotipska identifikacija 28 odabranih izolata iz majčinog mlijeka sekvenciranjem 16S rRNA gena Sangerovom metodom. Usporedbom rezultata sekvenciranja sa sekvencama pohranjenim u NCBI bazi podataka primjenom BLASTn algoritma, otkriveno je da 11 sojeva pripada rodu *Lactobacillus*, 5 rodu *Enterococcus*, 5 rodu *Streptococcus* i 7 rodu *Staphylococcus* (tablica 10). Kako bi se izračunala prosječna zastupljenost bakterijskih rodova među sojevima izoliranim iz majčinog mlijeka, rezultati sekvenciranja 28 odabranih, genetički različitih izolata, uspoređeni su s rezultatima hijerarhijske klaster analize RAPD-PCR elektroforetskih profila svih 100 izoliranih sojeva (slika 24). Tako je potvrđeno da među ukupno 100 bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, najviše pripada rodu *Enterococcus* (46 %) te rodovima *Staphylococcus* (27 %) i *Lactobacillus* (22 %), dok rodu *Streptococcus* pripada samo 5 % izoliranih bakterija.

5.3. Detekcija sojeva producenata potencijalnih terapijskih biomolekula, S-proteina i bakteriocina, među BMK izoliranim iz majčinog mlijeka

Iako postoji mnogo dokaza o korisnom učinku probiotika na zdravlje domaćina, poput jačanja funkcije crijevne barijere, modulacije imunosnog odgovora te antagonizma prema patogenim bakterijama (što uključuje proizvodnju antimikrobnih spojeva i kompeticiju za vezna mjesta na sluznici), molekularni mehanizmi odgovorni za te učinke nisu dovoljno razjašnjeni (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016). Zna se da su multifaktorijalni i da uključuju različite bioaktivne proizvode mikrobnog metabolizma poput površinskih molekula i metabolita koje bakterije luče u izvanstanični prostor. Iako su rijetko prisutni u probiotičkim bakterijama, S-proteini zbog iznimnog utjecaja na probiotička svojstva soja producenta predstavljaju jedne od najistraživanijih površinskih komponenti probiotičkih baterija, koje vezanjem na PRR receptore crijevnih epitelnih i dendritičkih stanica te makrofaga sudjeluju u regulaciji brojnih signalnih puteva, modulaciji crijevnog i sistemskog imunosnog sustava, inhibiciji apoptoze, ublažavanju upale i poboljšanju funkcije crijevnog epitela (Monteagudo-Mera i sur., 2019). Osim što imaju imunomodulatornu aktivnost, S-proteini prisutni na površini određenih probiotičkih sojeva tvore zaštitni sloj koji štiti stanicu producenta od nepovoljnih uvjeta okoliša, djeluje kao molekulsko sito i ima ulogu u rastu i održavanju oblika stanice, agregaciji, adheziji, kolonizaciji, stvaranju biofilmova te interakciji stanica producenta s domaćinom (Gerbino i sur., 2015; Hynönen i Palva, 2013).

Iako je proizvodnja S-proteina rijetko svojstvo probiotičkih bakterija te u literaturi do sada nije opisan niti jedan producent S-proteina izoliran iz majčinog mlijeka, provedena je ekstrakcija površinskih proteina svih bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka, te njihovo elektroforetsko razdvajanje (slika 25). Pritom je kao pozitivna kontrola korišten soj *Lb. helveticus* M92, okarakteriziran našim prethodnim istraživanjima (Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016) kao producent S-proteina, vidljivih na elektroforetskom profilu soja M92 na slici 25 u obliku dominantne proteinske vrpce veličine oko 45 kDa. Budući da je tehnologijom rekombinantne DNA nemoguće konstruirati potpunog S-sloj-deficijentnog mutanta među vrstama roda *Lactobacillus* (Hynönen i Palva, 2013; Buck i sur., 2005), kao negativna kontrola korišten je probiotički soj *Lb. plantarum* D13 koji ne sadrži S-proteine prema našim ranijim istraživanjima (Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016).

Naime, funkcionalni geni za S-proteine su vrlo vjerojatno esencijalni za laktobacile koji ih sadrže te je njihova ekspresija konstitutivna (Hynönen i Palva, 2013). Iako su istraživanja potvrdila prisutnost brojnih gena za potencijalne transkripcijske faktore u genomima nekoliko *Lactobacillus* vrsta (Azcarate-Peril i sur., 2008), što ukazuje na potencijal regulirane ekspresije *slp* (*engl.* S-layer protein) gena pod određenim uvjetima, molekularni mehanizmi transkripcijske i translacijske regulacije tih gena su još uvijek gotovo u potpunosti neistraženi (Hynönen i Palva, 2013).

Neočekivano, analizom SDS-PAGE proteinskih profila sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, kod čak 8 sojeva (MB1, MB2, MB4, MB9, MB12, MB13, MB19, MB20) je potvrđena prisutnost dominantne proteinske vrpce veličine 45-55 kDa, specifične za S-proteine (slika 25). Prethodno provedenom hijerarhijskom klaster analizom RAPD-PCR produkata, navedeni sojevi su svrstani u 4 klastera čiji su predstavnici (MB1, MB2, MB13 i MB20) sekvenciranjem 16S rRNA gena identificirani kao pripadnici *Lb. brevis* vrste, unutar koje su u literaturi opisani sojevi producenti S-proteina (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016).

Proteinski profili dobiveni elektroforezom međusobno su uspoređeni hijerarhijskom klaster analizom te je analizom dendrograma uočeno da pripadnici iste bakterijske vrste imaju veoma slične proteinske profile (slika 26). Tako su sojevi identifikacijske oznake KR i MC na SDS-PAGE dendrogramu grupirani u potpuno iste klastere kao i na RAPD-PCR dendrogramu (slike 34 i 35). Također, 8 sojeva producenata S-proteina, svrstano je u ista 4 klastera kao i na dendrogramu generiranom hijerarhijskom klaster analizom RAPD-PCR elektroforetskih profila.

Zatim je kod 28 genetički različitih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, ispitana prisutnost gena koji kodiraju za S-proteine PCR-metodom sa specifičnim početnicama, pri čemu je kao pozitivna kontrola korištena DNA referentnog soja producenta S-proteina (*L. helveticus* M92) a kao negativna kontrola DNA referentnog soja koji ne proizvodi S-proteine (*L. plantarum* D13). Vrpca veličine 1,2 kb, karakteristična za S-proteine, uočena je samo kod referentnog soja *Lb. helveticus* M92 (slika 27). Dobiveni rezultat je očekivan jer je sličnost sekvenci gena koji kodiraju za S-proteine vrlo niska, baš kao i sličnost aminokiselinske sekvence S-proteina, zbog čega se potvrda prisutnosti S-proteina uglavnom provodi elektronskom i AFM mikroskopijom, mikroskopiranjem sa skenirajućom sondom te tehnikama rasapa X-zraka i neutrona (Hynönen i Palva, 2013; Baranova i sur, 2012).

Nakon identifikacije sekvenciranjem 16S rRNA gena Sangerovom metodom te SDS-PAGE analize svih sojeva, iz daljnjih analiza su isključeni sojevi *Staphylococcus epidermis* MC5, AF2, AF4, AF5, MB6, RS8 i RS17, *Streptococcus oralis* MB5, MB11 i RS4, *Streptococcus mitis* RS19 *i Enterococcus durans* AF12, zato što se ne ubrajaju u skupinu probiotičkih bakterija. Za daljnje eksperimente je stoga odabrano 16 sojeva: *Lactobacillus plantarum* KR19, MC19, MB7, MB15, MB18 i RS10, *Lactobacillus fermentum* MC1, *Enterococcus faecium* KR20, MC13 i AF16, *Enterococcus faecalis* MC2, *Lactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te *Streptococcus salivarius* MB10.

Molekularni mehanizmi probiotičkog djelovanja, osim površinskih komponenti, uključuju i metabolite koje bakterije luče u izvanstanični prostor (Lebeer i sur, 2018; Kos i sur., 2011; Šušković i sur., 2010). Bakteriocini su ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi male molekulske mase, koji producentima osiguravaju kompetitivnu prednost u polimikrobnom okruženju, djeluju kao signalne molekule u „quorum sensing“ interakciji producenta s drugim bakterijama te kao ligandi u interakciji s receptorima stanica imunosnog sustava i epitelnih stanica domaćina, čime imaju direktan utjecaj na regulaciju signalnih puteva (Kareb i Aïder, 2020; Simons i sur., 2020).

Proizvodnja bakteriocina se smatra važnim svojstvom pri odabiru probiotičkih sojeva, zbog čega je u svrhu detekcije producenata bakteriocina među 16 odabranih sojeva BMK izoliranih iz majčinog mlijeka, provedena PCR analiza sa 6 različitih parova početnica (slika 28). Među vrstama roda *Lactobacillus*, izoliranima iz majčinog mlijeka, prisutnost čak 3 gena (*plnJ*, *plnA* i *plnEF*) koja kodiraju za plantaricine, uočena je kod svih *Lb. plantarum* sojeva (KR19, MC19, MB7, MB15, MB18 i RS10) potencijalnih producenata bakteriocina. *Lb. plantarum* ima jedan od najvećih genoma među BMK jer objedinjuje veliki broj gena dobivenih horizontalnim transferom gena kroz pokretne elemente poput profaga, plazmida, transpozona i integrona (Kleerebezem i sur., 2003; Chevallier i sur., 1994), a često sadrži i plazmide koji mogu posjedovati gene za rezistenciju na antibiotike, katabolizam laktoze, proizvodnju proteolitičkih enzima i bakteriocina (Van Kranenburg i sur., 2005). Bakteriocinski *pln* lokus sadrži 5 operona: *plnEFI* i *plnJKLR*, koji kodiraju bakteriocine i imunosne proteine; *plnGHSTUV*, koji kodira ABC transportni sustav za izlučivanje peptida; *plnABCD*, koji kodira peptide za put transdukcije signala, te *plnMNOP*, koji sadrži gene nepoznatih funkcija. Peptid PlnA inducira transkripciju svih 5 navedenih *pln* operona koji su reprimirani pod normalnim uvjetima (Diep i sur., 2009;

Diep i sur., 2003). Pozitivni signali s početnicama za gene *plnA* i *plnEF*, koji kodiraju za plantaricine, uočeni su i kod soja *Lb. fermentum* MC1, te za gene *plnJ*, *plnA* i *plnEF*, kod svih sojeva vrste *Lb. brevis* (MB1, MB2, MB13 i MB20), što ukazuje da su sekvence bakteriocina navedenih sojeva djelomično homologne sa sekvencama plantaricina. Ehrmann i sur. (2000) su također utvrdili da je čak 28 od 53 aminokiseline koje se nalaze na početku aminokiselinske sekvence plantaricina 1.25β soja *Lb. plantarum* TMW1.25, identično onima bakteriocina brevicina 27, soja *Lb. brevis* SB27. Prisutnost gena *plnS*, *plnW* i *plnNC8*, nije uočena kod ijednog *Lactobacillus* soja. Istraživanja drugih autora su pokazala da su geni koji kodiraju za plantaricin S i W vrlo rijetki među sojevima vrste *Lb. plantarum* (Sáenz i sur., 2009; Holo i sur., 2001).

Iako BMK većinom proizvode samo jedan bakteriocin, neke vrste proizvode više bakteriocina koji često pripadaju različitim klasama (Dimov i sur., 2005). Proizvodnja 3 i više bakteriocina je osobito česta kod vrsta roda *Enterococcus* i *Streptococcus* (Park i sur., 2003). Enterokoki čine jedne od najzastupljenijih BMK crijevnog mikrobioma sisavaca. Najčešći producenti bakteriocina među enterokokima su vrste *E. faecium* i *E. faecalis*, čiji bakteriocini gotovo isključivo pripadaju drugoj skupini termostabilnih nelantibiotičkih bakteriocina (Nes i sur., 2007). Iako se većina bakteriocinskih operona nalazi na plazmidima, što omogućuje horizontalni transfer gena za biosintezu bakteriocina unutar i između vrsta, geni za biosintezu enterocina (npr. *entA* i *entB*), većinom su kodirani na kromosomu (Dimov i sur., 2005). Među sojevima roda *Enterococcus*, izoliranim iz majčinog mlijeka, vrlo slabi pozitivni signali za prisutnost gena *plnA* i *plnEF* uočeni su samo kod sojeva *E. faecium* KR20 i *E. faecalis* MC2 (slika 28). Navedeni plantaricini pripadaju drugoj klasi termostabilnih nelantibiotičkih bakteriocina, baš poput enterocina sojeva *E. faecium* i *E. faecalis*, zbog čega su vjerojatno prisutne homologije unutar njihovih sekvenci. Također, rezultati PCR analize podržavaju hipotezu o horizontalnoj razmjeni gena koji kodiraju za bakteriocine među bakterijama prisutnim u istom staništu.

Većina regulatornih sustava probiotičkih bakterija, usmjerena je na kompeticiju s drugim bakterijama i preživljavanje u različitim okolišnim uvjetima, što podrazumijeva detekciju širokog spektra okolišnih signala i odgovor na njih kontrolom ekspresije različitih gena (Sturme i sur., 2007) i proizvodnjom različitih antimikrobnih spojeva poput organskih kiselina, vodikovog peroksida, etanola, diacetila, acetaldehida, acetoina, ugljikovog dioksida, reuterina, reutericiklina i bakteriocina (Guimarães i sur., 2018; Kos i sur., 2011; Šušković i sur., 2010), koji pokazuju

jako antagonističko djelovanje prema mnogim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim mikroorganizmima, uključujući uzročnike kvarenja i patogene mikroorganizme (Adeniyi i sur., 2015). Antimikrobna aktivnost predstavlja jedan od najvažnijih mehanizama probiotičkog djelovanja, kojom mikroorganizam producent osigurava kompetitivnu prednost u polimikrobnom okruženju, zbog čega predstavlja važan WHO/FAO izborni kriterij pri selekciji probiotičkih sojeva.

Stoga je metodom difuzije s rupama u agaru, ispitano antagonističko djelovanje bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka prema 4 patogena mikroorganizma: *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111™, *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1. Prema rezultatima iz tablice 11, najjače antagonističko djelovanje, određeno metodom difuzije s rupama u agaru, pokazali su sojevi *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20, a snažno antimikrobno djelovanje istom metodom je utvrđeno i kod sojeva *Lb. plantarum* KR19, MC19 i MB18. Promjeri zona inhibicije rasta Gram-pozitivnih test-mikroorganizma *S. aureus* i *L. monocytogenes*, kretali su se u rasponu od 0 do 23 mm, odnosno 0 do 30 mm, dok su se promjeri zona inhibicije Gram-negativnih mikroorganizama *E. coli* i *S.* Typhimurium kretali od 0 do 16 mm, odnosno od 0 do 18 mm. Prema tome, bakterije izolirane iz majčinog mlijeka su snažnije inhibirale rast Gram-pozitivnih nego Gram-negativnih test-mikroorganizama, što ukazuje na potencijalnu ulogu bakteriocina u njihovom antimikrobnom djelovanju. Također, soj *Streptococcus salivarius* MB10, u čijem genomu nije utvrđena prisutnost gena za bakteriocine (slika 28), jedini nije pokazao antimikrobno djelovanje prema 4 ispitana patogena mikroorganizma, dok su sojevi *Enterococcus faecium* MC13 i AF16, koji također ne proizvode bakteriocine, pokazali vrlo slabo antimikrobno djelovanje prema svim patogenim test-mikroorganizmima.

Osim metodom difuzije s rupama u agaru, antimikrobno djelovanje bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka prema patogenim test-mikroorganizmima *S. aureus* 3048, *L. monocytogenes* ATCC® 19111™, *E. coli* 3014 i *S.* Typhimurium FP1 ispitano je i metodom dvostrukog sloja agara (tablica 12).

Efektivni inhibicijski odnos (EIR), utvrđen ovom metodom, iznosio je od 0,75 do 4,63 za test-mikroorganizam *S. aureus*, 0,50 do 3,38 za *L. monocytogenes*, od 0,50 do 4 za *E. coli* te 0,63 do 4 za *S.* Typhimurium. Rezultati su interpretirani prema Coeuret i sur. (2004) gdje EIR < 0,5 označava slabu, a EIR > 1,5 jaku inhibiciju, dok vrijednosti između upućuju na srednje jako

inhibicijsko djelovanje. Najjače antimikrobno djelovanje prema patogenim mikroorganizmima, određeno metodom dvostrukog sloja, pokazali su sojevi *Lb. plantarum* KR19 i MC19, kod kojih je ranije PCR analizom utvrđena prisutnost 3 gena za biosintezu bakteriocina (slika 28). Najslabije antimikrobno djelovanje prema svim test-mikroorganizmima, kao i u metodi difuzije s rupama u agaru, pokazao je soj *Streptococcus salivarius* MB10.

Osim prema patogenim mikroorganizmima, metodom dvostrukog sloja ispitano je i antimikrobno djelovanje bakterija iz majčinog mlijeka prema srodnim BMK iz rodova *Lactobacillus, Lactococcus* i *Enterococcus* (tablica 13). Rezultati su pokazali da bakterije izolirane iz majčinog mlijeka imaju puno snažnije antimikrobno djelovanje prema patogenim bakterijama nego prema srodnim BMK. Samo je jedan soj, *Lb. brevis* MB20, pokazao jako inhibicijsko djelovanje prema svim srodnim BMK. Kod navedenog soja je i na elektroferogramu produkata PCR reakcije sa specifičnim početnicama za bakteriocine, uočen pozitivan signal za prisutnost gena *plnJ, plnA* i *plnEF* (slika 28). Jako inhibicijsko djelovanje prema barem jednoj srodnoj BMK, pokazali su i sojevi *Lb. plantarum* KR19 i MC19, te *Lb. brevis* MB1, MB2 i MB13. Sojevi *Streptococcus salivarius* MB10 i *Enterococcus faecium* AF16, nisu pokazali antimikrobno djelovanje prema srodnim BMK, dok su sojevi *Enterococcus faecium* KR20, *Enterococcus faealis* MC2 i *Enterococcus faecium* MC13 pokazali vrlo slabo prema svim ispitanim srodnim BMK.

5.4. Probiotički potencijal sojeva producenata S-proteina i bakteriocina izoliranih iz majčinog mlijeka

Antimikrobna rezistencija, odnosno pojava multirezistentnih bakterija uslijed prekomjernog korištenja antibiotika širokog spektra u terapijske svrhe te za poticanje rasta životinja na farmama, predstavlja prijetnju globalnom zdravlju i jedan je od najvećih izazova suvremene medicine. Preduvjet sustavnom prikupljanju podataka i analizi rezultata praćenja rezistencije bila je standardizacija rada mikrobioloških laboratorija, poradi čega su 2011. usvojeni europski standardi pri izradi i interpretaciji antibiograma (*engl.* European committee for antibiotic sensitivity testing, EUCAST). Antimikrobna rezistencija se definira kao svojstvo bakterije da preživi i raste u prisutnosti spoja koji bi je inače uništio ili spriječio njezin rast, što bakterija osigurava inaktivacijom antimikrobnog spoja, gubitkom osjetljivosti na antimikrobni spoj modifikacijom ciljane molekule, ili smanjenjem koncentracije antimikrobnog spoja u stanici pomoću tzv. "efflux pumpi" (Fraqueza, 2015). Rezistencija bakterije na antibiotik može biti primarna (intrinzična, urođena) ili sekundarna, tj. stečena (Das i sur., 2020). Smatra se intrinzičnom kad se gen za antibiotičku rezistenciju nalazi na "kromosomskoj" DNA i samim time je nasljedan i prisutan u većini sojeva unutar iste bakterijske vrste. Intrinzična rezistencija ne predstavlja rizik jer nije izazvana prijašnjom izloženošću antibiotiku i jer su šanse za prijenos rezistencije na drugu bakteriju minimalne te se događaju u iznimno rijetkim slučajevima kada je gen za rezistenciju omeđen insercijskim sekvencama (Das i sur., 2020). S obzirom na to da se probiotici najčešće koriste za ponovno uspostavljanje ravnoteže crijevne mikrobiote tijekom uzimanja antibiotika, urođena rezistencija na antibiotike kod probiotičkih bakterija često predstavlja poželjno svojstvo (Broaders i sur., 2013). Mehanizme antimikrobne obrane bakterija s intrinzičnom rezistencijom čine urođena proizvodnja enzima, koji inaktiviraju antimikrobni spoj, nemogućnost ulaska antimikrobnog spoja uslijed nepropusnosti stanične stijenke, pojačano izlučivanje antimikrobnog spoja iz stanice pomoću "efflux" pumpi, te nedostatak ciljnih mjesta djelovanja antimikrobnog spoja (Kumar i sur., 2005). Sekundarna rezistencija može biti prisutna samo kod nekih sojeva iste vrste, inače podložne djelovanju tog antibiotika, te se može širiti horizontalnim prijenosom genetičkog materijala između bakterija koje nisu u srodstvu (Pradhan i sur., 2019). Nastaje ili mutacijom bakterijskog kromosoma, u kojem se slučaju vrlo rijetko prenosi horizontalnim transferom, ili unosom strane DNA pomoću pokretnih genetičkih elemenata, koji često nose gene za rezistenciju na jedan ili više antibiotika (Das i sur., 2020;

Devirgiliis i sur., 2013). Usvajanje stranog genetičkog materijala putem horizontalnog prijenosa jedan je od najvažnijih pokretača bakterijske evolucije (Munita i Arias, 2016), a odvija se transformacijom, transdukcijom ili konjugacijom (Burmeister, 2015).

Pojedina istraživanja upućuju na sličnost antibiotičkog rezistoma dojenčeta i pokretnih genetičkih elementa tipičnih za mikrobiom majčinog mlijeka i intestinalnu mikrobiotu majke, te se spekulira o mogućnosti prijenosa gena za rezistenciju između majke i djeteta (Pärnänen i sur., 2018). Stoga je detekcija gena za antibiotičku rezistenciju, osim s aspekta provjere sigurnosti potencijalnih probiotičkih sojeva, važna i s aspekta karakterizacije mogućih načina prijenosa antibiotičkih determinanti. Osim ispitivanja antibiotičke rezistencije patogenih bakterija, neophodno je provoditi i kontrolu rezistencije nepatogenih, komensalnih bakterija, osobito onih koje su namijenjene za korištenje u ishrani životinja i ljudi jer može doći do horizontalnog prijenosa gena za rezistenciju na patogene pripadnike mikrobiote domaćina. Stoga je jedan od glavnih općih izbornih kriterija pri odabiru potencijalnih probiotičkih sojeva njihova osjetljivost na antibiotike (Šušković i sur., 2001).

Osjetljivost bakterijskih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka na 9 antibiotika (ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomicin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol), na koje je prema EFSA-inim smjernicama iz 2012. nužno ispitati osjetljivost probiotičkih sojeva namijenjenih za primjenu kod ljudi i životinja, ispitana je disk-difuzijskom metodom i E-testom. Vrijednosti promjera zona inhibicije dobivenih disk-difuzijskom metodom, uspoređeni su s CLSI standardima. Kao što je vidljivo u tablici 14, disk-difuzijskom metodom je kod svih ispitanih sojeva potvrđena fenotipska rezistencija na kanamicin i gentamicin, koji pripadaju skupini aminoglikozidnih antibiotika. Također, kod svih sojeva osim kod soja *Streptococcus salivarius* MB10, utvrđena je i fenotipska rezistencija na aminoglikozidni antibiotik streptomicin. Osim na aminoglikozidne antibiotike, svi sojevi roda *Lactobacillus,* su disk-difuzijskom metodom pokazali fenotipsku rezistenciju na vankomicin, dok su na ostale antibiotike osjetljivi ili umjereno osjetljivi. Svi sojevi roda *Enterococcus,* osim *E. faecalis* MC2 koji je pokazao rezistenciju i na klindamicin, ovom su metodom pokazali osjetljivost ili umjerenu osjetljivost na sve antibiotike osim aminoglikozidnih. Soj *Streptococcus salivarius* MB10 je pokazao fenotipsku osjetljivost na sve antibiotike, osim aminoglikozidnih antibiotika kanamicina i gentamicina.

Kako bi se utvrdila minimalna inhibitorna koncentracija potrebna za inhibiciju rasta BMK izoliranih iz majčinog mlijeka pomoću 9 antibiotika propisanih od strane EFSA-e, provedena je metoda fenotipskog određivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike metodom difuzije u agar pomoću E-testa. Rezultati E-testa, izraženi pomoću MIC vrijednosti (tablica 15), uspoređeni su sa službenim graničnim vrijednostima za antibiotičku osjetljivost koje je propisala EFSA. Prema rezultatima disk-difuzijske metode i E-testa, svi sojevi *Lactobacillus* vrsta, su fenotipski osjetljivi ili umjereno osjetljivi na sve primijenjene antibiotike osim vankomicina i aminoglikozidnih antibiotika (kanamicina, gentamicina i streptomicina). Dobiveni rezultati su u skladu s literaturom, prema kojoj većina bakterija iz roda *Lactobacillus* posjeduje urođenu rezistenciju na kanamicin, gentamicin, streptomicin, vankomicin, neomicin, ciprofloksacin, trimetoprim, metronidazol, sulfametoksazol i bacitracin, dok su osjetljivi na β-laktamske antibiotike, kloramfenikol, tetraciklin, eritromicin, linezolid i kvinepristin-dalfopristin (Fraqueza, 2015). Jedna od najpodrobnije ispitanih rezistencija laktobacila je ona na vankomicin, koja se ne smatra prijetnjom jer je kromosomski kodirana i samim time nije prenosiva na druge bakterijske sojeve, za razliku od stečene rezistencije posredovane plazmidima i transpozonima koja ima veliki potencijal za prenošenje na druge bakterijske sojeve, a koja je često prisutna kod nekih vankomicin-rezistentnih vrsta iz roda *Enterococcus* (Coeuret i sur., 2004). Vrste roda *Lactobacillus* su rezistentne na vankomicin jer im je terminalni D-Ala-D-Ala dipeptid peptidoglikana, na koji se veže vankomicin s citoplazmatske strane stanične stijenke bakterije, zamijenjen D-Ala-D-laktatom ili D-Ala-D-serinom, što sprječava vezanje vankomicina (Gueimonde i sur., 2013). Iako postoji sve više dokaza o njegovoj nefrotoksičnosti (Neely i sur., 2018), vankomicin se još uvijek koristi jer predstavlja posljednju liniju obrane kod ozbiljnih infekcija uzrokovanim stafilokokima, enterokokima i drugim Gram-pozitivnim patogenim bakterijama te u liječenju pseudomembranskog kolitisa (Dinu i sur., 2020). Rezistencija na aminoglikozidne antibiotike se također smatra intrinzičnom kod laktobacila jer ne posjeduju citokromom-posredovani transport elektrona koji sudjeluje u unosu tog antibiotika u stanicu (Gueimonde i sur., 2013). Prema rezultatima E-testa i disk-difuzijske metode, svi *Lactobacillus* sojevi izolirani iz majčinog mlijeka se smatraju sigurnima za primjenu kod ljudi i životinja.

Vrste roda *Enterococcus* posjeduju intrinzičnu rezistenciju na veliki broj antibiotika uključujući cefalosporine, sulfonamide, oksacilin, ertapenem i perfloksacin, dok vrste *E. faecalis* i *E. faecium* mogu biti i intrinzično rezistentne na aminoglikozidne antibiotike, klindamicin,

eritromicin, trimetoprim-sulfametoksazol i fusidnu kiselinu (Kateete i sur., 2019). Dodatno, sojevi *E. faecium* često posjeduju i urođenu rezistenciju na ampicilin. Prema rezultatima prikazanima u tablicama 14 i 15, svi sojevi *E. faecium* (KR20, MC13 i AF16), izolirani iz majčinog mlijeka su fenotipski osjetljivi na sve antibiotike osim pojedinih aminoglikozidnih antibiotika. Jedino je soj *E. faecium* MC13 pokazao i fenotipsku rezistenciju na ampicilin, karakterističnu za sojeve te vrste. Iako je niska razina rezistencije na aminoglikozidne antibiotike urođena kod enterokoka, pokazalo se da sojevi koji su visokorezistentni na aminoglikozide, često imaju gene za rezistenciju na navedene antibiotike na plazmidima i konjugativnim transpozonima (Zarrilli i sur., 2005). Soj *E. faecalis* MC2, pokazao je u fenotipskim metodama rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike, klindamicin, eritromicin i tetraciklin (tablice 14 i 15), zbog čega je bilo potrebno PCR metodom provjeriti je li višestruka rezistencija koju je pokazao fenotipskim metodama urođena ili stečena.

Sojevi roda *Streptococcus* često posjeduju intrinzičnu rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike, ceftazidim i fusidnu kiselinu, dok su rezistencije streptokoka na ostale antibiotike većinom stečene, premda pojedini sojevi posjeduju intrinzičnu rezistenciju na ciprofloksacin, oksacilin, linezolid, fosfomicin, daptomicin, mupirocin i vankomicin (Vestergaard i sur., 2016). Kao što je vidljivo u tablicama 14 i 15, soj *S. salivarius* MB10 je fenotipski rezistentan samo na kanamicin i gentamicin.

Kako bi se utvrdilo je li rezistencija sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka urođena ili stečena, provedena je i genotipska karakterizacija antibiotičke rezistencije tih sojeva PCR-metodom s početnicama za gene koji se nalaze na prijenosnim genetičkim elementima, podložnim horizontalnom transferu. Navedena metoda je nužna za potvrdu sigurne primjene potencijalnih probiotičkih sojeva kod ljudi i životinja jer su u literaturi prisutni podaci o dokazanoj prisutnosti gena za rezistenciju na antibiotike poput kloramfenikola, eritromicina, streptomicina, tetraciklina i vankomicina na prijenosnim genetičkim elementima laktobacila (Pradhan i sur., 2019). Analizom elektroferograma PCR-produkata dobivenih korištenjem početnica za gen *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*, kod soja *Lactobacillus plantarum* MB15, uočena je odgovarajuća vrpca veličine 348 pb (slika 29). Budući da je navedeni gen, koji osigurava rezistenciju na gentamicin, plazmidno kodiran i stoga podložan horizontalnom transferu, isključen je iz daljnjih eksperimenata. Kod ostalih *Lactobacillus* sojeva nije utvrđena prisutnost

prenosivih gena za rezistenciju na antibiotike i stoga se mogu, barem s aspekta antibiotičke rezistencije, smatrati sigurnima za primjenu kao probiotici ili funkcionalne starter kulture. Kod sojeva *Streptococcus salivarius* MB10 te *Enterococcus faecalis* MC2, također je uočena prisutnost potencijalno prenosivog gena koji osigurava rezistenciju na gentamicin (slika 29), zbog čega se ni oni ne smatraju sigurnim za primjenu te su isključeni iz daljnjih istraživanja.

Osim sojeva *Lactobacillus plantarum* MB15, *Streptococcus salivarius* MB10 i *Enterococcus faecalis* MC2, izuzetih iz daljnjih istraživanja zbog posjedovanja potencijalno prenosivih gena za rezistenciju na antibiotike, iz daljnjih istraživanja je isključen i soj *Enterococcus faecium* AF16, jer ne proizvodi S-proteine i bakteriocine. Za daljnje analize, odabrano je 12 producenata S-proteina i bakteriocina koji ne sadrže potencijalno prenosive gene za rezistenciju na antibiotike: *Lb. plantarum* KR19, MC19, MB7, MB18 i RS10, *Lb. fermentum* MC1, *E. faecium* KR20 i MC13 te *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20.

Liofilizacija je proces sušenja u smrznutom stanju, pri čemu dolazi do sublimacije leda pri uvjetima niske temperature i visokog vakuuma. Koristi se za očuvanje osjetljivih bioloških supstanci poput terapeutskih proteina, antibiotika, živih mikroorganizama, virusnih i bakterijskih cjepiva, monoklonalnih antitijela, enzima, hormona, liposoma, nanočestica, eritrocita, tkiva za transplantaciju, kostiju, itd. (Lee i sur., 2020; Langford i sur., 2018). Proces liofilizacije se sastoji od tri koraka: početnog smrzavanja uzorka, sublimacije leda primarnim sušenjem te uklanjanja eventualno prisutne nesmrznute vode sekundarnim sušenjem. Budući da se koristi za sušenje osjetljivih supstanci poput mikroorganizama, kod kojih dolazi do osmotskog šoka i oštećenja membrane uslijed stvaranja intracelularnog leda i rekristalizacije, često se tijekom procesa liofilizacije koriste lioprotektanti poput obranog mlijeka, monosaharida, disaharida, polisaharida, aminokiselina, glicerola, proteina sirutke itd., koji stabiliziraju staničnu membranu i stvaraju zaštitni omotač oko stanica (Zamfir i Grosu-Tudor, 2014). Preživljavanje procesa liofilizacije je važno probiotičko svojstvo jer se ona najčešće koristi u pripravi suhih aktivnih pripravaka probiotičkih stanica. Stoga je ispitano preživljavanje odabranih bakterijskih sojeva, izoliranih iz majčinog mlijeka, tijekom postupka liofilizacije, s i bez dodatka obranog mlijeka kao lioprotektora (slika 30A). Smrtnost bakterijskih stanica, izražena kao Δlog CFU mL^{-1}, kod većine sojeva je bila značajno niža ($P<0,05$) kada je tijekom postupka liofilizacije korišteno obrano mlijeko kao lioprotektor. Kod sojeva *Lb. plantarum* MB7 i *Lb. brevis* MB20 nije bilo značajne razlike u smrtnosti stanica liofiliziranih u fosfatnom puferu i u obranom mlijeku. Tijekom

liofilizacije u fosfatnom puferu, smrtnost je bila najniža (1,00 ± 0,05) kod soja producenta S-proteina, *Lb. brevis* MB20, a najviša (4,53 ± 0,11) kod soja *Lb. plantarum* MC19. Tijekom liofilizacije u obranom mlijeku, smrtnost soja *Lb. brevis* MB13, koji proizvodi S-proteine, iznosila je samo 0,03 ± 0,02, dok je najviša (2,16 ± 0,05) bila kod soja *Lb. plantarum* MB7. Ostali producenti S-proteina su također izvrsno preživljavali liofilizaciju u obranom mlijeku i fosfatnom puferu, što potvrđuje premisu o zaštitnoj ulozi S-proteina u preživljavaju soja producenta tijekom nepovoljnih uvjeta, koja je potvrđena i našim prijašnjim istraživanjima (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016).

Ljudski GIT sastoji se od želuca, dvanaesnika (duodenuma), taštog crijeva (jejunuma), vitog crijeva (ileuma), obodnog crijeva (kolona), ravnog crijeva (rektuma) i analnog kanala (Prakash i sur., 2011). Donji dio probavnog trakta je ciljno mjesto adhezije, kolonizacije i metaboličke aktivnosti probiotičkih bakterija, kojima surovi uvjeti gornjeg dijela GIT-a, poput lizozima u slini, niskog pH u želucu te prisutnosti žučnih soli i probavnih enzima u tankom crijevu, predstavljaju prepreku u sigurnom prolasku do mjesta djelovanja (Kos, 2001). Kako bi ostvarili blagotvoran učinak na zdravlje domaćina, probiotički sojevi moraju biti prisutni u crijevima u dostatnom broju, zbog čega je preživljavanje nepovoljnih uvjeta GIT-a jedan od ključnih kriterija pri odabiru potencijalnih probiotičkih sojeva. Bakterije posjeduju nekoliko mehanizama za borbu protiv nepovoljnih uvjeta okoliša, poput regulatornih proteina pratitelja (*engl.* regulatory chaperone proteins), koji popravljaju oštećenja proteina i DNA, ekstruzije protona F1F0-ATP-azom, pumpi za izlučivanje žuči, hidrolaza žučnih soli, dekarboksilaza i transportera za borbu protiv snižavanja intracelularnog pH, promjena u energetskom metabolizmu, promjena u lipidnom sastavu stanične membrane te promjena površine stanice proizvodnjom različitih bioaktivnih molekula, uključujući S-proteine (Fedorová i sur., 2018). Ispitano je *in vitro* preživljavanje BMK izoliranih iz majčinog mlijeka u simuliranim sokovima želuca i tankog crijeva (slika 30B). Posebno je važno dokazati preživljavanje potencijalnih probiotičkih sojeva u želucu, gdje zbog niskog pH želučanog soka (2,0-3,0), većina mikroorganizama ne može preživjeti (Singh i sur., 2012). Kao što je vidljivo na slici 30B, želučani sok je značajno smanjio broj živih stanica svih sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka. Stopa preživljavanja sojeva nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku iznosila je od 53,70 % soja *Ec. faecium* KR20, do 88,52 % soja producenta S-proteina *Lb. brevis* MB20. Nakon želučanog soka, provedena je *in vitro* simulacija prolaska bakterijskih stanica izoliranih iz

majčinog mlijeka kroz tanko crijevo, četverosatnom inkubacijom u simuliranom soku koji, za razliku od želučanog soka, nije značajno (P>0,05) utjecao na preživljavanje ijednog soja osim *Lb. fermentum* MC1. Preživljavanje probiotičkih sojeva u simuliranom soku tankog crijeva uočili su i drugi autori (Feng i sur., 2017). Postotak preživjelih bakterijskih kolonija poraslih na optimalnoj hranjivoj podlozi nakon izlaganja bakterija simuliranom soku tankog crijeva je, kao i nakon izlaganja simuliranom želučanom soku, bio najniži kod soja *Ec. faecium* KR20 (50,83 %), a najviši kod soja *Lb. brevis* MB20 (86,46 %).

Adhezija na epitelne i subepitelne strukture GI sustava, važan je kriterij za odabir perspektivnih probiotičkih sojeva, jer je neophodan preduvjet njihove kolonizacije, ekskluzije patogena, ali i komunikacije sa stanicama domaćina i iskazivanje njihovih blagotvornih učinaka. Adhezija je kompleksan proces na koji utječu površinska svojstva bakterijske stanice, karakteristika materijala na koje bakterija adhezira te okolišni faktori. U sam proces adhezije su uključene brojne slabe, nespecifične fizikalno-kemijske interakcije, ali i specifične interakcije liganda i receptora (Beussart i sur., 2014). U nespecifične fizikalno-kemijske interakcije se ubrajaju elektrostatske, van der Waalsove, vodikove i hidrofobne interakcije, uvjetovane sastavom površine bakterijskih stanica, tj. prisutnošću spojeva poput glikoproteina, lipoproteina, egzopolisaharida, lipoteihonske kiseline, S-proteina i tzv. „moonlighting“ proteina (Pan i sur., 2017; Beussart i sur., 2014). Svojstva površine stanice, uz svojstvo agregacije i prianjanja na različite biološke površine, smatraju se primarnim markerima u procjeni kolonizacijskog potencijala probiotičkih sojeva i njihovog potencijalnog učinka na domaćina (Shahbazi i sur., 2016; Nishiyama i sur., 2015). Stoga je u svrhu procjene hidrofobnosti površine stanica sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka ispitana njihova adhezija na heksan (slika 31A). Afinitet sojeva *Lb. plantarum* KR19, MC19 i RS10 prema nepolarnom otapalu heksanu bio je niži od 40 %, što ukazuje da je površina stanice navedenih sojeva pretežno hidrofilna. S druge strane, sojevi *Lb. plantarum* MB7 i MB18, kao i svi *Lb. brevis* sojevi producenti S-proteina (MB1, MB2, MB13 i MB20), pokazali su izrazitu hidrofobnost jer je stupanj njihove adhezije na heksan bio veći od 90 %. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturom, prema kojoj su površinska svojstva stanica *Lb. plantarum* vrste izrazito specifična za svaki soj, i dok je kod većine sojeva površina stanice hidrofilna (Śliżewska i sur., 2021; Dias i sur., 2013), kod nekih je hidrofobnost površine stanice veća od 90 % (Fonseca i sur., 2021). Makromolekularni omotači bakterijskih stanica mogu biti: (i) nepolisaharidne makromolekule, poput lipida i/ili proteina, (ii) amfifilne molekule, tj.

kombinacija hidrofilnih polisaharida s lipidima ili hidrofobnim polisaharidima te (iii) anionski hidrofilni polisaharidi (Rijnaarts, 1994). Prisutnost proteinskog materijala na površini stanice uzrokuje povećanu hidrofobnost, dok je hidrofilnost površine povezana s prisutnošću polisaharida (Firoozmand i Rousseau, 2016; Lahtinen i sur., 2008; Kos i sur, 2003). Stoga ne iznenađuje da su svi producenti S-proteina pokazali izrazitu hidrofobnost površine stanice, koja se smatra jednim od najvažnijih svojstava potencijalnih probiotičkih sojeva jer utječe na njihov rast na različitim supstratima, agregaciju, formaciju biofilmova i adheziju (Banić i sur., 2018; Oliveira i sur., 2001). Naime, ispitivanje hidrofobnosti se može smatrati predskazateljem svojstva adhezije na hidrofobnu površinu eukariotskih epitelnih stanica (Falah i sur., 2019) i na hidrofilnu površinu mukusa koji prekriva površinu epitelnih stanica (Nader-Macías i sur., 2008).

Osim hidrofobnosti površine stanice, autoagregacija i koagregacija također pružaju preliminarnu procjenu adhezijskog potencijala probiotičkih sojeva, što je preduvjet uspješne kolonizacije u crijevima (Pan i sur., 2017). Različite studije indiciraju da BMK mogu spriječiti adheziju patogenih bakterija na crijevnu mukozu formiranjem fizičke barijere autoagregacijom ili koagregacijom s patogenima, koje su usko povezane i s antagonističkim učinkom BMK jer utječu na proizvodnju antimikrobnih spojeva (Vlková i sur., 2008; Collado i sur., 2007). Autoagregacija je proces reverzibilnog nakupljanja stanica, pri čemu dolazi do njihovog spontanog taloženja u mediju. Autoagregacija mikrobnih stanica također osigurava da probiotik dostigne veliku gustoću stanica u crijevima (Jikang i Wenxiang, 2019). Stoga, ispitana je autoagregacija sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka te su rezultati prikazani kao postotak agregiranih stanica nakon 5 h inkubacije (slika 31B). Sojevi *Lb. brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 te sojevi *Lb. plantarum* MB7 i MB18, koji su pokazali najveću hidrofobnost u eksperimentu adhezije na heksan (slika 31A), pokazali su i iznimnu autoagregaciju, budući da je više od 95 % njihovih stanica autoagregiralo unutar 5 h (slika 31B). Najslabiju autoagregaciju (60,41 ± 2,52 %) pokazao je soj *Lb. fermentum* MC1. Sojevi vrste *Lb. fermentum* često proizvode EPS-e, koji mogu maskirati površinske strukture odgovorne za međustanične interakcije i time negativno utjecati na autoagregaciju (Dertli i sur., 2015). Pokazalo se da mutanti sa smanjenom produkcijom EPS-a pojačano autoagregiraju u odnosu na divlji tip (Dertli i sur., 2015).

Koagregacija s patogenim bakterijama omogućuje probiotičkim bakterijama manipulaciju mikrookolišem patogena i sprječavanje njihovog rasta sekrecijom antimikrobnih spojeva na jako maloj udaljenosti. Stoga je ispitana koagregacija odabranih BMK, izoliranih iz majčinog mlijeka

s test-mikroorganizmima *Staphylococcus aureus* 3048, *Listeria monocytogenes* ATCC® 19111™, *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serotip Typhimurium FP1 (slika 31C). Najslabiju koagregaciju sa sva 4 patogena mikroorganizma, pokazao je soj *Lb. fermentum* MC1, koji je pokazao i najslabiju autoagregaciju (slike 31B i 31C). Najbolju koagregaciju *s E. coli* pokazao je soj *Lb. plantarum* MB18 (87,30 ± 0,25 %), sa *S.* Typhimurium soj *Lb. brevis* MB20 (87,36 ± 0,43 %), s *L. monocytogenes* soj *Lb. brevis* MB1 (88,29 ± 0,28 %), a sa *S. aureus* soj *Lb. brevis* MB2 (89,61 ± 0,51 %). Činjenica da su svi producenti S-proteina pokazali izvrsnu autoagregaciju i koagregaciju sa svim ispitanim test-mikroorganizmima, implicira da su S-proteini vrlo vjerojatno uključeni u procese agregacije probiotičkih sojeva, što je u skladu s našim prethodnim istraživanjima (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016). Budući da su sojevi koji su pokazali najvišu hidrofobnost površine stanice, pokazali i najsnažniji kapacitet autoagregacije i koagregacije, evidentna je korelacija između površinskih svojstava i agregacijskih svojstava, što su ustanovili i drugi autori (Banić i sur., 2018; Collado i sur., 2007).

Jedan od najvažnijih kriterija pri odabiru potencijalnih probiotičkih sojeva je svojstvo njihove adhezije na crijevni epitel, što je preduvjet interakcije s domaćinom i pozitivnog utjecaja na njegovo zdravlje (Ouwehand i sur., 2002). Adhezija bakterija je multifaktorijalan proces na koji utječu površinska svojstva stanice, tip površine ili tkiva domaćina, uvjeti okoliša i svojstvo agregacije (Kleerebezem i sur., 2010; Lebeer i sur., 2008; Vizoso Pinto i sur., 2007). Sloj epitelnog tkiva je građen od različitih vrsta stanica koje podliježu apoptozi, ljušte se i kontinuirano zamjenjuju svakih 4-5 dana, a uključuju enterocite, Panethove stanice, vrčaste stanice i neuroendokrine stanice (Kong i sur., 2018). Najzastupljeniji su enterociti, koji imaju važnu ulogu u apsorpciji nutrijenata (npr. iona, vode, šećera, peptida i lipida) i u sekreciji imunoglobulina (Kong i sur., 2018). Neuroendokrine stanice djeluju kao kemoreceptori i potiču probavu, detektiraju štetne spojeve i iniciraju zaštitni odgovor (Cox, 2016).

Oko 10 % svih crijevnih epitelnih stanica čine jednostanične žlijezde, tzv. vrčaste stanice, koje luče glikozilirane proteine mucine veličine 0,5-40 MDa, građene od ~90 % ugljikohidrata, prvenstveno N-acetilgalaktozamina, N-acetilglukozamina, galaktoze, fukoze, sijalinske kiseline te tragova manoze i sulfata (Kong i sur., 2018; Tailford i sur., 2015; Etzold i sur., 2014). Mucini ovisno o glikozilaciji mogu biti neutralni ili kiseli, a sadrže karakteristična tandemska ponavljanja ostataka treonina, prolina i serina (Dekker i sur., 2002; Hanisch, 2001). Translociraju se na površinu membrane ili izlučuju i polimeriziraju te čine strukturnu osnovu sloja mukoznog gela,

kojem daju viskoelastična fizikalna svojstva (Kong i sur., 2018). Glikozilacija proteinske osnovice i intermolekularno povezivanje terminalnih regija učinkovito štite polimere mucina od proteazne aktivnosti i tako čuvaju integritet zaštitnog strukturalnog matriksa (Corfield, 2000). Mukus je semipermeabilni gel-matriks debljine 300-700 μm, koji dopušta izmjenu plinova, vode i nutrijenata s epitelom kojeg prekriva u obliku neprekinutog sloja (Zhang i Wu, 2020). Olakšava prolazak hrane kroz crijeva i djeluje kao fizička barijera koja štiti stijenku crijeva od fizičkih i kemijskih oštećenja, probavnih enzima, toksina, patogena, dehidracije i abrazije (Zhang i Wu, 2020; Cornicky i sur., 2015; Kim i Ho, 2010). Pruža stanište i nutrijente komensalnoj crijevnoj mikrobioti i služi kao matriks antimikrobnim peptidima i proteinima koje proizvode Panethove stanice u tankom crijevu, posebice u ileumu (Chairatana i Nolan, 2017; Clevers i Bevins, 2013). Pri ispitivanju adhezije bakterija i odabiru modela pomoću kojih će se analizirati, prisutnost sloja mukusa, koji predstavlja prvu fizičku barijeru s kojom se alohtone bakterije susreću u crijevima, često se zanemaruje (Johansson i sur., 2011). Ona je posebno važna u debelom crijevu, gdje je sloj mukusa najdeblji, a količina mikroorganizama najveća (van Tassel i Miller, 2011). Adhezija na mukus je jedan od ključnih preduvjeta kolonizacije nepokretnih mikroorganizama u GIT-u i interakcije probiotičkih organizama sa stanicama domaćina (Frese i sur., 2013), te je stoga *in vitro* ispitana adhezija BMK izoliranih iz majčinog mlijeka na mucin imobiliziran na polistirenskim pločicama. Prema rezultatima vidljivim na slici 32A, najsnažniju adheziju na mucin, pokazao je soj *Lb. plantarum* KR19, kod kojeg je pri ispitivanju adhezije na heksan, uočena i najmanja hidrofobnost površine stanice (slika 31A). Pritom su sojevi koji su snažno adhezirali na heksan, pokazali slab adhezijski kapacitet za vezanje na mucin. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturom, prema kojoj se visoka hidrofobnost površine bakterijske stanice smatra predskazateljem slabe adhezije na hidrofilnu površinu mukusa (Boegh i Nielsen, 2015; Nader-Macías i sur., 2008). Nakon tretmana proteinazom K, adhezija svih *Lactobacillus* sojeva na mucin se značajno smanjila, što sugerira da je adhezija laktobacila na mucin vjerojatno djelomično posredovana proteinima. Istraživanja molekularnih mehanizama prepoznavanja i adhezije su pokazala da u interakcije s lancem mucina ulaze ugljikohidrati i proteini putem različitih adhezina prisutnih na površini bakterijske stanice (Etzold, 2014; Juge, 2012). Također je uočeno da je adhezija laktobacila na mucin većinom posredovana proteinima vezanim na staničnu stijenku (Chatterjee i sur., 2018), što potvrđuje hipotezu o proteinskoj naravi adhezina na mucin, prisutnih na površini *Lactobacillus* sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka. Među BMK

izoliranim iz majčinog mlijeka, tretman proteinazom K nije značajno (P>0,05) utjecao jedino na adheziju na mucin sojeva *Enterococcus faecium* KR20 i MC13. Zanimljivo je da su Jin i sur. (2000) uočili da je tretman proteinazom K čak doveo do snažnije adhezije soja *Ec. faecium* 18C23 na mucin.

Iako ga vrčaste stanice kontinuirano proizvode, mucin se istovremeno i kontinuirano razgrađuje djelovanjem bakterijskih i ljudskih proteaza te uslijed infekcija i fizikalne erozije crijeva (Banić i sur., 2018). Mikroorganizmi u tom slučaju mogu doprijeti do izloženog tkiva sluznice, zbog čega je važno ispitati adheziju bakterija na različite crijevne epitelne i subepitelne strukture. Caco-2 stanična linija ljudskog kolorektalnog karcinoma spontano diferencira u kulturi stvarajući monosloj stanica koji eksprimira nekoliko morfoloških i funkcionalnih značajki zrelih enterocita tankog crijeva, zbog čega se često koristi kao model crijevne epitelne barijere (Lea, 2015). Caco-2 stanice rastu u kulturi poput monosloja epitelnih stanica, a kada dosegnu određenu konfluentnost, počinju polarizirati stječući apikalni četkasti porub s mikrovilima, karakterističan za enterocite, dok između susjednih stanica nastaju tzv. „tight junctions“ (Lea, 2015). Caco-2 stanice sadrže brojne receptore i transportne proteine karakteristične za ljudske epitelne stanice, a izlučuju i različite probavne enzime te membranske peptidaze i disaharidaze koje su normalno prisutne u tankom crijevu čovjeka, poput laktaze, aminopeptidaze N, sukraza-izomaltaze i dipeptidilpeptidaze IV (Lea, 2015). Budući da strukturalno, morfološki i funkcionalno nalikuju diferenciranim enterocitima tankog crijeva, Caco-2 stanice su korištene kao *in vitro* model ispitivanja adhezijskih svojstava BMK izoliranih iz majčinog mlijeka na sluznicu ljudskog tankog crijeva. Prema rezultatima prikazanim na slici 32B, najsnažniju adheziju na Caco-2 stanice pokazao je soj *Lb. brevis* MB1, a najslabiju soj *Lb. fermentum* MC1. Sojevi vrste *Lb. fermentum* često proizvode EPS-e koji mogu smanjiti adheziju na stanice crijeva i razne druge površine zbog prekrivanja površinskih makromolekula koje imaju ulogu adhezina (Castro-Bravo, 2018). Osim toga, EPS-i mogu djelovati i kao inhibitori lektina, proteina koji specifično prepoznaju i vežu šećere, a čija je primarna funkcija posredovanje u prianjanju i adheziji bakterija na stanice domaćina (Bernal i Llamas, 2012). Lektini se nalaze na površini bakterijskih stanica te prepoznaju i vežu glikanske supstrate prisutne na površini stanica domaćina (Esko i Sharon, 2009). Više autora je potvrdilo da mutanti kod kojih je smanjena produkcija EPS-a bolje adheziraju na crijevne epitelne stanice u odnosu na divlji tip (Tahoun i sur, 2017; Dertli i sur., 2015). Soj *Lb. brevis* MB1, producent S-proteina, koji je pokazao i snažnu hidrofobnost u

eksperimentu adhezije na heksan, pokazao je i najjači kapacitet adhezije na Caco-2 stanice. Istovremeno, sojevi *Lb. plantarum* KR19 i MC19, koji su pokazali najslabiju hidrofobnost, pokazali su i slabu adheziju na hidrofobnu površinu Caco-2 stanica, što je u skladu s tvrdnjom da je velika hidrofobnost bakterijske stanice u korelaciji sa svojstvom adhezije na hidrofobnu površinu eukariotskih epitelnih stanica (Nader- Macías i sur., 2008).

ECM je složena strukturna cjelina koja okružuje epitelne stanice i ima ključnu ulogu u očuvanju njihovog strukturnog i funkcionalnog integriteta (Vélez i sur., 2007). Služi kao fizička barijera između epitelnih stanica i vezivnih tkiva, koja pritom dopušta difuziju plinova i transport signalnih molekula (Poltavets i sur., 2018). Građen je od različitih proteina koji imaju ključnu ulogu u regulaciji staničnih funkcija, uključujući diferencijaciju, proliferaciju, preživljavanje i migraciju (Bonnans i sur., 2014). Iako adhezija na proteine ECM-a nije primarni preduvjet kolonizacije probiotičkih bakterija u GIT-u, jer su prekriveni epitelnim ili endotelnim stanicama i zaštitnim slojem mukusa i stoga nisu izravno dostupni za vezanje bakterija, uslijed oštećenja sluznice može doći do njihovog izlaganja i kolonizacije nepoželjnih mikroorganizmima koji potom mogu uzrokovati infekciju (Styriak i sur., 2003). Budući da se mnoge patogene bakterije uspješno vežu na proteine ECM-a, bilo je važno ispitati imaju li i BMK izolirane iz majčinog mlijeka to svojstvo važno za sprječavanje patogenih infekcija u oštećenim crijevima kroz kompeticiju s patogenima za ista vezna mjesta na receptorima (Yadav i sur., 2013; Lorca i sur., 2002). Stoga je ispitana adhezija bakterija izoliranih iz majčinog mlijeka na tri različita proteina ECM-a: fibronektin, laminin i kolagen. Rezultati prikazani na slici 33 ukazuju da najjaču adheziju na sva tri proteina ima soj *Lb. plantarum* KR19, koji je pokazao i najjaču adheziju na mucin od svih izolata iz majčinog mlijeka. Soj KR19 je najslabije adhezirao na nepolarno otapalo heksan (slika 31A), što ukazuje na hidrofilnu narav stanične površine tog soja, zbog čega je vjerojatno najsnažnije adhezirao na ECM i mucin, koji imaju hidrofilna svojstva (Yang i sur., 2017; Nader-Macías i sur., 2008). Tretman proteinazom K je uzrokovao značajno smanjenje adhezije svih *Lb. brevis* sojeva producenata S-proteina (MB1, MB2, MB13 i MB20) na laminin, kolagen i fibronektin, što ukazuje da je njihova adhezija na proteine ECM-a vjerojatno dijelom posredovana S-proteinima. Sojevi *Enterococcus faecium* KR20 i MC13, ukupno su pokazali najslabiju adheziju na proteine ECM-a, na koju nije značajno ($P>0,05$) utjecao tretman proteinazom K.

5.5. Genomička i proteomička karakterizacija S-proteina i bakteriocina probiotičkih sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C

Osim sojeva izoliranih iz majčinog mlijeka, u ovom radu su detaljno okarakterizirani i producenti potencijalnih terapijskih biomolekula, S-proteina (*Lb. brevis* SF9B) i bakteriocina (*Lb. plantarum* SF9C), koji su ranije izolirani iz rasola tradicionalno proizvedenog kiselog kupusa i čiji je probiotički potencijal dokazan našim ranijim istraživanjima (Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018). Navedeni sojevi su identificirani sekvenciranjem cijelog genoma u IGA Technology servisu te su dobivene sekvence pohranjene u GenBank genskoj banci NCBI baze podataka pod pristupnim brojevima NIGJ00000000 (*Lb. brevis* SF9B) i RHLZ01000000 (*Lb. plantarum* SF9C). U tablici 16 prikazani su genomski podaci oba soja, iz koje je vidljivo da soj SF9B sadrži 2 467 947 pb raspoređenih u 74 kontiga, a soj SF9C 3 268 876 pb raspoređenih u 14 kontiga. Broj kodirajućih sekvenci soja SF9B odgovara prosječnom broju (1700-3000) kodirajućih sekvenci kod *Lactobacillus* vrsta (van Pijkeren i O'Tolle, 2013), dok je broj kodirajućih sekvenci soja SF9C (3229) nešto veći. Udio G+C parova baza soja SF9B iznosi 45,9 %, a soja SF9C 44,4 %. Pomoću DNA Plotter aplikacije, konstruirani su genomski atlasi sojeva SF9B i SF9C na kojima je vidljiv raspored i duljina kontiga te distribucija gvaninskih i citozinskih nukleotida u genomu (slika 34). Funkcionalna anotacija, distribucija i kategorizacija kodirajućih gena (*engl.* Protein Encoding Genes, PEGs) oba soja, provedena je pomoću RAST servera (slika 35). S obzirom na to da S-proteini čine otprilike 10-20 % ukupnih staničnih proteina bakterije producenta (Li i sur., 2020), ne iznenađuje podatak da treću najzastupljeniju skupinu gena soja producenta S-proteina, *Lb. brevis* SF9B, čine geni povezani sa staničnom stijenkom i kapsulom (slika 35A).

PCR-analizom sa specifičnim početnicama je kod soja SF9C potvrđena prisutnost 3 gena (*plnJ, plnEF* i *plnA*) koji sudjeluju u biosintezi plantaricina (slika 36). U svrhu detaljnije karakterizacije biosinteze plantaricina na genomskoj razini, provedena je *in silico* identifikacija klastera gena uključenih u biosintezu plantaricina primjenom BAGEL4 servera te je identificirano jedno područje interesa (AOI) locirano na kontigu 13 (slika 37). Translatirana nukleotidna sekvenca gena smještenih na *pln* lokusu soja SF9C je korištenjem BLASTx algoritma uspoređena sa svim proteinima pohranjenim u NCBI bazi podataka. Tako je otkriveno da soj SF9C sadrži čak 9 gena (*plnK, plnJ, plnN, plnO, plnA, plnC, plnD, plnF, plnE* i *plnS)* koji

kodiraju za bakteriocine (tablica 17). Analiza *pln* lokusa je također pokazala da se u genomu soja SF9C, nizvodno od gena za bakteriocine, nalaze i geni koji kodiraju specifične imunosne proteine koji soju producentu osiguravaju otpornost na proizvedeni bakteriocin tako što djeluju kao antagonistički receptori sintetiziranog bakteriocina ili kao specijalizirani sustavi za izlučivanje bakteriocina iz stanice proizvođača. Na 13. kontigu genoma soja SF9C, locirani su i geni za ABC-transportere odgovorne za transport proizvedenih bakteriocina iz stanice (tablica 17). Pomoću SWISS-MODEL servera je pretpostavljena 3D-struktura dvopeptidnih plantaricina PlnJK i PlnEF soja *Lb. plantarum* SF9C (slika 38A), a svojstva aminokiselinskih ostataka (hidrofobnost, hidrofobni moment i *netto* naboj) koji formiraju α-uzvojnice PlnJK i PlnEF plantaricina, određena su pomoću HeliQuest servera (Slika 38B). Analizom helikalnih projekcija konstruiranih pomoću HeliQuest servera, utvrđeno je da je peptid PlnJ najhidrofobniji (H=0,466), dok je peptid PlnK najmanje hidrofoban (-0,045). *Netto* naboj analiziranih peptida kretao se od -2 (PlnK) do 5 (PlnE), a hidrofobni moment od 0,206 (PlnJ) do 0,440 (PlnE).

Usporedbom translatirane nukleotidne sekvence soja *Lb. brevis* SF9B sa S-proteinima pohranjenim u NCBI bazi podataka korištenjem BLASTx algoritma, otkriveno je da sadrži čak 3 gena koji kodiraju za S-proteine homologne SlpB, SlpC i SlpD proteinima soja *Lb. brevis* ATCC 14869. Kako bi se utvrdilo dolazi li do ekspresije navedenih gena, provedena je ekstrakcija površinskih proteina soja SF9B te njihovo elektroforetsko razdvajanje SDS-PAGE i 2D elektroforezom. SDS-PAGE elektroforezom je ustanovljena prisutnost dominantne proteinske vrpce veličine oko 50 kDa (slika 39A), a 2D-elektroforeza istog uzorka potvrdila je prisutnost proteina iste veličine i pI vrijednosti oko 10 (slika 39B). Budući da su S-proteini laktobacila visokobazični i molekularne mase 40-55 kDa (Sára i Sleytr, 2000), elektroforetski rezultati su ukazali na vrlo visoku vjerojatnost ekspresije *slp* gena. Dominantna vrpca SDS-PAGE elektroforeze i točka 2D-elektroforeze su potom izrezane i tripsinizirane, a dobiveni triptički peptidi su podvrgnuti LC-MS analizi. Pretragom Mascot baze podataka, otkrivena je homologija izoliranih proteina sa SlpB proteinom soja *Lb. brevis* ATCC 14869 (slika 40), što znači da u *in vitro* uvjetima dolazi do ekspresije samo jednog, *slpB* gena, dok se ekspresija *slpC* i *slpD* gena smatra utišanom. Pretpostavljena molekulska masa izoliranog S-proteina iznosi 50,9 kDa, a pI vrijednost 9,54. Sekundarna struktura izoliranog S-proteina je pretpostavljena PSIPRED metodom implementiranom u Phyre2 serveru, prema kojoj je građen od 6 % α-uzvojnica, 46 % β-nabranih ploča i 51 % neuređenih struktura (slika 41A). Dobiveni rezultat je u skladu s

literaturom, prema kojoj S-proteini obično sadrže 14 % α-uzvojnica, 39 % β-nabranih ploča i 47 % nasumičnih zavoja (Qamsari i sur., 2017; Hynönen i Palva, 2013). Zatim je homolognim modeliranjem pretpostavljena tercijarna struktura S-proteina pomoću I-TASSER servera (slika 41B) te je pretpostavljena ukupna točnost strukture izražena kao C=-1,76, dok je lokalna točnost prikazana kao odstupanje udaljenosti između ostataka u strukturi modela i izvornoj strukturi određenoj ResQ algoritmom (slika 41C).

Nakon detaljne karakterizacije, ispitan je utjecaj prisutnosti S-proteina na probiotički potencijal soja producenta *Lb. brevis* SF9B, pri čemu je u svim eksperimentima kao pozitivna kontrola korišten soj *Lb. helveticus* M92, koji je našim prethodnim istraživanjima okarakteriziran kao producent S-proteina, a kao negativna kontrola soj *Lb. plantarum* D13, koji prema našim ranijim istraživanjima ne proizvodi S-proteine (Butorac i sur., 2020; Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016). Pretpostavlja se da se *slp* geni preferencijalno eksprimiraju kada se bakterijska stanica nađe u stresnoj situaciji, u svrhu stvaranja zaštitne mehaničke barijere S-proteina koja štiti stanice od izravnog izlaganja nepovoljnim uvjetima okoliša (Gerbino i sur., 2015). Stoga je ispitan utjecaj S-proteina na preživljavanje soja *Lb. brevis* SF9B tijekom prolaska kroz simulirane uvjete GIT-a i tijekom liofilizacije. Među ispitanim sojevima, producent S-proteina *Lb. brevis* SF9B, pokazao je najnižu smrtnost u simuliranim uvjetima GIT-a (Δlog CFU mL^{-1}=2,04 ± 0,15). Tretman GHCl-om je značajno povećao smrtnost soja SF9B te kontrolnog soja producenta S-proteina *Lb. helveticus* M92, dok nije značajno utjecao na smrtnost kontrolnog soja *Lb. plantarum* D13 koji ne proizvodi S-proteine (tablica 18). Zaštitni učinak S-sloja uočen je i tijekom liofilizacije. Iako obrano mlijeko nije značajno utjecalo na preživljavanje netretiranih stanica soja SF9B tijekom liofilizacije, pokazalo je značajan ($P<0,05$) zaštitni učinak u preživljavanju stanica kojima je GHCl-om uklonjen sloj S-proteina (tablica 18). Ulogu S-proteina u preživljavanju soja producenta u simuliranim uvjetima GIT-a i tijekom liofilizacije, ustanovili su i drugi autori (Uroić i sur., 2016; Meng i sur., 2014).

Kako bi se ispitao utjecaj S-proteina na površinska svojstva soja SF9B, provedeno je ispitivanje adhezije na heksan prije i nakon tretmana stanica GHCl-om, pri čemu je snažnija adhezija ukazivala na jaču hidrofobnost bakterijske stanice. Rezultati prikazani na slici 42A ukazuju da sojevi producenti S-proteina, *Lb. brevis* SF9B i kontrolni soj *Lb. helveticus* M92, snažnije adheziraju na heksan, odnosno hidrofobniji su od soja *Lb. plantarum* D13 koji ne sadrži S-proteine. Uklanjanje S-proteina i drugih nekovalentno vezanih proteina s površine stanice

GHCl-om, značajno ($P<0,05$) je smanjilo adheziju na heksan sojeva M92 i SF9B, dok nije utjecalo na adheziju soja D13, što potvrđuje ulogu S-proteina u hidrofobnosti površine stanice soja producenta. Dobiveni rezultati su u skladu s Rong i sur. (2015), prema kojima S-proteini osiguravaju hidrofobnost površine stanice producenta. Drugi autori su također potvrdili da prisutnost proteina na površini stanice uzrokuje jaču hidrofobnost, dok je hidrofilnost stanice povezana s prisutnošću ugljikohidrata (Firoozmand i Rousseau, 2016; Kos i sur., 2003).

Sojevi producenti S-proteina, pokazali su i snažno svojstvo autoagregacije, budući da je više od 80 % stanica sojeva SF9B i M92 autoagregiralo tijekom 5 h inkubacije (slika 42B). Tretman GHCl-om je značajno snizio autoagregaciju sojeva producenata S-proteina, dok nije značajno utjecao na autoagregaciju soja D13. Soj SF9B je pokazao najsnažniju autoagregaciju i koagregaciju među ispitanim sojevima što ukazuje na povezanost autogregacijskog i koagregacijskog fenotipa (slike 42B-42D). Također, potvrđena je i povezanost hidrofobnosti površine stanice sa svojstvom autoagregacije i koagregacije, budući da su oba producenta S-proteina, *Lb. brevis* SF9B i *Lb. helveticus* M92 snažnije adhezirala na heksan, ali i pokazala snažniju autoagregaciju i koagregaciju s *E. coli* 3014 i *S.* Typhimurium FP1 od soja *Lb. plantarum* D13 (slika 42). Činjenica da je soj D13 također pokazao dobru agregaciju, iako je ona bila nešto niža nego kod sojeva M92 i SF9B, ukazuje da S-proteini očito nisu jedini faktori koji posreduju u agregaciji bakterijskih stanica. Prema Goh i Klaenhammer (2010) u agregaciji i adheziji bakterija osim proteina vezanih na površinu stanice, mogu sudjelovati i drugi spojevi poput teihonske i lipoteihonske kiseline te polisaharida.

Soj *Lb. brevis* SF9B pokazao je i najsnažniju adheziju na mucin među ispitanim sojevima (slika 43A). Tretman GHCl-om je značajno ($P<0,01$) snizio adheziju sojeva SF9B (80,61 ± 5,82 %) i M92 (80,31 ± 7,85 %), dok je adheziju soja D13 snizio za samo 21,10 ± 1,67, što ukazuje na ulogu S-proteina u adheziji bakterija na mucin. Ispitan je i utjecaj S-proteina na adheziju soja SF9B na Caco-2 staničnu liniju crijevnih epitelnih stanica. Prema rezultatima prikazanim na slici 43B, soj SF9B najsnažnije adhezira i na Caco-2 stanice, što potvrđuje hipotezu da prevladavajuća hidrofobnost površine bakterijskih stanica olakšava njihovu nespecifičnu adheziju. Tretman GHCl-om je rezultirao potpunim gubitkom svojstva adhezije sojeva producenata S-proteina na Caco-2 stanice, što implicira da su S-proteini medijatori adhezije na Caco-2 stanice. Također, tretman GHCl-om je uzrokovao i značajno ($P<0,05$) smanjenje adhezije soja D13 koji ne proizvodi S-proteine, što ukazuje na značajnu ulogu drugih nekovalentno vezanih proteina u

adheziji tog soja na Caco-2 stanice, koji se također uklanjaju GHCl-om. Dobra adhezija soja D13 na Caco-2 stanice ukazuje da i druge površinske strukture, poput lipoteihonske kiseline (Jakava-Viljanen i Palva, 2007) posreduju u adheziji bakterija.

S ciljem ispitivanja uloge S-proteina u adheziji na proteine ECM-a, ispitana je adhezija soja SF9B na fibronektin, laminin i kolagen, prije i nakon tretmana GHCl-om i proteinazom K (tablica 19). Tretman GHCl-om je značajno utjecao na adheziju sojeva producenata S-proteina M92 i SF9B na fibronektin, dok nije utjecao na adheziju soja D13, što ukazuje na ulogu S-proteina u adheziji na fibronektin. Tretman GHCl-om, koji uklanja proteine nekovalentno vezane na stanicu, nije značajno utjecao na adheziju soja D13 na ijedan protein ECM-a, dok je tretman proteinazom K značajno smanjio njegovu adheziju na fibronektin i kolagen, što implicira da u adheziji soja D13 na navedene proteine ECM-a vjerojatno sudjeluju kovalentno vezani proteini.

S ciljem ispitivanja utjecaja primjene združene kulture sojeva producenata potencijalnih terapijskih biomolekula na sastav crijevnog mikrobioma, 18 štakora je kanilirano tijekom 5 dana jednom dozom ($3 \cdot 10^9$ CFU mL^{-1}) probiotičke suspenzije sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C u omjeru 1:1. Budući da se mikrobiota bolesnih razlikuje od mikrobiote zdravih štakora, prije probiotičkog tretmana su štakori podijeljeni u dvije jednake skupine od kojih je prva predstavljala model crijevne disbioze nastale uslijed Alzheimerove bolesti izazvane intreperitonealnim ubrizgavanjem $AlCl_3$ i D-galaktoze, a druga kontrolnu skupinu zdravih štakora kojoj je na isti način ubrizgana fiziološka otopina. Istraživanja su pokazala da toksični metali poput aluminija imaju negativan utjecaj na mikrobiotu crijeva ljudi i životinja, te da bakterije iz porodice *Lactobacillaceae*, posebice *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. brevis*, vežu i uklanjaju toksične metale (Yu i sur., 2016), dok soj *Lb. plantarum* smanjuje oštećenje mozga miševa izazvano aluminijem (Tian i sur., 2017). Prije samog eksperimenta, te 3 odnosno 10 dana nakon njegovog završetka, iz kaveza su s čiste stelje prikupljeni uzorci fecesa štakora. Štakori su potom eutanizirani i prikupljeni su uzorci tkiva mozga svake jedinke. Iz homogenata tkiva malog mozga, kolorimetrijskom metodom je ispitana AChE aktivnost, a promjene povezane s Alzheimerovom bolešću kod štakora tretiranih s $AlCl_3$ i D-galaktozom, potvrđene su imunohistokemijskom analizom pomoću primarnih pročišćenih β-amiloidnih antitijela (4G8) i Iba1 antitijela (slika 44). AChE aktivnost u kontrolnoj skupini se kretala od 1,2-1,58 mola hidroliziranog supstrata min^{-1} mg^{-1} proteina, dok je u skupini tretranoj $AlCl_3$ bila značajno viša ($P<0,05$) i iznosila od 1,38 do 2,4 mola hidroliziranog supstrata min^{-1} mg^{-1} proteina. Broj plakova

na mozgu je također bio značajno ($P<0,05$) viši u mozgu štakora tretiranih s $AlCl_3$ nego u kontrolnoj skupini tretiranoj fiziološkom otopinom. Difuzni (benigni) plakovi u malom mozgu (*lat.* cerebellum) štakora, pojavili su se mnogo ranije od neuritskih plakova karakterističnih za Alzheimerovu bolest. Mali mozak štakora tretiranih s $AlCl_3$ je bio negativan na AT8 neuropatološki marker, ali pozitivan na 4G8 i Iba1 markere (slika 44).

Zatim je iz prikupljenih uzoraka fecesa štakora izolirana DNA te je provedeno sekvenciranje hipervarijabilne V3 regije 16S rRNA gena pomoću Illumina MiSeq platforme. Podaci dobiveni sekvecniranjem su analizirani pomoću QIIME 2 programa. Analiza prosječne zastupljenosti taksonomskih koljena, otkrila je da su u fekalnom mikrobiomu obje skupine štakora dominantne bakterije iz koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, čija je kolektivna zastupljenost bila viša od 80 % (slika 45A). Fekalni mikrobiom skupine izložene $AlCl_3$ je u usporedbi s fekalnim mikrobiomom štakora iz kontrolne skupine, sadržavao manje bakterija iz koljena *Firmicutes, Euryarchaeota,* TM7*, Tenericutes* i *Actinobacteria*, a više bakterija iz koljena *Bacteroidetes* i *Cyanobacteria*, a najizraženije su bile razlike u udjelima dva najzastupljenija koljena. Tako je prosječan udio bakterija iz koljena *Firmicutes* u skupini izloženoj $AlCl_3$ iznosio 62,57 %, dok je u kontrolnoj skupini bio viši (66,19 %). Nasuprot tome, prosječan udio bakterija iz koljena *Bacterioidetes* je bio viši u skupini izloženoj $AlCl_3$ (21,60 %) nego u kontrolnoj skupini (15,17 %). Vogt i sur. (2017) su pri ispitivanju crijevnog mikrobioma ljudi oboljelih od Alzheimerove bolesti, također zamijetili značajno viši *Bacteroidetes* te niži udio *Firmicutes* nego u crijevnom mikrobiomu zdravih pojedinaca. Očekivano, probiotičkom intervencijom se u obje skupine povećala zastupljenost bakterija iz koljena *Firmicutes*, čiji je udio bio najviši u uzorcima prikupljenim 10 dana nakon završetka kaniliranja (slika 45A). Također, došlo je i do porasta zastupljenosti bakterija iz koljena *Spirochaetes,* TM7 i *Tenericutes* te smanjenja udjela bakterija iz koljena *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*.

Analiza prosječne zastupljenosti bakterijskih rodova u fekalnom mikrobiomu štakora, otkrila je prisutnost određenih patogenih rodova poput *Escherichia* i *Helicobacter* samo u štakorima izloženim $AlCl_3$, dok isti nisu detektirani u fekalnom mikrobiomu štakora kontrolne skupine (slika 45B). U fekalnom mikrobiomu štakora izloženih $AlCl_3$ uočen je viši udio bakterija iz roda *Acinterobacter,* poznatih uzročnika bakterijemije, upale pluća, sekundarnog meningitisa i drugih infektivnih bolesti te bakterija iz roda *Sutterella,* koje razgrađuju IgA i uzrokuju brojne GI

bolesti, te čiji je smanjeni udio pokazatelj crijevne homeostaze (Adamkova i sur., 2021; Bergogne-Bérézin i sur., 2001). Također, u fekalnom mikrobiomu štakora izloženih $AlCl_3$, uočen je viši udio oportunističkih patogena iz roda *Streptococcus* u odnosu na fekalni mikrobiom štakora kontrolne skupine. Nasuprot tome, u fekalnom mikrobiomu štakora kontrolne skupine je uočen viši udio korisnih bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Blautia*, koje smanjuju metabolički stres i upalne reakcije organizma te pokazuju značajna probiotička svojstva koja se očituju proizvodnjom bakteriocina, SCFA i drugih korisnih metabolita, antimikrobnom aktivnošću, itd. (Chakravarthy i sur., 2018). U fekalnom mikrobiomu štakora kontrolne skupine, uočen je i značajno ($P<0,05$) viši udio arheja iz roda *Methanobrevibacter* koje metaboliziraju krajnje produkte fermentacije bakterija i tako olakšavaju probavu složenih polisaharida, te su visokozastupljene u crijevima zdravih, a slabo prisutne u crijevima pretilih pojedinaca (Samuel i sur., 2007). Također, u kontrolnoj skupini je uočen i značajno ($P<0,05$) viši udio bakterija iz roda *Turicibacter* koje smanjuju metabolički stres i upalne reakcije organizma te su slabo zastupljene u crijevima pretilih osoba (Li i sur., 2013).

Probiotički tretman sojevima *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C, uzrokovao je promjene u zastupljenosti određenih bakterijskih rodova u fekalnom mikrobiomu obje skupine štakora (slika 45C). Probiotički tretman je u fekalnom mikrobiomu obje skupine štakora uzrokovao porast zastupljenosti korisnih bakterija iz rodova *Lactobacillus*, *Adelcreutzia*, *Bacteroides*, *Turicibacter* te bakterija nepoznatih rodova iz porodice F16 i reda F39. Istovremeno, došlo je do smanjenja udjela patogenih bakterija iz rodova *Escherichia*, *Helicobacter*, *Sutterella* i *Acintetobacter*, pri čemu su neki patogeni rodovi poput *Helicobacter*, *Acinetobacter* i *Escherichia* u potpunosti eliminirani iz fekalnog mikrobioma obje skupine štakora nakon kaniliranja probiotičkom suspenzijom sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C.

Na krute MRS hranjive podloge, potom su nacijepljeni uzorci fecesa zdravih štakora i štakora izloženih $AlCl_3$ prikupljeni prije početka kaniliranja i treći, odnosno deseti dan nakon završetka kaniliranja štakora probiotičkom suspenzijom sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C. Iz kolonija prikupljenih nakon prekonoćne inkubacije, izolirana je DNA pomoću Maxwell uređaja te je PCR-reakcijom amplificirana V2-V3 regija 16S rRNA gena bakterija poraslih na MRS podlozi. DGGE analizom dobivenih PCR produkata, potvrđena je prisutnost *L. brevis* i *L.*

plantarum vrsta u svim prikupljenim fecesima štakora (slika 46). Dominantne vrpce koje ne pripadaju vrstama *L. brevis* i *L. plantarum* su izrezane, te je iz gela ekstrahirana DNA. Sekvenciranjem 16S rRNA gena je potvrđeno da je u svim analiziranim uzorcima prisutna vrsta *Lb. animalis*. Treći dan nakon završetka kaniliranja, u uzorcima fecesa zdravih štakora te štakora tretiranih s $AlCl_3$, primijećena je prisutnost *Lb. reuteri* vrste, čija prisutnost nije potvrđena u niti jednom kontrolnom uzorku prikupljenom prije kaniliranja, a koja se zadržala i u uzorcima fecesa prikupljenim deseti dan nakon završetka kaniliranja (slika 46). Također, u PCR-DGGE elektroforetskim profilima DNA bakterijskih kolonija poraslih iz uzoraka fecesa zdravih štakora i štakora tretiranih s $AlCl_3$, prikupljenih deseti dan nakon završetka probiotičkog tretmana, primijećena je pojava još nekoliko slabo vidljivih vrpca, što sugerira da je primjena probiotičke suspenzije sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C uzrokovala promjenu sastava crijevne mikrobiote obje skupine štakora.

6. ZAKLJUČCI

1. Analizom rezultata sekvenciranja 16S rRNA gena 30 uzoraka majčinog mlijeka i fecesa doječadi pomoću QIIME 2 platforme, ustanovljeno je da je mikrobiom mlijeka svake majke i fecesa svakog djeteta jedinstven te da se njihov sastav mijenja tijekom laktacije i sazrijevanja djeteta. Također je utvrđena korelacija u sastavu mikrobioma mlijeka majki s mikrobiomom fecesa njihove dojenčadi.
2. U svrhu odabira potencijalnih probiotika nove generacije sa svojstvom biosinteze potencijalnih terapijskih biomolekula, iz prikupljenih uzoraka mlijeka, ukupno je izolirano 100 bakterijskih sojeva od kojih je 46 % pripadalo rodu *Enterococcus,* 27 % *Staphylococcus,* 22 % *Lactobacillus* i 5 % *Streptococcus*. Hijerarhijskom klaster analizom njihovih RAPD-PCR produkata, odabrano je 28 genetički različitih sojeva koji su genotipski i fenotipski okarakterizirani.
3. SDS-PAGE analizom je utvrđeno da čak 4 *Lb. brevis* soja (MB1, MB2, MB13 i MB20) sadrže S-proteine, nikad ranije otkrivene u sojevima izoliranim iz majčinog mlijeka, a PCR-analizom je kod 6 *Lb. plantarum* sojeva utvrđena prisutnost čak 3 gena (*plnJ*, *plnA* i *plnEF*) koji sudjeluju u biosintezi bakteriocina.
4. Ustanovljena antimikrobna aktivnost, preživljavanje u nepovoljnim uvjetima, te agregacija i adhezija na različite epitelne i subepitelne strukture intestinalnog trakta, ukazuju na najveći probiotički potencijal producenata potencijalnih terapijskih biomolekula S-proteina i bakteriocina, u odnosu na ostale ispitane sojeve izolirane iz majčinog mlijeka.
5. Detaljna genomička i proteomička karakterizacija probiotičkih sojeva producenata potencijalnih terapijskih biomolekula, ranije izoliranih iz rasola kiselog kupusa, pokazala je da soj *Lb. plantarum* SF9C sadrži čak 9 gena (*plnK, plnJ, plnN, plnO, plnA, plnC, plnD, plnF, plnE* i *plnS)* koji kodiraju za bakteriocine, dok soj *Lb. brevis* SF9B sadrži 3 gena (*slpB*, *slpC* i *slpD*) koji kodiraju S-proteine, od kojih se u *in vitro* uvjetima eksprimira samo jedan, *slpB* gen, koji kodira za protein homologan SlpB proteinu *Lb. brevis* ATCC 14869.
6. Sekundarna struktura izoliranog S-proteina soja *Lb. brevis* SF9B, pretpostavljena je PSIPRED metodom implementiranom u Phyre2 serveru, a tercijarna struktura homolognim modeliranjem pomoću I-TASSER servera. Pomoću SWISS-MODEL servera je pretpostavljena tercijarna struktura dvopeptidnih plantaricina PlnJK i PlnEF soja *Lb. plantarum* SF9C, a svojstva aminokiselinskih ostataka (hidrofobnost, hidrofobni moment i *netto* naboj) koji formiraju njihove α-uzvojnice, određena su pomoću HeliQuest servera.

7. Ustanovljena je zaštitna uloga S-proteina tijekom preživljavanja nepovoljnih uvjeta, kao i tijekom agregacije te adhezije soja SF9B na različite crijevne epitelne i subepitelne strukture.
8. Primjena združene kulture sojeva SF9B i SF9C utječe na sastav fekalnog mikrobioma 18 laboratorijskih štakora podijeljenih u dvije jednake skupine, od kojih je jedna predstavljala model crijevne disbioze izazvane Alzheimerovom bolešću, potaknutom intraperitonealnim ubrizgavanjem $AlCl_3$ i D-galaktoze, a druga skupina, koja je tretirana na isti način fiziološkom otopinom, model normalne crijevne mikrobiote.
9. Određivanjem AChE aktivnosti te imunohistokemijskom analizom homogenata tkiva malog mozga, potvrđene su promjene povezane s Alzheimerovom bolesti kod štakora izloženih $AlCl_3$. Usporedba sastava fekalnog mikrobioma tih štakora sa sastavom fekalnog mikrobioma štakora kontrolne skupine, potvrdila je crijevnu disbiozu kod štakora izloženih $AlCl_3$.
10. DGGE analiza i analiza fekalnog mikrobioma 18 štakora pomoću QIIME 2 platforme, potvrdili su da *in vivo* primjena združene kulture sojeva SF9B i SF9C uzrokuje promjene u sastavu fekalnog mikrobioma. Kaniliranje štakora probiotičkom suspenzijom navedena dva soja, dovelo je do smanjenja udjela patogenih bakterija iz rodova *Escherichia*, *Helicobacter*, *Sutterella* i *Acintetobacter*, te do porasta zastupljenosti korisnih bakterija.

7. LITERATURA

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* **237**. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599

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. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **49**(3), 349-354.

Adamkova, P., Hradicka, P., Gancarcikova, S., Kassayova, M., Ambro, L., Bertkova, I., Maronek, M., Farkasova Iannaccone, S., Demeckova, V. (2021) Single donor FMT reverses microbial/immune dysbiosis and induces clinical remission in a rat model of acute colitis. *Pathogens*, **10**(2), 152.

Adeniyi, B. A., Adetoye, A., Ayeni, F. A. (2015) Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow faeces against potential enteric pathogens. *Afri. Health Sci.* **15**(3), 888-95.

Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Al Karaawi, M. A., Siddiqui, M. U. (2017) Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **49**(1), 1-11.

Alonso, B. L., Irigoyen von Sierakowski, A., Sáez Nieto, J. A., Rosel, A. B. (2017) First report of human infection by *Christensenella minuta*, a Gram-negative, strickly anaerobic rod that inhabits the human intestine. *Anaerobe*, **44**, 124-125.

Anonymous 1 - http://2011.igem.org/Team:Bielefeld-Germany/Results/S-Layer/Guide/1 Pristupljeno 16. travnja 2020.

Anwar, H., Irfan, S., Hussain, G., Faisal, M., Muzaffar, H., Mustafa, I., Mukhtar, I., Malik, S., Ullah, M. I. (2019) Gut microbiome: A new organ system in body. doi: 10.5772/intechopen.89634

Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., Silvestri, G., Vignaroli, C., Clementi, F. (2007) Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products. *J. Food Prot.* **70**, 557–65.

Asquer, A. Krachkovskaya, I. (2021) Uncertainty, institutions and regulatory responses to emerging technologies: CRISPR Gene editing in the US and the EU (2012–2019). *Regul. Gov.* doi: 10.1111/rego.12335

Avershina, E., Lundgård, K., Sekelja, M., Dotterud, C., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., Rudi, K. (2016) Transition from infant- to adult-like gut microbiota. *Environ. Microbiol.* **18**(7), 2226-2236.

Azad, F., Rifat, M. A., Manir, M. Z., Biva, N. A. (2019) Breastfeeding support through wet nursing during nutritional emergency: A cross sectional study from Rohingya refugee camps in Bangladesh. *PLoS One,* **14**(10). doi: 10.1371/journal.pone.0222980

Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., Goh, Y. J., Sanozky-Dawes, R. B., Pfeiler, E. A., O'Flaherty, S., Buck, B. L., Dobson, A., Duong, T., Miller, M. J., Barrangou, R., Klaenhammer, T. R. (2008) Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. *Appl. Environ. Microbiol*. **74**, 4610-4625.

Ballard, O., Morrow, A. L. (2013) Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* **60**(1), 49-74.

Balmer, M. L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M. A., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., Bernsmeier, C., Ronchi, F., Wyss, M., Stroka, D., Dickgreber, N., Heim, M. H., McCoy, K. D., Macpherson, A. J. (2014) The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci. Transl. Med.* **6**(237). doi: 10.1126/scitranslmed.3008618

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

Baranova, E., Fronzes, R., Garcia-Pino, A., Van Gerven, N., Papapostolou, D., Pehau-Arnaudet, G., Pardon, E., Steyaert, J., Howorka, S., Remaut, H. (2012) SbsB structure and lattice reconstruction unveil Ca^{2+} triggered S-layer assembly. *Nature,* **487**, 119-122.

Bardanzellu, F., Fanos, V., Reali, A. (2017) "Omics" in human colostrum and mature milk: Looking to old data with new eyes. *Nutrients*, **9**(8), 843.

Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Šušković, J. (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **100**(1), 43-53.

Benevides, L., Burman, S., Martin, R., Robert, V., Thomas, M., Miquel, S., Chain, F., Sokol, H., Bermudez-Humaran, L. G., Morrison, M., Langella, P., Azevedo, V. A., Chatel, J. M., Soares, S. (2017) New insights into the diversity of the genus *Faecalibacterium*. *Front. Microbiol.* **8**, 1790.

Bergogne-Bérézin, E. (2001) The increasing role of *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **3**, 440-444.

Bernal, P., Llamas, M. A. (2012) Promising biotechnological applications of antibiofilm exopolysaccharides. *Microb. Biotechnol.* **5**(6), 670-673.

Beveridge, T. J., Pouwels, P. H., Sára, M., Kotiranta, A., Lounatmaa, K., Kari, K., Kerosuo, E., Haapasalo, M., Egelseer, E. M., Schocher, I., Sleytr, U. B., Morelli, L., Callegari, M. L., Nomellini, J. F., Bingle, W. H., Smit, J., Leibovitz, E., Lemaire, M., Miras, I., Salamitou, S., Béguin, P., Ohayon, H., Gounon, P., Matuschek, M., Koval, S. F. (1997) Functions of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 99-149.

Biagi, E., Quercia, S., Aceti, A., Beghetti, I., Rampelli, S., Turroni, S., Faldella, G., Candela, M., Brigidi, P., Corvaglia, L. (2017) The bacterial ecosystem of mother's milk and infant's mouth and *Gut. Front Microbiol.* **30**(8), 1214.

Bingle, W. H., Nomellini, J. F., Smit, J. (1997) Linker mutagenesis of the *Caulobacter crescentus* S-layer protein: toward a definition of an N-terminal anchoring region and a C-terminal secretion signal and the potential for heterologous protein secretion. *J. Bacteriol.* **179**, 601-611.

Boegh, M., Nielsen, H. M. (2015) Mucus as a barrier to drug delivery-understanding and mimicking the barrier properties. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. **116**, 179-186.

Boesmans, L., Valles-Colomer, M., Wang, J., Eeckhaut, V., Falony, G., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., Raes, J., Verbeke, K. (2018) Butyrate producers as potential next-generation probiotics: Safety assessment of the administration of *Butyricicoccus pullicaecorum* to healthy volunteers. *mSystems*, **3**(6). doi: 10.1128/mSystems.00094-18

Boix-Amorós, A., Collado, M. C., Mira, A. (2016) Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front. Microbiol.* **20**(7), 492.

Bonnans, C., Chou, J., Werb, Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biology* **15**, 786-801.

Brandl, K., Schnabl, B. (2017) Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **33**(3), 128-133.

Breitwieser, A., Gruber, K., Sleytr, U. B. (1992) Evidence for an S-layer protein pool in the peptidoglycan of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **174**, 8008-8015.

Broaders, E., Gahan, C. G., Marchesi, J. R. (2013) Mobile genetic elements of the human gastrointestinal tract: potential for spread of antibiotic resistance genes. *Gut Microbes*, **4**, 271–80.

Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J., Lebeer, S., Kiekens, F. (2016) Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *Int. J. Pharm.* **505**(1-2), 303-18.

Bron, P. A., Marcelli, B., Mulder, J., van der Els, S., Morawska, L. P., Kuipers, O. P., Kok, J., Kleerebezem, M., (2018) Renaissance of traditional DNA transfer strategies for improvement of industrial lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **56**, 61-68.

Brønden, A., Albér, A., Rohde, U., Gasbjerg, L. S., Rehfeld, J. F., Holst, J. J., Vilsbøll, T., Knop, F. K. (2018) The bile acid-sequestering resin sevelamer eliminates the acute GLP-1 stimulatory effect of endogenously released bile acids in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* **20**(2), 362-369.

Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., Klaenhammer, T. R. (2005) Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(12), 8344-8351.

Bujnakova, D., Strakova, E., Kmet, V. (2014) *In vitro* evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe*, **29**, 118–127.

Burberry, A., Wells, M. F., Limone, F., Couto, A., Smith, K. S., Keaney, J., Gillet, G., van Gastel, N., Wang, J. Y., Pietilainen, O., Qian, M., Eggan, P., Cantrell, C., Mok, J., Kadiu, I., Scadden, D. T., Eggan, K. (2020) C9orf72 suppresses systemic and neural inflammation induced by gut bacteria. *Nature*, **582**(7810), 89-94.

Burki, T. K. (2018) Of milk and microbes. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **3**(1), 16.

Burmeister, A. R. (2015) Horizontal gene transfer. *Evol. Med. Public Health*, **2015**(1), 193-194.

Busnelli, M., Manzini, S., Chiesa, G. (2019) The gut microbiota affects host pathophysiology as an endocrine organ: A focus on cardiovascular disease. *Nutrients*, **12**(1), 79.

Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Durgo, K., Oršolić, O., Kukolj, M., Radović, S., Scalabrin, S., Žučko, J., Starčević, A., Šušković, J., Kos, B. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microb. Cell Fact.* **19**(1), 106.

Campana, R., van Hemert, S., Baffone, W. (2017) Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog*. **9**, 12.

Cárdenas, N., Martín, V., Arroyo, R., López, M., Carrera, M., Badiola, C., Jiménez, E., Rodríguez, J. M. (2019) Prevention of recurrent acute otitis media in children through the use of *Lactobacillus salivarius* PS7, a target-specific probiotic strain. *Nutrients*, **11**(2), 376.

Carmo, F. L., Rabah, H., Carvalho, R. D., Gaucher, F., Cordeiro, B. F., Silva, S. H., Loir, Y. L., Azevedo, V. A., Jan, G. (2018) Extractable bacterial surface proteins in probiotic-host interaction. *Front. Microbiol.* **9**, 645.

Cassir, N., Benamar, S., Croce, O., La Scola, B. (2016) *Clostridium* species identification by 16S rRNA pyrosequencing metagenomics, *Clin. Infect. Dis.* **62**(12), 1616-1618.

Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A., Ruas-Madiedo. P. (2018) Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Front. Microbiol.* **9**, 2426.

Castro-González, J. M., Castro, P., Sandoval, H., Castro-Sandoval, D. (2019) Probiotic lactobacilli precautions. *Front. Microbiol.* **10**, 375.

Cavallero, G. J., Malamud, M., Casabuono, A. C., Serradell, M. L. Á., Couto, A. S. (2017) A glycoproteomic approach reveals that the S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefiri* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated. *J. Proteomics*, **162**, 20-29.

Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D., Chikindas, M. L. (2015) Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **46**(5), 494-501.

Ceapa, C., Davids, M., Ritari, J., Lambert, J., Wels, M., Douillard, F. P., Smokvina, T., de Vos, W. M., Knol, J., Kleerebezem, M. (2016) The variable regions of *Lactobacillus rhamnosus* genomes reveal the dynamic evolution of metabolic and host-adaptation repertoires. *Genome Biol. Evol.* **8**(6), 1889-1905.

Cerquetti, M., Serafino, A., Sebastianelli, A., Mastrantonio, P. (2002) Binding of *Clostridium difficile* to Caco-2 epithelial cell line and to extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **32**, 211-218.

Chairatana, P., Nolan, E. M. (2017) Defensins, lectins, mucins, and secretory immunoglobulin A: microbe-binding biomolecules that contribute to mucosal immunity in the human gut. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52**(1), 45-56.

Chakaroun, R. M., Massier, L., Kovacs, P. (2020) Gut microbiome, intestinal permeability, and tissue bacteria in metabolic disease: perpetrators or bystanders? *Nutrients*, **12**(4), 1082.

Chakravarthy, S. K., Jayasudha, R., Prashanthi, G. S., Ali, M. H., Sharma, S., Tyagi, M., Shivaji, S. (2018) Dysbiosis in the gut bacterial microbiome of patients with uveitis, an inflammatory disease of the eye. *Indian J. Microbiol.* **58**(4), 457-469.

Chassard, C., Delmas, E., Lawson, P. A., Bernalier-Donadille, A. (2008) *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**(4), 1008-1013.

Chatterjee, M., Pushkaran, A. C., Vasudevan, A. K., Menon, K. K. N., Biswas, R., Mohan, C. G. (2018) Understanding the adhesion mechanism of a mucin binding domain from *Lactobacillus fermentum* and its role in enteropathogen exclusion. *Int. J. Biol. Macromol.* **110**, 598-607.

Chevallier, B., Hubert, J. C., Kammerer, B. (1994) Determination of chromosome size and number of rrn loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**(1-2), 51-6.

Chin, N., Méndez-Lagares, G., Taft, D. H., Laleau, V., Kieu, H., Narayan, N. R., Roberts, S. B., Mills, D. A., Hartigan-O'Connor, D. J., Flaherman, V. J. (2021) Transient effect of infant formula supplementation on the intestinal microbiota. *Nutrients,* **13**, 807.

Clarke, G., Sandhu, K. V., Griffin, B. T., Dinan, T. G., Cryan, J. F., Hyland, N. P. (2019) Gut reactions: Breaking down xenobiotic-microbiome interactions. *Pharmacol. Rev.* **71**(2), 198-224.

Clevers H. C., Bevins C. L. (2013) Paneth cells: Maestros of the small intestinal crypts. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 289-311.

Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J. P. (2004) *In vitro* screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J. Dairy Res.* **71**(4), 451-60.

Collado, M. C., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007) Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**(4), 454-60.

Cordaillat-Simmons, M., Rouanet, A., Pot, B. (2020) Live biotherapeutic products: The importance of a defined regulatory framework. *Exp. Mol. Med.* **52**(9), 1397-1406.

Corfield, A. P, Myerscough, N., Longman, R., Sylvester, P., Arul, S., Pignatelli, M. (2000) Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut,* **47**(4), 589-94.

Corfield, A. P. (2018) The Interaction of the gut microbiota with the mucus barrier in health and disease in human. *Microorganisms,* **6**(3), 78.

Cornicky, S., Tawiahy, A. Chadee, K. (2015) Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers*, **3**, 1-2.

Corona-Cervantes, K., García-González, I., Villalobos-Flores, L. E., Hernández-Quiroz, F., Piña-Escobedo, A., Hoyo-Vadillo, C., Rangel-Calvillo, M. N., García-Mena, J. (2020) Human milk microbiota associated with early colonization of the neonatal gut in Mexican newborns. *Peer J.* **22**, 8.

Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(10), 777-788.

Cox, H. M. (2016) Neuroendocrine peptide mechanisms controlling intestinal epithelial function. *Curr. Opin. Pharmacol.* **31**, 50-56.

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 Antimicro.* **9**(4), 371-379.

Damiati, S., Peacock, M., Mhanna, R., Søpstad, S., Sleytr, U.B., Schuster, B. (2018) Bioinspired detection sensor based on functional nanostructures of S-proteins to target the folate receptors in breast cancer cells. *Sens. Actuat. B. Chem.* **267**, 224-230.

Das, D. J., Shankar, A., Johnson, J. B., Thomas, S. (2020) Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. *Nutrition*, **69**, 110567.

De Angelis, M., Gobbetti, M. (2011) stress responses of lactobacilli. U: Stress Responses of Lactic Acid Bacteria (Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., ured.), Springer, Boston, SAD, str. 219-249.

de la Fuente-Núñez, C., Mertens, J., Smit, J., Hancock, R. E. W. (2012) Bacterial surface layer protects against antimicrobial peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5452-5456.

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C. R. (2018) How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnol. Adv.* **36**(8), 2060-2076.

Dekaboruah, E., Suryavanshi, M. V., Chettri, D., Verma, A. K. (2020) Human microbiome: An academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Arch. Microbiol.* **202**(8), 2147-2167.

Dekker, J., Rossen, J. W., Büller, H. A., Einerhand, A. W. (2002) The MUC family: An obituary. *Trends Biochem. Sci.* **27**(3), 126-131.

Derkx, P.M., Janzen, T., Sørensen, K.I. Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B., Johansen, E. (2014) The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology. *Microb. Cell Fact.* **13**(1). doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S5

Derrien, M., Belzer, C., de Vos, W. M. (2017) *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb. Pathog.* **106**, 171-181.

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

Devirgiliis, C., Zinno P., Perozzi G. (2013) Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Front. Microbiol.* **4**, 301.

Dias, F., Duarte, W., Schwan, R. (2013) Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Bioscience*, **29**, 1678-1686.

Diep, D. B., Myhre, R., Johnsborg, O., Aakra, A., Nes, I. F. (2003) Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the *pln* operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. *Mol. Microbiol.* **47**(2), 483-94.

Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., Nes, I. F. (2009) An overview of the mosaic bacteriocin *pln* loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides,* **30**(8), 1562-1574.

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

Dimov, S., Ivanova, P., Harizanova, N. (2005) Genetics of bacteriocins biosynthesis by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **19**(2), 4-10.

Dinu, V., Lu, Y., Weston, N., Lithgo, R., Coupe, H., Channell, G., Adams, G. G., Gómez, A. T., Sabater, C., Mackie, A., Parmenter, C., Fisk, I., Phillips-Jones, M. K., Harding, S. E. (2020) The antibiotic vancomycin induces complexation and aggregation of gastrointestinal and submaxillary mucins. *Sci. Rep*. **10,** 960.

do Carmo, M. S., Santos, C. I. D., Araújo, M. C., Girón, J. A., Fernandes, E.S., Monteiro-Neto, V. (2018) Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. *Food Funct.* **9**(10), 5074-5095.

Doron, S., Snydman, D. R. (2015) Risk and safety of probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **60**(2), 129-134.

Doudna, J. A., Charpentier, E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346**(6213). doi: 10.1126/science.1258096

Douillard, F., de Vos, W. M. (2019) Biotechnology of health-promoting bacteria, *Biotechnol. Adv*. **37**(6).

Duijts, L., Jaddoe, V. W. V., Hofman, A., Moll, H. A. (2010) Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics*, **126**(1).

Duquesne, S., Petit, V., Peduzzi, J., Rebuffat, S. (2007) Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**(4), 200-209.

Džidić, M., Boix-Amorós, A., Selma-Royo, M., Mira, A., Collado, M. (2018) Gut microbiota and mucosal immunity in the neonate. *Med. Sci.* **6**(3), 56.

Eeckhaut, V., Machiels, K., Perrier, C., Romero, C., Maes, S., Flahou, B., Steppe, M., Haesebrouck, F., Sas, B., Ducatelle, R., Vermeire, S., Van Immerseel, F. (2013) *Butyricicoccus pullicaecorum* in inflammatory bowel disease. *Gut*, **62**(12), 1745-1752.

Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Teirlynck, E., Pasmans, F., Fievez, V., Snauwaert, C., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Louis, P., Vandamme, P. (2008) *Butyricicoccus pullicaecorum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, butyrate-producing bacterium isolated from the caecal content of a broiler chicken. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2799-2802.

El-Semman, I. E., Karlsson, F. H., Shoaie, S., Nookaew, I., Soliman, T. H., Nielsen, J. (2014) Genome-scale metabolic reconstructions of *Bifidobacterium adolescentis* L2-32 and *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 and their interaction. *BMC Syst. Biol.* **8,** 41.

Engels, C., Ruscheweyh, H., Beerenwinkel, N., Lacroix, C., Schwab, C. (2016) The common gut microbe *Eubacterium hallii* also contributes to intestinal propionate formation. *Front. Microbiol.* **7**. doi: 10.3389/fmicb.2016.00713

Esko, J., Sharon N. (2009) Microbial lectins: hemagglutinins, adhesins, and toxins. U: Essentials of glycobiology (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., ured.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, SAD, str. 34.

Etzold, S., Kober, O. I., Mackenzie, D. A., Tailford, L. E., Gunning, A. P., Walshaw, J., Hemmings, A. M., Juge, N. (2014) Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. *Environ. Microbiol.* **16**, 888-903.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., Cani, P. D. (2013) Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *P. Natl. Acad. Sci. U S A.* **110**(22), 9066-9071.

Fagan, R. P., Fairweather, N. F. (2014) Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 211-222.

Falah, F., Vasiee, A., Behbahani, B. A., Xazdi, F. T., Moradi, S., Mortazavi, S. A., Roshanak, S. (2019) Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *Microb. Pathog.* **131**, 246-253.

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.

Fedorová, M., Nemcová, R., Mudroňová, D., Styková, E., Brudňáková, M., Reiffová, K. (2018) Exopolysaccharides may increase gastrointestinal stress tolerance of *Lactobacillus reuteri*. *Folia Vet.* **62**(4), 24-32.

Feng, Y., Qiao, L., Liu, R., Yao, H., Gao, C. (2017) Potential probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the intestinal mucosa of healthy piglets. *Ann. Microbiol.* **67**, 239-253.

Fernández, L., Pannaraj, P. S., Rautava, S., Rodríguez, J. M. (2020) The microbiota of the human mammary ecosystem. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. **10**, 586667.

Firoozmand, H., Rousseau, D. (2016) Microbial cells as colloidal particles: Pickering oil-in-water emulsions stabilized by bacteria and yeast. *Food Res. Int.* **81**, 66-73.

Fonseca, H. C., de Sousa Melo, D., Ramos, C. L., Dias, D. R., Schwan, R. F. (2021) Probiotic properties of lactobacilli and their ability to inhibit the adhesion of enteropathogenic bacteria to Caco-2 and HT-29 cells. *Probiotics Antimicro.* **13,** 102-112.

Fraqueza, M. J. (2015) Antibiotic restistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **212**, 76-88.

Frese, S. A., Mackenzie, D. A., Peterson, D. A., Schmaltz, R., Fangman, T., Zhou, Y., Zhang, C., Benson, A. K., Cody, L. A., Mulholland, F., Juge, N., Walter, J. (2013) Molecular characterization of host-specific biofilm formation in a vertebrate gut symbiont. *PLoS Genet.* **9**(12).

Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Louise Thomas, E., Bell, J. D. (2014) The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat. Commun.* **5**, 3611.

Fuqua, C., Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 439-468.

Geerlings, S. Y., Kostopoulos, I., de Vos, W. M., Belzer, C. (2018) *Akkermansia muciniphila* in the human gastrointestinal tract: When, where, and how? *Microorganisms*, **6**(3), 75.

Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M. A., Gómez-Zavaglia, A. (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **31**(12), 1877-1887.

Ghrairi, T., Chaftar, N., Hani, K. (2012) Bacteriocins: Recent advances and opportunities in progress in food preservation. U: Progress in Food Preservation (Bhat, R., Karim Alias, A., Paliyath, G., ured.), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, str. 485-511.

Gil, A., Rueda, R., Ozanne, S., Beek, E., Van Loo-Bouwman, C., Schoemaker, M., Marinello, V., Venema, K., Stanton, C., Schelkle, B., Flourakis, M., Edwards, C. (2020) Is there evidence for bacterial transfer via the placenta and any role in the colonization of the infant gut?-A systematic review. *Crit. Rev. Microbiol.* **46**, 1-15.

Gillor, O., Kirkup, B. C., Riley, M. A. (2004) Colicins and microcins: The next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**, 129-146.

Goh, Y. J., Klaenhammer, T. R. (2010) Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ Microbiol*. **76**(15), 5005-5012.

Gómez-Gallego, C., Pohl, S., Salminen, S., De Vos, W. M., Kneifel, W. (2016) *Akkermansia muciniphila*: A novel functional microbe with probiotic properties. *Benef. Microbes,* **7**(4), 571-584.

Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., Ley, R. E. (2014) Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, **159**(4), 789-799.

Greely, H.T. (2017) Is de-extinction special? *Hastings Cent. Rep.* **47**. doi: 10.1002/hast.749

Gueimonde, M., Sánchez, B., De los Reyes-Gavilán, C., Margolles, A. (2013) Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* **4**, 202.

Guimarães, A., Santiago, A., Teixeira, J. A., Venâncio, A., Abrunhosa, L. (2018) Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* **264**, 31-38.

Guimarães, J. A., Ferraz, H. C., Alves, T. L. M. (2014) Langmuir-Blodgett films of cholesterol oxidase and S-layer proteins onto screen-printed electrodes. *Appl. Surf. Sci.* **298**, 68-74.

Györvary, E., Schroedter, A., Talapin, D. V., Weller, H., Pum, D., Sleytr, U. B. (2004) Formation of nanoparticle arrays on S-layer protein lattices. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **4**, 115-120.

Gómez-Gallego, C., Garcia-Mantrana, I., Salminen, S., Collado, M. C. (2016) The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin. Fetal Neonat. M.* **21**(6), 400-405.

Hage, E., Wilkie, G. S., Linnenweber-Held, S., Dhingra, A., Suárez, N. M., Schmidt, J. J., Kay-Fedorov, P. C., Mischak-Weissinger, E., Heim, A., Schwarz, A., Schulz, T. F., Davison, A. J., Ganzenmueller, T. (2017) Characterization of human cytomegalovirus genome diversity in immunocompromised hosts by whole genomic sequencing directly from clinical specimens. *J. Infect. Dis.* **215**(11), 1673-1683.

Hanisch, F. G. (2001) O-glycosylation of the mucin type. *Biol. Chem.* **382**(2), 143-9.

Harris, H. M. B., Bourin, M. J. B., Claesson, M. J., O'Toole, P. W. (2017) Phylogenomics and comparative genomics of *Lactobacillus salivarius*, a mammalian gut commensal. *Microb. Genom.* **3**, 1-16.

Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., Lotfipour, F. (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **113**(4), 723-736.

Hassiotou, F., Geddes, D. T., Hartmann, P. E. (2013) Cells in human milk: state of the science. *J. Hum. Lact.* **29**(2), 171-182.

Hayashi, A., Sato, T., Kamada, N., Mikami, Y., Matsuoka, K., Hisamatsu, T., Hibi, T., Roers, A., Yagita, H., Ohteki, T., Yoshimura, A., Kanai, T. (2013) A single strain of *Clostridium butyricum*

induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe*, **13**(6), 711-722.

Heikkilä, M. P., Saris, P. E. (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.* **95**(3), 471-478.

Hill, C. J., Lynch, D. B., Murphy, K., Ulaszewska, M., Jeffery, I. B., O'Shea, C. A., Watkins, C., Dempsey, E., Mattivi, F., Tuohy, K., Ross, R. P., Ryan, C. A., O' Toole, P. W., Stanton, C. (2017) Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the INFANTMET Cohort. *Microbiome,* **5**(1), 4.

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) Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**(8), 506-514.

Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic S., Nes, I. F. (2001) Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology,* **147**(3), 643-651.

Huang, C. H., Li, S. W., Huang, L., Watanabe, K. (2018) Identification and classification for the *Lactobacillus casei* group. *Front. Microbiol.* **9**, 1974.

Hugenholtz, F., de Vos, W. M. (2018) Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**(1), 149-160.

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. (2007) Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 730-739.

Hynönen, U., Palva, A. (2013*) Lactobacillus* surface layer proteins: Structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225-5243.

Ibrahim, H.S., El-Ghany, A., Mohamed, S., El Shafie, M. T., Hady, E. (2019) Cognitive functions in breastfed versus artificially fed in preschool children. *Egypt. J. Hosp. Med.* **77**, 5742-5751.

Ilk, N., Schumi, C. T., Bohle, B., Egelseer, E. M., Sleytr, U. B. (2011) Expression of an endotoxin-free S-layer/allergen fusion protein in Gram-positive *Bacillus subtilis* 1012 for the potential application as vaccines for immunotherapy of atopic allergy. *Microb. Cell. Fact.* **10**, 6.

Ip, S., Chung, M., Raman, G., Chew, P., Magula, N., DeVine, D., Trikalinos, T., Lau, J. (2007) Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid. Rep. Technol. Assess.* **153**, 1-186.

Jahn-Schmid, B., Graninger, M., Glozik, M., Küpcü, S., Ebner, C., Unger, F. M., Sleytr, U. B., Messner, P. (1996) Immunoreactivity of allergen (Bet v1) conjugated to crystalline bacterial cell surface layers (S-layers). *Immunotechnology,* **2**, 103-113.

Jakava-Viljanen, M., Palva, A. (2007) Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *Vet. Microbiol.* **124**, 264-273.

Jiang, L., Gulanski, B. I., De Feyter, H. M., Weinzimer, S. A., Pittman, B., Guidone, E., Koretski, J., Harman, S., Petrakis, I. L., Krystal, J. H., Mason, G. F. (2013) Increased brain uptake and oxidation of acetate in heavy drinkers. *J. Clin. Invest.* **123**(4), 1605-1614.

Jikang, J., Wenxiang, L. (2019) Characterization and *in vitro* properties of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* for probiotic potential and nitrite degradation. *Sci. Asia,* **45**, 555.

Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J. M. (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr. Microbiol.* **51**(4), 270-4.

Jin, L. Z., Marquardt, R. R., Zhao, X. (2000) A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(10), 4200-4204.

Jirakittidul, P., Panichyawat, N., Chotrungrote, B., Mala, A. (2019) Prevalence and associated factors of breastfeeding in women with gestational diabetes in a University Hospital in Thailand. *Int. Breastfeed. J.* **14**. doi: 10.1186/s13006-019-0227-8

Johansson, M. E., Larsson, J. M., Hansson, G. C. (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *PNAS* **108**(1), 4659-665.

Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F., Chassard, C. (2014) Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ. Microbiol.* **16**(9), 2891-2904.

Juge, N. (2012) Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends Microbiol.* **20**, 30-39.

Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., Settharaksa, S. (2013) *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, **22**, 6-13.

Kareb, O., Aïder, M. (2020) Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review. *Probiotics Antimicro.* **12**(1), 5-17.

Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C., Meile, L. (2006) Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 145-55.

Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., Joloba, M. L., Najjuka, F. C. (2010) Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **9**, 23.

Kerry, G. R, Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. S., Das, G. (2018) Benefaction of probiotics for human health: A review. *J. Food Drug Anal.* **26**(3), 927-939.

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

Khan, S. T., Malik, A. (2019) Next-generation probiotics their molecular taxonomy and health benefits. U: Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies (Malik, A., Erginkaya, Z., Erten, H., ured.), Springer, Cham, Švicarska, str. 471-500.

Kim, Y. S., Ho, S. B. (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **12**(5), 319-330.

Kleerebezem, M., Binda, S., Bron, P. A., Gross, G., Hill, C., Johan, E. T., van Hylckama, V., Lebeer, S., Satokari, R., Ouwehand, A. C. (2019) Understanding mode of action can drive the

translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. *Cur. Opin. Biotechnol.* **56**, 55-60.

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

Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., Bron, P. A. (2010) The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**(2), 199-230.

Klotz, C., Barrangou, R. (2018) Engineering components of the *Lactobacillus* S-layer for biotherapeutic applications. *Front. Microbiol.* **9**, 228.

Kõll, P., Mändar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M., Hammarström, L. (2008) Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol. Immunol.* **23**(2) 139-47.

Kong, S., Zhang, Y. H., Zhang, W. (2018) Regulation of intestinal epithelial cells properties and functions by amino acids. *Biomed Res. Int.* doi: 10.1155/2018/2819154

König, H., Fröhlich, J. (2009) Lactic acid bacteria. U: Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine (König, H., Unden, G., Fröhlich, J., ured.), Springer, Heidelberg/Berlin, Njemačka.

Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S. C., Singh, S. K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T. R., van Kooyk, Y. (2008) S-layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 19474-19479.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Kos, B., Beganović, J., Jurašić, L., Švađumović, M., Leboš Pavunc, A., Uroić, K. i Šušković, J. (2011) Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. *Mljekarstvo,* **61**(4), 273-282.

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

Kumar, A., Schweizer, H. P. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1486-1513.

Kuntz, S., Rudloff, S., Kunz, C. (2008) Oligosaccharides from human milk influence growth-related characteristics of intestinally transformed and non-transformed intestinal cells. *Br. J. Nutr.* **99**(3), 462-471.

Lackey, K. A., Williams, J. E., Meehan, C. L., Zachek, J. A., Benda, E. D., Price, W. J., Foster, J. A., Sellen, D. W., Kamau-Mbuthia, E. W., Kamundia, E. W., Mbugua, S., Moore, S. E., Prentice, A. M., K, D. G., Kvist, L. J., Otoo, G. E., García-Carral, C., Jiménez, E., Ruiz, L., Rodríguez, J. M., Pareja, R. G., Bode, L., McGuire, M. A., McGuire, M. K. (2019) What's normal? Microbiomes in human milk and infant feces are related to each other but vary geographically: the inspire study. *Front Nutr.* **6**(45). doi: 10.3389/fnut.2019.00045

Lahtinen, S., Ouwehand, A., Collado, M. C., Salminen, S., Vesterlund, S., Tang, M., Satokari, R. (2008) Mechanisms of probiotics. U: Handbook of probiotics and prebiotics (Lee, Y. K., Salminen, S., ured.), John Wiley and Sons, New Jersey, SAD, str. 386.

Langford, A., Bhatnagar B., Walters R., Tchessalov S., Ohtake S. (2018) Drying technologies for biopharmaceutical applications: Recent developments and future direction. *Dry. Technol.* **36**, 677-684.

Le Doare, K., Holder, B., Bassett, A., Pannaraj, P. S. (2018) Mother's milk: A purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Front. Immunol.* **28**(9), 361.

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

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

Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. (2008) Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**(4), 728-64.

Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Kos, B., Uroić, K., Blažić, M., Šušković, J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production, *Food Technol. Biotech*. **50**(2), 141-151.

Leboš Pavunc, A., Kos, B., Beganović, J., Uroić, K., Bučan, D., Šušković, J. (2013) Antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of autochthonous starter cultures as safety parameters for fresh cheese production. *Mljekarstvo,* **63**(4), 185-194.

Lee, H., Jiang, D., Pardridge, W. M. (2020) Lyoprotectant optimization for the freeze-drying of receptor-targeted trojan horse liposomes for plasmid dna delivery. *Mol. Pharm.* **17**(6), 2165-2174.

Leenay, R. T., Aghazadeh, A., Hiatt, J., Tse, D., Roth, T. L., Apathy, R., Shifrut, E., Hultquist, J. F., Krogan, N., Wu, Z., Cirolia, G., Canaj, H., Leonetti, M. D., Marson, A., May, A. P., Zou, J. (2019) Large dataset enables prediction of repair after CRISPR-Cas9 editing in primary T cells. *Nat. Biotechnol.* **37**(9), 1034-1037.

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

Li, H. P., Chen, X., Li, M. Q. (2013) Butyrate alleviates metabolic impairments and protects pancreatic beta cell function in pregnant mice with obesity. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 1574-1584.

Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A. S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J. Y., Edris, S., Yang, H., Wang, J., Hansen, T., Nielsen, H. B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Dore, J., Ehrlich, S. D., MetaHIT Consortium, Bork, P., Wang, J., (2014) An

integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* **32**(8), 834-841.

Liu, C., Zhang, Z. Y., Dong, K., Yuan, J. P., Guo, X. K. (2009) Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed. Environ. Sci.* **22**, 401-12.

Liu, W., Li, L., Khan, M. A., Zhu, F. (2012) Popular molecular markers in bacteria. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* **27**(3), 103-107.

Lopez-Siles, M., Duncan, S., Garcia-Gil, L. J., Martinez-Medina, M. (2017) *Faecalibacterium prausnitzii*: from microbiology to diagnostics and prognostics. *ISME J.* **11**(4), 841-852.

Lorca, G., Torino, M. I., Font de Valdez, G., Ljungh, Å. (2002) Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**(1), 31-37.

Łubiech, K., Twarużek, M. (2020) *Lactobacillus* bacteria in breast milk. *Nutrients*, **12**(12), 3783.

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.

Macpherson, A. J., Harris, N. L. (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **4**(6), 478-485.

Mak, P. Chapter 13 - Staphylococcal Bacteriocins, Editor(s): Vincenzo Savini, Pet-To-Man Travelling Staphylococci, Academic Press, 2018, Pages 161-171, doi: 10.1016/B978-0-12-813547-1.00013-3

Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L. (2004) Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *J. Bacteriol.* **186**(5), 1556-1564.

Maldonado, J., Gil-Campos, M., Maldonado-Lobón, J. A., Benavides, M. R., Flores-Rojas, K., Jaldo, R., Del Barco Jiménez, I, Bolívar, V., Valero, A. D., Prados, E., Peñalver, I., Olivares, M. (2019) Evaluation of the safety, tolerance and efficacy of 1-year consumption of infant formula supplemented with *Lactobacillus fermentum* CECT5716 Lc40 or *Bifidobacterium breve* CECT7263: a randomized controlled trial. *BMC Pediatr.* **19**(1), 361.

Manzoni, C., Kia, D. A., Vandrovcova, J., Hardy, J., Wood, N. W., Lewis, P. A., Ferrari, R. (2018) Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief. bioinform.* **19(**2), 286-302.

Market Research Report (2020) Probiotics market size, share & COVID-19 impact analysis by microbial genus (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and yeast), application (functional foods & beverages, dietary supplements, and animal feed), distribution channel (supermarkets/hypermarkets, pharmacies/health stores, convenience stores, online retail, and others) and regional forecast, 2020-2027. str. 144

Martín, R., Bermúdez-Humarán, L.G., Langella, P. (2018) Searching for the bacterial effector: The example of the multi-skilled commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii*. *Front. Microbiol.* **9**, 346.

Martín, R., Miquel, S., Benevides, L., Bridonneau, C., Robert, V., Hudault, S., Chain, F., Berteau, O., Azevedo, V., Chatel, J. M., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L. G., Thomas, M., Langella, P. (2017) Functional characterization of novel *Faecalibacterium prausnitzii* strains isolated from healthy volunteers: a step forward in the use of *F. prausnitzii* as a next-generation probiotic. *Front. Microbiol.* **8**, 1226.

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 Pathog.* **9**, 28.

Maxmen, A. (2017) Living therapeutics: Scientists genetically modify bacteria to deliver drugs. *Nat. Med.* **23**, 5–7.

Mays, Z., Nair, N. (2018) Synthetic biology in probiotic lactic acid bacteria: At the frontier of living therapeutics. *Curr. Opin. Biotech.* **53**, 224-231.

Meng, J., Zhu, X., Gao, S. M., Zhang, Q. X., Sun, S., Lu, R. (2014) Characterization of surface layer proteins and its role in probiotic properties of three *Lactobacillus* strains. *Int. J. Biol. Macromol.* **65**, 110-114.

Messner, P., Schäffer, C., Egelseer, E. M., Sleytr, U. B. (2010) Occurrence, structure, chemistry, genetics, morphogenesis, and function of S-layers. U: Prokaryotic Cell Wall Compounds-

Structure and Biochemistry (König, H., Claus, H., Varma, A., ured.), Springer, Heidelberg, Njemačka, str. 53-109.

Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turroni, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arboleya Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., Ventura, M. (2017) The first microbial colonizers of the human gut: Composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**(4). doi:10.1128/MMBR.00036-17

Milani, C., Hevia, A., Foroni, E., Duranti, S., Turroni, F., Lugli, G. A., Sanchez, B., Martín, R., Gueimonde, M., van Sinderen, D., Margolles, A., Ventura, M. (2013) Assessing the fecal microbiota: an optimized ion torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS One*, **8**(7). doi: 10.1371/journal.pone.0068739

Million, M., Lagier, J. C., Yahav, D., Paul, M. (2013) Gut bacterial microbiota and obesity. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**(4), 305-13. doi: 10.1111/1469-0691.12172

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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 6463-6472.

Morelli, L., Capurso, L. (2012) FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *J. Clin. Gastroenterol.* **46**(1-2). doi: 10.1097/MCG.0b013e318269fdd5

Morris, J. J. (2018). What is the hologenome concept of evolution? *Faculty Rev.* doi: 10.12688/f1000research.14385.1

Motta, J. P., Bermúdez-Humarán, L. G., Deraison, C., Martin, L., Rolland, C., Rousset, P., Boue, J., Dietrich, G., Chapman, K., Kharrat, P., Vinel, J. P., Alric, L., Mas, E., Sallenave, J. M., Langella, P., Vergnolle, N. (2012) Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci. Transl. Med.* **4**(158). doi: 10.1126/scitranslmed.3004212

Munita, J. M., Arias, C. A. (2016) Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**(2).

Murphy, K., Curley, D., O'Callaghan, T. F., O'Shea, C. A., Dempsey, E. M., O'Toole, P. W., Ross, R. P., Ryan, C. A., Stanton, C. (2017) The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Sci. Rep.* **7**, 40597.

Nader-Macías, M. E. F., Otero, M. C., Espeche, M. C., Maldonado, N. C. (2008) Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**(11), 1387-1395.

Nakanishi, S., Tanaka, M. (2010) Sequence analysis of a bacteriocinogenic plasmid of *Clostridium butyricum* and expression of the bacteriocin gene in *Escherichia coli*. *Anaerobe*, **16**(3), 253-257.

Navarro-Tapia, E., Sebastiani, G., Sailer, S., Toledano, L. A., Serra-Delgado, M., García-Algar, Ó., Andreu-Fernández, V. (2020) Probiotic supplementation during the perinatal and infant period: Effects on gut dysbiosis and disease. *Nutrients*, **12**(8), 2243.

Neely, M., Kato, L., Youn, G., Kraler, L., Bayard, D. S., Guilder, M. V., Schumitzky, A., Yamada, W. M., Jones, B. E., Minejima, E. (2018) Prospective trial on the use of trough concentration versus area under the curve to determine therapeutic vancomycin dosing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, 2.

Negash, A. W., Tsehai, B. A. (2020) Current applications of bacteriocin. *Int. J. Microbiol.* doi: 10.1155/2020/4374891

Nes, I. F., Yoon, S., Diep, D. B (2007) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. *Food Sci. Biotechnol.* **16**(5), 675-690.

Nishie, M., Nagao, J., Sonomoto, K. (2012) Antibacterial peptides "bacteriocins": An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* **17**(1), 1-16.

Nishiyama, K., Nakazato, A., Ueno, S., Seto, Y., Kakuda, T., Takai, S., Yamamoto, Y., Mukai, T. (2015) APF reduces *Campylobacter* colonization of chicken. *Mol. Microbiol.* **98**, 712-726.

Nowrouzian, F. L., Clermont, O., Edin, M., Östblom, A., Denamur, E., Wold, A. E., Adlerberth, I. (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). doi: 10.1128/AEM.01681-19

Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., Agrawal, R. (2015) Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *J. Appl. Microbiol.* **119**(3), 797-808.

Oka, K., Osaki, T., Hanawa, T., Kurata, S., Sugiyama, E., Takahashi, M., Tanaka, M., Taguchi, H., Kamiya, S. (2018) Establishment of an endogenous *Clostridium difficile* rat infection model and evaluation of the effects of *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 probiotic strain. *Front. Microbiol.* **9**, 1264.

Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Rodríguez, J. M., Xaus, J. (2006) Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J. Appl. Microbiol.* **101**(1), 72-79.

Oliveira, R., Azeredo, J., Teixeira, P., Fonseca, A. P. (2001) The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. U: Biofilm Community Interactions: Chance or Necessity? (Gilbert, P., Allison, D., Brading, M., Verran, J., Walker, J., ured.), Bioline, Cardiff, UK, str. 11-22.

Oluola, O., Kong, L., Fein, M., Weisman, L. E. (2007) Lysostaphin in treatment of neonatal *Staphylococcus aureus* infection. *Antimicrob. Agents Ch.* **51**(6), 2198-2200.

Oscáriz, J. C., Pisabarro, A. G. (2001) Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.* **4**(1), 13-19.

Ouoba, L. I., Lei, V., Jensen, L. B. (2008) Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **121**, 217-24.

Ouwehand, A., Salminen, S., Isolauri, E. (2002) Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 279-89.

Ozen, M., Dinleyici, E. C. (2015) The history of probiotics: The untold story. *Benef. Microbes*, **6**(2), 159-65.

Pan, M. Kumaree, K. K., Shah, N. P. (2017) Physiological changes of surface membrane in *Lactobacillus* with prebiotics. *J. Food Sci.* **82**, 744-750.

Pannaraj, P. S., Li, F., Cerini, C., Bender, J. M., Yang, S., Rollie, A., Adisetiyo, H., Zabih, S., Lincez, P. J., Bittinger, K., Bailey, A., Bushman, F. D., Sleasman, J. W., Aldrovandi, G. M. (2017) Aassociation between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr.* **171**(7), 647-654.

Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligna, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., Tsakalidou , E. (2015) Discovering probiotic microorganisms: *In-vitro, in-vivo,* genetic and omics approaches. *Front. Microbiol.* **6**, 58.

Park, S. H., Itoh, K. Fujisawa, T. (2003) Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 294-300.

Pärnänen, K., Karkman, A., Hultman, J., Lyra, C., Bengtsson-Palme, J., Larsson, J., Rautava, S., Isolauri, E., Salminen, S., Kumar, H., Satokari, R., Virta, M. (2018) Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nat. Commun.* **9**, 3891.

Perry, G. H., Dominy, N. J., Claw, K. G., Lee, A. S., Fiegler, H., Redon, R., Werner, J., Villanea, F. A., Mountain, J. L., Misra, R., Carter, N. P., Lee, C., Stone, A. C. (2007) Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat. Genet.* **39**(10), 1256-1260.

Petrova, P., Tsvetanova, F., Petrov, K (2018) Low cell surface hydrophobicity is one of the key factors for high butanol tolerance of lactic acid bacteria. *Eng. Life Sci.* **19**(2), 133-142.

Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Bzducha-Wróbel, A., Synowiec, A. (2018) Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82. *Antonie van Leeuwenhoek*, **111**(6), 921-932.

Pleschberger, M., Saerens, D., Weigert, S., Sleytr, U. B., Muyldermans, S., Sára, M., Egelseer, E. M. (2004) An S-layer heavy chain camel antibody fusion protein for generation of a nanopatterned sensing layer to detect the prostate-specific antigen by surface plasmon resonance technology. *Bioconjug. Chem.* **15**, 664-671.

Plovier, H., Everard, A., Druart, C., Depommier, C., Van Hul, M., Geurts, L., Chilloux, J., Ottman, N., Duparc, T., Lichtenstein, L., Myridakis, A., Delzenne, N. M., Klievink, J., Bhattacharjee, A., van der Ark, K. C., Aalvink, S., Martinez, L. O., Dumas, M. E., Maiter, D., Loumaye, A., Hermans, M. P., Thissen, J. P., Belzer, C., de Vos, W. M., Cani, P. D. (2017) A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat. Med.* **23**(1), 107-113.

Poinsot, P., Penhoat, A., Mitchell, M., Sauvinet, V., Meiller, L., Louche-Pélissier, C., Meugnier, E., Ruiz, M., Schwarzer, M., Michalski, M. C., Leulier, F., Peretti, N. (2020) Probiotic from

human breast milk, *Lactobacillus fermentum*, promotes growth in animal model of chronic malnutrition. *Pediatr. Res.* **88**(3), 374-381.

Poltavets, V., Kochetkova, M., Pitson, S. M., Samuel, M. S. (2018) The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Front. Oncol.* **8**, 431.

Pouwels, P., Kolen, A. M., Boot, H. J (1997) S-layer protein genes in *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 78-82.

Pradhan, R., Madhup, S., Pant, S. (2019) Antibiogram and biofilm formation among carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*. *TUJM,* **6**, 63-69.

Prado Acosta, M., Ruzal, S. M., Cordo, S. M. (2016) S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor. *Int. J. Biol. Macromol.* **92**, 998-1005.

Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M., Tomaro-Duchesneau, C. (2011) Gut microbiota: Next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, **5**, 71-86.

Pum, D., Neubauer, A., Györvary, E., Sára, M., Sleytr, U. B. (2000) S-layer proteins as basic building blocks in a biomolecular construction kit. *Nanotechnology*, **11**, 100.

Pum, D., Sleytr, U. B. (2014) Reassembly of S-layer proteins. *Nanotechnology*, **25**(31), 312001.

Rachel, R. (2010) Cell envelopes of crenarchaeota and nanoarchaeota. U: Prokaryotic cell wall compounds-structure and biochemistry (König, H., Claus, H., Varma, A., ured.), Springer, Heidelberg, Njemačka, str. 271-291.

Radaic, A., Ye, C., Parks, B., Gao, L., Kuraji, R., Malone, E., Kamarajan, P., Zhan, L., Kapila, Y. L. (2020) Modulation of pathogenic oral biofilms towards health with nisin probiotic. *J. Oral Microbiol.* **12**(1), 1809302.

Rajilić-Stojanović, M., de Vos, W. M. (2014) The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**(5), 996-1047.

Rasinkangas, P., Reunanen, J., Douillard, F. P., Ritari, J., Uotinen, V., Palva, A., de Vos, W. M. (2014) Genomic characterization of non-mucus-adherent derivatives *of Lactobacillus rhamnosus* GG reveals genes affecting pilus biogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**(22), 7001-7009.

Rasinkangas, P., Tytgat, H., Ritari, J., Reunanen, J., Salminen, S., Palva, A., Douillard, F. P., de Vos, W. M. (2020) Characterization of highly mucus-adherent non-gmo derivatives of *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG. *Front. Bioeng. Biotechn.* **8**, 1024.

Rijnaarts, H. H. M. (1994) Interactions between bacteria and solid surfaces in relation to bacterial transport in porous media. Doktorska disertacija. Agricultural University, Wageningen, Nizozemska.

Ringseis, R., Gessner, D. K., Eder, K. (2020) The gut-liver axis in the control of energy metabolism and food intake in animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **8**, 295-319.

Riskin, A., Almog, M., Peri, R., Halasz, K., Srugo, I., Kessel, A. (2012) Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr. Res.* **71**(2), 220-225.

Robert, S., Steidler, L. (2014) Recombinant *Lactococcus lactis* can make the difference in antigen-specific immune tolerance induction, the Type 1 diabetes case. *Microb. Cell Fact.* **13**(1). doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S11

Rodrigues-Oliveira, T., Souza, A. A., Kruger, R., Schuster, B., Maria de Freitas, S., Kyaw, C. M. (2019) Environmental factors influence the *Haloferax volcanii* S-layer protein structure. *PLoS One*, **14**(5). doi: 10.1371/journal.pone.0216863

Rodríguez, J. M. (2014) The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv. Nutr.* **5**(6), 779-784.

Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2006) Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* **111**, 234-40.

Rong, J., Zheng, H., Liu, M., Hu, X., Wang, T., Zhang, X., Jin, F., Wang, L. (2015) Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC Microbiol.* **15**(196). doi: 10.1186/s12866-015-0525-2

Rosenfeld, C. S. (2017) Gut dysbiosis in animals due to environmental chemical exposures. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **7**, 396.

Rossi, O., van Berkel, L. A., Chain, F., Tanweer Khan, M., Taverne, N., Sokol, H., Duncan, S. H., Flint, H. J., Harmsen, H. J., Langella, P., Samsom, J. N., Wells, J. M. (2016)

Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci. Rep.* **6**, 18507.

Rouanet, A., Bolca, S., Bru, A., Claes, I., Cvejic, H., Girgis, H., Harper, A., Lavergne, S. N., Mathys, S., Pane, M., Pot, B., Shortt, C., Alkema, W., Bezulowsky, C., Blanquet-Diot, S., Chassard, C., Claus, S. P., Hadida, B., Hemmingsen, C., Jeune, C., Lindman, B., Midzi, G., Ruiz, L., Bacigalupe, R., García-Carral, C., Boix-Amoros, A., Argüello, H., Silva, C. B., de los Angeles Checa, M., Mira, A., Rodríguez, J. M. (2019) Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. *Sci. Rep.* **9**, 8435.

Rutsch, A., Kantsjö, J. B., Ronchi, F. (2020) The gut-brain axis: How microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology. *Front. Immunol.* **11**. doi: 10.3389/fimmu.2020.604179

Saarela, M. H. (2019) Safety aspects of next generation probiotics. *Curr. Opin. Food Sci.* **30**, 8-13.

Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Navarro, L., Diez, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2009) Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 176-183.

Samuel, B. S., Hansen, E. E., Manchester, J. K., Coutinho, P. M., Henrissat, B. Fulton, R., Latreille, P., Kim, K., Wilson, R. K., Gordon, J. I. (2007) Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *P. Natl. Acad. Sci.* USA **104**(25), 10643-10648.

Sára, M., Sleytr, U. B. (2000) S-layer proteins. *J. Bacteriol.* **182**, 859-868.

Sarsaiya, S., Shi, J., Chen, J. (2019) Bioengineering tools for the production of pharmaceuticals: Current perspective and future outlook. *Bioengineered*, **10**(1), 469-492.

Savadogo, A., Quattara Cheik, A. T., Bassole Imael, H. N., Traore, S. A. (2006) Bacteriocins and lactic acid bacteria-A minireview. *Afr. J. Biotechnol.* **5**(9), 678-683.

Schmidt, C. (2013) The startup bugs. *Nat. Biotechnol.* **31**, 279-281.

Schroeder, B. O., Bäckhed, F. (2016) Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* **22**(10), 1079-1089.

Seki, H., Shiohara, M., Matsumura, T., Miyagawa, N., Tanaka, M., Komiyama, A., Kurata, S. (2003) Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI. *Pediatr. Int.* **45**(1), 86-90.

Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., Lapidus, A., Rokhsar, D. S., Lebrilla, C. B., German, J. B., Price, N. P., Richardson, P. M., Mills, D. A. (2008) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *P. Natl. Acad. Sci.* **105**(48), 18964-18969.

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* **14**(8). doi: 10.1371/journal.pbio.1002533

Shetty, S. A., Boeren, S., Bui, T. P. N., Smidt, H., de Vos, W. M. (2020) Unravelling lactate-acetate and sugar conversion into butyrate by intestinal *Anaerobutyricum* and *Anaerostipes* species by comparative proteogenomics. *Environ. Microbiol.* **22**(11), 4863-4875.

Shetty, S. A., Zuffa, S., Bui, T. P. N., Aalvink, S., Smidt, H., De Vos, W. M. (2018) Reclassification of *Eubacterium hallii* as *Anaerobutyricum hallii* gen. nov., comb. nov., and description of *Anaerobutyricum soehngenii* sp. nov., a butyrate and propionate-producing bacterium from infant faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**(12), 3741-3746.

Simons, A., Alhanout, K., Duval, R. E. (2020) Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, **8**(5), 639.

Singh, T., Kaur, G., Malik, R., Schillinger, U., Guigas, C., Kapila, S. (2012) Characterization of intestinal *Lactobacillus reuteri* strains as potential probiotics. probiotics and antimicrobial proteins. **4**(1), 47-58.

Šipailienė, A, Petraitytė, S. (2018) Encapsulation of probiotics: Proper selection of the probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms. *Probiotics Antimicro.* **10**(1), 1-10.

Sleytr, U. B., Beveridge, T. J. (1999) Bacterial S-layers. *Trends Microbiol.* **7**, 253-260.

Sleytr, U. B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B., Messner, P., Schäffer, C. (2002) Self-assembly protein systems: microbial S-layers. U: Biopolymers Polyamides and Complex Proteinaceous

Materials I (Steinbüchel, A., Fahnestock, S. R., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, Njemačka, str. 285-338.

Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M., Pum, D. (2014) S-layers: Principles and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 823-864.

Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M., Pum, D., Horejs, C. M., Tscheliessnig, R., Ilk, N. (2011) Nanobiotechnology with S-layer proteins as building blocks. *Prog. Mol. Biol. Transl.* **103**, 277-352.

Śliżewska, K., Chlebicz-Wójcik, A., Nowak, A. (2021) Probiotic properties of new *Lactobacillus* strains intended to be used as feed additives for monogastric animals. *Probiotics Antimicro.* **13**, 146-162.

Soda, N., Verma, L., Giri, J. (2018) CRISPR-Cas9 based plant genome editing: Significance, opportunities and recent advances. *Plant Physiol. Biochem.* **131**, 2-11.

Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermúdez-Humarán, L. G., Gratadoux, J. J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J. P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottière, H. M., Doré, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P. (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *P. Natl. Acad. Sci.* **105**(43), 16731-16736.

Song, H. Y., Zhou, L., Liu, D. Y., Yao, X. J., Li, Y. (2018) What roles do probiotics play in the eradication of *Helicobacter pylori*? Current knowledge and ongoing research. *Gastroenterol. Res. Pract.* doi: 10.1155/2018/9379480

Sonnenborn, U. (2016) *Escherichia coli* strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**(19). doi: 10.1093/femsle/fnw212

Sornplang, P., Piyadeatsoontorn, S., (2016) Probiotic isolates from unconventional sources: A review. *J. Anim. Sci. Technol.* **58**, 26.

Stephens, S. K., Floriano, B., Cathcart, D. P., Bayley, S. A., Witt, V. F., Jiménez-Díaz, R., Warner, P. J., Ruiz-Barba, J. L. (1998) Molecular analysis of the locus responsible for production of plantaricin S, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(**5), 1871-1877.

Stimson, E., Virji, M., Makepeace, K., Maskell, D., Ferguson, D. J. (1995) Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol. Microbiol.* **17**, 1201-1214.

Sturme, M. H. J., Francke, C., Siezen, R. J., de Vos, W. M., Kleerebezem, M. (2007) Making sense of quorum sensing in lactobacilli: A special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology*, **53**(12), 3939-3947.

Styriak, I., Nemcová, R., Chang, Y. H., Ljungh, A. (2003) Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**(4), 329-333.

Sundekilde, U. K., Downey, E., O'Mahony, J. A., O'Shea, C. A., Ryan, C. A., Kelly, A. L., Bertram, H. C. (2016) The effect of gestational and lactational age on the human milk metabolome. *Nutrients*, **8**(5), 304.

Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

Šušković, J., Kos, B. (2020) Predavanja iz kolegija „Probiotici i starter kulture“, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotech.* **48**(3), 296-307.

Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotech.* **39**, 227-235.

Szatraj, K., Szczepankowska, A., Chmielewska-Jeznach, M. (2017) Lactic acid bacteria-promising vaccine vectors: possibilities, limitations, doubts. *J. Appl. Microbiol*. **123**, 325-339.

Tahoun, A., Masutani, H., El-Sharkawy, H., Gillespie, T., Honda, R. P., Kuwata, K., Inagaki, M, Yabe, T., Nomura, I., Suzuki, T. (2017) Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages. *Gut Pathog.* **9**, 27.

Tailford, L. E., Crost, E. H., Kavanaugh, D., Juge., N. (2015) Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front. Genet.* **6**, 81.

Taverniti, V., Stuknyte, M., Minuzzo, M., Arioli, S., De Noni, I., Scabiosi, C., Cordova, Z. M., Junttila, I., Hämäläinen, S., Turpeinen, H., Mora, D., Karp, M., Pesu, M., Guglielmetti, S. (2013)

S-layer protein mediates the stimulatory effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1221-1231.

Tian, F., Yu, L., Zhai, Q., Xiao, Y., Shi, Y., Jiang, J., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. (2017) The therapeutic protection of a living and dead *Lactobacillus* strain against aluminum induced brain and liver injuries in C57BL/6 mice. *PLoS One*, **12**(4). doi: 10.1371/journal.pone.0175398

Tierney, B. T., Yang, Z., Luber, J. M., Beaudin, M., Wibowo, M. C., Baek, C., Mehlenbacher, E., Patel, C. J., Kostic, A. D. (2019) The landscape of genetic content in the gut and oral human microbiome. *Cell Host Microbe*, **26**(2), 283-295.

Togo, A., Dufour, J. C., Lagier, J. C., Dubourg, G., Raoult, D., Million, M. (2019) Repertoire of human breast and milk microbiota: A systematic review. *Future Microbiol.* **14**, 623-641.

Toscano, M., De Grandi, R., Miniello, V. L., Mattina, R., Drago, L. (2017) Ability of *Lactobacillus kefiri* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. *Dig. Liver Dis.* **49**(3), 261-267.

Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M. L., Thomas, M., Guyot, J. P. (2012) *Lactobacillaceae* and cell adhesion: Genomic and functional screening. *PLoS One*, **7**(5). doi: 10.1371/journal.pone.0038034

Udayappan, S., Manneras-Holm, L., Chaplin-Scott, A., Belzer, C., Herrema, H., Dallinga-Thie, G. M., Duncan, S. H., Stroes, E. S. G., Groen, A. K., Flint, H. J., Backhed, F., de Vos, W. M., Nieuwdorp, M. (2016) Oral treatment with *Eubacterium hallii* improves insulin sensitivity in *db/db* mice. *NPJ Biofilms Microbi.* **2**, 16009.

Uddin, F., Rudin, C. M., Sen, T. (2020) CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Front. Oncol.* **10**, 1387.

Ulsemer, P., Toutounian, K., Kressel, G., Goletz, C., Schmidt, J., Karsten, U., Hahn, A., Goletz, S. (2016) Impact of oral consumption of heat-treated *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964 on the level of natural TFα-specific antibodies in human adults. *Benef. Microbes*, **7**(4), 485-500.

Urbaniak, C., Angelini, M., Gloor, G. B., Reid, G. (2016) Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome*, **6**(4), 1.

Uroić, K., Novak, J., Hynöonen, U., Pietilä, T.E., Leboš Pavunc, A., Kant, R., Kos, B., Palva, A., Šušković, J. (2016) The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT - Food Sci. Technol*. **69**, 623-632.

van den Elsen, L., Garssen, J., Burcelin, R., Verhasselt, V. (2019). Shaping the gut microbiota by breastfeeding: the gateway to allergy prevention? *Front. Pediatr.* **7**, 47.

van der Ark, K., Aalvink, S., Suarez-Diez, M., Schaap, P. J., de Vos, W. M., Belzer, C. (2018) Model-driven design of a minimal medium for *Akkermansia muciniphila* confirms mucus adaptation. *Microb. Biotechnol.* **11**(3), 476-485.

Van Kranenburg, R., Golić, N., Bongers, R., Leer, R. J., de Vos, W. M., Siezen, R. J., Kleerebezem, M. (2005) Functional analysis of three plasmids from *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1223-1230.

van Pijkeren, J. P., Barrangou, R. (2017) Genome editing of food-grade lactobacilli to develop therapeutic probiotics. *Microbiol. Spectr.* **5**(5). doi:10.1128/microbiolspec.BAD-0013-2016

van Pijkeren, J. P., Canchaya, C., Ryan, K. A., Li, Y., Claesson, M. J., Sheil, B., Steidler, L., O'Mahony, L., Fitzgerald, G. F., van Sinderen, D., O'Toole, P. W. (2006) Comparative and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(6), 4143-4153.

Van Pijkeren, J.P., O´Tolle, P.W. (2013) Comparative and Functional Genomics of the Genus Lactobacillus. U: Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics, (Ljungh, Å. Wadström, T. ured.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, str. 59-82.

van Tassell, M. L., Miller, M. J. (2011) *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, **3**(5), 613-636.

Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J. (2007) Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**(2), 140-148.

Ventura, M., Turroni, F., van Sinderen, D. (2012) Probiogenomics as a tool to obtain genetic insights into adaptation of probiotic bacteria to the human gut. *Bioengineered*, **3**(2), 73-79.

Vestergaard, M., Leng, B., Haaber, J., Bojer, M. S., Vegge, C. S., Ingmer, H. (2016) Genome-wide identification of antimicrobial intrinsic resistance determinants in *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **7**, 2018.

Vizoso Pinto, M. G., Schuster, T., Briviba, K., Watzl, B., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. (2007) Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *J. Food Prot.* **70**(1), 125-134.

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

Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., Carlsson, C. M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B. B., Rey, F. E. (2017) Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **7**(1), 13537.

Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., Stroes, E. S., de Vos, W. M., Hoekstra, J. B., Nieuwdorp, M. (2012) Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, **143**(4), 913-916.

Walker, W. A., Iyengar, R. S. (2015) Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr. Res*. **77**(1-2), 220-228.

Wan, Y., Jiang, J., Lu, M., Tong, W., Zhou, R., Li, J., Yuan, J., Wang, F., Li, D. (2020) Human milk microbiota development during lactation and its relation to maternal geographic location and gestational hypertensive status. *Gut Microbes*, **11**(5), 1438-1449.

Wang, B., Kraig, E., Kolodrubetz, D. (2000) Use of defined mutants to assess the role of the *Campylobacter rectus* S-layer in bacterium epithelial cell interactions. *Infect. Immun.* **68**, 1465-1473.

Wang, Y. T., Oh, S. Y., Hendrickx, A. P., Lunderberg, J. M., Schneewind, O. (2013) *Bacillus cereus* G9241 S-layer assembly contributes to the pathogenesis of anthrax-like disease in mice. *J. Bacteriol.* **195**, 596-605.

Weigert, S., Sára, M. (1995) Surface modification of an ultrafiltration membrane with crystalline structure and studies on interactions with selected protein molecules. *J. Memb. Sci.* **106**, 147-159.

Wu, M., Liu, X., Bai, H., Lai, L., Chen, Q., Huang, G., Liu, B., Tang, G. (2019) Surface-layer protein-enhanced immunotherapy based on cell membrane-coated nanoparticles for the effective inhibition of tumor growth and metastasis. *ACS Appl. Mater. Interfaces,* **11**(10), 9850-9859.

Yadav, A. K., Tyagi, A., Kaushik, J. K., Saklani, A. C., Grover, S, Batish, V. K. (2013) Role of surface layer collagen binding protein from indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen. *Microbiol. Res.* **168**(10), 639-645.

Yang, L., Jiang, Z., Zhou, L., Zhao, K., Ma, X., Cheng, G (2017) Hydrophilic cell-derived extracellular matrix as a niche to promote adhesion and differentiation of neural progenitor cells *RSC Advances*, **7**(72), 45587-45594.

Yang, Y., Gu, H., Sun, Q., Wang, J. (2018) Effects of *Christensenella minuta* lipopolysaccharide on RAW 264.7 macrophages activation. *Microb. Pathog.* **125**, 411-417.

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J. I. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, **486**(7402), 222-227.

Yu, L., Zhai, Q., Liu, X., Wang, G., Zhang, Q., Zhao, J., Narbad, A., Zhang, H., Tian, F., Chen, W. (2016) *Lactobacillus plantarum* CCFM639 alleviates aluminium toxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 1891-1900.

Zacharof, M. P., Lovitt, R. W. (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. A review article. *APCBEE Proc*. **2**, 50-56.

Zamfir, M., Grosu-Tudor, S. S. (2014) Stress response of some lactic acid bacteria isolated from Romanian artisan dairy products. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**(2), 375-384.

Zarrilli, R., Tripodi, M. F., Di Popolo, A., Fortunato, R., Bagattini, M., Crispino, M., Florio, A., Triassi, M., Utili, R. (2005) Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *J. Antimicrob. Chemother*. **56**(5), 827-835.

Zhang, M., Wu, C. (2020) The relationship between intestinal goblet cells and the immune response. *Biosci. Rep*. **40**(10). doi: 10.1042/BSR20201471

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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**(4), 2782-2858.

Zhou, H., Zhou, S. Y., Gillilland, M., Li, J. Y., Lee, A., Gao, J., Zhang, G., Xu, X., Owyang, C. (2020) Bile acid toxicity in Paneth cells contributes to gut dysbiosis induced by high-fat feeding. *JCI Insight*, **5**(20). doi: 10.1172/jci.insight.138881

Zimmermann, P., Curtis, N. (2020) Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *J. Infect.* **81**(1), 17-47.

Zong, X., Fu, J., Xu, B., Wang, Y., Jin, M. (2020) Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides, *Anim. Nutr.* **6**(4), 389-396,

Žučko, J., Starčević, A., Diminić, J., Oros, D., Mortazavian, A. M., Putnik, P. (2020) Probiotic - friend or foe? *Curr. Opin. Food Sci.* **32**, 45-49.

8. ŽIVOTOPIS

Martina Banić rođena je 6. travnja 1989. godine u Vinkovcima. Nakon završene Gimnazije Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima, 2008. je upisala Prehrambeno-biotehnološki fakultet (PBF) Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad pod naslovom „Reidentifikacija bakterijskih sojeva iz probiotičkih nutraceutičkih proizvoda“ izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak, u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, kojeg je pročelnica prof. dr. sc. Jagoda Šušković, te 2015. godine stekla zvanje magistre inženjerke molekularne biotehnologije. Nakon toga, zaposlila se kao asistent u istom Laboratoriju i 2016. godine upisala poslijediplomski studij Biotehnologije i bioprocesnog inženjerstva, prehrambene tehnologije i nutricionizma. Tijekom svog znanstveno-istraživačkog rada, aktivno je sudjelovala na HRZZ projektima „Probiotici i starter kulture-površinski proteini i bakteriocini“ voditeljice prof. dr. sc. Blaženke Kos i „Istraživanje ravnoteže mikrobioma debelog crijeva-MicroEquilibrium“ voditelja izv. prof. dr. sc. Antonia Starčevića, a trenutno je suradnica na projektu „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ voditeljice prof. dr. sc. Blaženke Kos. Dobitnica je prestižne FEMS stipendije za mlade istraživače koja joj je omogućila 3 mjeseca istraživačkog rada tijekom 2017. godine na Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finska, na znanstvenom projektu „The effect of prebiotics on the abundance of Ct85, a bacterial phylotype indicative of healthy human gut“. Iste godine, osvojila je srebrnu medalju Udruge inovatora Hrvatske na međunarodnom sajmu inovacija Agro Arca za izložene rezultate „Primjena protektivnih matriksa i metoda za proizvodnju probiotičkih bakterija“ autora: K. Zorić, M. Banić, A. Leboš Pavunc, K. Uroić, J. Novak, B. Kos, J. Šušković. Za postignute rezultate u području biotehničkih znanosti s mogućom primjenom u gospodarstvu, 2020. godine je dobila Potporu Biotehničke zaklade. Koautorica je 4 znanstvena rada Q1 kategorije i 17 postera prezentiranih na domaćim i međunarodnim skupovima. Članica je Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog društva za biotehnologiju. Tijekom svog dosadašnjeg rada, vodila je brojne radionice na Danima otvorenih vrata PBF-a, Festivalu znanosti te projektnu PANDA radionicu za darovitu djecu. Osim u znanstveno-istraživačkom radu, sudjeluje u nastavi kao suradnica na kolegijima Biotehnologija 4, Tehnologija antibiotika, Tehnologija enzima, Mikrobna ekologija, Probiotici i starter kulture i Crijevna mikroflora, prehrana i zdravlje, te u izradi završnih i diplomskih radova.

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

1. 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*. *Microb. Cell Fact.* **20,** 85.
2. Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Durgo, K., Oršolić, O., Kukolj, M., Radović, S., Scalabrin, S., Žučko, J., Starčević, A., Šušković, J., Kos, B. (2020) The functional capacity of plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* SF9C and S-layer-carrying *Lactobacillus brevis* SF9B to withstand gastrointestinal transit. *Microb. Cell Fact.* **19**, 106.
3. Leboš Pavunc, A., Penava, L., Ranilović, J., Novak, J., Banić, M., Butorac, K., Petrović, E., Mihaljević-Herman, V., Bendelja, Savić Mlakar, A., Durgo, K., Kos, B., Šušković, J. (2019) Influence of dehydrated wheat/rice cereal matrices on probiotic activity of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12®. *Food Technol. Biotech.* **57**(2), 147-158.
4. 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 Sci. Technol.* **93**, 257-267.