

Identifikacija i funkcionalnost bakterijskih sojeva u liofiliziranim probiotičkim pripravcima na hrvatskom tržištu

Džidara, Petra

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:159:265053>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

PETRA DŽIDARA

**IDENTIFIKACIJA I FUNKCIONALNOST
BAKTERIJSKIH SOJEVA U LIOFILIZIRANIM
PROBIOTIČKIM PRIPRAVCIMA NA
HRVATSKOM TRŽIŠTU**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Zagreb, 2021



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

PETRA DŽIDARA

**IDENTIFICATION AND FUNCTIONALITY OF
BACTERIAL STRAINS IN LYOPHILIZED
PROBIOTIC PREPARATIONS ON THE
CROATIAN MARKET**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: PhD, Jasna Novak, Full Professor

Zagreb, 2021

Ovaj doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kojeg je pročelnica prof. dr. sc. Jagoda Šušković, a pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak, te u Centru za kontrolu namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, tijekom predstojništva dr. sc. Milice Gačić, čija je aktualna predstojnica dr. sc. Andrea Benussi-Skukan. Istraživanja su provedena u okviru znanstveno-istraživačkog projekta “Probiotici, prebiotici i funkcionalne starter kulture“ 058-0581990-2007 voditeljice prof. dr. sc. Jagode Šušković.

ŽIVOTOPIS MENTORA

Prof. dr. sc. Jasna Novak zaposlena je od 2003. u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Na istom fakultetu je diplomirala smjer Biokemijsko inženjerstvo, te doktorirala u području Molekularne Biotehnologije. Nekoliko puta se znanstveno usavršavala na eminentnim europskim institucijama. Prvi puta 2006. kao doktorand boravila je tijekom 18 mjeseci na istraživačkom institutu French National Institute for Agricultural Research, INRA, Proteomics Platform PAPSS: Protein Structure and Biochemistry Unit, Pariz. 2011. odlazi na poslijedoktorsko usavršavanje na Department of Veterinary Bioscience, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, zatim 2011. u Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Beograd, te 2014. na Katedru za biotehnologiju, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Aktivna je i kao gostujući nastavnik na Department of Biotechnology and Life Science, University of Insubria u okviru ERASMUS programa mobilnosti. Sudjelovala u realizaciji ukupno 18 znanstvenih i stručnih/tehnoloških nacionalnih ili međunarodnih projekta. Objavila je 32 izvorna znanstvena rada, te je sudjelovala sa 6 predavanja i 38 postera na znanstvenim skupovima. Redovito sudjeluje u recenzijama znanstvenih radova časopisa s visokim učinkom odjeka (ukupno recenzirala više od 60 znanstvenih radova), a članica je Uredničkog odbora znanstvenih časopisa *Food Bioscience*, *American Journal of Microbiological Research* i *BioMed Research International - Microbiology*. Suradnik je na nekoliko modula koji se izvode na preddiplomskim i diplomskim studijima, te na doktorskom studiju *Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam* Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Mentor je 1 doktorskog rada, 19 diplomskih i 23 završna rada, te 1 magistarskog rada prema prijašnjem programu doktorskog studija. Redovito sudjeluje u programima popularizacije znanosti (Festival znanosti, 2016; XII Ljetna tvornica znanosti, 2018; Znanstveni kvart, 2018; PANDA, 2019; Festival znanosti, 2021). Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatske mljekarske udruge, European Biotechnology Thematic Network Association i Hrvatskog mikrobiološkog društva, a od 2021. predsjednica Sekcije za primijenjenu mikrobiologiju. U dva navrata 2005. i 2007. dodijeljene su joj potpore Biotehničke zaklade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, a 2007. je sudjelovala kao koautor na radovima koji su nagrađeni Prvom Nagradom Saveza inovatora Poljske i autora tehničkih unapređenja na 5. međunarodnoj izložbi ARCA 2007, te 2017. Srebrenom

medaljom na 9. međunarodnom sajmu inovacija Agro Arca. Dobitnica je i Nagrade mladom znanstveniku „Vera Johanides“ za 2011. godinu koju dodjeljuje Akademija tehničkih znanosti Hrvatske. Njezin znanstveni rad obuhvaća funkcionalnu karakterizaciju različitih metabolita i makromolekularnih staničnih struktura odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline kao molekularnih čimbenika funkcionalnosti probiotičkih sojeva, s potencijalnim učinkom na intestinalnu mikrobiotu domaćina, koja su temelj za definiranje interakcija probiotičkih bakterija s domaćinom *in situ*, u gastrointestinalnom traktu kao ciljnom mjestu djelovanja.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na redovnoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2012./2013. održanoj dana 20. studenog 2012. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na 7. sjednici održanoj 15. siječnja 2013. godine u akademskoj godini 2012./2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Disertacija

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

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

UDK: 579.86:579.864:612.014.1(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

IDENTIFIKACIJA I FUNKCIONALNOST BAKTERIJSKIH SOJEVA U LIOFILIZIRANIM PROBIOTIČKIM PRIPRAVCIMA NA HRVATSKOM TRŽIŠTU

Petra Džidara, dipl. ing.

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

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Kratki sažetak:

Istraživački cilj je uspostaviti pouzdan metodološki pristup za robusnu analizu probiotičkih pripravaka. Prioritetno je definirana ispravnost taksonomske nomenklature i usklađenost koncentracije probiotičkih stanica s preporučenom dnevnom dozom. Mikrobiološka analiza i združena primjena fenotipskih i genotipskih metoda isključila je prisutnost neprobiotičkih bakterija. Probiotički pripravci su sigurni za ljudsku primjenu jer su prema metaboličkim, fiziološkim i fermentacijskim profilima potvrđeni kao vrste iz rodova *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium* te je ustanovljena niska pojavnost fenotipske rezistencije na antibiotike. Analizom SDS-PAGE proteinskih profila temeljem dendrograma generiranih pomoću Gel Compare II, sojevi su klasificirani u *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium* rod. Razlikovanje sojeva utemeljeno je na analizi polimorfizma slučajno umnoženih fragmenata DNA, čija je biotipizacija provedena umnažanjem V9 regije 16S rRNA *Bifidobacterium* ili 16S/23S intergenske rRNA „spacer“ regije *Lactobacillus* vrste. Sojevi su identificirani sekvencioniranjem 16S rRNA gena. Potencijal kolonizacije i jačanja funkcije intestinalne barijere određeni su karakterizacijom adaptacije na ekstremne uvjete mikrookoliša i gastrointestinalnog trakta, adhezije na mucin i proteinske ligande intestinalnih niša. Pojedini sojevi iskazuju aktivnost hidrolaze žučnih soli, asimilaciju kolesterola ili prebiotičkih supstrata i kompetitivne ekskluzije enteropatogena. Razvijeni integrirani pristup obuhvaća primjenu molekularne metodologije i *in vitro* eksperimentalnih modela za validaciju probiotičkih bakterija.

Broj stranica: 158

Broj slika: 30

Broj tablica: 31

Broj literaturnih navoda: 129

Ključne riječi: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, funkcionalnost, probiotici, kontrola kvalitete

Datum obrane: 23. srpnja 2021.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. prof. dr. sc. Blaženka Kos
3. prof. dr. sc. Lidija Kozačinski
4. prof. dr.sc. Jasna Mrvčić (zamjena)

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

PhD thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

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

UDK: 579.86:579.864:612.014.1(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

IDENTIFICATION AND FUNCTIONALITY OF BACTERIAL STRAINS IN LYOPHILIZED PROBIOTIC PREPARATIONS ON THE CROATIAN MARKET

Petra Džidara, MSc

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

Supervisor: PhD Jasna Novak, Full Professor

Short abstract:

The research goal was to define a reliable methodological approach for robust analysis of probiotic preparations. The correctness of the taxonomic nomenclature and the compliance of the concentration of probiotic cells with the recommended daily dose were defined as a priority. Microbiological analysis of probiotic products and the combined application of phenotypic and genotypic methods, ruled out the presence of contaminating non-probiotic bacteria. The products are safe for use due to the low incidence of phenotypic resistance to antibiotics of strains which are according to metabolic, physiological characteristics and carbohydrate fermentation profiles grouped to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species. SDS-PAGE of soluble cell or surface proteins and computer-aided comparison of the electrophoretic protein patterns generated by Gel Compare II classified bacterial strains into *Lactobacillus* spp. or *Bifidobacterium* spp. RAPD-PCR was used to generate unique and identifying DNA profiles of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains, whose biotyping was performed by amplification of V9 region of 16S rRNA *Bifidobacterium* or 16S/23S intergenic rRNA "spacer" region of *Lactobacillus* species. Probiotic strains were identified by 16S rRNA sequencing. Colonization potential and enhancement of intestinal barrier function were determined based on the adaptation to the extreme microenvironment conditions and gastrointestinal tract and adhesion to the mucin and protein ligands of intestinal niches. Strains show bile salt hydrolase activity and cholesterol or prebiotics assimilation and competitive exclusion of enteropathogens. The developed integrated approach includes the application of the molecular methodology and *in vitro* experimental models for the validation of probiotic bacteria.

Number of pages: 158

Number of figures: 30

Number of tables: 31

Number of references: 129

Original in: Croatian

Keywords: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, functionality, probiotic, quality control

Date of the thesis defense: July 23rd, 2021.

Reviewers:

1. PhD Jagoda Šušković, Full Professor having a tenure
2. PhD Blaženka Kos, Full Professor having a tenure
3. PhD Lidija Kozačinski, Full Professor having a tenure
4. PhD Jasna Mrvčić, Full Professor (substitute)

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

SAŽETAK

Liofilizirani probiotički pripravci, uglavnom su namijenjeni uspostavljanju ponovne ravnoteže narušenog sastava mikrobiote prilikom poremećaja funkcije probavnog sustava odraslih, djece i novorođenčadi. Nedavne znanstvene spoznaje o povezanosti sastava intestinalne mikrobiote, ali i mikrobiote drugih dijelova tijela i učinaka na zdravlje čovjeka, posljedično su utjecale na masovnu proizvodnju probiotičkih pripravaka čija primjena se preporučuje i prilikom narušavanja sastava mikrobiote usne šupljine, kože ili urogenitalnog trakta. Iz znanstvene literature su dostupni podaci o opsežnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, kliničkim studijama i meta-analizama, koji doprinose karakterizaciji korisnih učinaka primjene probiotičkih sojeva. S obzirom na veliku potražnju probiotika kao dodataka prehrani, koji podliježu važećim zakonskim propisima o hrani, te učestaloj neusklađenosti informacija na deklaracijama proizvoda s općim, funkcionalnim i tehnološkim svojstvima probiotičkih mikroorganizama, odnosno nepotpunih informacija o sadržanim pojedinačnim ili konzorcijima mikrobnih kultura, te koncentraciji bakterijskih stanica na deklaracijama, potrebno je bilo uspostaviti nadzor prisutnih mikrobnih vrsta, utvrđivanjem ispravnosti navedene taksonomske identifikacije soja i broja sadržanih stanica mikroorganizama te provjeriti sigurnost primjene i evaluaciju funkcionalnih svojstava *in vitro*. Sigurnosti primjene probiotičkih sojeva doprinosi i provjera funkcionalnih svojstava identificiranih sojeva sukladno preporukama Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), a u svrhu znanstvenog dokazivanja zdravstvenih tvrdnji navedenih na probiotičkim pripravcima, pri čemu su odabrane optimalne *in vitro* metode za utvrđivanje funkcionalnosti. Ovim istraživanjima uspostavljen je učinkovit metodološki pristup za robusnu analizu velikog broja uzoraka, kako bi se osigurala kontrola kvalitete i posljedično inicirala provjera djelotvornosti probiotičkih pripravaka na hrvatskom tržištu. U ovoj disertaciji taksonomska identifikacija sadržanih bakterijskih sojeva određena je primjenom molekularne metodologije što je rezultiralo provjerom prisutnost navedenih probiotičkih sojeva i eliminacijom moguće prisutnost kontaminirajućih sojeva, odnosno neprobiotičkih mikroorganizama. Najzastupljeniji probiotički bakterijski sojevi su, prema fiziološkim svojstvima, Gram-pozitivne, nepokretne i nesporigene bakterije, morfologije štapića ili koka, koje ne eksprimiraju enzim katalazu, a sintetiziraju mliječnu kiselinu u visokim koncentracijama i time provode uspješnu acidifikaciju supernatanata kulture tijekom prekonoćnog rasta, te su stoga preliminarno klasificirane kao bakterije mliječne kiseline (BMK). U izabranim probiotičkim pripravcima na hrvatskom tržištu pomoću API 50 CHL testa identificirani su sojevi iz roda *Lactobacillus*,

a BBL CRYSTAL™ ANR sustavom za identifikaciju, sojevi iz roda *Bifidobacterium*. Na temelju proteinskih profila dobivenih SDS-PAGE analizom ukupnih staničnih i površinskih proteina, izolirani sojevi su također svrstani, izradom dendrograma pomoću Gel Compare II programskog paketa, u rodove *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Između bakterijskih sojeva ustanovljena je niska pojavnost fenotipske rezistencije na antibiotike te su probiotički pripravci sigurni za primjenu. Osim karakterizacije fenotipskih karakteristika, analiza polimorfizma slučajno umnoženih fragmenata DNA omogućila je razlikovanje sadržanih sojeva koji su identificirani 16S rRNA sekvencioniranjem.

Funkcionalnost sojeva utemeljena je na *in vitro* karakterizaciji preživljavanja u simuliranih uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT). Sadržani sojevi iz probiotičkih pripravaka toleriraju koncentraciju žučnih soli, koje su prisutne *in vivo*, te u visokom broju preživljavaju tijekom inkubacije u simuliranom želučanom soku, a zatim tijekom direktnog prijelaza u simulirani sok tankog crijeva, što upućuje na otpornost pojedinih sojeva na uvjete GIT i hipotetsku mogućnost kolonizacije gastrointestinalnih niša. Funkcionalnim učincima probiotičkih sojeva doprinosi adhezija na intestinalnu sluznicu što je okarakterizirano definiranjem kapaciteta vezanja sojeva na mikrobna otapala, svojstvom autoagregacije, te adhezije sojeva na kolagen, laminin, fibronektin i mucin *in vitro*. *Lactobacillus reuteri* ima mogućnost vezanja na mucin. Iako, ovisno o pojedinom soju, bakterijske kulture pokazuju i potencijal asimilacije kolesterola i aktivnost hidrolaze žučnih soli, te antimikrobne učinke, to ukazuje na kolonizacijski potencijal u GIT, što je temelj za biomodulacijski učinak na sastav intestinalne mikrobiote, te time posljedično njihovu primjenu kao živih bioterapijskih pripravaka u domaćinu. Osim što je prema rezultatima među sojevima iz pripravaka potvrđena pojavnost fenotipova specifičnih za probiotičke bakterije, ovim istraživanjima je uspostavljen integrirani pristup koji podrazumijeva primjenu fenotipske karakterizacije i molekularne metodologije za identifikaciju sadržanih sojeva u svrhu provjere prisutnosti navedenih probiotičkih bakterija odnosno isključivanja prisutnosti neprobiotičkih bakterija, te su predložene optimalne *in vitro* metode za utvrđivanje funkcionalnosti.

Sadržaj

1. UVOD	14
2. OPĆI DIO.....	17
2.1. Bakterije mliječne kiseline iz roda <i>Lactobacillus</i> i <i>Bifidobacterium</i>	17
2.2. Provjera funkcionalnosti mikrobnih sojeva u probiotičkim pripravcima	21
2.3. Mehanizmi prilagodbe probiotičkih bakterija na uvjete tijekom proizvodnje i primjene	26
2.3.1. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija na uvjete promjene temperature.....	28
2.3.2. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija na uvjete visoke koncentracije kiselina	31
2.3.3. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija u uvjetima osmotskog šoka.....	33
2.3.4. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija na uvjete oksidativnog stresa	34
2.3.5. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija na uvjete visokog hidrostatskog tlaka i nedostatka hranjivih tvari	35
2.4. Bioaktivne molekule i komponente stanične stijenke značajne za probiotičke učinke	37
3. MATERIJALI I METODE	43
3.1. Materijali	43
3.1.1. Mikroorganizmi	43
3.1.2. Hranjive podloge za čuvanje i uzgoj mikroorganizama	45
3.1.3. Kemikalije	45
3.1.4. Uređaji i pribor	46
3.1.5. Liofilizirani probiotički pripravci dostupni na hrvatskom tržištu.....	47
3.2. METODE RADA	48
3.2.1. Fenotipske i genotipske karakteristike bakterijskih izolata	48
3.2.1.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	48
3.2.1.2. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom	48
3.2.1.3. Bojanje bakterijskih stanica po Gramu.....	48
3.2.1.4. KOH metoda.....	48
3.2.1.5. Katalaza test	49
3.2.1.6. Određivanje sporogenosti.....	49
3.2.1.7. Određivanje pH vrijednosti, postotka proizvedene mliječne kiseline i stvaranja plina	49
3.2.1.8. Fenotipska identifikacija bakterijskih sojeva pomoću API testa.....	50
3.2.1.9. Fenotipska identifikacija bakterijskih sojeva pomoću BBL CRYSTAL™ ANR testa	51
3.2.1.10. SDS-PAGE analiza.....	52
3.2.1.11. Ispitivanje osjetljivosti bakterija mliječne kiseline na različite antibiotike.....	54
3.2.1.12. Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika primjenom E-testa....	55
3.2.1.13. Izolacija genomske DNA	57
3.2.1.14. Lančana reakcija polimerazom.....	58
3.2.1.15. Metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA.....	59
3.2.1.16. DNA elektroforeza u gelu agaroze	60

3.2.1.17. Identifikacija bakterijskih sojeva sekvencioniranjem 16S rRNA gena	60
3.2.2. Testovi za karakterizaciju funkcionalnosti <i>in vitro</i>	61
3.2.2.1. Ispitivanje tolerancije bakterijskih sojeva na različite koncentracije soli i pH vrijednosti	61
3.2.2.2. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta	61
3.2.2.3. Turbidimetrijska metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja bakterijskih sojeva	61
3.2.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara ("Agar-spot-test metoda")	62
3.2.2.5. Ispitivanje autoagregacijskih i koagregacijskih svojstava bakterija mliječne kiseline	62
3.2.2.6. Bakterijska adhezija na otapala	63
3.2.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje slobodne kolne kiseline	64
3.2.2.8. Ispitivanje asimilacije prebiotičkih supstrata	64
3.2.2.9. <i>In vitro</i> adhezija na proteine ekstracelularnog matriksa	65
3.2.2.10. <i>In vitro</i> adhezija na glikoprotein mucin	65
4. REZULTATI	68
4.1. Identifikacija probiotičkih sojeva iz pripravaka	68
4.2. <i>In vitro</i> evaluacija funkcionalnih svojstava probiotičkih sojeva iz pripravaka	98
5. RASPRAVA	120
5.1. Identifikacija probiotičkih sojeva iz pripravaka	120
5.2. <i>In vitro</i> evaluacija funkcionalnih svojstava probiotičkih sojeva iz pripravaka	129
6. ZAKLJUČCI	139
7. LITERATURA	141
8. ŽIVOTOPIS	158

1. UVOD

1. UVOD

Temelj za primjenu pojedinih sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) kao probiotika su znanstvene spoznaje o korisnim učincima ovih bakterija na zdravlje domaćina. Probiotici prema definciji je jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi i životinja, djeluju korisno na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikrobiote probavnog sustava domaćina (FAO/WHO, 2002; Hill 2014). Osobito je atraktivna primjena probiotičkih bakterija, od strane farmaceutska industrije, kao bioterapeutika koji se razmatraju kao živi lijekovi za prevenciju ili terapiju bolesti prvenstveno gastrointestinalnog trakta, no i drugih poremećaja, dok je primjena probiotičkih kultura kao dodataka prehrani ili funkcionalnim dodaci hrani ili nutraceutici, značajno zastupljena među svjetskom populacijom (Šušković i sur., 2019; Šušković, 2009). Prema literaturi ustanovljeno je često nepodudaranje deklariranog sadržaja pripravaka i rezultata kontrole kvalitete za veliki broj analiziranih tržišnih liofiliziranih probiotičkih (Huys, 2006; Lewis 2016; Ullah i sur., 2019). Upravo ove spoznaje potakle su eksperte okupljene u ovlaštenim institucijama Europske komisije na raspravu o značaju definiranja sigurnosti primjene mikroorganizama koji se koriste u proizvodnji hrane (Gibson i sur., 2011). Naime, pretjerana komercijalizacija probiotička umanjuje značaj njihovog bioterapijskog potencijala, sa znanstveno dokazanim funkcionalnim učincima, a čija primjena je jedan od najučinkovitijih pristupa mikrobne terapije za modulaciju sastava mikrobiote i obuhvaća, prema najnovijem izrazu, koncept primjene biomodulatora (Martin i Langella, 2019). Stoga je u Europi pokrenuta inicijativa reidentifikacije bakterijskih sojeva koji se koriste kao probiotici da bi se osnovala banka probiotičkih sojeva kao temelj za daljnja istraživanja i uspostavljanje kontrole kvalitete pripravaka (Huys, 2006; Lewis 2016). Europska agencija za sigurnost hrane (*engl.* EFSA - European Food Safety Authority; 2009) izdaje upute za znanstvenu provjeru zdravstvenih tvrdnji koje se navode na deklaraciji proizvoda. Pri uvođenju smjernica o znanstvenim zahtjevima za procjenu zdravstvenih tvrdnji probiotičkih pripravaka, EFSA naglašava potrebu provođenja fizioloških testova i kliničkih ispitivanja za dokazivanje funkcionalnosti probiotika, jer postojeća ispitivanja mnogih probiotičkih pripravaka ne zadovoljavaju u potpunosti stroge kriterije prema kojima bi se moglo definirati njihovo korisno djelovanje na zdravlje i sigurnost primjene u svjetskoj populaciji (EFSA, 2011).

U komercijalno dostupnim probiotičkim proizvodima najčešće se koriste BMK prvensteno iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, koje su Gram-pozitivne, nesporogene, štapićaste bakterije, koje rastu u mikroaerobnim ili anaerobnim uvjetima na kompleksnim hranjivim

podlogama te proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. Na europskoj razini postoje preporuke za mikroorganizme koji se koriste u probiotičkim pripravcima, no nisu točno definirane metode za procjenu sigurnosti probiotičkih sojeva (Campedelli i sur., 2019). Primjena molekularno-genetičkih metoda, a osobito suvremenih omičkih metodologija značajna je u biotehnologiji hrane za identifikaciju i karakterizaciju fizioloških aktivnosti probiotičkih mikroorganizama za definiranje terapijske primjene ili primjene starter kultura u fermentacijskim procesima, što je doprinos kvaliteti i sigurnosti fermentirane hrane (Dobson i sur., 2012). Zbog gore navedenog, EFSA predlaže smjernice za procjenu sigurnosti mikroorganizama u hranidbenom lancu s QPS statusom (*engl.* Qualified Presumption of Safety) pri čemu se za korištenje mikroorganizama oslanja na postojeće iskustvo, a navedeni status odgovara GRAS statusu (*engl.* Generally Regarded As Safe) Američke uprave za hranu i lijekove (*engl.* United States Food and Drug Administration, US FDA). Cilj istraživanja je identifikacija bakterijskih sojeva prisutnih u liofiliziranim probiotičkim pripravcima na hrvatskom tržištu te ispitivanje funkcionalnosti identificiranih bakterijskih sojeva. Identifikacija prisutnih bakterija će se provesti na temelju fenotipskih i genotipskih značajki te pohrana sojeva i ispitivanje njihovih funkcionalnih svojstava koja daju probiotički atribut konačnom proizvodu. Provođenjem fenotipske i genotipske identifikacije bakterijskih sojeva u liofiliziranim probiotičkim pripravcima na hrvatskom tržištu primjenom različitih biokemijskih testova i molekularnih genetičkih metoda definirati će se točnost deklariranog sadržaja u probiotičkim pripravcima koji se nalaze na tržištu. Istraživački aspekti disertacije usmjereni su prema poboljšanju pristupa za validaciju probiotičkih bakterija iz raznovrsnih probiotičkih pripravaka koji, usprkos značajnim bioterapijskim učincima za modulaciju sastava intestinalnog mikrobioma, uslijed komercijalizacije i nedostatka sustava kontrole kvalitete, nemaju definiranu uniformnu primjenu prvenstveno zbog nedostatka definiranih zakonskih propisa na nacionalnoj odnosno neusklađenosti legislative na međunarodnoj razini. Stoga provjera funkcionalnih svojstava identificiranih bakterijskih sojeva, sukladno preporukama Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), za znanstveno dokazivanje zdravstvenih tvrdnji navedenih na probiotičkim pripravcima, će pridonijeti nadzoru distribucije komercijalnih probiotičkih pripravaka na hrvatskom tržištu, pri čemu će se odabrati i najučinkovitije metode za utvrđivanje funkcionalnosti.

2. OPĆI DIO

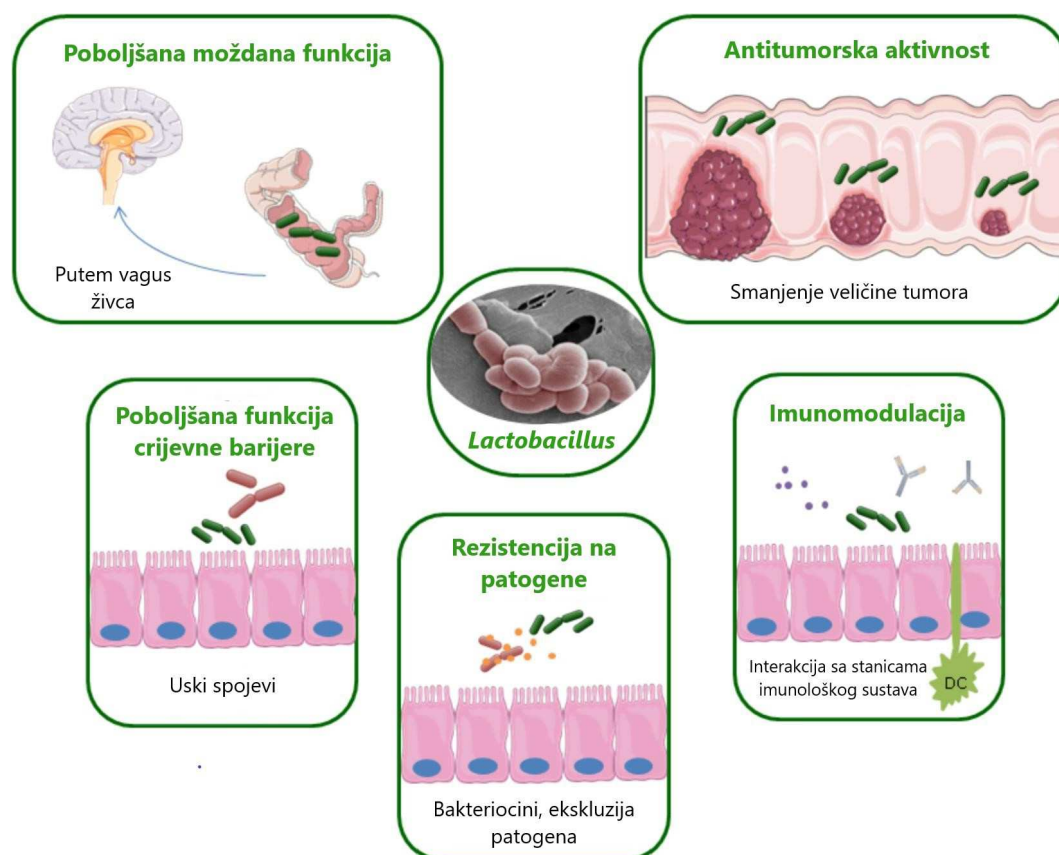
2. OPĆI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*

Bakterije rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* su dio autohtone mikrobne populacije različitih staništa. Pojedini sojevi izolirani su iz gastrointestinalnog trakta (GIT), urogenitalnog trakta i usne šupljine čovjeka (Alterman i sur., 2005; Leboš Pavunc i sur., 2012). Bakterije iz roda *Lactobacillus* imaju niski sadržaj G+C baza u genomu, a klasificiraju se pod koljeno *Firmicutes*, a bakterije iz roda *Bifidobacterium* imaju visoki sadržaj G+C baza u genomu te pripadaju pod koljeno *Actinobacteria*. Oba roda BMK sintetiziraju mliječnu kiselinu i/ili octenu kiselinu s antimikrobnim učinkom (Šušković i sur., 2010). Pojedini sojevi sintetiziraju i druge komponente s antimikrobnim djelovanjem poput vodikovog peroksida, etanola, diacetila, acetaldehida te specifične spojeve bakteriocine. Antimikrobno djelovanje može biti posljedica inhibicijskog učinka više različitih spojeva (Dobson i sur., 2012; Coman i sur., 2014; Liévin-Le Moal i Servin, 2014; Butorac i sur., 2020). Upravo je kompeticija bakterija iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* s patogenim mikroorganizmima u hrani ili uzročnicima infekcija, jedan od mehanizama inhibicije rasta neželjenih mikroorganizama (Šušković i sur., 2010). Takvi sojevi, osim doprinosa u oblikovanju arome, teksture i hranjivih vrijednosti fermentiranih proizvoda, mogu spriječiti kvarenje hrane i posredno utjecati na sprječavanje infekcije kod čovjeka. Na udio ovih bakterija u ukupnoj mikrobnoj populaciji utječu specifični uvjeti okoliša poput pH vrijednosti, dostupnosti kisika, dostupnih supstrata za rast i interakcija s drugim bakterijskim vrstama. Za razumijevanje mehanizama probiotičkog djelovanja potrebno je razumijevanje fiziologije bakterijske stanice i molekularnih mehanizama prilagodbe bakterijskih stanica na različite uvjete mikrookoliša, čiji se potencijal može primijeniti za očuvanje funkcionalnosti bakterija u probiotičkim pripravcima, bilo tijekom industrijske proizvodnje ili primjene *in situ*. Bakterije iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* su najčešće okarakterizirane kao probiotici (Kos i sur., 2003, Leboš Pavunc i sur., 2019). Da bi se neki mikroorganizam mogao primijeniti kao probiotik mora zadovoljiti opće, tehnološke i funkcionalne izborne kriterije (Šušković i sur., 2011). Opći kriteriji uključuju podrijetlo i preciznu taksonomsku identifikaciju probiotičkih bakterija, zdravstvenu sigurnost, osobito provjeru prisutnosti rezistencije na antibiotike. Ako genom potencijalne probiotičke bakterije sadrži gene rezistencije na antibiotike može doći do horizontalnog prijenosa tih gena na komensalne sojeve intestinalne mikrobiote ili pak oportune patogene (Campedelli i sur., 2019). Dodatno probiotičke bakterije trebaju biti

otporne prema niskim pH vrijednostima, želučanom soku, soku gušterače i žučnim solima. Tehnološki kriteriji odnose se na preživljavanje i zadržavanje aktivnosti probiotičkih bakterija tijekom pripreme i skladištenja probiotičkog proizvoda. Funkcionalni kriteriji uključuju specifična svojstva probiotičkih bakterija kao što su adhezija na crijevni epitel koja ovisi o svojstvima autoagregacije i koagregacije s patogenima, antimikrobno djelovanje prema patogenim mikroorganizmima, poticanje imunološkog odgovora, promjene mikrobnog metabolizma u probavnom traktu (Jensen i sur., 2014; Comon i sur., 2014).

S aspekta funkcionalnosti značajno je razumijevanje preciznih mehanizama imunomodulacije probiotičkih sojeva (Berggen i sur., 2011; Fanning i sur., 2012; Lebeer i sur., 2012; Uroić i sur., 2016). Prema kliničkim istraživanjima primjena probiotika utječe na suzbijanje upalnih bolesti crijeva i gastrointestinalnih infekcija, a dokazani su i učinci pri korištenju probiotika oralno ili sistemski, kod kroničnih oboljenja jetre, sindroma disfunkcije više organa i autoimunih bolesti. Trenutne spoznaje o interakciji laktobacila i imunološkog sustava upućuju na to da su neophodni za razvoj homeostaze u GIT (Hill i sur., 2018). Imunomodulacija probiotičkim sojevima razlikuje se s obzirom na vrstu, koncentraciju stanica i imunitet domaćina (Peters i sur., 2019).



Slika 1. Zdravstveni učinci probiotičkog djelovanja u domaćinu (preuzeto od Gill i sur., 2018).

Sva navedena funkcionalna svojstva moraju se ispitati pojedinačno za svaki soj mikroorganizma koji se istražuje kao probiotički soj (Slika 1.). Uz *in vitro* istraživanja neophodno je provesti i detaljne *in vivo* studije. U Tablici 1. su navedeni zdravstveni učinci, te mehanizmi koji su temelj probiotičkog djelovanja pojedinih sojeva. Pojedine istraživačke grupe istražuju učinak probiotičkih mikroorganizama u suzbijanju kancerogenih procesa u probavnom sustavu (Sanders i sur., 2019). U polaznoj karakterizaciji, ključni kriterij je precizna taksonomska identifikacija bakterijskog soja sadržanog u probiotičkom pripravku. Za identifikaciju se primjenjuju fenotipske i genotipske metode. Biokemijski testovi za karakterizaciju fenotipskih svojstava su lako izvedivi jer su standardizirani za ispitivanje mikrobnog metabolizma ugljikohidrata i ostalih supstrata. Iako su fenotipske analize dostupne i omogućuju preliminarnu identifikaciju probiotičkog soja, rezultate analize je potrebno provjeriti molekularno-genetičkim metodama za identifikaciju i klasifikaciju bakterijskih sojeva poput sekvencioniranja 16S rRNA gena, gel elektroforeza u promjenjivom električnom polju (engl. Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE), gel elektroforeze u denaturirajućem gradijentu (engl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), metode slučajnog umnožavanja polimorfne DNA (engl. Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) ili analizom polimorfizma dužine umnoženih fragmenata (engl. Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP).

Tablica 1. Najvažnija svojstva i mehanizmi probiotičkog djelovanja prilagođeno prema Merciner i sur. (2003).

Promjene metabolizma laktoze kod domaćina:
β-galaktozidaza probiotičkog soja razgrađuje laktozu
Pozitivni učinci na intestinalnu mikrobiotu:
Uspostavljanje ravnoteže sastava, smanjenje koncentracije toksičnih produkata metabolizma
Antibakterijsko djelovanje
Prevenција infekcija GIT:
Poticanje proizvodnje antitijela
Stimulacija sistemskog i sekretornog imunoodgovora
Promjene uvjeta u GIT inhibiraju patogene sojeve (pH, proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina, bakteriocina)
Promjene mjesta vezanja toksina
Promjene sastava crijevne mikrobiote
Adhezija na intestinalnu sluznicu što sprječava adheziju patogenih sojeva
Natjecanje za hranjive tvari
Modulacija imunološkog sustava:
Jačanje nespecifičnog imunoodgovora pri infekcijama
Povećanje fagocitotne aktivnosti u bijelim krvnim stanicama
Povećanje IgA u serumu (pri infekciji atenuiranim sojevima <i>Salmonella typhimurium</i>)
Proliferacija epitelnih limfocita
Regulacija ravnoteže Th1/Th2, poticanje sinteze citokina
Ublažavanje upalnih i alergijskih reakcija:
Uspostavljanje homeostaze imunološkog sustava
Regulacija sinteze citokina
Prevenција translokacije antigena u krvotoku
Doprinos sprječavanju pojave raka debelog crijeva:
Vezanje mutagena
Inaktivacija karcinogenih tvari
Promjena aktivnosti mikroorganizama crijevne mikrobiote
Imuno odgovor
Učinak na koncentraciju sekundarnih žučnih soli
Krvni lipidi, srčane bolesti:
Asimilacija kolesterola
Promjene aktivnosti enzima hidrolaze žučnih soli
Antioksidativni učinak
Učinak u snižavanju pojave visokog krvnog tlaka:
Peptidazna aktivnost u mliječnim proizvodima doprinosi sintezi antihipertenzivnih tripeptida (inhibitori angiotenzin konvertirajućih enzima)
Komponente stanične stijenke imaju učinak inhibitora angiotenzin konvertirajućih enzima
Urogenitalne infekcije:
Adhezija na epitelne stanice urogenitalnog trakta
Kompetitivna ekskluzija patogena
Inhibicija sinteze štetnih tvari (H ₂ O ₂ , biosurfaktanta)
Infekcije uzrokovane <i>Helicobacter pylori</i> :
Kompetitivna ekskluzija
Sinteza mliječne kiseline
Smanjenje aktivnosti ureaze <i>H. pylori</i>
Regulacija metabolizma (konstipacija)

2.2. Provjera funkcionalnosti mikrobnih sojeva u probiotičkim pripravcima

Primjena probiotičkih pripravaka za profilaksu i u liječenju zdravstvenih poremećaja, te za poboljšanje zdravstvenog statusa je trend prepoznat među svjetskom populacijom. Svijest o važnosti načina prehrane i povezanosti sastava intestinalne mikrobiote i zdravlja je utjecala na optimiranje tehnologije proizvodnje, povećanje biotehnološke proizvodnje te plasiranje mnogobrojnih probiotičkih proizvoda s deklariranim tvrdnjama o korisnim učincima za zdravlje čovjeka u svim dobnim skupinama, započevši s novorođenčecom. Na tržištu je dostupan široki dijapazon probiotičkih pripravaka brojnih proizvođača dodataka prehrani, za specifičnu primjenu s različitim zdravstvenim tvrdnjama (Herbel i sur., 2013). Probiotički pripravci preporučuju se za poticanje imuniteta domaćina s ciljem zaštite od patogena sprječavanjem kolonizacije nepoželjnih bakterija te za uspostavljanje ravnoteže sastava intestinalne mikrobiote. Probiotički učinci su utemeljeni na potencijalu ovih bakterija da doprinose sprječavanju propusnosti crijevnog epitela, eliminaciji patogena koagregacijom ili kompetitivnom ekskluzijom natjecanjem za hranjive sastojke i mjesta vezanja te modulacijom imunološkog odgovora (Ansari i sur., 2019; Lebeer i sur., 2020). Pojedini probiotički sojevi sintetiziraju specifične biomolekule ili eksprimiraju enzime poput proteinaza koje posreduju u nastajanju biopeptida (Beganović i sur., 2013). Mogu sintetizirati i raznovrsne metabolite poput vitamina B, gama-amino-maslačne kiseline (*engl.* gamma-aminobutyric acid, GABA), bakteriocine i makromolekule poput S-proteina ili egzopolisaharida (Siragusa i sur., 2007; Field i sur., 2018; Sanders i sur., 2019; Butorac i sur., 2020; Butorac i sur., 2021). Primjena probiotičkih proizvoda osim kao dodataka prehrani ekspandira i u kliničku primjenu kao bioterapeutika za raznovrsne zdravstvene poremećaje. Među korisnim učincima za zdravlje GIT, probiotičke bakterije su se pokazale učinkovite u ublažavanju simptoma sindroma iritabilnog crijeva, pri tome je terapijski učinak zabilježen kod pacijenata s Chronovom bolesti, no još se uspješniji pokazao za pacijente s ulceroznim kolitisom. Također se probiotička terapija primjenjuje za uklanjanje simptoma putničke dijareje i dijareje kao posljedice antibiotske terapije, te akutne dijareje u dječjem uzrastu, no i kod prijevremeno rođene djece kod koje je uslijed primjene probiotika uočena smanjena incidencija nekrotizirajućeg enterokolitisa (Lewis i sur., 2016; Ansari i sur., 2019). Probiotički pripravci koji sadrže sojeve roda *Bifidobacterium* često se koriste u odjelima za neonatologiju u jedinicama intenzivne njege zbog GRAS (*engl.* generally regarded as safe) statusa, no još značajnije zbog rasprostranjenosti i zastupljenosti u GIT zdrave dojenčadi i znanstveno dokazanih korisnih učinaka na zdravlje (O'Connell i sur., 2011). Kod dojenčadi, u čijoj

mikrobioti GIT su značajno zastupljene bakterije iz roda *Bifidobacterium*, smanjene su nuspojave na pojedina cjepiva, imaju veću otpornost na infekcije pojedinim patogenima i pojačanu funkciju crijevne barijere (Lewis i sur., 2016). Bifidobakterije doprinose pravilnom uspostavljanju stečenog i urođenog imunološkog sustava dojenčeta, i prilikom kolonizacije GIT djeteta ublažuju pojavnost upalnih procesa (Lewis i sur., 2016).

Ova alternativna primjena kao bioterapijskih pripravaka zahtjeva detaljnu procjenu sigurnosne primjene i uspostavljanje ispravnih i preciznijih mjera kontrole kvalitete tijekom proizvođačke prakse unutar aspekta zdravstvene sigurnosti ciljane zdravstvene skupine (Patro i sur., 2016). Podaci navedeni na deklaraciji proizvoda trebaju sadržavati informacije o sastavu mikrobnih kultura, broju bakterijskih stanica po gramu ili volumenu pripravka (*engl.* colony-forming unit, CFU) i naveden rok valjanosti. U literaturi je opisna primjena suvremene tehnologije sekvencioniranja metagenoma i kultivacije prisutnih mikrobnih vrsta u pripravcima, te je ustanovljena neispravnosti deklaracija probiotičkih pripravaka s obzirom na broj mikrobnih stanica i sastav mikrobnih sojeva (Lewis i sur., 2016; Patro i sur., 2016; Lugli i sur., 2019; Ansari i sur., 2019; Ullah i sur., 2020). Tako je prema rezultatima analize probiotičkih pripravaka na američkom tržištu ustanovljena učestala nekonzistencija s deklaracijama na proizvodu, gdje od ukupno 13 proizvoda samo 4 sadrže ispravnu deklaraciju, što je uzrokovalo zabrinutost znanstvene zajednice o sigurnosti primjene ovakvih pripravaka (Patro i sur., 2016). Sličan je zaključak proizašao iz rezultata istraživanja provjere ispravnosti probiotičkih proizvoda na europskom tržištu, gdje je gotovo polovica testiranih pripravaka neispravno deklarirana. Lewis i sur. (2016) su upravo u svom istraživanju potvrdili da od 16 probiotičkih pripravaka koji deklariraju prisutnost bifidobakterija u svom sastavu, samo je na jednom pripravku ispravno navedena taksonomija soja. Štoviše, ustanovili su da većina proizvoda sadrže vrste iz drugih rodova što upućuje na nedostatak sustavne kontrole kvalitete probiotičkih proizvoda.

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (*engl.* World Health Organisation, WHO) i novijoj definiciji Međunarodnog znanstvenog udruženja za probiotike i prebiotike (*engl.* International Scientific Association of Probiotics and Prebiotic, ISAPP, 2014), probiotik je proizvod koji sadrži detaljno okarakterizirane sojeve živih mikroorganizama u dovoljnoj koncentraciji mikrobnih stanica da može doprinijeti zdravstvenim učincima domaćina (Hill i sur., 2014). Prema toj definiciji ključne značajke probiotičkih proizvoda su vijabilnost, te broj mikroorganizama potreban za postizanje specifičnih učinaka. Stoga se u skladu s razvojem probiogenomike, primjenjuju rutinske mikrobiološke metode, ali i suvremeni istraživački pristupi za ispitivanje funkcionalnosti prisutnih bakterijskih sojeva u pripravcima (Patro i sur.,

2016). Ullah i sur. (2019) proveli su uzgoj na selektivnim hranjivim podlogama, na MRS hranjivom agaru za laktobacile i M17 hranjivom agaru za laktokoke i pristupe sekvencioniranja nove generacije, kako bi proveli mikrobiološku analizu, te definirali sastav prisutne bakterijske populacije i time hipotetski moguću kontaminaciju u komercijalnim probiotičkim proizvodima na kineskom tržištu. Autori su primijenili tehnologiju Illumina HiSeq-2000 platforme za sekvencioniranje i razvili bioinformatički sustav za analizu podataka (Ullah i sur., 2019). Razvijen je pristup za analizu i provjeru ispravnosti probiotičkih sojeva unutar pripravaka dostupnih na tržištu. Lewis i sur. (2016) primijenili su metodu lančane reakcije polimeraze (PCR) za brzu i učinkovitu identifikaciju *B. longum*, na razini podvrste, te su rezultate dodatno potvrdili usporedbom s „mock“ mikrobnom zajednicom (umjetno stvorena mikroba zajednica definiranog sastava kultivirana u *in vitro* laboratorijskim uvjetima). Za identifikaciju prisutnih mikrobnih vrsta primjenjuje se i sekvencioniranje metagenoma, izolacija DNA izravno iz sadržaja probiotičkih proizvoda, bez koraka kultivacije na selektivnim hranjivim podlogama, što omogućuje provjeru podataka navedenih na deklaraciji (Patro i sur., 2016; Ullah i sur., 2019). Analiza metagenoma pomoću pristupa koji je neovisan o kultivaciji mikroorganizama je precizna analitička metodologija, koja u kratkom vremenskom periodu omogućuje definiranje sastava i detektira eventualno prisutnu kontaminaciju neželjenim mikroorganizmima u probiotičkom pripravku. Ovim pristupom, upravo zbog zaobilazanja koraka kultivacije mikrobnih vrsta, nije moguće definirati vijabilnost (preživljavanje) deklariranih mikroorganizama, što je presudno za postizanje funkcionalnog učinka prema definiciji probiotičkog soja. Prema navedenom, primjena sekvencioniranja zajedno s tradicionalnim mikrobiološkim pristupima kultivacije na selektivnim hranjivim podlogama omogućuju precizniju kvalitativnu i kvantitativnu procjenu probiotičkih pripravaka.

Ullah i sur. (2019) primijenili su sekvencioniranje metagenoma za provjeru dva probiotička proizvoda i ustanovili da je sastav mikroorganizama bio u skladu s podacima navedenim na deklaraciji. Iako iz jednog od ispitivanih pripravaka nije bilo moguće provesti kultivaciju mikroorganizama na hranjivim podlogama, metagenomskom analizom ustanovljena je prisutnost i identificirane su 4 mikrobne kulture. Isto tako za jedan pripravak koji prema deklaraciji sadrži 15 različitih mikrobnih kultura, samo pola sojeva je uzgojeno na selektivnim hranjivim podlogama, ali prisutnost svih 15 vrsta je identificirano sekvencioniranjem, ipak ustanovljene su kod pojedinih pripravaka neispravnosti u deklaraciji. U drugom istraživanju Ansari i sur. (2019) su iz različitih probiotičkih pripravaka i napitaka, koji se primjenjuju kao dodatak prehrani, izolirali na selektivnim hranjivim podlogama *Bacillus coagulans*, *B.*

subtilis, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *Saccharomyces boulardii* te primijenili sekvencioniranje 16S rRNA gena i MALDI-ToF (engl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) spektrometriju masa za identifikaciju.

Spoznaje o zdravstvenim implikacijama probiotičkih proizvoda koje proizlaze iz specifičnih svojstava pojedinog bakterijskog soja osobito su značajne za zdravstvene skupine u kojima se primjenjuju za ciljanu terapiju, stoga je neophodno na deklaraciji izvijestiti identifikaciju prisutne mikrobne vrste na taksonomskoj razini soja. Prema podacima iz literature, često na uzorcima analiziranih probiotičkih pripravaka nije naveden podatak za soj, već se navodi samo prisutna vrsta, što nije u skladu s legislativom (Ansari i sur., 2019).

Broj znanstvenih istraživanja s ključnom riječi probiotik neprestano se povećava, te se provode opsežna klinička istraživanja za karakterizaciju specifičnih učinaka sojeva koji su detaljno opisani u literaturi, poput *L. rhamnosus* LGG®. No unatoč velikom broju znanstvenih informacija postoji disperzija između provedenih istraživanja, te su neophodne sustavne i kontrolirane studije (de Simone, 2018). Da bi se kliničkim ispitivanjima mogli sakupiti pouzdani podaci o učincima primjene pojedinih probiotičkih sojeva, što bi kliničarima omogućilo temelje za ispravne preporuke u propisivanju primjene probiotika, potrebno je povećati i precizirati standarde za identifikaciju sojeva i regulativu dostupnih pripravaka.

Proizlazi da razumijevanje fiziologije korisnih mikroorganizama doprinosi definiranju terapijskih učinaka probiotičkih pripravaka jer upravo krajnji produkti mikrobnog metabolizma poput mliječne kiseline i kratkolančanih masnih kiselina su značajni za učinke na zdravlje. Različiti eksperimentalni pristupi se primjenjuju za karakterizaciju mikrobnih metaboličkih putova koje se očituju ekspresijom specifičnog „probiotičkog“ fenotipa. Proteomički pristupi, uključujući transkriptomiku, funkcionalna genomika i analize metaboličkih putova odnosno metabolomika te primjena metaboličkog inženjerstva su strategije, koje omogućuju preusmjeravanje metaboličkih putova s ciljem postizanja pojačanih probiotičkih svojstava soja. Za osiguranje dostupnosti potrebnih izvora ugljika s ciljem usmjeravanja metabolizma prema stvaranju željenih metabolita, prehrana se može nadopuniti specifičnom hranom ili prebiotičkim vlaknima u obliku dodataka prehrani. Razumijevanje nutritivnih preferencija korisnih bakterija doprinijeti će razvoju učinkovitih proizvoda sa sinbiotičkim učinkom, odnosno pripravaka koji sadrže probiotike i prebiotike (Ansari i sur., 2019).

Prilikom odabira probiotičkog soja, s obzirom na ekspanziju probiotičkih pripravaka na tržištu, otežavajuća je okolnost što često marketinška prezentacija pojedinih pripravaka nije u skladu sa stvarnim učincima sojeva iz pripravka, a navedeno je posljedica nepotpune i

neusklađene regulative probiotičkih proizvoda. U SAD, prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (*engl.* Food and Drug Administration; FDA), probiotici su kategorizirani kao dodaci ili sastojci prehrane. Smatra se da sojevi mikroorganizama, sadržani u probiotičkim pripravcima imaju GRAS status (*engl.* Generally Regarded As Safe) i ne provodi se detaljna regulatorna kontrola i potvrda učinkovitosti. Iako se za mnoge probiotičke sojeve provodi procjena specifičnih učinaka unutar kliničkih studija, na deklaracijama pripravka nije uvijek navedena identifikacija na razini soja. Pojedina probiotička svojstva karakteristična su za čitav rod ili vrstu, no ipak nepotpuna ili čak netočna deklaracija probiotičkih pripravaka s aspekta kontrole kvalitete i sigurnost primjene je propust osobito s obzirom na činjenicu da prisutne mikrobne vrste nemaju probiotičke učinke klinički ispitanih sojeva. Dodatni je izazov što su kod pojedinih sojeva ustanovljene promjene u funkcionalnim svojstvima, i time probiotičkom djelovanju, kao posljedica različitih uvjeta proizvođačke prakse, te dodatkom preostalih sastojaka pripravka. Grześkowiak i sur., (2011) usporedili su 15 pripravaka različitih proizvođača, te su iz 14 uspješno izolirali i potvrdili identifikaciju *L. rhamnosus* GG te toleranciju sojeva na kisele uvjete i adheziju na intestinalni mukus, no ustanovili su da izolati iz nekoliko pripravaka nisu podjednako učinkoviti u ekskluziji različitih patogena, kompeticijom ili inhibicijom. Propisivanje probiotičkih pripravaka mora biti utemeljeno na postavkama znanstvenih istraživanja i kliničkih studija. Preživljavanje sojeva prilikom primjene i moguća kontaminacija mikroorganizmima, uključujući patogene sojeve, ključni su izazovi u kliničkoj primjeni. Iako većina sojeva ima GRAS status, neophodno je provjeriti identifikaciju prisutnih sojeva prilikom provođenja znanstvenih istraživanja i kliničkih ispitivanja, kako bi se osigurala ispravna interpretacija generiranih podataka. Kako se radi o korisnim, nepatogenim mikroorganizmima, pogrešna deklaracija navođenjem neispravne taksonomske identifikacije, vjerojatno neće dovesti do rizika za pacijente, no može voditi do izostanka učinka, a u kliničkim studijima do donošenja pogrešnih zaključaka, osobito jer su pojedina probiotička svojstva karakteristična za soj. Potrebno je primijeniti precizne metode identifikacije koje će omogućiti razlikovanje podvrsta poput *B. longum* subsp. *longum* i *B. longum* subsp. *infantis*. Stoga je neophodno provoditi sustavnu i kontinuiranu provjeru probiotičkih pripravaka, a osobito za probiotičke pripravke za koje je uspostavljena validirana, dobra proizvođačka praksa.

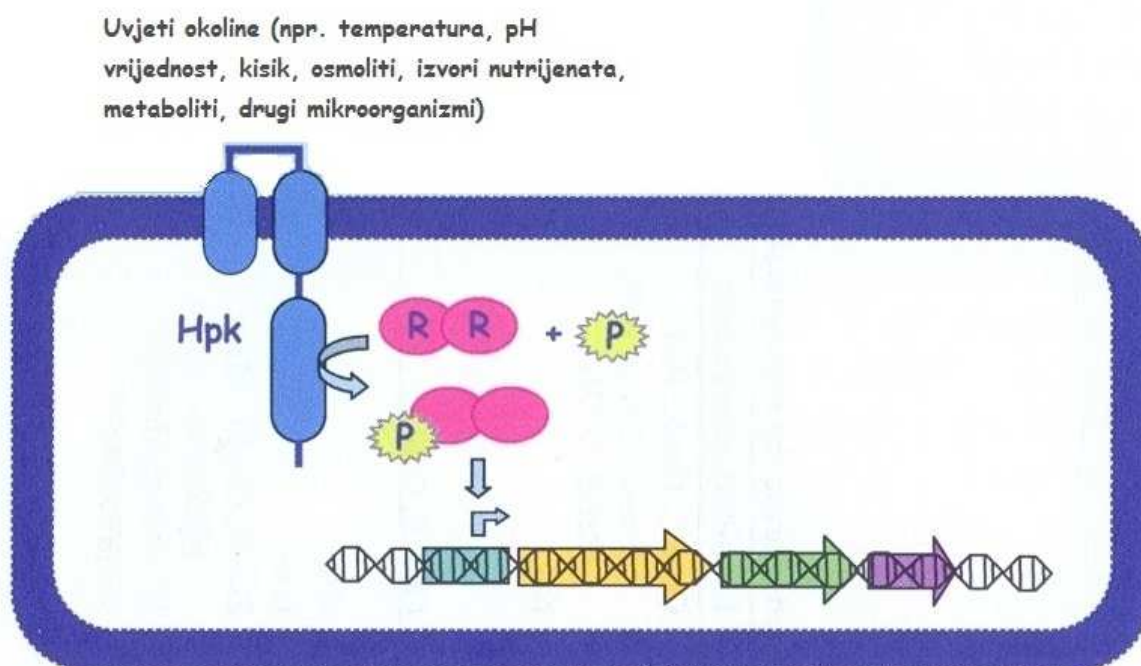
2.3. Mehanizmi prilagodbe probiotičkih bakterija na uvjete tijekom proizvodnje i primjene

Za karakterizaciju molekularnih mehanizama probiotičkog djelovanja, temeljno je razumijevanje mehanizama stanične prilagodbe na specifične uvjete mikrookoliša. Komparativnom analizom genoma bakterija iz roda *Lactobacillus* ustanovljene su promjene ekspresije specifičnih gena kao rezultat prilagodbe stanica na nepovoljne uvjete okoliša (Goh i Klaenhammer, 2009). U Tablici 2. prikazana je raznovrsnost ekoloških staništa iz kojih su izolirane pojedine vrste iz roda *Lactobacillus*, te veličina njihovih genoma. Primjerice prilikom rasta u mlijeku, smanjena je ekspresija gena koji kodiraju za enzime metabolizma ugljikohidrata i biosinteze aminokiselina i kofaktora, a povećana je ekspresija gena za transportne proteine peptida i hidrolizu te time slabija metabolička aktivnost stanice (Callanan i sur., 2008).

Tablica 2. Stanište i veličina genoma pojedinih bakterijskih vrsta iz roda *Lactobacillus* (Goh i Klaenhammer, 2009).

Ekosustav	<i>Lactobacillus</i> soj	Veličina genoma (Mb)
GIT čovjeka	<i>L. gasseri</i> ATCC 33323	1,93
	<i>L. johnsonii</i> NCC533	1,99
	<i>L. plantarum</i> WCFS1	3,31
	<i>L. reuteri</i> DSM20016	1,99
	<i>L. reuteri</i> JMC1112	2,04
	<i>L. salivarius</i> UCC118	1,83
	<i>L. ruminis</i> ATCC 25644	2,14
GIT svinje	<i>L. amylovorus</i> GRL1118	1,89
	<i>L. johnsonii</i> ZLJ010	1,99
GIT goveda	<i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i>	1,92/2,15-2,37/
	<i>L. ruminis</i> ATCC 27782	2,06
Povrće	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>	3,25/2,57/
	<i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i>	2,01/2,49
Kompost	<i>L. curvatus</i> , <i>L. coryniformis</i>	1,93/2,84
Silaža	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>	3,3/2,9/
	<i>L. reuteri</i> , <i>L. buchneri</i>	1,99/2,5
Kiseli kupus	<i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i>	1,8/1,7-2,0/
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>	1,81-2,01/
Pekarski proizvodi	<i>L. brevis</i> ATCC367, <i>L. plantarum</i>	2,34/ 3,25
	<i>L. sanfranciscensis</i>	1,37
Sirevi	<i>L. casei</i> ATCC334, <i>L. plantarum</i>	2,91/ 3,22
	<i>L. helveticus</i> DPC4571	2,08
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC11842	1,86
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC BAA-365	1,86
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	1,91
Fermetirano mlijeko	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	1,85/
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranoferiens</i>	1,99/2,5/2,11
Kobasice	<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23 K	1,88
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i>	/1,88-2,01
Vino	<i>L. plantarum</i>	3,32
Pivo	<i>L. brevis</i>	2,67-2,92

L. acidophilus, *L. gasseri* i *L. johnsonii*, izolirane iz GIT, u genomu sadrže gene za enzime koji doprinose preživljavanju u nepovoljnim uvjetima prisutnim u želucu te potiču interakcije s intestinalnom sluznicom. Veličina genoma *L. casei* i *L. plantarum* iznosi 2,9 Mb odnosno 3,3 Mb i u usporedbi s genomima srodnih vrsta je veća (Tablica 2.), a sadrži značajan udio gena koji kodiraju za regulatorne i transportne proteine (Kleerebezem i sur., 2010). Regulacija transkripcije kod vrsta iz roda *Lactobacillus* posredovana je dvokomponentnim regulatornim sustavima (*engl.* two-component regulatory systems, TCS). TCS se sastoji od histidin protein kinaze (HPK) u staničnoj membrani i citoplazmatskog regulatora (*engl.* response regulator, RR), koji regulira ekspresiju specifičnih gena (Slika 2.). TCS reguliraju prilagodbu bakterijske stanice na promjene uvjeta mikrookoliša, poput naglih promjena temperature, niskih koncentracija kiselina, visokih koncentracija žučnih soli, promjena osmolarnosti i raspoloživosti hranjivih tvari, te na promjene koncentracije signalnih molekula u autoindukciji (*engl.* quorum sensing, QS) (Sturme i sur., 2005).



Slika 2. Pojednostavljen prikaz mehanizma prijenosa signala posredovanjem dvokomponentnog regulatornog sustava (*engl.* two-component regulatory systems, TCSs). Pri promjeni uvjeta mikrookoliša, histidin protein kinaza HPK u staničnoj membrani aktivira citoplazmatski „response“ regulator RR pomoću fosfatne skupine P. Aktivirani RR utječe na ekspresiju specifičnih gena (De Angelis i Gobetti, 2011).

2.3.1. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija na uvjete promjene temperature

Prilikom naglih povišenja temperature mikrookoliša povećana je ekspresija skupine HSP proteina, proteina toplinskog šoka (*engl.* heat shock proteins, HSPs), membranskih serin proteinaza iz HtrA/DefP porodice, Clp multimernog kompleksa, te HSPs proteina niskih molekulskih masa (*engl.* sHSPs - small heat-shock proteins) u stanicama laktobacila. Ako su stanice prethodno izložene subletalnom toplinskom stresu, inducira se sinteza ovih proteina, koji su dio specifičnog staničnog odgovora, a eksprimiraju se pojačano i prilikom drugih nepovoljnih uvjeta mikrookoliša, kada su dio općeg staničnog odgovora na stres. Otpornost stanica vrste *L. helveticus* na toplinu je uspješnija nakon izlaganja bakterijskih stanica blagom toplinskom šoku (Tablici 3). Prilikom blažih promjena temperature mikrookoliša HSP proteini se djelomično induciraju. Analizom proteina sojeva iz roda *Lactobacillus* 2D-elektroforezom ustanovljena je povećana ekspresija HSP proteina multienzimskog kompleksa DnaK (DnaK, DnaJ i GrpE) i GroEL (GroEL i GroES) (Altermann i sur., 2005). DnaK/DnaJ i GroES/GroEL se mogu asocirati s pojedinim proteinima, te utjecati na ponovno vezanje, preslagivanje kemijski denaturiranog proteina (Walker i sur., 1999). Kod bakterija vrsta *L. sakei*, *L. johnsonii* i *L. acidophilus* regulacija *dnaK* operona se odvija na razini transkripcije koja se inducira pri povišenim temperaturama i u uvjetima nakupljanja visokih koncentracija etanola i soli. HrcA protein bakterije *L. sakei* je supresor i sprječava ekspresiju *dnaK* operona, kada nije prisutan toplinski šok, putem interakcije s *cis*-elementom CIRCE. *htrA* koji kodira za membransku serin proteinazu iz HtrA/DegP porodice, također može sudjelovati u odgovoru stanice na toplinski stres. Ekspresija *htrA* kod vrste *L. helveticus* CNRZ32 višestruko je povećana nakon prethodnog izlaganja stanica 4% otopini NaCl (Smeeds i sur., 1998). Također, stanice *L. helveticus* prethodno podvrgnute blažim uvjetima toplinskog šoka pokazuju promjene u indukciji gena te je transkripcija *htrA* transkripta značajno snižena (Tablica 3).

ClpP multimerni kompleks je serinska proteaza koja razgrađuje peptide kraće od 7 aminokiselina. Genom probiotičkog soja *L. gasseri* ATCC 33323 sadrži ClpC, ClpE, ClpL i ClpX, ATPaze porodice proteina koje sudjeluju u prilagodbi bakterije na stresne uvjete (Tablica 3). Suokko i sur. (2008) su ustanovili da je tijekom kratkog izlaganja stanica toplinskom šoku povećana ekspresija ClpC, ClpE i ClpL. Delecijski mutant u *clpL* značajno slabije preživljavaju pri letalnim temperaturama. HrcA-ovisna regulacija *clp* gena je konzervirana kod laktobacila (van de Guchte i sur., 2006; Suokko i sur., 2008). 2D elektroforezom utvrđeno je da se nakon izlaganja stanica vrste *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

povišenoj temperaturi, povećava ekspresija ClpX, ClpQ i ClpL (Lim i sur., 2002). Genomi vrsta *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. johnsonii* i *L. plantarum* sadrže gene za sHSP malih molekulskih masa s konzerviranom alfa-kristalin domenom u C-terminalnoj regiji, koji formiraju oligomerne komplekse (Altermann i sur., 2005; van de Guchte i sur., 2006; Fiocco i sur., 2007).

Prilagodba bakterije na uvjete povišenih temperatura presudna je za tehnološke karakteristike vrsta iz roda *Lactobacillus* jer pri visokim temperaturama se potiču specifični metabolički putovi (Tablica 3). Kod bakterije *L. helveticus* pri izlaganju povišenim temperaturama povećana je razina ekspresije HPSs tijekom rasta u sirutki (Di Cagno i sur., 2010). Povećana je aktivnost proteinaza i peptidaza i ekspresija gena za enzime glikolize poput gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze, enolaze i piruvat kinaze. Nakon izlaganja probiotičkog soja *L. gasseri* toplinskom stresu, povećana je aktivnost endopeptidaze PepO (Suokko i sur., 2008) (Tablica 3.).

Tablica 3. Biokemijski učinci izlaganja stanica laktobacila različitim stresnim uvjetima (Di Cagno i sur., 2010)

Stres	vrste iz roda <i>Lactobacillus</i>	Biokemijski učinci
Visoke temperature	<i>L. helveticus</i>	Povećanje aktivnosti proteaze i peptidaze
	<i>L. gasseri</i>	Povećanje aktivnosti neutralne endopeptidaze PepO
Niske temperature	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Uklanjanje vode iz stanice
Kiselinski	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i>	Sinteza γ -aminomaslačne kiseline (GABA)
	<i>L. sanfranciscensis</i> <i>Lactobacillus</i> sp.	Poboljšani metabolički put arginin deiminaze i sinteza 2-acetil-pirolina Sinteza egzopolisaharida
Osmotski	<i>Lactobacillus</i> sp.	Povećana sinteza GABA.
	<i>L. sanfranciscensis</i>	Pojačana proizvodnja izovalerične kiseline, octene kiseline i alkohola.
Oksidativni	<i>L. sakei</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>	Sinteza H ₂ O ₂ , sinteza (E,E)-2,4-dekadienal(E)-2-nonenola
	<i>L. sanfranciscensis</i>	Povećana razina tiola zbog aktivnosti GshR
Visoki pritisak	<i>L. sanfranciscensis</i> <i>L. helveticus</i>	Povećano preživljavanje Aktivacija aminopeptidaza
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Aktivacija peptidaza PepN, PepX i PepA
Quorum sensing	<i>L. sanfranciscensis</i>	Modifikacija aktivnosti e peptidaza i enzima sinteze hlapivih organskih spojeva
	<i>L. plantarum</i>	Modifikacija aktivnosti enzima sinteze hlapivih organskih spojeva
	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i>	Sinteza autoinduktora-2

U uvjetima niskih temperatura, za očuvanje metaboličke aktivnosti, stanice razvijaju prijelazni odgovor na stres. U bakterijskoj stanici može doći i do promjena udjela kratkolančanih i/ili nezasićenih masnih kiselina u lipidima stanične membrane, koncentracije otopljenih tvari u stanici, aktivnosti proteina uključenih u stanični odgovor na toplinski šok (HSPs i sHSPs) i aktivnosti specifične grupe proteina koji se induciraju u uvjetima niskih temperatura (*engl.* cold-induced proteins, CIPs) (Lorca i de Valdez, 2009). Inkubacije stanica laktobacila pri nižim temperaturama značajno doprinose oporavaku bakterijskih stanica prilikom smrzavanja. Prilikom postupnog snižavanja temperatura uvjeta rasta, udio kratkih i/ili nezasićenih masnih kiselina u lipidima membrane se povećava, što omogućuje povećanu propusnost citoplazmine membrane, uslijed promjene aktivnosti proteina membrane s funkcijama ionskih pumpi i transporta hranjivih tvari. Smrzavanje bakterijskih stanica uz dodatak krioprotektora može spriječiti gubitak vode iz stanice tijekom liofilizacije (Tablica 3). Glicin betain, prolin i karnitin imaju značajnu ulogu u osmoprotekciji, ali i prilagodbi bakterijskih stanica na niske temperature. Tolerancija *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIP 101027^T na -20°C i odmrzavanje pri 37°C postignuta je prethodnim tretmanom stanice s otopinama poput dimetil sulfoksid, glicerola, laktoze, saharoze i trehaloze (Fiocco i sur., 2007). Adonitol, kojeg većina vrsta iz roda *Lactobacillus* ne može metabolizirati, iskazuje zaštitni učinak na stanice tijekom liofilizacije, pretpostavlja se zbog steričke konformacije hidroksilnih grupa ovog spoja koje zamjenjuju molekule vode u strukturi proteina.

Prethodno izlaganje bakterijskih stanica stresnim uvjetima također utječe na postizanje boljeg preživljavanja tijekom smrzavanja. Bolje preživljavanje stanica vrsta *L. johnsonii* i *L. acidophilus* tijekom smrzavanja, postignuto je prethodnim izlaganju stanica visokim temperaturama ili otopini natrijevog klorida (Walker i sur., 1999). Adaptacija stanica na niske temperature uključuje aktivnost proteina GroES i GroEL kod vrste *L. paracasei* i sHSPs kod vrste *L. plantarum* (Fiocco i sur., 2007). Nadalje, sojevi vrste *L. acidophilus*, koji uspješno preživljavaju u uvjetima niske koncentracije kiseline i visoke koncentracije žuči, stabilniji su tijekom smrzavanja u usporedbi sa sojevima koji nisu bili prethodno izloženi stresnim uvjetima (Azcarate-Peril i sur., 2004, Ryan i sur., 2019).

Proteini CIPs (*engl.* cold-induced proteins) se induciraju kod vrsta iz roda *Lactobacillus* pri ekstremno niskim temperaturama. CIPs imaju vrlo niske molekulske mase oko 7 kDa, a pripadaju skupini proteina koji se induciraju prilikom izlaganja stanica niskim temperaturama (Csp proteini). CspA^E i CspB^B se mogu vezati na jednolančanu DNA i RNA (Derzelle i sur., 2000).

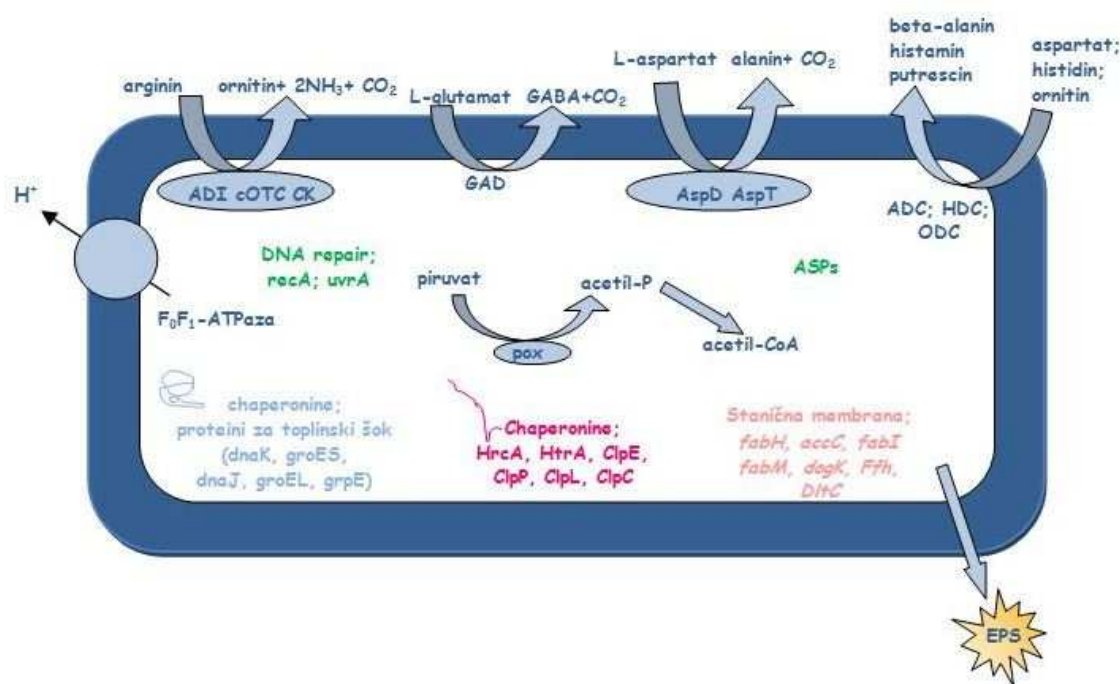
2.3.2. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija na uvjete visoke koncentracije vodikovih iona

Bakterijski sojevi vrsta iz roda *Lactobacillus* posjeduju nekoliko mehanizama za regulaciju unutarstanične pH vrijednosti (pH_i) (Slika 3.) i to putem F_0F_1 -ATP protonske pumpe, dekarboksilacije/katabolizma aminokiselina te sinteze općih proteina stresa (GSPs) i chaperona, koji sudjeluju u popravku ili razgrađuju oštećenu DNA i proteine, čime nastaju produkti s alkalnim učincima, te mogu utjecati na modifikaciju sastava stanične membrane (Cotter i Hill, 2003). F_0F_1 -ATP sintetaza je enzimski kompleks koji omogućava prijenos protona iz citoplazme stanice pomoću proton motorne sile, što je važan mehanizam regulacije pH_i , na koji utječe i propusnost same citoplazmine membrane (Slika 3.) što je značajno prilikom prilagodbe na visoke koncentracije žučnih soli (Lebeer i sur., 2008; Ruiz i sur., 2013; Ryan i sur., 2019). Aktivnost enzima glutamat dekarboksilaze (GAD) omogućuje otpornost vrsta iz roda *Lactobacillus* na visoke koncentracije H^+ iona. Ekspresija *gad* utječe na smanjenje koncentracije vodikovih iona u citoplazmi zbog dekarboksilacije glutamata u γ -aminomaslačnu kiselinu (GABA) pomoću ugradnje vodikovih iona (H^+) (Cotter i Hill, 2003). GABA se izlučuje ekstracelularno. Prema istraživanjima *Lactobacillus* sojevi koji proizvode GABA, uspješno preživljavaju i sintetiziraju GABA i u simuliranim uvjetima GIT (Siragusa i sur., 2007).

Metabolički put arginin deaminaze (ADI) uključuje osim ovog enzima, aktivnost ornitin transkarbamoylaze, cOTC i karbamat kinaze te transportnog proteina membrane, koji katalizira izmjenu elektrona između arginina i ornitina. Povećana otpornost vrsta iz roda *Lactobacillus* na uvjete visokih koncentracija kiseline djelomično proizlazi iz održavanja optimalnog pH_i uslijed sinteze NH_3 razgradnjom arginina. Također energije u obliku ATP nastalog tijekom ADI metabolizma omogućuje transport protona iz citoplazme pomoću F_0F_1 -ATP-aze i može utjecati na bolje preživljavanje stanica nakon iscrpljivanja primarnog izvora energije (Lebeer i sur., 2008).

Mehanizam staničnog odgovora na uvjete visokih koncentracija kiseline ATR (*engl.* acid-tolerance response, ATR) podrazumijeva induciranje ASP proteina (*engl.* acid shock proteins) i sudjeluje u prilagodbi na uvjete niske koncentracije kiselina. Stanice vrste *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, koje su prethodno izložene blažim kiselinskim uvjetima, značajno bolje preživljavaju letalne koncentracije kiselina. Sojevi *L. acidophilus* otporni na kiselinu i žuč, mogu rasti pri pH 3,5 s 0,3% žuči, a izolirani su nakon selekcije u uvjetima visoke koncentracije želučane kiseline (Lorca i de Valdez, 2009; De Angelis i sur., 2011). Učinak visokih koncentracija kiselina na rast različitih sojeva *Lactobacillus* vrsta ispitan je analizom

proteoma pomoću 2D elektroforeze te je ustanovljena povećana ekspresija ASPs proteina (15 do 40) (Lee i sur., 2013; De Angelis i sur., 2011). ASP proteini inducirani kod vrste *L. reuteri* sudjeluju u: transportu i vezanju proteina, procesima transkripcije i translacije, u metabolizmu nukleotida i biosinteze aminokiselina, u metabolizmu ugljikohidrata, piruvata i acetil-CoA te u održavanju pH homeostaze. Za sprječavanje oštećenja DNA u uvjetima niskih pH vrijednosti, ključno je nekoliko staničnih mehanizama. Pri tom je najznačajniji nukleotidni ekscizijski popravak, putem Uvr endonukleaze čime se uklanjaju oligonukleotidi duljine 12-13 baza s oštećenjem (Slika 3.). UvrA, UvrB i UvrC proteini prepoznaju oštećenu DNA i imaju mogućnost popravka modifikacije jedne baze, veće nakupine nukleotida, nekovalentne modifikacije te intra- i interlančane unakrsne baze.



Slika 3. Pretpostavljeni mehanizmi prilagodbe bakterija iz roda *Lactobacillus* u uvjetima visoke koncentracije H^+ iona (De Angelis i Gobbetti, 2011) F_0F_1 -ATPaza; ADI arginin deiminaza; cOTC ornitin transkarbamoilaze; CK karbamat kinaza; GAD glutamat dekarboksilaza; AspD L-aspartat- β -dekarboksilaza; AspT aspartat-alanin antiport; ADC arginin dekarboksilaza; HDC histidin dekarboksilaza; ODC ornitin dekarboksilaza; ASPs proteini za kiselinski šok; GroES GroEL, GrpE, DnaK i DnaJ, proteini za toplinski šok; HrcA, represor protein; HtrA, proteaza; ClpE, ClpP, ClpC i ClpL, „chaperon“; Pox piruvat oksidaza; Ffh, „chaperon“; FabH, β -ketoacil-acil nosač protein sintaze III; FabI, protein nosač acila (ACP) reduktaze; FabM, poli(A)-vežući protein (PABP); AccC, biotin karboksil protein nosač; DagK diacilglicerol kinaza; DltC D-alanil protein nosač; RecA, DNA-ovisna ATPaza; i UvrA, podjedinica UvrABC endonukleaze.

Adaptacija vrste *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* na kisele uvjete mikrookoliša inducira gene *fabH*, *accC*, *fabI*, koji kodiraju enzime uključene u biosintezu masnih kiselina u staničnoj membrani (Slika 3.). Mliječna kiselina potiče ekspresiju pojedinih proteina nepoznatih funkcija na površini stanice, a koji bi mogli biti odgovorni za promjenu gena *ffh* kod vrste *L. acidophilus* (Azcarate-Peril i sur., 2004).

Bakterijske stanice sintetiziraju i reagiraju na signalne molekule nižih molekulskih masa slične hormonima nazvane autoinduktori, a mogu također biti značajni za adaptaciju stanica u nepovoljnim uvjetima. Nakon što je postignuta kritična koncentracija signalnih molekula (*quorum*), u bakterijskim stanicama se inicira signalnu kaskadu reakcija koja utječe na promjene ekspresije ciljanog gena (Gobbetti i sur., 2007). Autoinduktor 2 (AI-2) se sintetizira pomoću LuxS. U uvjetima povećanih koncentracija kiselina u mikrookolišu, inducira se sinteza autoinduktora AI-2 kod probiotičkih sojeva *L. rhamnosus* i *L. acidophilus* (Moslehi-Jenabian i sur., 2009).

2.3.3. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija u uvjetima osmotskog šoka

S ciljem zadržavanja unutarstanične tekućine i održavanja unutarstaničnog tlaka, stanice vrsta iz roda *Lactobacillus* akumuliraju specifične otopljene tvari. *In silico* analiza genoma pokazala je da *L. plantarum* ima tri sustava za akumulaciju i biosintezu kvarternih amonijevih spojeva poput glicin betaina/karnitina/kolina (Kleerbezem i sur., 2003). U prisutnosti ovih sastojaka, inhibicija rasta mikroorganizama je značajno odgođena, te se odvija u značajno ekstremnijim uvjetima stresa (Glaasker i sur., 1998). Prolin i glutamat doprinose povećanoj propusnosti stanične membrane vrste *L. plantarum*. Inaktivacijom specifičnih gena ustanovljeno je da se pri hiperosmotskom stresu aktivira transportni sustav koji sudjeluje u zaštiti stanica *L. plantarum* pri niskim vrijednostima aktiviteta vode. Transportni sustav QacT ima visoki afinitet za kvarterne amonijeve spojeve, a niski afinitet za prolin. Aktivacija hiperosmotskim stresom većinom se odvija na razini enzima, a rjeđe na razini ekspresije gena. Budući da se razina akumulacije glicin betaina kod *L. plantarum* smanjila s porastom unutarstanične koncentracije glicin betaina te da je očita inhibicija *trans*-supstrata umanjena zbog osmotskog šoka, aktivacijski mehanizam najvjerojatnije uključuje regulaciju transportera kroz konformacijske promjene na mjestu unutarnjeg mjesta vezanja na enzimu (Glaasker i sur., 1998). Genom *L. sakei* kodira za tri ABC transportera i natrijev simporter, koji su specifični za glicin betain i karnitin (Chaillou i sur., 2005).

Molekule glicin betaina, prolina i glutamata naglo se transportiraju iz stanice, dok količina drugih aminokiselina ostaje nepromijenjena (Glaasker i sur., 1998). Molekularni mehanizmi transporta nisu još uvijek u potpunosti istraženi, no imaju svojstva karakteristična za mehanosenzitivne kanale (*engl.* mechanosensitive channels). Specifična svojstva ovog sustava su brz transport uvjetovan hipoosmotskim šokom kao i amfifilnim molekulama koje se ugrađuju u membranu, transport neovisno o metaboličkoj energiji i supstratima na *trans* (vanjskoj) strani membrane i većinom transport spriječen ionima gadolinijuma (Gd^{3+}), nespecifičnim inhibitorima kalcijevih kanala (Glaasker i sur., 1998).

Hiperosmotski uvjeti mikrokoliša potiču aktivaciju odgovora bakterijske stanice vrsta iz roda *Lactobacillus* i na druge stresne uvjete. Dodatak NaCl u prisutnosti glicin betaina značajno poboljšava preživljavanje vrsta iz roda *Lactobacillus* tijekom liofilizacije. Dodatak NaCl utječe na povećanje koncentracije *dnaK*-specifične mRNA kod vrsta *L. acidophilus* i *L. johnsonii*. Ustanovljena je i povećana sinteza GABA i pojedinih hlapivih organskih spojeva kod *Lactobacillus* sojeva u uvjetima osmotskog stresa tijekom fermentacije (Siragusa i sur., 2007) (Tablica 3.).

2.3.4. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija na uvjete oksidativnog stresa

Bakterijske stanice vrsta iz roda *Lactobacillus* sudjeluju u reduciranju radikala kisika koji se nakupljaju prilikom oksidativnog stresa uslijed enzimske aktivnosti NADH oksidaze, NADH peroksidaze i superoksid dismutaze (SOD) i učinka Mn^{2+} , askorbata, tokoferola i glutationa (De Angelis i sur., 2011). *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* reducira O_2 u H_2O_2 pomoću NADH oksidaze te snižava koncentraciju O_2 . U stanicama *L. plantarum* ATCC 8014, O_2 se reducira u H_2O putem H_2O_2 pomoću NADH oksidaze i NADH peroksidaze. Oksidacija piruvata s O_2 vodi do nastajanja H_2O_2 . Detoksifikacija O_2 vodi povećanju stvaranja H_2O_2 što uzrokuje oksidativni stres i vodi ranijem prelazu iz eksponencijalne u stacionarnu fazu (Marty-Teyssset i sur., 2000). Genom vrste *L. plantarum* kodira za proteine transporta mangana, te je vjerojatno da Mn^{2+} ioni sudjeluju u vezanju kisikovih radikala ili kao kofaktori za mangan-ovisnu katalazu (Serrano i sur., 2007). Mangan-ovisna superoksid dismutaza SodA identificirana je kod soja *L. sanfranciscensis* CB1 (De Angelis i Gobbetti, 1999). U aerobnim uvjetima, postignuta je maksimalna aktivnost Sod u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta. Aeracija i dostupnost Mn^{2+} utječu na skraćivanje lag faze te na povećanje prirasta i prinosa stanica vrste *L. sanfranciscensis*. Kako *L. sanfranciscensis* nema katalazu, NADH peroksidaza je odgovorna za razgradnju H_2O_2 . (Tablica 3). U odsutnosti fermentabilnog supstrata nakuplja se H_2O_2 jer za razliku od katalaze, NADH peroksidaza zahtjeva kontinuirani metabolizam da bi

proizvodila NADH (Stolz i sur., 1995). Vrsta *L. sanfranciscensis* pri aerobnim uvjetima, u hranjivoj podlozi zasićenoj s Mn^{2+} značajno akumulira H_2O_2 , što se odvija usporedno s potpunim iscrpljivanjem maltoze (De Angelis i Gobbetti, 1999). Učinkovitost razgradnje i niska specifična brzina stvaranja H_2O_2 uočene su kod aerotolerantnog soja *L. sakei* NCFB2813 (*L. sakei*^{ins}) koji je rastao pri 90% O_2 (De Angelis i Gobetti., 1999). *L. sakei* DSM6333 (*L. sakei*^{sens}), za razliku od *L. sakei*^{ins}, slabije raste u uvjetima 90% O_2 . Ustaljeno stanje koncentracije superoksid-radikala u citoplazmi vrste *L. sakei*^{sens} znatno je više nego u soju koji nije osjetljiv na kisik, što upućuje na važnost sustava za nakupljanja kisika u zaštiti stanice (Tablica 3). Aktivnost Sod je značajno veća kod *L. sakei*^{ins} nego kod *L. sakei*^{sens}. Oštećenje proteina kod *L. sakei*^{sens} utječe na povećanje udjela protein-karbonila i smanjenu aktivnost enzima fumaraze i reduktaze fumaraze (De Angelis i Gobbetti, 1999). Gen *katA*, koji kodira za katalazu kod *L. sakei* LTH677, eksprimiran je u *L. sakei* LK1 i *Lactobacillus curvatus* LTH1432 (Hertel i sur., 1998), te je ustanovljen isti mehanizam regulacije ekspresije *katA* kod rekombinantnih sojeva. Dodatak H_2O_2 anaerobnim kulturama i prijelaz na anaerobne uvjete, rezultirao je značajnim porastom aktivnosti KatA. Nakon ekspresije *trxB* iz *L. johnsonii* u *E. coli* AD494, povećana je tolerancija rekombinantnog soja na kisik, što podupire pretpostavku o ulozi *trxB* u sprječavanju stvaranja disulfidnih veza unutar enzima. Povećana ekspresija tioredoksina smanjuje osjetljivosti *L. plantarum* na povišene koncentracije kisika (Serrano i sur., 2007). Prekomjerna ekspresija tioredoksina uzrokovala je transkripciju gena koji kodiraju za proteine metabolizma purina, biosintezu proteina, odgovor na stresne uvjete i transport mangana. Enzim glutation reduktaza GshR katalizira NADPH-ovisnu redukciju glutationa disulfida kod *L. sanfranciscensis* (Tablica 3). Glutation djeluje puferirajuće i ublažava redoks potencijal u bakterijskim stanicama. Glutation je glavni neproteinski tiolni sastojak u stanicama i sudjeluje u povećanju otpornosti na osmotski stres, toksične elektrofile i oksidativni stres. Elektron donor je za reaktivni kisik, te metaboličke reakcije poput redukcije hidroperoksida i lipidnih peroksida. GshR *L. sanfranciscensis* ima presudnu ulogu u zaštiti stanice od oksidativnog stresa održavanjem visokog omjera intracelularnog GSH/GSSG (Vermeulen i sur., 2007).

2.3.5. Prilagodba stanica probiotičkih bakterija na uvjete visokog hidrostatskog tlaka i nedostatka hranjivih tvari

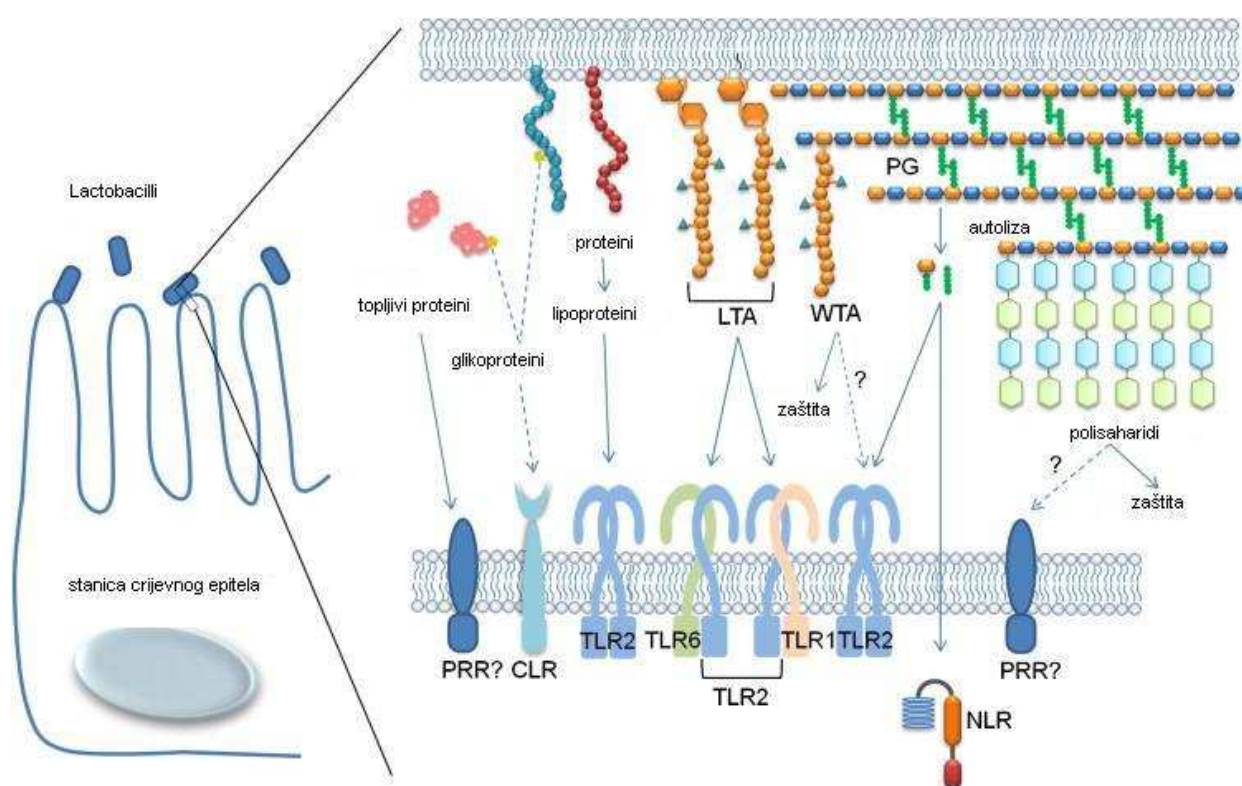
U uvjetima visokog hidrostatskog tlaka može doći do promjena stanične morfologije i integriteta membrane. Uvjeti visokog hidrostatskog tlaka uzrokuju i promjene konformacije

ribosoma, posebice 30S podjedinice, što inhibira vezanje aa-tRNA na ribosom i rezultira smanjenjem brzine translacije (Lorca i de Valdez, 2009). Prilagodba bakterijskih stanica vrsta iz roda *Lactobacillus* na uvjete visokog tlaka upućuje na slične stanične odgovore koji su karakteristični za različite stresne uvjete. Proteinski profil stanica *L. sanfranciscensis* uzgojenog pri aerobnim uvjetima i atmosferskom tlaku uspoređeni su s proteinima stanica izloženih povećanom tlaku. Ustanovljeno je da stanice u uvjetima povećanja tlaka pokušavaju ublažiti pad translacijske sposobnosti putem: regulacije translacijskih faktora, regulacijom gena koji utječu na preciznost translacije i induciranjem sinteze proteina stresa. Peptidaze/proteaze sudjeluju u razgradnji peptida/proteina koji se ne mogu smotati uz pomoć proteinskih kompleksa (*engl.* chaperona). Regulacija proteaze ClpL bakterije *L. sanfranciscensis* ovisi o tlaku mikrokoliša. Analizom transkriptoma bakterije *L. sanfranciscensis* pri uvjetima visokog hidrostatskog tlaka ustanovljeno je da se inducira transkripcija 42 gena. Radi se o genima koji kodiraju za elongacijske faktore EF-G, EF-TU, ribosomalne proteine (S2, L6, L11) i gene za translaciju ili proteinske komplekse (GroEL, ClpL) (Pavlović i sur., 2008). Nakon što su stanice *L. sakei* podvrgnute visokom tlaku, inducira se sinteza ribosomalni proteini RplJ i RpsF, ali i NusG, čija se aktivnost uobičajeno inducira pri uvjetima niskih temperatura.

U uvjetima nedostatka izvora hranjivih tvari smanjena je sinteza nukleinskih kiselina i proteina, te povećana razgradnja proteina i sinteza aminokiselina. Iscrpljivanje esencijalnih hranjivih tvari i akumulacija krajnjih produkata fermentacije ograničava eksponencijalnu fazu te vodi prijelazu u stacionarnu fazu. Prelazak u stacionarnu fazu uzrokuju i stresni uvjeti visoke ili niske temperature, osmotski i oksidativni šok. Stanični odgovor uključuje poticanje transkripcije specifičnih grupa gena ili regulona. U stacionarnoj fazi rasta, prilagodba stanice je posredovana brojnim regulonima, što omogućuje zadržavanje metaboličke aktivnosti i preživljavanje (Lorca i de Valdez, 2009). Katabolizam aminokiselina je značajan za preživljavanje vrste *L. sakei* u stacionarnoj fazi rasta. Izgladnjivanje stanica uzrokuje povećanje sinteze 16 proteina kod vrste *L. acidophilus* (Lorca i de Valdez, 2009). Kod vrste *L. plantarum* većina proteina koji sudjeluju u prilagodbi na stres inducira se u početku stacionarne faze. Glikolitički enzimi su drugačije regulirani kod vrste *L. casei* tijekom nedostatka laktoze. Razlika u ekspresiji enzima glikolize upućuje na strategiju stanice za preživljavanje (van de Guchte i sur., 2002).

2.4. Bioaktivne molekule i komponente stanične stijenke značajne za probiotičke učinke

Specifičan sastav stanične stijenke probiotičkih bakterija ima važnu ulogu prilikom adhezije, kolonizacije, u različitim fiziološkim i imunološkim učincima te omogućuje interakcije probiotičkih stanica s epitelnim i drugih tkivima domaćina. Površinski proteini bakterija iz roda *Lactobacillus* mogu imati višestruke biološke funkcije, te je značajna njihova uloga kao adhezina (Hynonen i Pavla, 2013). S-layer proteini, proteini stanične stijenke koji sadrže LPXTG ponavljajuću sekvencu, transportni proteini i mnogi drugi proteini na površini bakterijske stanice su okarakterizirani kao adhezini (Kos i sur., 2003; Beganović i sur., 2011, Hynonen i Palva, 2013). Adhezini sudjeluju u interakciji bakterijskih stanica s epitelnim stanicama domaćina, sa stanicama fagocita, s komponentama ekstracelularnog matriksa i mukusa i specifičnim komponentama u tjelesnim tekućinama. PRR receptori epitelnih stanica domaćina, TLR (*engl.* Toll-Like Receptors), NOD (*engl.* Nucleotide Oligomerization Domain-Like Receptors, NLRs) i CLR (*engl.* C-type Lectin Receptors) specifično prepoznaju polisaharide, peptidoglikane (PG), teihonske kiseline, lipoproteine i površinske glikoproteine u staničnoj stijenci (Slika 4.).



Slika 4. Interakcije komponenta stanične stijenke *Lactobacillus* stanica i receptora intestinalnih epitelnih stanica domaćina PRR (preuzeto od Lee i sur., 2013).

Sekvencionirani genomi probiotičkih sojeva omogućuju analizu gena koji kodiraju za adhezine i druge funkcionalne proteine (Kleerebezem i sur., 2010; Lee i sur., 2013; Petrova sur., 2018). Prema Kleerebezem i sur. (2010) površinski proteini laktobacila kao Gram-pozitivnih bakterija mogu se općenito grupirati u: površinske proteine S-sloja (*engl.* S-layer proteins); proteine stanične stijenke s LPXTG sekvencom; proteine citoplazme tzv. "housekeeping proteini", koji su detektirani u ekstracelularnom proteomu; transportne proteine i proteine čije biološke funkcije nisu još opisane.

Površinski S-sloj izgrađen je od podjedinica S-(gliko)proteina. Proteini S-sloja detektirani su samo kod *Lactobacillus* sojeva između BMK (Hynonon i Palva, 2013; Uroić i sur., 2016; Banić i sur, 2018). S-protein bakterija *L. gasseri* i *L. johnsonii* ima ulogu u agregaciji stanica. Stanice *L. crispatus* JCM 5810 se uspješno adheziraju na proteine ekstracelularnog matriksa, a ustanovljeno je da se protein CbsA (*engl.* collagen binding S-layer protein A) veže na kolagen tip IV (Kleerebezem i sur., 2010).

LPXTG proteini stanične stijenke također posreduju u probiotičkim svojstvima (Kleerebezem i sur., 2010). Mub protein s LPXTG sekvencom soja *L. reuteri* 1063 posreduje u adheziji stanica na ugljikohidratne komponente intestinalne sluznice (Kleerebezem i sur., 2010). Komparativna genomska analiza pokazala je prisutnost Mub proteina kod većine sojeva laktobacila (Boekhorst i sur., 2006). Msa protein (*engl.* mannose-specific adhesin) sudjeluje u adheziji i u interakciji bakterije *L. plantarum* s domaćinom. Površinski proteini MucBP *L. acidophilus* NCFM sudjeluju u vezanju na stanice CaCo-2 stanične linije (Tao i sur., 2013). Pri tome MucBP vjerojatno posreduju u vezanju na različite ligande i mukozne površine. Lsp protein vrste *L. reuteri* 100-23 ima sličnosti s LPXTG proteinima bakterija *L. johnsoni* i *L. gasseri*, no razlikuje se od proteina Gram-pozitivnih koka koji sudjeluju u stvaranju biofilmova i adheziji na stanice epitela, te ima ulogu u kolonizaciji GIT miševa i adheziji na epitel GIT *ex vivo*. Lsp proteini sadrže karakteristične Rip ponavljajuće sekvence koje su prisutne kod adhezina Gram-pozitivnih koka i kod *L. reuteri*. Genom bakterije *L. salivarius* UCC118 kodira za gen za ekspresiju proteina s LPXTG sekvencom, koji sudjeluju u adheziji intestinalnih stanica stanične linije (van Pijkeren i sur., 2006; Kleerebezem i sur., 2010).

U ekstracelularnom proteomu identificirani su i stanični proteini, koji imaju važne biološke uloge tijekom rasta i staničnog metabolizma (*engl.* housekeeping proteini). Nazivaju se i „nevezanim“ (*engl.* anchorless) proteinima jer primarna struktura ne sadrži signalnu sekvencu za transport proteina van citoplazmine membrane. Primjerice GroEL i EF-Tu, enolaza i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GADPH) enzimi glikolize su tkz. „moonlight“ proteini (Kleerebezem i sur., 2010). GroEL ili Hsp60, je "chaperon" protein, a GroEL protein vrste *L.*

johnsonii La1, eksprimiran u *E. coli*, veže se na HT29 stanične linije (Bergonzelli i sur., 2006). GroEl potiče sintezu IL-8 u stanicama HT29 stanične linije i makrofaga. EF-Tu protein je elongacijski faktor. EF-Tu vrste *L. johnsonii* La1 se može adhezirati na mucine ili stanice CaCo-2 stanične linije, odnosno na HT29 stanične linije, te inducira sintezu IL-8 (Bergonzelli i sur., 2006).

Laktobacili sintezom mliječne kiseline snižavaju pH vrijednost mikrookoliša što uzrokuje i promjenu strukture površine njihovih stanica i funkciju proteina adhezina (Kleerebezem i sur., 2010). Adhezija laktobacila na CaCo-2 stanice i mukus crijevnog epitela, kao i na proteine ekstracelularnog matriksa, učinkovitija je pri nižim pH vrijednostima. GroEL, EF-Tu i Mub proteini *L. johnsonii* La1 imaju veći afinitet za specifične ligande pri nižim pH vrijednostima (Bergonzelli i sur., 2006, Perea Velez i sur., 2007). Pretpostavka je da su ovi proteini vezani ionskim interakcijama na površinu bakterijske stanice i stoga su osjetljiviji na promjene pH vrijednosti ili koncentracije soli (Antikainen i sur., 2007a). Pri neutralnim pH vrijednostima soj *L. crispatus* ST1 otpušta enolazu i GAPDH s površine stanice. Enolaza i GAPDH vjerojatno su ionskim interakcijama vezani na površinu bakterijske stanice pri pH vrijednostima koje su niže od vrijednosti njihovih izoelektričnih točaka. Proteini S-sloja soja *L. crispatus* ST1 imaju vrijednosti pH u alkalnom području, stoga se ne otpuštaju u medij pri kiselim i neutralnim vrijednostima pH, jer su i dalje vezani na lipoteihonsku kiselinu (Antikainen i sur., 2007a). Iako su tipični unutarstanični proteini GAPDH i enolaza, doprinose površinskim svojstvima stanica te posreduju u bakterijskoj adheziji, a kod soja *L. crispatus* je dokazano da vežu laminin i fibronektin (Antikainen i sur., 2007; Kleerebezem i sur., 2010).

Stanice *L. reuteri* JCM 5810 i izolirani CbsA protein inhibiraju adheziju *E. coli* na laminin *in vitro* (Perea Velez i sur., 2007; Kleerebezem i sur., 2010). Bakterijske stanice i protein S-sloja *L. crispatus* ZJ001 inhibiraju adheziju stanica *E. coli* O157:H7 i *Salmonella* Typhimurium na stanice HeLa stanične linije (Perea Velez i sur., 2007; Kleerebezem i sur., 2010). Bakterije roda *Lactobacillus* inhibiraju infekcije gastrointestinalnog i urogenitalnog trakta ljudi poticanjem imunološkog odgovora i antibakterijskom djelovanjem (Reid i Bruce, 2006). *L. rhamnosus* GR-1 i *L. reuteri* RC-14 uspješno se adheziraju na uroepitelne stanice, a *L. rhamnosus* GR-1 sintetizira antimikrobne komponente, što utječe na aktivaciju obrambenih mehanizama domaćina (Reid i Bruce, 2006; Liévin-Le Moal i Servin, 2014). Soj *L. reuteri* RC-14 proizvodi vodikov peroksid i površinski aktivne tvari, te potiče sintezu mucina, i utječe na smanjenu ekspresiju virulentnih faktora patogena. Soj *L. reuteri* ATCC 55730, koji proizvodi bakteriocin, ima sposobnost adhezije i kolonizacije na površinu sluznice GIT i poticanje imunološkog odgovora prilikom gastrointestinalnih infekcija djece (Jensen i sur.,

2014; Hill i sur., 2018). Prva opisna funkcionalna uloga S-proteina laktobacila je adhezija na epitelne stanice domaćina. Protein SlpA iz S-sloja bakterije *L. brevis* ATCC 8287 ima funkciju adhezina na stanične linije crijevnog epitela i na fibronektin (Hynonen i Palva, 2013). Proteini S-sloja CbsA bakterije *L. crispatus* posreduju u adheziji na kolagen i laminin. Prema literaturnim podacima rod *Lactobacillus* sadrži više od 250 različitih vrsta, koje se međusobno razlikuju u građi stanične stijenke, no pojedine karakteristike su tipične za Gram-pozitivne bakterije, poput zajedničkih antigena. Zastupljenost D-alanina (D-Ala) unutar stanične stijenke laktobacila ima učinak induciranja sinteze citokina. Mutant Dlt⁻ vrste *L. plantarum* NCIMB8826, koji sadrži značajno smanjen udio D-Ala u usporedbi s divljim tipom soja, inducira sekreciju IL-10, te reducira lučenje TNF- α i IFN- γ (Kleerebezem i sur., 2010).

Biološke funkcije pila, flagela ili fimbrija, koji su tipični za patogene bakterije, tek su nedavno opisane kod komenzalnih bakterija GIT čovjeka. Adhezija i preživljavanje bakterije *L. rhamnosus* GG u domaćinu posredovani su pilima SpaCBA i SpaEF (Jensen i sur, 2014; Leeber i sur., 2020). SpaCBA pilus je odgovoran za adheziju na crijevni epitel CaCo-2 stanične linije i stvaranje biofilma (Lebeer i sur., 2012). SpaCBA mutant *L. rhamnosus* GG potiče povećanje razine mRNA za IL-8 *in vitro*, u usporedbi s divlji tipom, što je vjerojatno posljedica interakcija lipoteihonske kiseline i TLR2 (Lebeer i sur., 2012; Reunanen i sur., 2012). Pili prijanjaju na ugljikohidratne strukture koje se nalaze u glikoproteinskim ili glikolipidnim receptorima i pretpostavlja se da posreduju u prvom kontaktu sa stanicama domaćina, nakon čega slijedi formiranje čvršćih interakcija. U *in vivo* uvjetima u GIT miša, bakterija *B. breve* UCC2003 ekspirira pile koji pripadaju grupi tipa IVb ili obitelji Tad (*engl.* tight-adherence) pila (O'Connell i sur., 2011), čija je ekspresija potvrđena na površini stanica izoliranih iz GIT miša transmisijom elektronskom mikroskopijom. Tad lokus kod soja *B. breve* UCC2003 je konzerviran, što podupire hipotezu o kolonizaciji domaćina posredstvom pila te o postojanju mehanizama otpornosti bifidobakterija. Prisutnost površinskih struktura koje nalikuju pilima ustanovljena je anlizom površine stanica sojeva izoliranih iz GIT čovjeka *B. bifidum*, *B. longum* subsp. *longum* i *B. adolescentis* (Feroni i sur., 2011). Analiza genoma potvrdila je prisutnost genske nakupine za sortaze potrebnu za kovalentno vezanje podjedinica pila (Feroni i sur., 2011).

Osim proteina i završni produkti metabolizma poput kratkolančanih masnih kiselina (*engl.* short-chain fatty acid, SCFA), vitamina i polinezasićenih masnih kiselina, kao što je konjugirana linolenska kiselina, posreduju u interakciji probiotika s domaćinom. SCFA su značajni produkti mikrobnog metabolizma u GIT jer doprinose količini unesene energije,

potiču apsorpciju vode i natrija, snižavaju pH vrijednost u lumenu i bioraspoloživost toksičnih amina (Fukuda i sur., 2011). Iako bifidobakterije ne proizvode butirat kao završni produkt fermentacije, dokazano je da je acetat za bakterije iz roda *Clostridium*, supstrat za sintezu butirata (De Vuyst i Leroy, 2011). Butirat je osnovni izvor energije za stanice kolona te se istražuje s aspekta prevencije raka debelog crijeva (Wong i sur., 2006).

Stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija sadrže deblji sloj peptidoglikana. TLR2 i NLR receptori, koji su dio nespecifičnog imunološkog sustava domaćina, a prepoznaju kratke podjedinice peptidoglikana nastale uslijed enzimskog restrukturiranja peptidoglikana kod probiotičkih sojeva. Specifična struktura peptidoglikana probiotičkih bakterija vjerojatno doprinosi manjoj osjetljivost ovih sojeva na lizozim u GIT (Lebeer i sur., 2012; Tao i sur., 2013). Lipoteihonska kiselina *Lactobacillus* sojeva utječe na smanjenje sinteze TNF- α čija je proizvodnja inducirana lipoteihonskom kiselinom *Staphylococcus aureus* (Lee i sur., 2013).

3. MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1 Mikroorganizmi

U radu su korišteni sojevi BMK iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* izolirani iz različitih liofiliziranih probiotičkih proizvoda prisutnih na hrvatskom tržištu, označenih na slijedeći način: *Lactobacillus* sp. 1, *Lactobacillus* sp. 2A, *Bifidobacterium* sp. 2B, *Bifidobacterium* sp. 3, *Lactobacillus* sp. 4, *Lactobacillus* sp. 5/1, *Bifidobacterium* sp. 6B, *Lactobacillus* sp. 7A, združena kultura sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* 8, *Lactobacillus* sp. 8/1, *Bifidobacterium* sp. 8/2, *Lactobacillus* sp. 9, *Lactobacillus* sp. 13A i *Lactobacillus* sp. 13B. Sojevi su čuvani pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola (Tablica 4.). U pojedinim eksperimentima korišteni su referentni sojevi poput proteolitički aktivnog soja *Lactobacillus helveticus* M92, zatim funkcionalne starter kulture *Lactobacillus plantarum* L4 koji su okarakterizirani kao probiotički sojevi u Laboratoriju za tehnologiju antoibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te sojevi *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™, *Lactobacillus rhamnosus* GG® i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®, koji pripadaju najistraživanijim probiotičkim sojevima.

Ispitivanje antimikrobnog djelovanja bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* prisutnih u liofiliziranim probiotičkim pripravcima označenih redom 1, 2A, 2B, 4, 5/1, 6B, 7A, 8, 8/1, 8/2 i 9 provedeno je s test mikroorganizmima: *Staphylococcus aureus* 3048, *Staphylococcus aureus* K-144, *Escherichia coli* 3014, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* TM2 i *Listeria monocytogenes* ATCC 19111. Svi test-mikroorganizmi su čuvani pri -80 °C u hranjivom bujonu uz dodatak 15% (v/v) glicerola, te su neposredno prije eksperimenta inokulirani u svježu tekuću hranjivu podlogu, te inkubirani prekonoćno pri optimalnoj temperaturi rasta.

Tablica 4. Probiotički sojevi u tržišnim pripravcima navedenim na deklaraciji, te uvjeti rasta za izolaciju bakterijskih kolonija na selektivnih hranjivim podlogama.

Probiotički soj	Optimalni medij	Uvjeti rasta	Primjena
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, fermentirani mliječni proizvodi
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, fermentirani mliječni proizvodi
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, mlijeko, jogurt, mliječna hrana za dojenčad
<i>Lactobacillus fermentum</i>	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, sirevi
<i>Lactobacillus paracasei</i> Lpc-37	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, fermentirani mliječni proizvodi, sirevi
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, kozmetika
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 5289	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani
<i>Lactobacillus reuteri</i> RC 14 (13B)	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, sirevi, fermentirani mliječni proizvodi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR 1 (13A)	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, fermentirani mliječni proizvodi
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lr-32	MRS agar	mikroaerofilno 30°C/37°C/48 h	dodaci prehrani, fermentirani proizvodi
<i>S. salivarius</i> M18	Columbia krvni agar	aerobno 37°C/24 h	dodaci prehrani
<i>S. salivarius</i> K12	Columbia krvni agar	aerobno 37°C/24 h	dodaci prehrani
<i>Bifidobacterium lactis</i>	TOS agar	anaerobno 37°C/72 h	dodaci prehrani, mliječna hrana za dojenčad
<i>Bifidobacterium lactis</i> BI-07	TOS agar	anaerobno 37°C/72 h	dodaci prehrani
<i>Bifidobacterium lactis</i> BI-04	TOS agar	anaerobno 37°C/72 h	dodaci prehrani
<i>Bifidobacterium longum</i>	TOS agar	anaerobno 37°C/72 h	dodaci prehrani
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> , BB-12	TOS agar	anaerobno 37°C/72 h	dodaci prehrani

3.1.2. Hranjive podloge za čuvanje i uzgoj mikroorganizama

Za izolaciju i uzgoj BMK korištene su hranjive podloge slijedećeg sastava:

- TOS-propionat agar: pepton iz kazeina 10 g/L; kvašćev ekstrakt 1,0 g/L; kalijev dihidrogen fosfat 3,0 g/L; kalijev hidrogen fosfat 4,8 g/L; amonijev sulfat 3,0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; L-cistein monoklorid 0,5 g/L; natrijev propionat 15,0 g/L; galaktooligosaharidi (TOS) 10,0 g/L; agar 15,0 g/L; u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge iznosi 6,7; sterilizacija se provodi pri 115°C/15 min.
- MRS (Man-Rogosa-Sharpe) agar: pepton 10 g/L; mesni ekstrakt 10 g/L; kvašćev ekstrakt 5 g/L; glukoza 20 g/L; Tween 80 1 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/L; natrijev-acetat 5 g/L; agar 20 g/L; u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge iznosi 6,5; sterilizacija pri 121 °C/15min.
- MRS (Man-Rogosa-Sharpe) tekuća hranjiva podloga jednakog je sastava kao MRS agar, samo bez dodanog agara

Hranjive podloge za čuvanje i održavanje test mikroorganizama:

- hranjivi agar, sastava: pepton 15 g/L; mesni ekstrakt 3 g/L; NaCl 5 g/L; kalijev fosfat 0,3 g/L; agar 18 g/L; u destiliranoj vodi. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- hranjivi bujon je jednakog sastava kao hranjivi agar, ali bez dodatka agara.

3.1.3. Kemikalije

U ovoj disertaciji korištene su slijedeće kemikalije:

- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- fosfatni pufer, „Kemika“, Hrvatska
- etilacetat, „Kemika“, Hrvatska
- n-heksan, „Riedel de Haen“, Njemačka

-
- kloroform, „Carlo Erba“, Italija
 - natrijev taurodeoksikolat, „Sigma“, SAD
 - sulfatna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
 - furfuraldehid, „Kemika“, Hrvatska
 - ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
 - inulin, „Difco“, SAD
 - raftiloza P95, „Orafti“, Belgija
 - laktuloza, „Cal. Biochem“, SAD
 - D-manitol, „Difco“, SAD
 - pepton, „Biolife“, Malazija
 - mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija
 - kvašćev ekstrakt, „Difco“, SAD
 - dikalijev hidrogen fosfat, „Kemika“, Hrvatska
 - diamonijev hidrogen citrat, „Merck“, Njemačka
 - Tween 80, „Sigma“, SAD
 - magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija
 - manganov sulfat, „Merck“, Njemačka

3.1.4. Uređaji i pribor

U ovoj disertaciji korišteni su slijedeći uređaji i pribor:

- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- BioSpec-Nano spektrofotometar, Shimazu
- UV transiluminator DNR BioImaging System
- PCR uređaj Master Cycler personal Eppendorf
- PCR THERMALCYCLER (Biosistemi, 96 jažica)
- bireta
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- vibromješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija

-
- centrifuga CENTAUR 2, „Sanyo“, Engleska
 - centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
 - mikroskop OPTON III, „Zeiss“, Njemačka
 - čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
 - mikrotitarske pločice s 96 jažica
 - denzimati, „BioMerieux“, Francuska
 - magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
 - filter-diskovi s određenim koncentracijama antibiotika, Oxoid, Velika Britanija
 - Petrijeve zdjelice
 - Anaerocult®, „Merck“, Njemačka
 - automatske pipete, „Eppendorf“, SAD

3.1.5. Liofilizirani probiotički pripravci dostupni na hrvatskom tržištu

Komercijalno dostupni probiotički pripravci na hrvatskom tržištu su prikupljeni i katalogizirani prema vrstama probiotičkih bakterija koje sadrže, obliku pripravka i njihovoj namjeni te označeni redom PP1 do PP13.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Fenotipske i genotipske karakteristike bakterijskih izolata

3.2.1.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* izolirani iz probiotičkih pripravaka čuvani su na -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi s 15% (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80 °C u hranjivom tekućoj podlozi s 15% (v/v) glicerola.

3.2.1.2. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz kulture koja sadrži bakterijske stanice su pripremljena decimalna razrjeđenja u sterilnoj fiziološkoj otopini (0,9% NaCl). MRS agar u Petrijevim zdjelicama naciepljuje se sa 100 µl iz 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} razrjeđenja. Nakon inkubacije u mikroaerofilnim ili anaerobnim uvjetima tijekom 48 do 72 sata pri 37°C broje se porasle kolonije i preračunava se broj živih stanica po gramu uzorka.

3.2.1.3. Bojanje bakterijskih stanica po Gramu

Suspenzija prekonoćne kulture bakterija mliječne kiseline iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* prisutnih u liofiliziranim probiotičkim pripravcima, ravnomjerno je nanijeta pomoću mikrobiološke ušice na predmetnicu, te je obojana metodom bojanja bakterijskih stanica po Gramu i mikroskopirana uz povećanje 100X.

3.2.1.4. KOH metoda

Ova metoda se koristi za određivanje Gram-pozitivnih odnosno Gram-negativnih bakterija. Na predmetno stakalce se kapne 10 µl 3% kalijevog hidroksida (KOH) te se sterilno prenese mikrobiološkom ušicom vidljiva količina bakterijskih stanica u kapljicu KOH. Smjesa se promiješa, proširivajući mjesto do promjera od 1,5 cm. Ako suspenzija postane viskozna unutar 5-60 s, ispitivana bakterija se smatra Gram-negativnom, a u protivnom je Gram-pozitivna.

3.2.1.5. Katalaza test

Ovaj test se provodi kako bi se utvrdilo da li odabrani bakterijski soj proizvodi enzim katalazu. Mikrobiološkom ušicom se prenese dio ispitivane kulture na predmetno stakalce, a zatim se doda 1-2 kapi 3% vodikovog peroksida. Prisutnost katalaze je vidljiva pojavom mjehurića uslijed oslobađanja kisika.

3.2.1.6. Određivanje sporogenosti

Inokulum prekonoćne kulture ispitivanih bakterija mliječne kiseline se nacijepi u svježju hranjivu podlogu koja se kuha 10 minuta u vodenoj kupelji pri 80°C. Nakon toga se kulture inkubiraju pri 37°C tijekom 72 sata. Ako nije došlo do rasta kulture, ispitivana bakterija nije sporogena, odnosno ne stvara spore jer spore ne inaktivira temperaturu od 80°C.

3.2.1.7. Određivanje pH vrijednosti, postotka proizvedene mliječne kiseline i stvaranja plina

Određivanje pH vrijednosti, stupnja kiselosti i postotka proizvedene mliječne kiseline provedeno je prema metodama opisanim u Kos i sur. (2008). Određena je pH vrijednost supernatanta prekonoćne kulture BMK uzgojene u MRS hranjivoj podlozi, gdje se 1 mL uzorka supernatanta razrijedio s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak je titriran s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator. Sva mjerenja su provedena tri puta, kako bi se statistički obradili rezultati.

$$^{\circ}SH = a \cdot 20 \cdot f_{NaOH} \cdot 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}SH \cdot 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH}; f_{NaOH} = 1$$

$$(1^{\circ}SH \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%))$$

Proizvodnja plina iz glukoze procijenjena je inokulacijom sojeva u MRS tekuću hranjivu podlogu uz dodatak 3% glukoze u epruvetama koje sadrže obrnute Durhamove epruvete prema metodi da Silva i sur. (2019).

3.2.1.8. Fenotipska identifikacija bakterijskih sojeva pomoću API testa

API 50 CHL Medium, namijenjen identifikaciji roda *Lactobacillus* i srodnih rodova, je medij u obliku spremnom za upotrebu i omogućuje fermentaciju 49 ugljikohidrata na API 50 CH stripu (Slika 5.). Medij je inokuliran s prekonoćnom kulturom bakterijskih stanica te je postignuta gustoća stanica u iznosu 2 McFarlanda očitana pomoću denzitometra (Densimat, Biomérieux SA Francuska). Pripremljena suspenzija bakterijskih stanica je pomoću pipetmana inokulirana u 50 ampula koje sadrže pojedine ugljikohidrate. Nakon dodatka suspenzije bakterijskih stanica u ampule s ugljikohidratima slijedi nanošenje mineralnog ulja za stvaranje anaerobnih uvjeta. Tako priređen API strip, stavljen je u termostatsku inkubaciju pri optimalnoj temperaturi rasta mikroorganizma. Rezultati su očitani nakon 24h i 48h inkubacije, te se unešeni u program APIWEB®. Prilikom obrade rezultata pozitivnim su smatrani oni rezultati kod kojih je uslijed acidifikacije i prisutnosti bromkrezol purpurnog indikatora došlo do promjene boje u žuto. Biokemijski profil je očitao, a bakterijske kulture su identificirane pomoću programskog paketa s bazom podataka (V 5.0) (prema uputama proizvođača).



Slika 5. Prikaz fermentacijskih profila šećera bakterije mliječne kiseline određen API 50 CHL testom

3.2.1.9. Fenotipska identifikacija bakterijskih sojeva pomoću BBL CRYSTAL™ ANR testa

BBL Crystal™ Anaerobe (ANR) Identification (ID) System je komercijalno dostupan test koji se primjenjuje za identifikaciju izolata anaerobnih bakterija na temelju metaboličke aktivnosti uobičajenih, fluorogenih i kromogenih substrata (Slika 6). Test omogućuje ispitivanje fermentacije 29 različitih dehidriranih substrata, te sadrži fluorescentnu kontrolu unutar baze s 30 jažica za odvijanje reakcije. Suspenzija bakterijskih stanica priprema se u mediju dostupnom unutar testa. Baza s jažicama za odvijanje reakcije se inokulira sa supezijom bakterijskih stanica, te se preklopi s poklopcem koji sadrži substrate, što uzrokuje njihovu rehidrataciju i početak biokemijskih reakcija.

Nakon inkubacije pri određenim temperaturama bilježi se promjena boje, te prisutnost fluorescencije u pojedinoj jažici, što je rezultat metaboličke aktivnosti ispitivanog mikroorganizma. Dobiveni profil 29 različitih reakcija se interpretira pomoću deseteroznamenkastog broja koji je temelj za identifikaciju. Konačna identifikacija sojeva se provodi očitavanjem rezultata analize pomoću programskog paketa BD BBL™ Crystal™ MIND. Mogući biokemijski i enzimatski profili 29 substrata koje mogu metabolizirati različiti mikroorganizmi pohranjeni su u bazi podataka. Identifikacija se provodi usporedbom biokemijskih i enzimatskih profila ispitivanog bakterijskog izolata s reakcijskim profilom identificiranih mikroorganizama u bazi podataka.



Slika 6. Test za fenotipsku identifikaciju bakterijskih sojeva pomoću BBL CRYSTAL™ ANR testa.

3.2.1.10. SDS-PAGE analiza

3.2.1.10.1. SDS-PAGE analiza ukupnih staničnih proteina

Bakterijske kulture inokulirane su u 10 ml MRS tekuće hranjive podloge i inkubirane pri 37°C preko noći. Prekonoćne kulture bakterijskih stanica u stacionarnoj fazi centrifugirane su pri 9000 okr/min tijekom 15 min, a zatim su stanice isprane dva puta sa sterilnom otopinom 0,9 %-natrijeva klorida. Bakterijske stanice su nakon toga mehanički razbijene tako što je u mikroeprovete s bakterijskim stanicama dodan 1 g staklenih kuglica, (r=2 mm, VidraFOC), a zatim je suspenzija miješana na vibromješaču tijekom 4 min i to naizmjenično 30 s uz miješanje, 30 s hlađenjem u ledu, pri maksimalnoj brzini. Određena je koncentracija proteina u supernatantima pomoću uređaja BioSpec-Nano (Tablica 5). U suspenziju je dodano 1 mL otopine SDS (0,0625M Tris-HCL, pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) glicerol). Uzorci su prokuhani 10 min, a potom ohlađeni u ledu i centrifugirani na 9000 okr/min tijekom 15 min, te je provedena SDS-poliakrilamid gel elektroforeza.

Ekstrakti ukupnih staničnih proteina razdvojeni su pomoću SDS-PAGE prema metodi opisanoj po Laemmli (1970). U 15 µL svakog od priređenih uzoraka dodano je 5 µL reducirajućeg reagensa te su prokuhani 2-3 min. Nakon kuhanja ukupni volumen uzorka je nanešen na poliakrilamidni gel. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (4% gel za sabijanje i 12% gel za razdvajanje) se provodi u kadici za elektroforezu pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min. Nakon završene elektroforeze, gel se boji u 0,1%-tnom metilenskom modrilu R-250 s 50% metanola i 7% octene kiseline kroz najmanje 3 sata. Nakon bojanja, gel je odbojavan u 7%-tnoj octenoj kiselini. SDS-PAGE proteinski gel je skeniran (Scanjet 3800; Hewlett Packard, CA, SAD) te je slika spremljena u TIFF formatu. Priređen je dendrogram bakterijskih sojeva na temelju profila topljivih proteina pojedinog izolata BMK pomoću UPGMA metode (*engl.* Unweighted Pair Group Method Using Average Linkage), te pomoću Gel-Compare II programskog paketa (Applied Maths, St-Matens-Latem, Belgija).

Tablica 5. Koncentracije proteina određene pomoću BioSpec nano u uzorcima proteinskih ekstrakata topljivih staničnih i površinskih proteina bakterijskih izolata iz probiotičkih pripravaka i referentnih probiotičkih sojeva.

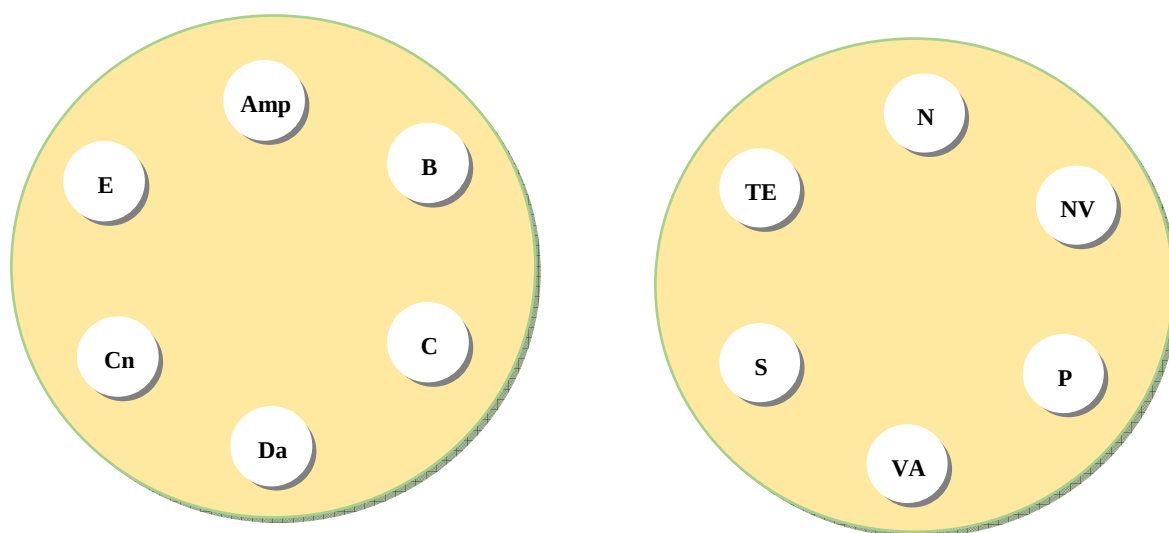
Bakterijski soj	Koncentracija u ekstraktu topljivih proteina (µg/µL)	Koncentracija u ekstraktu površinskih proteina (µg/µL)
1	19,21	5,2
2A	34,65	2,88
2B	33,83	2,96
3	38,22	2,62
4	9,2	10,9
6B	16,85	5,93
8/1	13,37	7,5
8/2	1,41	70
9	8,81	11,35
13A	10,86	9,2
13B	6,47	15,45
<i>L. rhamnosus</i> GG	49,58	2,0
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	7,89	12,67
<i>L. acidophilus</i> M92	5,27	18,97
<i>L. plantarum</i> L4	35,72	2,79
<i>Lactobacillus plantarum</i> LMG 9206	5,62	17,79

3.2.1.10.2. SDS-PAGE površinskih proteina bakterijskih stanica

Prekonočne kulture probiotičkih bakterija (3 ml) se centrifugiraju pri 9000 okr/min tijekom 5 minuta. Talog bakterijskih stanica se ispere dva puta s 1 ml sterilne destilirane vode, a zatim se resuspendira u 50 µl 2%-tne otopine SDS-a. Uzorke je potrebno prokuhati 10 minuta, a zatim centrifugirati 5 minuta pri 9000 okr/min. Proteini prisutni u dobivenim supernatantima kultura su razdvojeni pomoću SDS-PAGE. Koncentracija proteina u priređenom uzorku se očita na spektrofotometru BioSpec-nano, te se preračuna potreban volumen uzorka za analizu pomoću SDS-PAGE. U 15 µl svakog od priređenih uzoraka se doda 5 µl reducirajućeg reagensa i prokuha 2-3 min. SDS-PAGE se provodi pri uvjetima kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.10.1. *SDS-PAGE analiza ukupnih staničnih proteina.*

3.2.1.11. Ispitivanje osjetljivosti bakterija mliječne kiseline na različite antibiotike

Ispitana je i osjetljivost probiotičkih sojeva iz liofiliziranih pripravaka na različite antibiotike pomoću metode difuzije iz filter diska u agar, pomoću komercijalno dostupnih diskova Oxoid (Basingstoke, Velika Britanija), natopljenih određenom koncentracijom antibiotika. Osjetljivost svakog pojedinog izolata ispitana je na 12 različitih antibiotika tako da su obuhvaćene sve poznate skupine antibiotika: ampicilin, bacitracin, vankomicin, penicilin G kao inhibitori sinteze stanične stijenke; eritromicin, gentamicin, klindamicin, kloramfenikol, neomicin, streptomycin, tetraciklin kao inhibitori sinteze proteina; novobiocin kao inhibitor sinteze nukleinskih kiselina (Tablica 6.). Kolonije pojedinog izolata porasle na krutoj hranjivoj podlozi, MRS hranjivi agar, inokulirane su prekončno u tekuću hranjivu podlogu. Gustoća stanica u prekončnoj kulturi određena je očitavanjem stupnja McFarland pomoću denzitometra. 100 μ L suspenzije stanica je inokulirano u krutu hranjivu podlogu.



Slika 7. Raspored nanošenja filter-diskova s određenom koncentracijom pojedinog antibiotika na krutu hranjivu podlogu inokuliranu bakterijskim izolatom iz probiotičkog pripravka.

Oznake antibiotika:

Amp – ampicilin	N - neomicin
B – bacitracin	NV - novobiocin
C – kloramfenikol	P - penicilin G
Da – klindamicin	VA - vankomicin
Cn – gentamicin	S - streptomycin
E – eritromicin	TE – tetraciklin

Na svaku ploču s određenim izolatom postavljeno je šest filter diskova, redom kako je prikazano na Slici 7., koje su zatim stavljeni na inkubaciju pri optimalnoj temperaturi rasta. Nakon inkubacije pri optimalnim uvjetima rasta za pojedini izolat, slijedi mjerenje promjera

zona inhibicije, uključujući i promjer diska. Rezultati (prosjeak od 3 čitanja) su izraženi u milimetrima (Zhou i sur. 2005). Provedeni su testovi difuzije diska (Oxoid) za ampicilin (2 µg disk), bacitracin (10 µg disk), kloramfenikol (10 µg disk), klindamicin (2 µg disk), gentamicin (10 µg disk), eritromicin (5 µg disk), neomicin (10 µg disk), novobiocin (5 µg disk), penicilin G (1 unit), rifampicin (5 µg disk), vankomicin (30 µg disk), streptomycin (10 µg disk), tetraciklin (10 µg disk), (Salminen 2007) (Tablica 6.).

U tablici 6. su navedeni put sinteze, struktura i mikroorganizam producent antibiotika koji su korišteni za izradu antibiograma odnosno u ispitivanju osjetljivosti pojedinog probiotičkog soj na antibiotik.

Tablica 6. Antibiotici različitih skupina i mikroorganizmi producenti primjenjeni za izradu antibiograma probiotičkih sojeva.

Naziv	Put sinteze/struktura	Mikroorganizam producent
Ampicilin	Polusintetski/β-laktamski	<i>Penicillium chrysogenum</i> *
Bacitracin	Mikrobna biosinteza/Peptidni	<i>Bacillus licheniformis</i>
Kloramfenikol	Mikrobna i kemijska sinteza/aromatski	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Klindamicin	Polusintetski/derivat oligosaharida	<i>Streptomyces lincolnensis</i> *
Eritromicin	Mikrobna biosinteza/ Makrolidni	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
Gentamicin	Mikrobna biosinteza/Aminoglikozidni	<i>Micromonospora purpurea</i>
Neomicin	Mikrobna biosinteza/Aminoglikozidni	<i>Streptomyces fradiae</i>
Novobiocin	Mikrobna biosinteza/Kumarinski	<i>Streptomyces spheroides</i>
Penicilin G	Mikrobna biosinteza/β-laktamski	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Rifampicin	Polusintetski/Poliketidni	<i>Streptomyces mediterranei</i> *
Streptomycin	Mikrobna biosinteza/Aminoglikozidi	<i>Streptomyces griseus</i>
Tetraciklin	Mikrobna biosinteza/Poliketidni	<i>Streptomyces aureofaciens</i>

3.2.1.12. Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika primjenom E-testa

Gustoća suspenzije bakterijskih stanica podesi se na vrijednost McFarland standarda 1, te se bakterijski sojevi inokuliraju na MRS hranjvi agar. Na površinu ohlađenog MRS agara nanese se E-test s gradijentom koncentracije pojedinog antibiotika ampicilina, klindamicina, eritromicina, gentamicina, streptomicina, tetraciklina i vankomicina u rasponu od 0.016 do 256 µg/ml. Slijedi inkubacija tijekom noći pri optimalnim uvjetima rasta ispitivanih bakterijskih sojeva. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIC) se očitava prema uputama proizvođača. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIC) je najmanja vrijednost

koncentracije antibiotika koja inhibira bakterijski rast vidljiv nakon prekonoćne inkubacije pri optimalnim uvjetima rasta određenog mikroorganizma.

Kako bi se ustanovila prisutnost rezistencije na pojedini antibiotik panel stručnjaka FEEDAP ovlašten od Europske komisije definira mikrobiološke cut-off vrijednosti (EFSA, 2012). Mikrobiološke cut-off vrijednosti su definirane na temelju istraživanja vrijednosti MIC pojedinih antimikrobnih komponenti koje su potrebne za inhibiciju rasta pojedine bakterijske vrste. Podaci koji se primjenjuju za definiranje cut-off vrijednosti, koje je objavila EFSA, nalaze se u Tablici 7., a definirani su na temelju istraživanja koje je provela Europska Komisija za Ispitivanje Antimikrobne Osjetljivosti (*engl.* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST, <http://www.eucast.org/>) i nacionalni i Europski nadzorni odbori. Za analizu osjetljivosti pojedinih probiotičkih bakterija na različite antibiotike, a koje se koriste kao dodaci hrani, sojevi se mogu kategorizirati kao osjetljivi ili rezistentni na antibiotike: Osjetljiv (S) soj bakterije se smatra osjetljiv na antibiotik kada ga inhibira koncentracija jednaka ili niža od definirane granične vrijednosti MIC ($S \leq x \text{ mg / L}$); rezistentan (R): soj bakterija se smatra rezistentan kada soj nije inhibiran u koncentraciji antibiotika većoj od utvrđene granične vrijednosti MIC ($R > x \text{ mg / L}$) (Tablica 7.).

Osjetljivost bakterijskih izolata iz roda *Lactobacillus* i *L. rhamnosus* GG određena je pomoću E-testa. Na površinu inokuliranog MRS agara položene su trake s antibioticima E-test. MIC vrijednosti su određene nakon inkubacije u mikroaerofilnim uvjetima pri 37° C tijekom 24 sata. Osjetljivost sojeva *S. aureus* K-144 i *Escherichia coli* ATCC 25922 na antibiotike su korištene kao referentne vrijednosti.

Tablica 7. Vrijednosti minimalnih inhibicijskih koncentracija (MIC) pojedinih antibiotika, definirani prema EFSA, koje inhibiraju rast pojedinih bakterijskih vrsta koje su važni industrijski mikroorganizmi

Minimalne inhibicijske koncentracije (mg/L)	ampicilin	vankomicin	gentamicin	kanamicin	streptomycin	eritromicin	klindamicin	tetraciklin	kloramfenikol
Mikroorganizam									
<i>Lactobacillus</i> obavezno homofermentativni ^a	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> grupa	1	2	16	64	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> obavezno homofermentativni ^b	2	n.o.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.o.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> fakultativno heterofermentativni ^c	4	n.o.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.o.	16	64	n.o.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.o.	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lactobacillus casei /paracasei</i>	4	n.o.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.o.	128	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.o.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.o.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	64	64	2	2	4	4
<i>Bacillus spp</i>	n.o.	4	4	8	8	4	4	8	8
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2
Ostali Gram +	1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2

n.o. nije obavezno

^a uključujući *L. delbrueckii*, *L. helveticus*

^b nije obavezno za *L. salivarius*

^c uključujući *L. fermentum*

3.2.1.13. Izolacija genomske DNA

MRS podloga se inokulira s 5% prekonoćne kulture i inkubira 18 h pri 37°C. 1,5 ml prekonoćne kulture se centrifugira na 4000 okr/min tijekom 5 min i ispire u GTE puferu (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500 µl GTE pufera, uz dodatak lizozima (8 mg/500 µl) i RNA-ze (50 µl/ml) i inkubiraju 30 min pri 37°C. Zatim se dodaje 250 µl 2% SDS-a i vorteksira 1 min. Nakon toga se dodaje 100 µl neutralne smjese fenola i kloroforma, vorteksira 30 sekundi i centrifugira na 13000 okr/min tijekom 5 min. Supernatant se bez interfaze pomiješa s 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8) i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) slijedi centrifugiranje na 13000 okr/min tijekom 10 min. Talog se resuspendira u 300 µl 0,3 M NaAc

i 10 mM MgCl₂ i vorteksira. Nakon dodatka 700 µl apsolutnog etanola (ohlađenog na -20°C), uzorak se inkubira preko noći pri -20°C. Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 14000 okr/min tijekom 20 min. Talog se suspendira u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na -20°C) i ponovno centrifugira na 13000 okr/min tijekom 5 min. Talog DNA se resuspendira u 50 µl TE pufera (10 mM Tris + 1 mM EDTA).

3.2.1.14. Lančana reakcija polimerazom

Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze provedeno je u uređaju za PCR, Mastercycler personal, “Eppendorf” prema sastavu reakcijske smjese opisanim Tablici 8. i uvjetima PCR reakcije navedenim u Tablici 9. U ovom radu, kao DNA-kalup korištena je genomska DNA bakterijskih stanica izolirana kao što je to opisano u poglavlju 3.2.1.13. *Izolacija DNA*. Korištene su početnice specifične za rodove *Lactobacillus* LbLMA1-rev i R16-1 prema Dubernet i sur. (2002) odnosno za *Bifidobacterium* (Bb) (oligo-1 i oligo-2) redosljeda nukleotidnih sekvenci koji je naveden u Tablici 10. prema Kaufman i sur. (1997). Reakcijske smjese volumena 50 µl sadržavale su pojedine komponente za lančanu reakciju polimeraze kako je navedeno u Tablici 8.

Tablica 8. Sastav PCR reakcijske smjese za umnažanje ciljane sekvence u genomu *Lactobacillus*, odnosno *Bifidobacterium* sojeva.

	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
DNA-kalup	50 ng	50 ng
Početnice	0,5 µM	1 µM
Pufer	1 x	1 x
deoksiribonukleozid-trifosfati	0,2 mM	0,3 mM
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 mM
Taq polimeraza	2,5 U	2 U

Tablica 9. Uvjeti PCR za amplifikaciju ciljane sekvence su bili sljedeći:

Uvjeti PCR reakcije	Temperatura		Trajanje	
	Lb	Bb	Lb	Bb
Početna denaturacija	95°C	94°C	5 min	5 min
30 ciklusa:				
Denaturacija	95°C	94°C	30 s	1 min
Sparivanje početnica	55°C	57°C	30 s	3 min
Produljivanje lanca DNA	72°C	72°C	30 s	4 min
Završno produljivanje lanca DNA	72°C	72°C	7 min	8 min

Komplementarno sparivanje kalupa je provedeno s početnicama prikazanim u Tablici 10.:

Tablica 10. Slijedovi nukleotida korištenih početnica u PCR reakcijama specifičnim za bakterijsku vrstu.

Početnica	Nukleotidna sekvenca (5'→3')
LbLMA1-rev	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC
R16-1	CTTGTACACACCGCCCGTCA
lm26	GATTCTGGCTCAGGATGAACG
lm3	CGGGTGCTACCCACTTTCATG

3.2.1.15. Metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA

Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimeraze provedeno je u uređaju za PCR, Mastercycler personal, "Eppendorf" prema uvjetima navedenim u Tablici 11. Kao DNA-kalup korištena je genomska DNA bakterijskih stanica izolirana prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1.13 *Izolacija DNA*. Reakcijska smjesa volumena 50 µl bila je sljedećeg sastava (Gardner i sur., 2002 i Leboš Pavunc i sur., 2009):

DNA-kalup	1 µl
Početnice	1 µM
Pufer	1 x
deoksiribonukleozid-trifosfati	200 µM
MgCl ₂	4 mM
Taq polimeraza	2,5 U

Tablica 11. Umnožavanje ciljane DNA sekvence zas RAPD provedeno je pri sljedećim uvjetima PCR reakcije (Gardner i sur., 2002):

Uvjeti PCR reakcije	Temperatura	Trajanje
Početna denaturacija	94°C	5 min
40 ciklusa:		
Denaturacija	94°C	30 s
Sparivanje početnica	36°C	30 s
Produljivanje lanca DNA	72°C	2 min
Završno produljivanje lanca DNA	72°C	10 min

Komplementarno sparivanje početnica s kalupom trajalo je 1 minutu i to za umnažanje fragmenata specifičnih za bakterije mliječne kiseline upotrebom početnica prikazanih u Tablici 12. pri 36°C:

Tablica 12. Slijedovi nukleotida korištenih početnica (Gardner i sur., 2002):

Početnica	Nukleotidna sekvenca (5'→3')
2a	ACGAGGCAC
2b	ACGCGCCCT3

3.2.1.16. DNA elektroforeza u gelu agaroze

Koristi se 1,5% agarozni gel u kadici za elektroforezu u koju se ulije 1xTAE-pufer, tako da gel bude uronjen u pufer. U prvu jažicu se dodaje standard koji sadrži smjesu DNA fragmenata poznatih veličina odnosno λ DNA HindIII i 100 bp DNA Ladder. Uzorci DNA pomiješani s bojom za nanošenje uzoraka se nanose u pojedine jažice na 1 %-tnom agaroznom gelu. Elektroforeza u kadicama GNA 100 se provodi pri naponu od 70 V u vremenu od 2 sata. Nakon provedene elektroforeze gel se boja etidijevim-bromidom kroz 15 minuta, nakon čega se osvijetli ultraljubičastim svjetlom na UV transiluminatoru DNR BioImaging System pri valnoj duljini od 254 nm i fotografira pomoću programa Gel Capture.

3.2.1.17. Identifikacija bakterijskih sojeva sekvencioniranjem 16S rRNA gena

U uzorcima DNA izmjerena je koncentracije ekstrahirane ukupne genomske DNA pojedinih bakterijskih sojeva pomoću BioSpec-nano uređaja za određivanje koncentracije DNA i proteina direktno iz uzorka (Shimadzu Biotech). Za provjeru uspješnost izolacije DNA iz bakterijskog soja, pripremljeni uzorci se nanese na 0,8 % agarozni gel. Elektroforeza u kadicama GNA 100 se provodi pri naponu od 70 V tijekom 1-2 sata.

U PCR reakciji za amplifikaciju varijabilne regije 16S rRNA gena korištene su početnice: UNI16S_{forward} 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GC-3' i UNI16S_{reverse} 5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3'. PCR reakcija se provela u uređaju PCR THERMALCYCLER (Biosistemi, 96 jažica) ili Master Cycler personal. Komplementarno sparivanje početnica s DNA kalupom, traje 30 sekundi i to za umnožavanje fragmenata ispitivanih gena upotrebom početnica UNI16S_{forward} i UNI16S_{reverse} pri temperaturi sparivanja 50°C (*engl.* annealing temperature). Prisutnost PCR produkta, odnosno uspješnost umnažanja ciljane sekvence, provjerena je detekcijom na 0.8 % (w/v) agaroznom gelu. Dobiveni PCR amplikoni su pročišćeni pomoću QIAquick kita za pročišćavanje DNA (QIAGEN, Njemačka) prema uputama proizvođača, kako bi se uklonio višak nesparenih početnica i slobodnih nukleotida, nakon čega slijedi sekvencioniranje. Sekvencioniranje 16S rDNA regija je provedeno u ovlaštenoj instituciji MacroGen (Amsterdam, Nizozemska). Na temelju rezultata DNA sekvencioniranja, provedena je BLAST analiza 16S rRNA sekvence. Baza podataka dostupna je na poveznici NCBI (*engl.* National Center for Biotechnology Information) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> primjenom BLAST (*engl.* Basic Local Alignment Search Tool) algoritma provedeno je poravnavanje tražene sekvence sa svim sekvencama prisutnim u bazi podataka, te kao rezultat

dobiven je popis najuspješnijih podudaranja. Pretraživanje baze podataka omogućiti će identifikaciju bakterijskog izolata (Šušković i sur., 2021).

3.2.2. Testovi za karakterizaciju funkcionalnosti *in vitro*

3.2.2.1. Ispitivanje tolerancije bakterijskih sojeva na različite koncentracije soli i pH vrijednosti

Ispitana je tolerancija bakterijskih sojeva na različite koncentracije soli tako da je praćeno preživljavanje odabranih sojeva u tekućoj MRS hranjivoj podlozi uz dodatak 1,6%, 5%, 10% i 15% NaCl, odnosno pri različitim pH vrijednostima: 2, 6 i 8, svaki sat vremena tijekom šest sati, a zatim nakon 24 h i 72 h. Kao kontrola rasta sojeva iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* iz probiotičkim pripravaka praćen je rast sojeva u tekućoj MRS hranjivoj podlozi.

3.2.2.2. Ispitivanje preživljavanja bakterija u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Simulirani želučani sok je pripremljen suspendiranjem pepsina (3 g/L) u 0,5% otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,0 s koncentriranom kloridnom kiselinom. Simulirani sok tankoga crijeva je pripremljen suspendiranjem pankreatina (1 g/L), samog ili i žučnih soli (3,0 mg/mL goveđe žuči) u 0,5% otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom (Kos, 2001).

Suspencije bakterijskih stanica su inkubirane u simuliranom želučanom soku (pH = 2) tijekom 2 sata, a zatim su centrifugirane pri 3500 okr/min i resuspendirane u simuliranom soku tankoga crijeva (3 mg/mL goveđe žuči) i inkubirane tijekom 3 sata pri 37°C (Kos i sur., 2003). Broj živih stanica određivan je indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.1.2. *Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom.*

3.2.2.3. Turbidimetrijska metoda za određivanje antimikrobnog djelovanja bakterijskih sojeva

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 100 µL supernatanta ispitivane bakterijske kulture i 10 µL prekonoćne kulture pojedinog test mikroorganizma razrijeđene u 90 µL hranjivog tekuće podloge. Antibakterijsko djelovanje ispitivane bakterijske kulture prema test

mikroorganizmima tijekom 24 sata uzgoja pri 37 °C određeno je spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (inokulirana hranjivi tekuća podloga bez dodanog supernatanta ispitivane bakterije) i uzoraka s dodanim supernatantom mjera je inhibicije rasta test mikroorganizma. Apsorbancija ne inokulirane hranjive podloge predstavlja slijepu probu.

3.2.2.4. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara (“Agar-spot-test metoda”)

Ova metoda se koristi za testiranje antagonističkog međudjelovanja bakterija mliječne kiseline. Kultura bakterije, čija se antibakterijska aktivnost ispituje, nacijepi se u obliku kapi (5 µl) na MRS-agar hranjivu podlogu i inkubira na 37°C dok se ne razviju kolonije (18-24 h). Petrijeve zdjelice, na kojima su izrasle kolonije, se preliju s 10 ml MRS „soft-agara“, koji sadrži 100 µl suspenzije testiranog mikroorganizma. Inkubacija traje 24 sata pri 37°C. Nakon inkubacije se izmjere promjeri narasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID) te se izračuna efektivni inhibicijski odnos (EIR) prema izrazu:

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

A rezultati interpretiraju prema dobivenim vrijednostima i to :

$\text{EIR} < 0,5$ – slaba inhibicija

$0,5 < \text{EIR} < 1,5$ – umjerena inhibicija

$\text{EIR} > 1,5$ – značajna inhibicija

3.2.2.5. Ispitivanje autoagregacijskih i koagregacijskih svojstava bakterija mliječne kiseline

Bakterijske kulture su uzgojene u MRS tekućoj podlozi pri 37 °C tijekom 18 sati. Autoagregacijska i koagregacijska svojstva bakterijskih stanica odabranih kultura ispitana su u fosfatnom puferu (pH=7,2). Suspenzija bakterijskih stanica (4 mL) je izmiješana na vibromješaču, a zatim je određivana bakterijska autoagregacija i koagregacija tijekom 5 h pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija pri 600 nm je očitana uzorcima dobivenim prenošenjem 0,1 mL s vrha suspenzije bakterijskih stanica u 3,9 mL fosfatnog pufera (pH=7,2).

Postotak autoagregacije je izračunat prema formuli:

$$\% \text{ agregacije} = (1 - A_t/A_0) \times 100$$

A_t – aposorbancija u vremenu t (1, 2, 3, 4 ili 5 h)

A_0 – apsorbancija u vremenu $t=0$

Ispitana je također koagregacija odabranih bakterijskih sojeva s potencijalno patogenim mikroorganizmima *Escherichia coli* 3014 i *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FP1. Po 2 mL svake od para bakterijskih suspenzija izmiješa se na vibromješaču i ostavi stajati tijekom 5 h na sobnoj temperaturi. Uzorci su uzimani na isti način kao i za određivanje autoagregacije, očitana im je apsorbancija pri 600 nm, a postotak koagregacije je izračunat prema formuli:

$$\% \text{ koagregacije} = [(OD_x + OD_y)/2 - OD_{(x+y)}] / [(OD_x + OD_y)/2] \times 100$$

gdje su x i y pojedinačne bakterijske suspenzije ispitivanog bakterijskog para, a $(x + y)$ predstavlja suspenziju ispitivanog para bakterija (Kos i sur., 2003).

3.2.2.6. Bakterijska adhezija na otapala

BATS metoda (*engl.* Bacterial adhesion to solvents) je metoda za određivanje hidrofobnosti, te bazičnih (elektron-donorskih) i kiselih (elektron-akceptorskih) svojstava bakterija mliječne kiseline (Valeriano i sur., 2014). Bakterijski sojevi su nakon rasta u MRS tekućoj podlozi pri 37 °C tijekom 18 h, centrifugirane pri 3500 okr/min tijekom 15 minuta, isprane sterilnom destiliranom vodom i suspendirane u 0,1 M KNO_3 (pH=6,2). Priređenim suspenzijama mikrobnih stanica očitana je optička gustoća pri 620 nm (A_0), a zatim je dodano 1mL odgovarajućeg otapala (kloroform -elektron-akceptorsko otapalo; etil-acetat - jako elektron-donorsko otapalo i heksan, nepolarno otapalo). Priređena smjesa se homogenizirala tijekom 2 minute na vibromješaču. Slijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi kroz 20 minuta nakon čega je oprezno uzorkovano 100 μ L uzorka vodene faze te se je ponovno očitana apsorbancija (A) pomoću čitača mikrotitarskih pločica.

$$\% \text{ adhezije} = [(1-A)/A_0] \times 100$$

3.2.2.7. Spektrofotometrijsko određivanje slobodne kolne kiseline

Koncentracija slobodne kolne kiseline, nastale zbog hidrolazne (dekonjugacijske) aktivnosti odabranih bakterija mliječne kiseline je određivana nakon 24 h uzgoja u MRS bujonu s dodanih 2 mg/mL natrijeva taurodeoksikolata. U 3 mL uzorka dodano je 0,6 mL 4 M NaOH i 3,6 mL etilacetata. Dobro promućkana smjesa ostavi se 15 min na sobnoj temperaturi da bi se razdvojile faze. Količina od 2 mL gornjeg sloja etilacetata prenese se u čistu epruvetu pa se zatim otpari pri 60 °C u struji dušika. Suhi se ostatak otopi u 1 mL 0,01 M NaOH i 6 mL 8 M H₂SO₄ i 1%-tnog furfuraldehida, te ostavi stajati 13 min u vodenoj kupelji pri 65 °C. Nakon hlađenja uzorku se doda 5 mL ledene octene kiseline i očita se apsorbancija pri 660 nm. Za izradu baždarne krivulje pripremaju se otopine standardnih koncentracija: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 i 1 mg kolne kiseline/mL 0,01 M NaOH, a obrađuju se slijedom opisanim za uzorke nakon otparavanja. Paralelno je tijekom 24 sata uzgoja praćen rast odabranih sojeva mjerenjem apsorbancije pri 620 nm (Kos i sur., 2003).

3.2.2.8. Ispitivanje asimilacije prebiotičkih supstrata

Za ispitivanje asimilacije prebiotičkih supstrata pripremljene su MRS hranjive podloge koje su sadržavale sve sastojke osim glukoze umjesto koje je dodan jedan od sljedećih prebiotika: inulin, fruktooligosaharid (raftiloza), laktuloza ili manitol u koncentraciji od 10 g/L. Kao kontrola se koristi hranjiva podloga bez prebiotika kako bi se eliminirao rast na ostalim sastojcima hranjive podloge. Podloge su inokulirane s 5%-tnim inokulumom pojedinog soja i inkubirane tijekom 24 sata. Tijekom uzgoja je praćen rast bakterija mjerenjem apsorbancije pri 620 nm. Proizvodnja mliječne kiseline i pH vrijednost su određene nakon završetka uzgoja. pH vrijednost je izmjerena korištenjem pH-metra, a za određivanje mliječne kiseline je 1 mL uzorka razrijeđen s 19 mL destilirane vode u Erlenmeyerovoj tikvici od 100 mL. Razrijeđeni uzorak je titriran s 0,1 M NaOH uz fenolftalein kao indikator, do pojave blijedo ružičaste boje.

$$^{\circ}SH = a \cdot 20 \cdot f_{NaOH} \cdot 2$$

$$\% \text{ mliječne kiseline} = ^{\circ}SH \cdot 0,0225$$

$$a = \text{mL } 0,1 \text{ M NaOH } (1^{\circ}SH \sim 0,0225 \text{ g mliječne kiseline } (\%))$$

3.2.2.9. *In vitro* adhezija na proteine ekstracelularnog matriksa

Eksperimenti *in vitro* adhezije na proteine ekstracelularnog matriksa provedeni su s bakterijskim stanicama iz kasne eksponencijalne faze (OD_{620nm} od 3,5-4; odgovara $1,2 \times 10^9$ do $1,4 \times 10^9$ CFU ml/l). Ispitivanje adhezije bakterijskih stanica se provodilo u Polysorp mikrotitarskim pločama s 96 jažica (Nunc, Danska) koje na ravnom dnu sadrže imobilizirane proteine ekstracelularnog matriksa. Mikrotitarske ploče su presvučene s 50 μ g/ml fibronektina (Sigma, Njemačka), odnosno laminina ili kolagena u karbonatnom/bikarbonatnom puferu 50 mmol/l, pH 9,6, nakon čega su jažice mikrotitarskih ploča isprane tri puta s fosfatnim puferom i inkubirane 1 h u 1 % otopini Tween 20 (Fisher Scientific, New Jersey, SAD) u fosfatnom puferu. Nakon što je gustoća bakterijskih stanica svakog pojedinog soja podešena na $OD_{620nm} = 1,0$ u fosfatnom puferu, 100 μ l bakterijske suspenzije dodano je u jažice mikrotitarske pločice s imobiliziranim proteinom ekstracelularnog matriksa, te je slijedila inkubacija bakterijskih stanica preko noći pri 4 °C. Slijedilo je trostruko ispiranje sadržaja mikrotitarskih položica s 200 μ l fosfatnog pufera koji sadrži Tween 20, kako bi se uklonile nevezane bakterijske stanice, te je mikrotitarska pločica do sušenja sadržaja inkubirana na sobnoj temperaturi (vrijeme inkubacije približno 1 h). Tako priređene adhezirane bakterijske stanice bojane su s kristal violetom (1 mg ml/l tijekom 45 min, pH 4,0). Nakon ponovnog ispiranja, suvišak boje kristal violeta je uklonjen dodatkom 50 mmol/l citratnog pufera pH 4,0 (100 μ l po jažici), nakon čega je očitana apsorbancija pri 620 nm u čitaču mikrotitarskih ploča LKB 5060-006 („GDV“, Rim, Italija). Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta i rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri nezavisna pokusa, te je izračunata standardna devijacija (SD).

3.2.2.10. *In vitro* adhezija na glikoprotein mucin

Vezanje probiotičkih sojeva na mucin je provedeno na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica, koje su inokulirane bakterijskim stanicama poraslim do eksponencijalne faze rasta. U jažice mikrotitarskih pločica se prethodno, prije dodatka suspenzija bakterijskih stanica, dodaje glikoprotein mucin u koncentraciji od 50 μ g/mL u karbonatnom/bikarbonatnom puferu (50 mmol/L, pH 9,6) te se inkubira preko noći pri 4 °C. Potom se jažice isperu tri puta s fosfatnim puferom, te se mucin imobilizira tijekom sat vremena dodatkom 1% Tween 20 u fosfatnom puferu. 100 μ l suspenzije svakog soja, kojoj je podešena OD_{620} na 1 u fosfatnom puferu, se doda u svaku jažicu mikrotitarske pločice koje se zatim inkubiraju preko noći pri 37 °C. Nakon

uklanjanja neadsorbiranih odnosno nevezanih stanica (tri uzastopna ispiranja s 200 μ l 0.05% Tween 20 u fosfatnom puferu) mikrotitarske pločice se suše pri sobnoj temperaturi i vezane (adhezirane) stanice se detektiraju bojanjem kristal violetom. Potom se mikrotitarske pločice isperu s 100 μ l citratnog pufera (50 mmol/L, pH 4,0) i određuje se apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“ pri 620 nm. Također je određena i *in vitro* adhezija probiotičkih sojeva na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica koje ne sadrže vezani mucin kao kontrola. Eksperimenti su ponovljeni tri puta za izračunavanje srednje vrijednosti i standardne devijacije.

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Identifikacija probiotičkih sojeva iz pripravaka

Komercijalno dostupni probiotički pripravci na hrvatskom tržištu su nasumično prikupljeni i katalogizirani prema vrstama probiotičkih bakterija koje sadrže, formulaciji proizvoda i njihovoj namjeni, a označeni su redom PP1 do PP13. Radi se o pripravcima koji su, prema deklaraciji, namijenjeni za profilaksu ili ublažavanje većinom funkcionalnih poremećaja probavnog sustava odraslih osoba, djece ili dojenčadi i dostupni su u obliku formulacije tableta, pastila, vrećica s liofiliziranim pripravkom odgovarajuće doze ili kapi, te sadrže pojedinačne ili mješovite bakterijske kulture. No analiza je uključivala i PP10 koji se prema deklaraciji primjenjuje za modulaciju sastava mikrobiote usne šupljine djece, te pripravak PP13 koji se primjenjuje kod infekcija urogenitalnog trakta žena. U konačnici je prikupljeno 13 komercijalnih probiotičkih pripravaka od koji prema deklaraciji 11 sadrži visok broj živih stanica BMK iz rodova *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium*. Prema deklaraciji, probiotički pripravci sadrže probiotičke sojeve sa znanstveno dokazanim učincima u kliničkim ispitivanjima poput *L. rhamnosus* GG® ili *Bifidobacterium longum* BB536, koji su svjetski poznati sojevi. Eksperimentalni pristup obuhvaća primjenu brzih, učinkovitih i ekonomičnih metoda za provjeru tvrdnji deklariranih na probiotičkim pripravcima. U pripravku koji je sadržavao četrnaest različitih bakterijskih sojeva, uključujući i soj *Bacillus subtilis*, i u pripravku PP10 s 4 mikrobne vrste od kojih 2 pripadaju vrsti *Streptococcus salivarius*, otežana je izolacija čistih kultura mikroorganizama, stoga su isključeni iz daljnjih istraživanja. Provedena je karakterizacija fenotipskih svojstava i genotipska identifikacija bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka s ciljem uvida u točnost deklaracije na probiotičkom pripravku. Za izolaciju pojedinačnih mikrobnih kultura sadržanih u pripravcima korištene su klasične mikrobiološke metode te su definirane fiziološke i metaboličke karakteristike. U eksperimentima, te s obzirom na deklaraciju bakterijskih sojeva navedenih na proizvodu, primjenjene su selektivne hranjive podloge za rast, i to MRS hranjivi agar za izolaciju *Lactobacillus* sojeva i TOS-propionat hranjivi agar za izolaciju *Bifidobacterium* sojeva. Određivanjem broja poraslih bakterijskih kolonija (CFU/ml ili g) ustanovljeno je da je koncentracija bakterijskih stanica u svim probiotičkim pripravcima visoka, te je određen broj poraslih bakterijskih kolonija iznosio najmanje 10^5 CFU/ml. Broj poraslih bakterijskih kolonija je u rasponu vrijednosti između 10^5 do 10^9 CFU/ml ili CFU/g (Tablica 13.). Prema rezultatima, u dva probiotička pripravaka, broj mikrobnih stanica je iznosio ispod 10^6

CFU/ml, no treba istaknuti da se radi o probiotičkim pripravcima koji prema deklaraciji sadrže više različitih bakterijskih vrsta, te da *Streptococcus* vrste slabije rastu na MRS agaru, te da je selektivna podloga za učinkovitiju izolaciju ovih mikrobnih vrsta primjerice Columbia krvni agar. Za sve ostale pripravke potrebno je istaknuti da je CFU iznosio iznad 10^6 CFU/ml što je u skladu s deklaracijom navedenom na proizvodu, i još značajnije, sa zahtjevima definiranim prema ovlaštenim institucijama za postizanje probiotičkih učinaka u domaćinu. Kako nije bilo moguće razdvojiti sojeve koji prema deklaraciji u probiotičkim pripravcima sadrže više od 3 različite bakterijske vrste, u daljnjim analizama isključili smo probiotičke pripravke PP6 i PP7, te probiotički pripravak sa znatno nižim brojem bakterijskih stanica od onog navedenog na deklaraciji PP10, a koji sadrži 4 različita bakterijska soja. Podaci na deklaracijama probiotičkih pripravaka ispravno navode nazive bakterijskih vrsta, dok pojedini pripravci deklariraju ispravno taksonomsku identifikaciju do razine soja, što je slučaj za jedan od znanstveno najistraženijih probiotičkih sojeva *L. rhamnosus* GG® (Sanders i Leiber, 2014). Slično primjerice na jednom probiotičkom pripravku je naveden komercijalni naziv soja *Lb. reuteri* Protectis koji je već toliko uobičajen da se koristi i u znanstvenoj literaturi, a ispravan taksonomski naziv je u *Lb. reuteri* DSM 17938. U jednom od probiotičkih proizvoda PP13 određeno je i preživljavanje sadržanih probiotičkih kultura tijekom duljeg vremenskog perioda, tijekom 150 dana i ustanovljeno je da je u pripravku zadržan visoki broj metabolički aktivnih bakterijskih stanica tijekom skladištenja pri 4°C. No prilikom skladištenja pri sobnoj temperaturi ipak je zabilježeno smanjenje broja bakterijskih stanica i vrijednost je iznosila $1,3 \times 10^7$ CFU/ml što još uvijek vrijednost koja je iznad preporučene dnevne doze za unos probiotičkih stanica (Tablica 14.).

Tablica 13. Usporedba broja mikroorganizama navedenih na deklaraciji probiotičkih proizvoda (PP) i broja bakterijskih stanica nakon rasta na MRS ili TOS selektivnim hranjivim plogama.

Probiotički proizvod	Formulacija proizvoda	Primjena prema deklaraciji	Broj izoliranih vrsta	Deklariran broj mikroorganizama	Određen broj bakterijskih kolonija (CFU/ml; CFU/g)
PP1	kapi	GIT	1	1,0x10 ⁹ CFU	1,5x10 ⁹
PP2	liofilizirani pripravak	kolike dojenčadi	2	Nije navedeno	1,1x10 ⁹
PP3	liofilizirani pripravak	GIT i imunomodulacija	1	9,2x10 ⁸	4,0x10 ⁹
PP4	kapsule	GIT	1	1,0x10 ⁸	4,0x10 ⁸
PP5	pastille	mikrobiota oralne šupljine	1	2,0x10 ⁸	1,0x10 ⁹
PP6	liofilizirani pripravak	GIT	2	4,0x10 ⁹	4,0x10 ⁹
PP7	kapsule	GIT	14	1,0x10 ¹⁰	3,0x10 ¹⁰
PP8	kapsule	GIT	2	1,0x10 ⁹	1,0x10 ⁹
PP9	kapi	GIT dojenčadi	1	1,0x10 ⁸	1,0x10 ⁸
PP10	tablete	GIT i usna šupljina	3 (4)	3,5x10 ⁶ 2,5x10 ⁶ 1,0x10 ⁷	2,0x10 ⁵
PP11	liofilizirani pripravak	GIT	4 (5)	1,0x10 ¹⁰	2,5x10 ¹⁰
PP12	liofilizirani pripravak	GIT	3	1,0x10 ¹⁰	1,0x10 ¹⁰
PP13	kapsule	vaginalna mikrobiota	2	1,0x10 ⁹	1,43x10 ¹⁰

Tablica 14. Usporedba broj bakterijskih stanica pri različitim temperaturama skladištenja tijekom 5 mjeseci. Broj bakterijski stanica određen je nakon inokulacije bakterijskih kultura iz PP13 na MRS hranjivom podlozi.

Temperatura skladištenja pripravaka	Broj CFU/g uzorka					
	0 dan	30 dan	60 dana	90 dana	120 dana	150 dana
4 °C	1,43x10 ¹⁰	1,40x10 ¹⁰	1,36x10 ¹⁰	1,20x10 ¹⁰	1,10x10 ¹⁰	1,00x10 ¹⁰
Sobna temperatura	1,40x10 ¹⁰	1,18x10 ¹⁰	6,31x10 ⁹	2,10x10 ⁸	1,60x10 ⁷	1,30x10 ⁷

Bakterijski sojevi su inokulirani u selektivnu tekuću hranjivu podlogu i zatim inkubirani pri različitim uvjetima rasta, mikroaerofilno ili anaerobno pri različitim temperaturama kako bi se definirali optimalni uvjeti za rast. Provedena je fenotipska karakterizacija za definiranje fizioloških svojstava bakterijskih sojeva. Pri tome su bakterijski sojevi bojani metodom po Gramu, zatim mikroskopirani što je omogućilo i određivanje morfologije bakterijskih stanica. Ispitana je aktivnost enzima katalaze, te su bakterijski sojevi ispitani brzom KOH metodom te je proveden test sporogenosti (Tablica 15.). Na temelju rezultata ovih klasičnih mikrobioloških metoda ustanovljeno je da su ispitani sojevi Gram-pozitivne, nesporogene, katalaza-negativne bakterije, morfologije kratkih ili dužih štapića ili koka, koje uspješno rastu pri 37 °C u anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima. Pri tome se sojevi deklarirani kao predstavnici *Bifidobacterium* vrsta rasli samo nakon inkubacije u striktno anaerobnim uvjetima i pokazali su mogućnost stvaranja plina, što upućuje na heterofermentativni metabolički put u stanici. Sojevi koji nisu pokazali svojstvo stvaranja plina iz glukoze smatraju se homofermentativnim, a u suprotnom heterofermentativnim. Na temelju rezultata stvaranja plina procijenjeno je da bakterijski sojevi *Lactobacillus* vrste provode homofermentativni ili heterofermentativni metabolički put razgradnje glukoze (Tablica 15.).

Tablica 15. Fiziološka svojstva bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravka.

Bakterijski soj	KOH metoda	Bojanje po Gramu	Katalaza test	Test sporogenosti	Stvaranje plina
1	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-
2A	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-
2B	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	+
3	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	+
4	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-
5/1	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-
6B	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	+
7A	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	+
8	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	+
8/1	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-
8/2	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-
9	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-
13A	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-
13B	G +	G +	katalaza-negativna	nesporogena	-

Nakon prekonocnog uzgoja pri optimalnim uvjetima rasta određene su vrijednosti pH, stupanj kiselosti i postotak sintetizirane mliječne kiseline u supernatantu bakterijske kulture (Tablica 16.). Rast bakterija procijenjen je na temelju uspješnosti acidifikacije okolnog mikrookoliša,

odnosno tekuće hranjive podloge, mjerenjem snižavanja pH vrijednosti, te određivanjem produktivnosti mliječne kiseline u istom vremenskom intervalu. Ulazak bakterijskih stanica iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta prati i smanjenje sinteze mliječne kiseline, a time i pH vrijednosti supernatanta kulture, te je kod većine *Lactobacillus* sojeva ustanovljena otprilike 12 do 16 sati nakon inokulacije početne kulture. pH vrijednosti određene u supernatantu kulture pojedinog soja su u rasponu od $3,74 \pm 0,65$ do $5,05 \pm 0,39$ i u skladu su s određenim postotkom proizvedene mliječne kiseline. Niske pH vrijednosti određene u supernatantu kulture pojedinih sojeva su rezultat prvenstveno sinteze mliječne kiseline, primarnog metabolita, što je prilog karakterizacije bakterijskih sojeva u skupinu BMK. Bakterije iz roda *Bifidobacterium* proizvode mliječnu kiselinu kao jedan od glavnih proizvoda metabolizma ugljikohidrata, ali su filogenetski značajno različite od rodova BMK. Specifičnost bifidobakterija u usporedbi primjerice sa sojevima *Lactobacillus* vrste je da razgrađuju heksozu specifičnim metaboličkim putem (*engl.* “bifid shunt”) u kojem enzim fruktoza-6-fosfoketolaza ima ključnu ulogu. Bakterijski sojevi čuvani su u obliku zamrznutih bakterijskih kultura pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi s 15% (v/v) glicerola.

Tablica 16. Proizvodnja mliječne kiseline, stupanj kiselosti i pH vrijednost u supernatantima kulture nakon prekonoćnog uzgoja pojedinih bakterijskih izolata u MRS tekućoj podlozi pri optimalnim uvjetima rasta.

Oznaka soja	°SH	Mliječna kiselina (%)	pH
1	$124,00 \pm 30,20$	$2,79 \pm 0,68$	$3,80 \pm 0,03$
2A	$108,00 \pm 28,80$	$2,43 \pm 0,65$	$3,81 \pm 0,13$
2B	$110,67 \pm 16,17$	$2,49 \pm 0,36$	$3,74 \pm 0,65$
3	$56,00 \pm 10,58$	$1,26 \pm 0,24$	$5,05 \pm 0,39$
4	$109,3 \pm 12,20$	$2,46 \pm 0,27$	$4,38 \pm 0,10$
5/1	$108,0 \pm 14,40$	$3,43 \pm 1,84$	$4,28 \pm 0,02$
6B	$96,00 \pm 10,00$	$2,16 \pm 0,51$	$3,85 \pm 0,25$
7A	$102,70 \pm 20,10$	$2,31 \pm 0,45$	$3,77 \pm 0,09$
8	$100,00 \pm 10,10$	$2,25 \pm 0,07$	$3,75 \pm 0,04$
8/1	$96,00 \pm 12,20$	$2,20 \pm 0,06$	$3,85 \pm 0,39$
8/2	$100,00 \pm 10,20$	$2,25 \pm 1,80$	$4,15 \pm 3,82$
9	$72,00 \pm 16,00$	$1,62 \pm 0,36$	$4,30 \pm 0,03$

Kako bi se ustanovila mogućnost sinteze različitih izvora ugljika provedena je fenotipska identifikacija sojeva iz roda *Lactobacillus* pomoću API 50 CHL testa (Slika 8.; Tablica 17. do 18.), te sustavom za identifikaciju BBL CRYSTAL™ ANR za *Bifidobacterium* sojeve (Tablica 19.). Metoda je omogućila identifikaciju sojeva do taksonomske razine vrste

analizom fermentacijskih profila 49 različitih ugljikohidratnih supstrata kao izvora ugljika. Ova metoda je brza, ekonomična i jednostavne izvedbe te omogućuje rutinsku provjeru velikog broja bakterijskih sojeva, a omogućila je identifikaciju sojeva koji pripadaju rodu *Lactobacillus* u 77% ispitanih probiotičkih pripravaka, što je u skladu s navedenom deklaracijom na probiotičkim pripravcima. Pri tome je za većinu sojeva vrijednost postotka identifikacije (% ID) iznad 90%, što upućuje da se radi o vrlo dobroj ili uspješnoj identifikaciji (Tablica 20.).



Slika 8. Fenotipska identifikacija *Lactobacillus rhamnosus* 13A (ID= 91,8%) i *Lactobacillus reuteri* 13B (ID= 99,7%) API 50 CHL testom

Tablica 17. Fermentacijski profili *L. rhamnosus* 13A i *L. reuteri* 13B određeni na temelju mogućnosti fermentacije određenog šećernog supstrata biokemijskim testom API 50 CHL.

Ugljikohidrati	Oznaka izolata		Ugljikohidrati	Oznaka izolata	
	13A	13B		13A	13B
Kontrola	-	-	Arbutin	-	+
Glicerol	-	-	Eskulin	±	+
Eritriol	-	-	Salicin	-	+
D-arabinoza	-	-	Celobioza	-	+
L-arabinoza	-	-	Maltoza	+	±
Riboza	+	±	Laktoza	+	+
D-ksiloza	-	-	Melibioza	+	-
L-ksiloza	-	-	Saharoza	±	-
Adonitol	-	-	Trehaloza	-	+
β-metil-ksilozid	-	-	Inulin	-	-
Galaktoza	+	+	Melezitoza	-	+
D-glukoza	+	+	D-rafinoza	+	-
D-fruktoza	+	-	Amidon	-	-
D-manoza	+	-	Glikogen	-	-
L-sorboza	+	-	Ksilitol	-	-
Ramnoza	±	-	β-gentobioza	-	+
Dulcitol	-	-	D-turanoz	-	+
Inozitol	±	-	D-liksoza	-	-
Manitol	+	-	D-tagatoza	-	+
Sorbitol	±	-	D-fukoza	-	-
α-metil-D-manozid	-	-	L-fukoza	-	-
α-metil-D-glukozid	+	-	D-arabitol	-	-
N-acetil glukozamin	+	-	L-arabitol	-	-
Amigdalinal	+	-	Glukonat	±	±
2-keto-glukonat	-	-	5-keto-glukonat	-	-

-, negativna reakcija, nema promjene boje – nema fermentacije;

+, pozitivna reakcija, promjena boje unutar 48 sati inkubacije; prisutna fermentacija

±, promjena boje između zelene i žute

Tablica 18. Fermentacijski profil bakterijskih izolata iz probiotičkih pripravaka i fenotipska identifikacija nakon usporedbe s podacima u bazi podataka V5.0.

Supstrat	Oznaka izolata								
	1	2A	4	5	6B	8	8/1	8/2	9
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-acetilglukozamin	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Amigdalín	-	+	+	-	-	+	+	+	+
2-keto-glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Salicin	-	+	+	-	+	+	+/-	+	-
Celobioza	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Maltoza	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Laktoza	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Melibioza	-	-	+	+	-	+	-	-	+
Saharoza	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Trehaloza	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Melezitoza	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-rafinoza	-	-	+	-	-	+	-	+	+
Amidon	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Glikogen	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Ksilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-gentobioza	+	-	+	-	-	-	-	+	-
D-turanoza	-	-	+	-	+	-	-	-	-

Supstrat	Oznaka izolata								
	1	2A	4	5	6B	8	8/1	8/2	9
D-liksoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoza	+	+	+	-	+	-	-	-	+
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-keto-glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
API identifikacija	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. plantarum (rhamnosus)</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. reuteri</i>
ID	uspješna identifikacija	uspješna identifikacija	ueprihvatljiv profil	dobra identifikacija	dobra identifikacija	vrlo dobra identifikacija	vrlo dobra identifikacija	dobra identifikacija	neprihvatljiv profil

-, negativna reakcija, nema promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje unutar 48 sati;

±, promjena boje između zelene i žute

Za sojeve iz probiotičkih pripravaka PP3 i PP4 koji prema deklaraciji sadrže bakterijski soj iz roda *Bifidobacterium*, potvrđeno je, na temelju mogućnosti fermentacije specifičnih supstrata primjenom sustava za identifikaciju BBL CRYSTAL™ ANR, da se radi o bakteriji iz roda *Bifidobacterium* (Tablica 19.).

Tablica 19. Fenotipska identifikacija bakterijskih sojeva iz vrste *Bifidobacterium* na temelju fermentacije specifičnih supstrata.

Supstrat	PP3	PP4
Kontrola	-	-
L-arginin-AMC	+	+
L-histidin-AMC	+	+
4-MU- α -D-manozid	-	-
L-serin-AMC	+	+
L-izoleucin-AMC	-	-
4-MU- β -D-manozid	-	-
glicin-AMC	+	+
L-alanin-AMC	+	+
4MU-N-acetil- β -D-galaktozaminid	-	-
L-pirolutaminska kiselina-AMC	-	-
L-lizin-AMC	+	+
L-metionin-AMC	+	+
4MU- β -D-celobiopiranozid	-	-
4MU- β -D-ksilozid	-	-
L-fenilalanin-AMC	+	+
L-leucin-AMC	+	+
Escosyl	+	+
disaharid	+	-
furanoza	+	+
piranoza	+	+
p-n-p- α -D-galaktozid	+	+
p-n-p- β -D-galaktozid	+	-
p-n-p-fosfat	-	-
p-n-p- α -D-glukozid	+	-
p-n-p-N-acetil-glukozaminid	-	-
L-prolin-p-nitroanilid	+	-
p-n-p- α -L-fukozid	-	-
p-n-p- β -D-glukozid	-	-
L-alanin-L-alanin-p-nitroanilid	-	-
BBL identifikacija	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.
ID	uspješna identifikacija (99,72%)	vrlo dobra identifikacija (96,76%)

-, negativna reakcija, nema promjene boje;

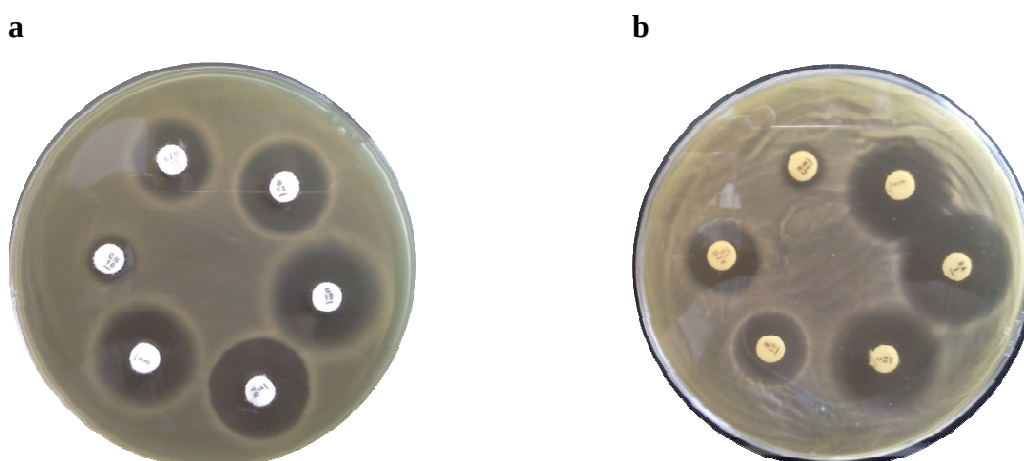
+, pozitivna reakcija, promjena boje unutar 24 sata;

±, promjena boje između + i -

Tablica 20. Fenotipska identifikacija bakterijskih sojeva na temelju fermentacijskih profila ugljikohidrata. Vrijednost postotka identifikacije, % ID, upućuju na sličnost fermentacijskih profila bakterijskih sojeva sa onima iz API baze podataka.

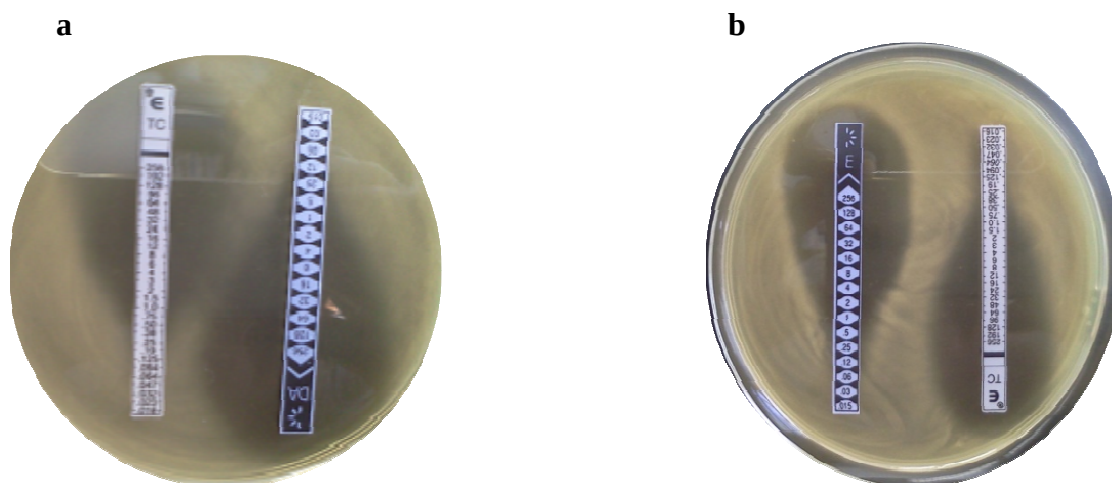
Oznaka soja	Fenotipska identifikacija	% ID
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	uspješna identifikacija (99,6%)
2A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	uspješna identifikacija
2B	<i>Bifidobacterium</i>	uspješna identifikacija (99,72%)
3	<i>Bifidobacterium</i>	vrlo dobra identifikacija (96,76%)
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> (<i>rhamnosus</i>)	neprihvatljiv profil
5/1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	dobra identifikacija
6B	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	dobra identifikacija
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	uspješna identifikacija
8/1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	uspješna identifikacija
8/2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	uspješna identifikacija (92,1%)
9	<i>Lactobacillus reuteri</i>	neprihvatljiv profil
13A	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	uspješna identifikacija (91,8%)
13B	<i>Lactobacillus fermentum</i>	uspješna identifikacija (99,7%)

S aspekta sigurnosti primjene probiotičkih sojeva potrebno je ustanoviti mogućnosti pojave antibiotske rezistencije. Metodom difuzije i E-testa ustanovljeno je da je kod 33% bakterijskih sojeva prisutna fenotipska rezistencija na kanamicin ili streptomycin, te na klindamicin ili tetraciklin kod 25% bakterijskih sojeva (Tablica 21. i 22.). Metodom difuzije u agar izrađeni su antibiogrami i jasno vidljive zone inhibicije rasta oko filter diskova s određenim antibiotikom za sojeve iz probiotičkog pripravka PP13 (Slika 9.).



Slika 9. Zone inhibicije rasta bakterijskih sojeva iz probiotičkog pripravka PP13 a) *L. rhamnosus* 13A i b) *L. reuteri* 13B uslijed antimikrobnog djelovanja 6 različitih antibiotika. Vrijednosti različitih skupina određene metodom difuzije.

Za sve sojeve su također određene vrijednosti minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika, koji su prikazani također za sojeve iz probiotičkog pripravka PP13 (Slika 10.). MIC vrijednost određene za *L. rhamnosus* soj 13A za tetraciklin je 0,06 ug/ml, a za klindamicin 0,12 ug/ml. Vrijednost MIC koja je potrebna za inhibiciju rasta *L. reuteri* 13B iznosi 0,06 ug/ml, a za tetraciklin 0,25 ug/ml.



Slika 10. Zone inhibicije rasta bakterijskih sojeva iz probiotičkog pripravka PP13 a) *L. rhamnosus* 13A uslijed inhibicijskog djelovanja antibiotika tetraciklina i klindamicina i b) *L. reuteri* 13B uslijed inhibicijskog djelovanja antibiotika eritromicina i tetraciklina i odgovarajuće vrijednosti minimalne inhibicijske koncentracije određene pomoću E-testa.

Intrinzična ili urođena rezistencija na vankomicin učestala je kod sojeva iz roda *Lactobacillus*. Prema rezultatima izolati iz probiotičkih proizvoda koji prema deklaraciji sadrže ili pojedinačni soj *Bifidobacterium*, ili su u pripravku u kombinaciji sa sojevima roda *Lactobacillus* kao mješovita probiotička kultura, osjetljivi su na vankomicin, što se može pretpostaviti da je posljedica rezistencije predstavnika iz roda *Lactobacillus* na ovaj antibiotik te smatrati doprinosom njihovoj ispravnoj identifikaciji (Tablica 21. i 22.). Rezistencija na vankomicin je kodirana genima na bakterijskom “kromosomu” i smatra se da nije prenosiva na komezalne bakterije GIT, a razlikuje se od stečene rezistencije, koja je prenosiva, jer se nalazi na mobilnim genetičkim elementima, te je učestala kod sojeva roda *Enterococcus* (Leboš Pavunc i sur., 2013.). Metodom difuzije u agaru ustanovljena je visoka učestalost fenotipske rezistencije kod ispitivanih sojeva na vankomicin i na aminoglikozidne antibiotike kanamicin i streptomycin (Tablica 21. i 22.).

Tablica 21. Osjetljivost izoliranih sojeva i test mikroorganizma *S. aureus* 3048 na različite antibiotike određena metodom difuzije.

Oznaka soja	Ampicilin (Amp)	Azitromicin (AMZ)	Bacitracin (B)	Kloramfenikol (C)	Klindamicin (DA)	Eritromicin (E)	Gentamicin (CN)	Neomicin (N)	Novobiocin (NV)	Penicilin G(P)	Rifampicin (RD)
	2 µg	15 µg	10 ug	10 µg	2 µg	5 µg	10 µg	10 µg	5 µg	1 units	5 µg
	Promjer zone inhibicije (mm)										
13A	7 16 18	11 12 17	17 7 18	25 15 20	24 11 22	22 19 21	13 8 10	8 0 8	13 13 14	15 16 13	32 19 23
$\bar{x}$	13,67	13,33	14	16,67	19	20,67	10,33	5,33	13,33	14,67	24,67
13B	12 0 0	12 15 14	24 10 17	26 20 21	27 20 25	23 18 20	9 0 10	0 0 0	18 12 15	13 12	26 17 30
$\bar{x}$	4,00	13,67	17	22,33	24	20,33	6,33	0	15	12,5	24,33
2A	12 0 16	13 18 15	12 11 10	23 22 24	23 22 24	22 24 24	19 11 7	0 8 0	18 24 26	17 23 15	25 24 26
$\bar{x}$	9,33	15,33	11	23	23	23,33	12,33	2,67	22,67	18,33	25
2B	7 13 18	12 19 19	7 18 6	22 24 22	20 22 21	20 28 28	0 9 6	0 0 12	10 20 14	20 19 17	23 28 29
$\bar{x}$	12,67	16,67	10,33	22,67	21	25,33	5,00	4,00	14,67	18,67	26,67
3	20 18 0	13 19 17	10 12 10	25 20 17	0 0 20	24 24 21	0 0 0	0 0 0	22 14 15	17 14 18	14 18 21
$\bar{x}$	12,67	16,33	10,67	20,67	6,67	23	0	0	17	16,33	17,67
4	10 0 23	14 9 19	13 14 17	24 22 20	40 24 27	26 20 11	10 10 11	0 7 9	14 12 15	0 0 22	30 26 26
$\bar{x}$	11	14	14,67	22	30,33	19,00	10,33	5,33	13,67	11,00	27,33
5/1	10 28 24	18 27 21	15 17 13	30 29 21	30 31 26	20 24	20 22 12	0 10 9	19 21 14	20 24 18	22 26 26
$\bar{x}$	20,67	22	15	26,67	29	14,67	18	6,33	18	20,67	24,67
6B	14 20 0	18 26 25	15 11 17	21 27 20	24 30 27	24 36 31	0 0 11	9 0 10	14 26 20	21 17 27	26 32 27
$\bar{x}$	11,33	23	14,33	22,67	27	30,33	3,67	6,33	20	21,67	28,33

Tablica 21. Osjetljivost izoliranih sojeva i test mikroorganizma *S. aureus* 3048 na različite antibiotike metodom difuzije

Oznaka soja	Ampicilin (Amp)			Azitromicin (AMZ)			Bacitracin (B)			Kloramfenikol (C)			Klindamicin (DA)			Eritromicin (E)			Gentamicin (CN)			Neomicin (N)			Novobiocin (NV)			Penicilin G(P)			Rifampicin (RD)		
	2 µg			15 µg			10 ug			10 µg			2 µg			5 µg			10 µg			10 µg			5 µg			1 units			5 µg		
	Promjer zone inhibicije (mm)																																
8/1	16	17	11	15	14	11	10	8	9	22	20	20	18	20	25	18	21	20	8	11	11	8	9	8	9	15	12	20	13	10	16	15	14
$\bar{x}$	14,67			13,33			9			20,67			21			19,67			10			8,33			12			14,33			15		
8/2	8	21	10	15	19	15	14	8	14	24	31	22	26	10	16	18	25	19	8	11	10	8	8	9	15	19	12	25	19	19	15	18	20
$\bar{x}$	13			16,33			12			25,67			17,33			20,67			9,67			8,33			15,33			21			17,67		
9	0	10	0	9	13	15	15	13	7	27	38	20	29	30	24	19	26	22	10	7	10	8	9	8	13	25	13	0	0	24	27	27	30
$\bar{x}$	3,33			12,33			11,67			28,33			27,67			22,33			9			8,33			17			8			28		
1LGG	15	21	21	16	14	25	11	11	11	26	20	21	22	20	24	26	19	29	9	8	11	0	0	6	20	16	22	20	19	19	29	18	30
$\bar{x}$	19			18,33			11			22,3			22			24,7			9,33			2			19,33			19,33			25,70		
S.aureus 3048	17	22		15	16	14	0	18		25	21		0	34		0	0		20	14		12	16		0	25		10	11		16	14	
$\bar{x}$	19,5			15			9			23			17			0			17			14			12,5			10,5			15		

Tablica 22. Osjetljivost ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) i referentnih sojeva na različite antibiotike određena metodom difuzije u agar.

Oznaka soja	Tetraciklin (TE)	Vankomicin (VA)	Oleandomicin (OL)	Spiramicin (SP)	Streptomycin (S)	Klaritromicin (CLR)	Fosfomicin (FOS)	Norfloksacin (NOR)	Amikacin (AK)	Ciprofloksacin (CIP)	Cefalotin (KF)	Cefaleksin (CL)
	10µg	30 µg	15µg	10 µg	10 µg	5 µg	µg	10 µg	µg	5µg	30µg	30 µg
	Promjer zone inhibicije (mm)											
13A	25 18 16	0 0 0	13 14 15	23 15 20	0 7 0	26 22 23	0 0 0	0 0 0	9 10 9	0 0 0	28 18 20	22 20 19
$\bar{x}$	19,67	0	14	19,33	2,33	23,67	0	0	9,33	0	22	20,33
13B	26 16 20	0 0 0	22 13 14	25 15 21	12 0 0	28 22 25	0 0 0	13 0 0	8 10 9	9 0 0	24 9 10	17 20 18
$\bar{x}$	20,67	0	16,33	20,33	4	25	0	4,33	9	3	14,33	18,33
2A	23 23 28	0 0 0	19 26 21	21 19 17	9 10 7	26 23 28	0 0 0	12 0 8	0 0 0	9 0 8	20 15 10	12 0 10
$\bar{x}$	24,67	0	22	19	8,67	25,67	0	6,67	0	5,67	15	7,33
2B	21 26 28	0 0 0	13 23 20	19 17 27	0 9 6	21 33 28	0 0 0	15 0 0	7 0 0	12 0 0	22 15 16	12 19 13
$\bar{x}$	25	0	18,67	21	5	27,33	0	5	2,33	4	17,67	14,67
3	15 27 25	12 0 0	19 23 17	25 22 19	0 0 0	22 25 22	18 20 0	8 9	0 0	7 9 8	18 16 17	0 8 7
$\bar{x}$	22,33	4,00	19,67	22	0	23	12,67	8,5	0	8	17	5
4	14 22 17	0 0 0	24 14 16	22 25 16	0 0 8	30 23 25	0 0 0	0 0 0	8 0 10	0 0 0	9 14 17	12 12 14
$\bar{x}$	17,67	0	18	21	2,67	26	0	0	6	0	13,33	12,67
5/1	14 20 21	0 0 0	18 18 18	22 23 25	0 9 0	24 23 25	0 0 0	0 0 0	7 0 0	0 0 0	22 20 18	14 20 19
$\bar{x}$	12,67	0	18	23,33	3	24	0	0	2,33	0	20	17,67

Tablica 22. Osjetljivost ispitivanih sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) i referentnih sojeva na različite antibiotike određena metodom difuzije u agar.

Oznaka soja	Tetraciklin (TE)	Vankomicin (VA)	Oleandomicin (OL)	Spiramicin (SP)	Streptomycin (S)	Klaritromicin (CLR)	Fosfomicin (FOS)	Norfloksacin (NOR)	Amikacin (AK)	Ciprofloksacin (CIP)	Cefalotin (KF)	Cefaleksin (CL)
	10µg	30 µg	15µg	10 µg	10 µg	5 µg	µg	10 µg	µg	5µg	30µg	30 µg
Promjer zone inhibicije (mm)												
6B	18 28 27	0 0 0	11 30 14	23 25 26	0 0 0	27 28 30	0 0 0	7 8 9	0 0 0	0 0 0	13 22 20	15 16 15
$\bar{x}$	24,33	0	18,33	24,67	0	28,33	0	8	0	0	18,33	15,33
8/1	20 16 13	0 0 0	12 17 20	20 24 19	0 8 7	25 15 17	0 0 0	0 0 0	0 0 0	0 0 0	13 14 14	10 9 11
$\bar{x}$	16,33	0	16,33	21	5	19	0	0	0	0	13,67	10
8/2	12 13 15	0 0 0	13 14 14	20 19 17	8 20 11	17 29 17	0 0 0	0 0 0	10 9 11	0 0 0	20 19 17	15 16 17
$\bar{x}$	13,33	0	13,67	18,67	13	21	0	0	10	0	18,67	16
9	27 30 25	13 0 0	16 15 0	21 26 21	8 0 8	27 23 32	0 0 0	0 0 0	8 0 0	0 0 0	11 7 8	15 16 14
$\bar{x}$	27,33	4,33	10,33	22,67	5,33	27,33	0	0	2,67	0	8,67	15
1 LGG	26 15 30	0 0 0	22 15 24	25 17 26	0 10 9	29 18 27	0 0 0	16 13 12	8 7 0	12 10 10	19 16 19	12 13 14
$\bar{x}$	23,67	0	20,33	22,67	6,33	24,67	0	13,67	5	10,67	18	13

Prema EFSA smjernicama potrebno je definirati osjetljivost probiotičkih bakterija prema specifičnim antibioticima. Temeljem rezultata, 3 *Lactobacillus* soja pokazala su fenotipsku rezistenciju na tetracikline, dok su jedan *Bifidobacterium* soj i 3 soja laktobacila pokazali rezistenciju na streptomycin. Kako je rezistencija na tetracikline često prisutna kod sojeva iz vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, Sanders i sur. (2010) su proveli *in vitro* eksperimente u kojima je istražena mogućnost horizontalnog prijenos gena rezistencije za tetraciklin između različitih sojeva ili vrsta. Međutim nisu bili uspješni (Sandersu i sur., 2010). Iako su pojedini probiotički sojevi *Lactobacillus* otporni na inhibicijsko djelovanje streptomicina, PCR analizom nije amplificiran gen za rezistenciju na ovaj antibiotik (Sanders i sur., 2010). Određene MIC antibiotika za pojedine sojeve su u skladu s izmjerenim vrijednostima dobivenim metodom difuzije iz diska na agar. Kod 3 soja ustanovljeno je da su vrijednosti MIC za tetraciklin bile više od vrijednosti postavljenih prema EFSA smjernicama (Tablica 22.). Prisutnost fenotipske rezistencije na tetracikline uočena je i u 3 soja *Lactobacillus*, dok su svi ispitani sojevi, osim pojedinačnih kultura *Bifidobacterium*, pokazali fenotip rezistencije na streptomycin. Izolati sojeva *Bifidobacterium* iz probiotičkih proizvoda, koji prema deklaraciji sadrže ili pojedinačan bakterijski soj ili konzorcij nekoliko bakterijskih sojeva, od kojih pojedini pripadaju rodu *Lactobacillus*, pokazali su osjetljivost na vankomicin, što je doprinos ispravnoj taksonomskoj identifikaciji (Tablica 21. do 23.).

Tablica 23. a) Vrijednosti minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika (MIC) koja sprječava rast izoliranih sojeva određene E-testom. **b)** Interpretacija osjetljivosti izoliranih sojeva iz probiotičkih pripravaka prema antibioticima prema smjernicama EFSA.

a)

Antibiotici	Sojevi iz probiotičkih pripravaka											
	1	2A	2B	3	4	5	6B	8/1	8/2	9	13A	13B
	MIC (µg/mL)											
ampicilin	1,0	1	0,06	1	0,25	0,06	0,12	0,06	0,12	2	2	4
vankomicin	>256	>256	>256	2	>256	>256	0-2	0,12	0,12	>256	>256	>256
gentamicin	16	16	16	24	4	8	16	12	16	4	16	8
kanamicin	>256	>256	>256	256	64	64	64	16	>256	>256	64	>256
streptomycin	64	32	256	96	64	64	16	16	16	192	32	128
eritromicin	0,25	0,06	0,25	0,12	0,03	0,02	0,06	0,25	0,25	0,06	0,12	0,06
klindamicin	0,19	0,03	0,06	0,06	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0,06	0,03
tetraciklin	0,25	2,0	0,04	0,06	4	4	4	0,02	0,02	24	12	32
kloramfenikol	1,0	1,5	1,0	0,01	2	0,75	1,0	2	1	1	1	1

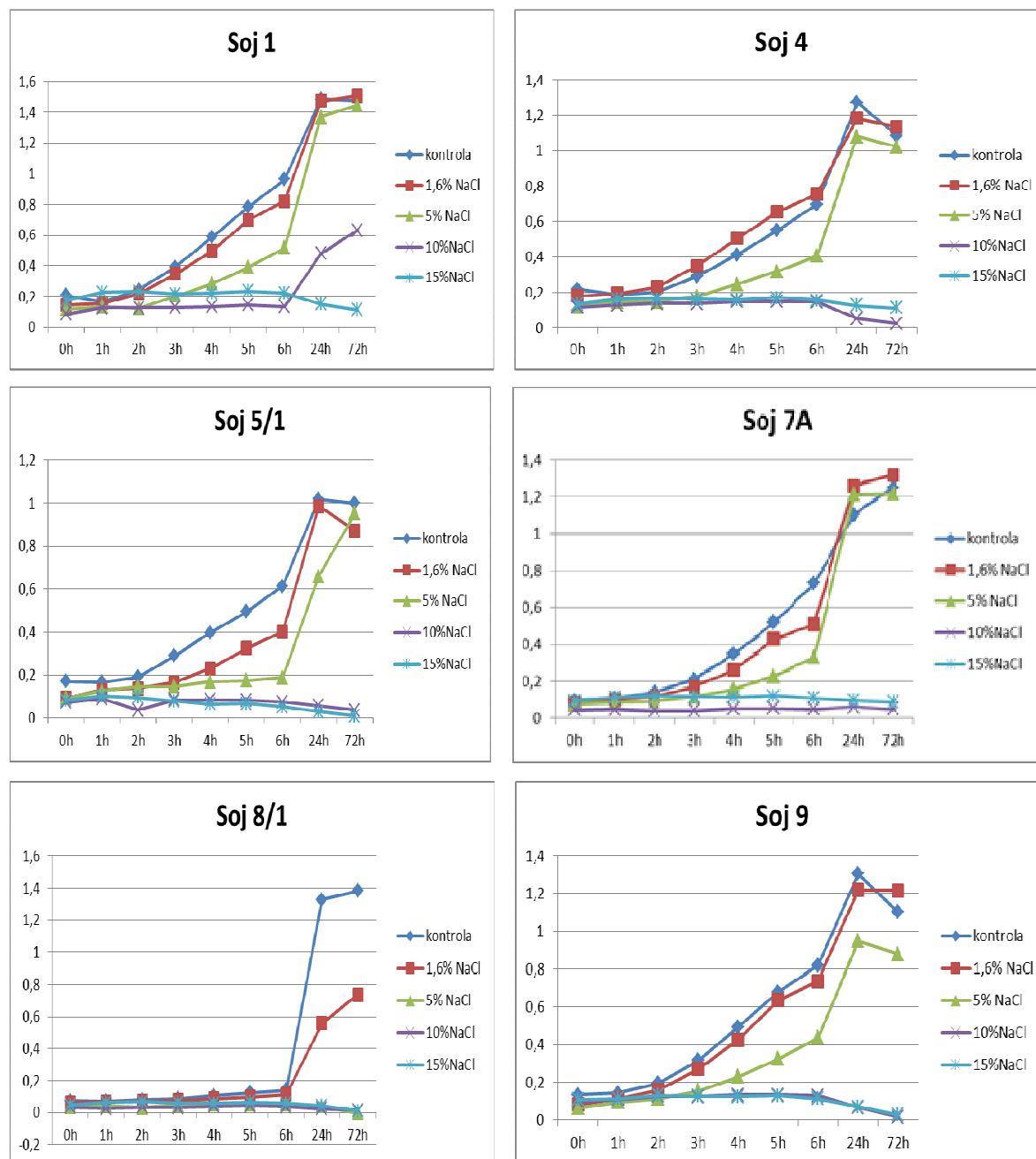
b)

Antibiotici	Sojevi iz probiotičkih pripravaka											
	1	2A	2B	3	4	5	6B	8/1	8/2	9	13A	13B
ampicilin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
vankomicin	n.z.	n.z.	R	S	n.z.	n.z.	n.z.	S	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.
gentamicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
kanamicin	R	R	n.z.	n.z.	S	S	S	S	S	R	S	R
streptomycin	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R
eritromicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
klindamicin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
tetraciklin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
kloramfenikol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

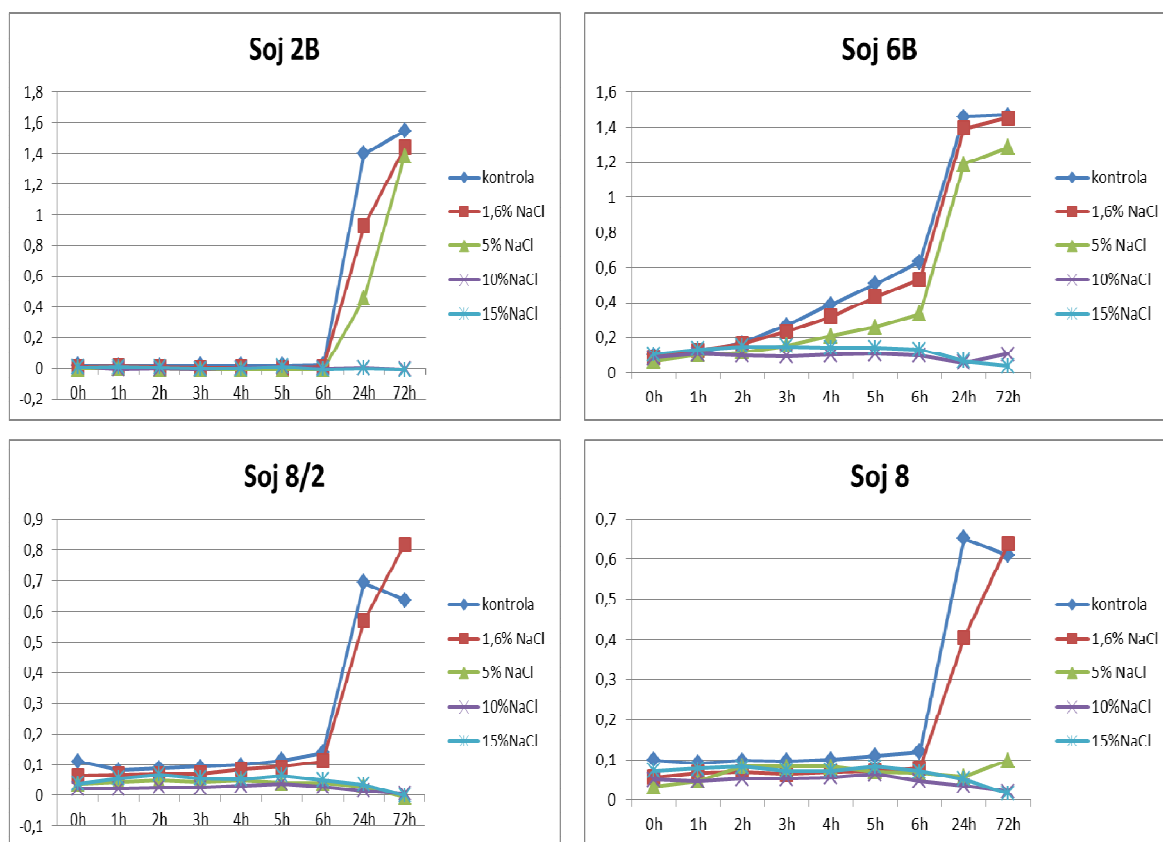
¹n.z. –prema EFSA smjernicama nije potrebno provoditi test osjetljivosti na antibiotike jer se radi o urođenoj rezistenciji na antibiotik

² radi jednostavnosti usporedbe s EFSA smjernicama zadržane skraćenice na engleskom jeziku S-osjetljiv (sensitive); R- rezistentan (*engl.* resistant)

Za daljnji doprinos klasifikaciji bakterijskih sojeva i funkcionalnim svojstvima određeni su fiziološki parametri poput temperature rasta, prilagodba bakterijskih stanica u uvjetima različitih koncentracija soli (Slika 11. i 12.) i različite pH vrijednosti mikrookoliša, uključujući ekstremne vrijednosti (Slika 13. i 14.).

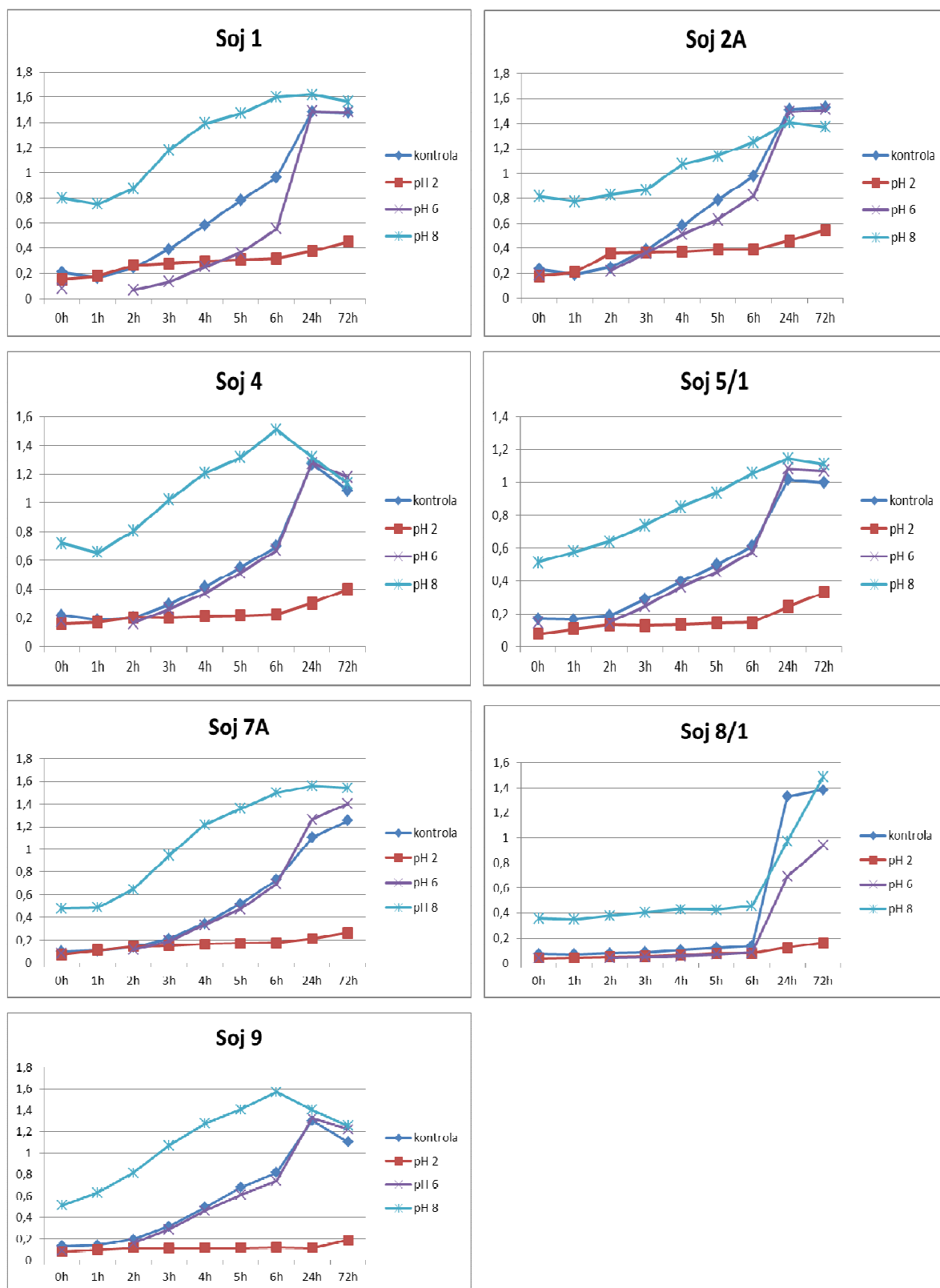


Slika 11. Utjecaj različitih koncentracija natrijeva klorida (1,6-15,0 % NaCl) na rast bakterijskih sojeva iz roda *Lactobacillus*.

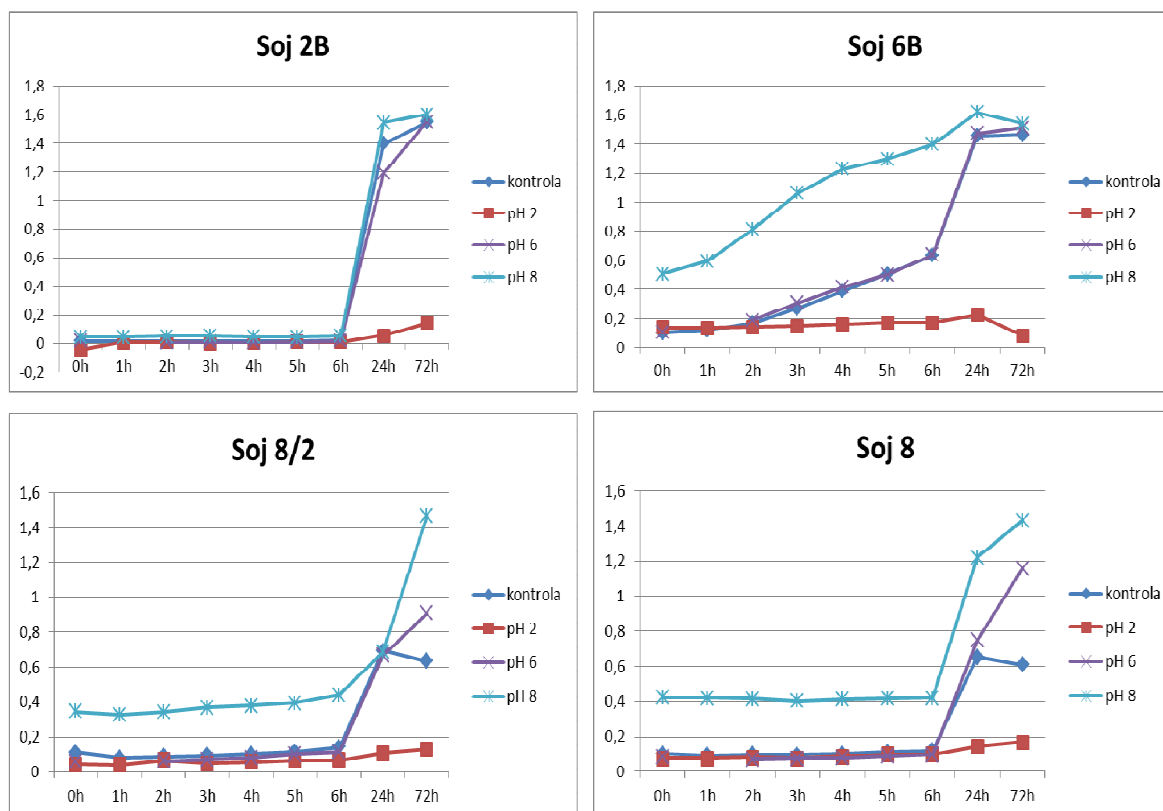


Slika 12. Utjecaj različitih koncentracija natrijeva klorida na rast sojeva bakterija mliječne kiseline iz roda *Bifidobacterium*.

Bakterijski sojevi mogu rasti u hiperosmotskim uvjetima u prisutnosti do 5 % natrijevog klorida u mikrookolišu, no pri ekstremnim vrijednostima koncentracija natrijevog klorida (10 % i 15 %) nije ustanovljen rast, što je očekivano, te je slično ustanovljeno prilikom inkubacije bakterijskih stanica u uvjetima ekstremnih vrijednosti pH u MRS tekućoj hranjivoj podlozi (Slika 13.).

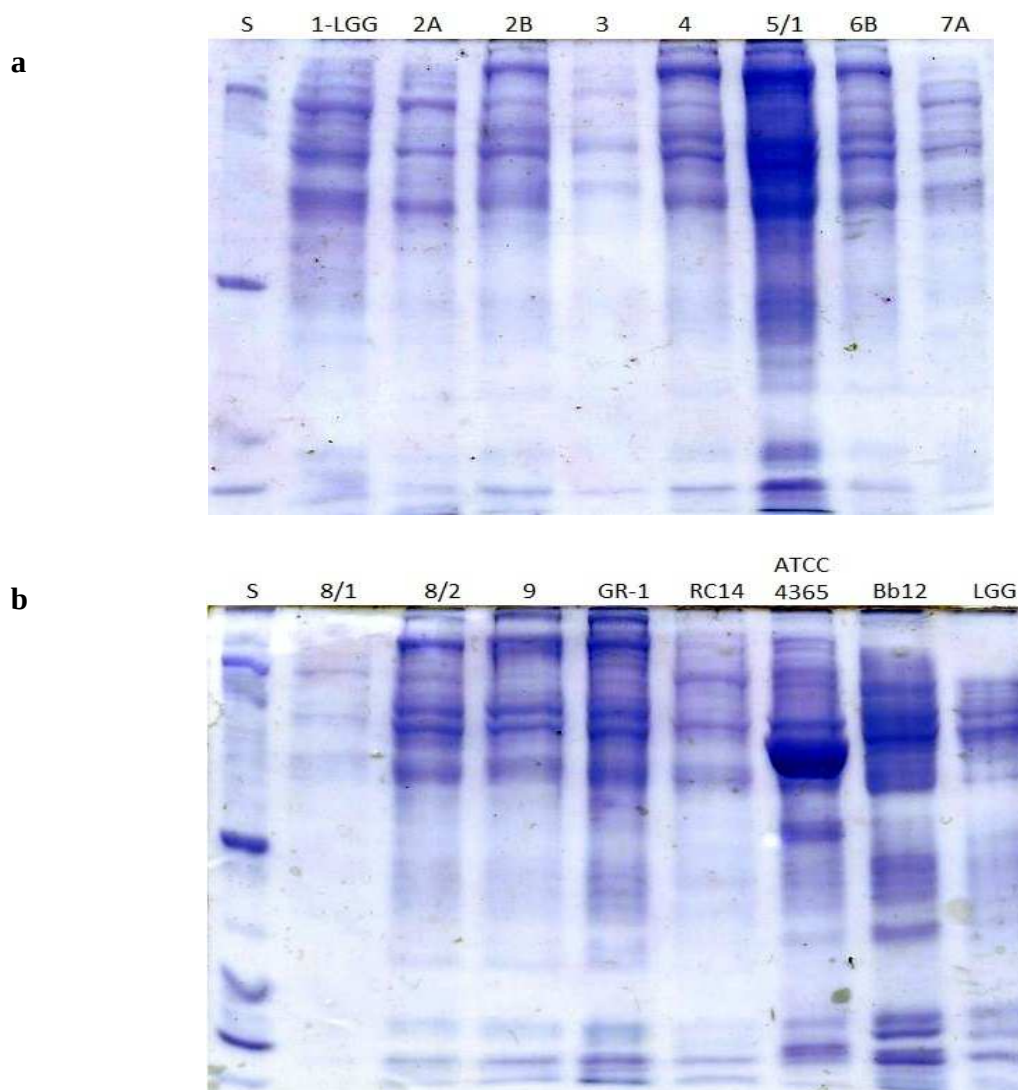


Slika 13. Utjecaj različitih pH vrijednosti na rast bakterijskih sojeva iz roda *Lactobacillus*.



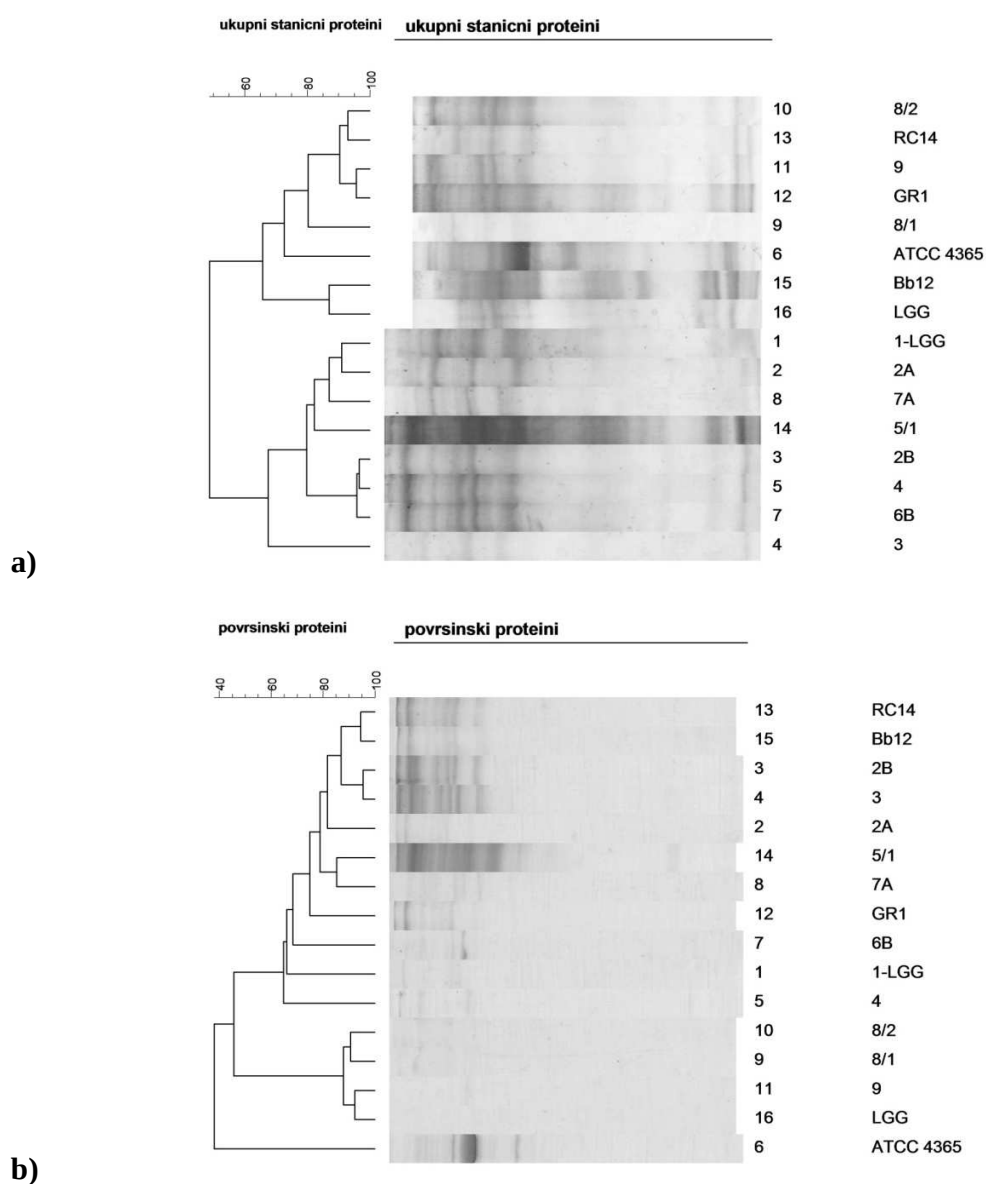
Slika 14. Utjecaj različitih pH vrijednosti mikrookoliša na rast bakterijskih sojeva iz roda *Bifidobacterium*.

Uz analizu fizioloških svojstava primjenom konvencionalnih mikrobioloških metoda i fenotipske identifikacije primjenom testova za fermentaciju različitih supstrata provedena je fenotipska karakterizacija SDS-PAGE analizom ukupnih topljivih i površinskih proteina bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka (Slika 15. a i b).



Slika 15. a) i b) SDS-PAGE analiza topljivih staničnih proteina bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka i referentnih sojeva.

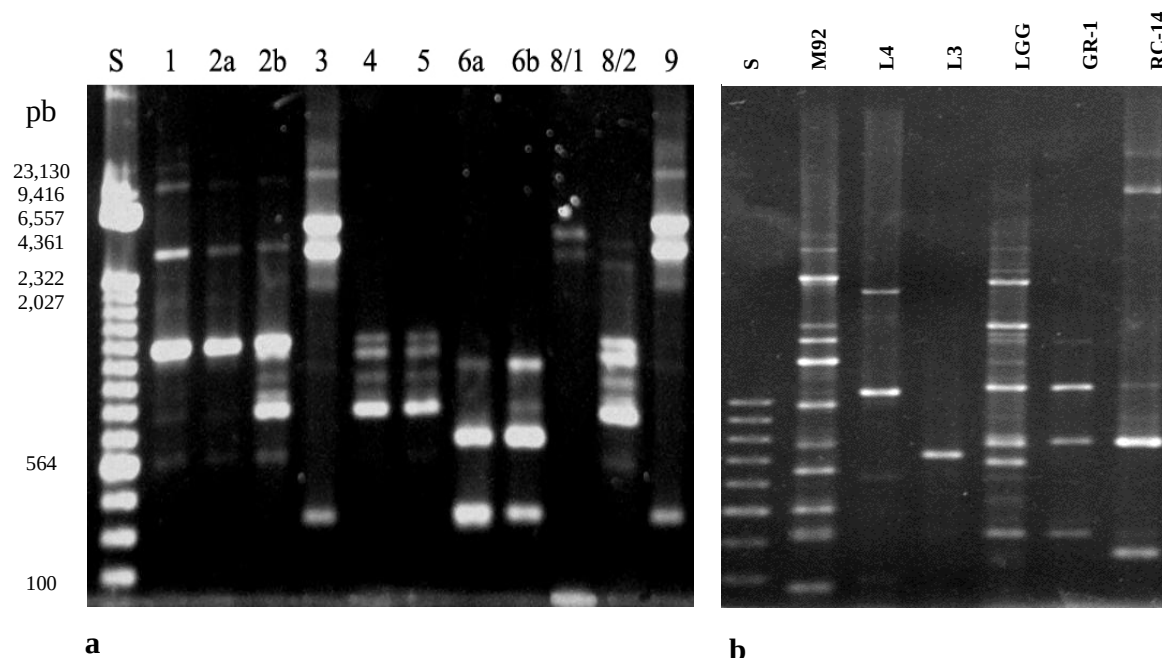
Analizom proteinskih profila sojevi su grupirani izradom dendrograma pomoću Gel Compare II programskog paketa (Slika 16. a i b). Dobiveni podaci su obrađeni primjenom Pearsonovog koeficijenta koleracije (r), dok su dendrogrami izrađeni temeljem UPGMA analize što je rezultiralo grupiranjem sojeva u dvije taksonomske skupine. Ekstrahirani su i ukupni stanični i površinski proteini tri referentna soja *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4365, *L. rhamnosus* GG® i *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, za grupiranje odnosno klasifikaciju ispitivanih sojeva u rod *Lactobacillus* odnosno *Bifidobacterium* na temelju generiranih proteinskih profila.



Slika 16. Dendrogram priredjen na temelju **a)** analize ukupnih staničnih proteina **b)** analize površinskih proteina *Lactobacillus* i *Bifidiobacterium* sojeva SDS-PAGE metodom (oznake, 1 do 16: bakterijski izolati iz probiotičkih pripravaka i tri referentna *L. acidophilus* ATCC[®] 4356[™], *L. rhamnosus* GG[®] i *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12[®]).

Za genomsku karakterizaciju provedena je RAPD-PCR metoda za umnažanje specifičnih DNA fragmenata, s oligonukleotidnim početnicama za bakterije mliječne kiseline, za razlikovanje i doprinos identifikaciji izolata iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Na temelju RAPD DNA

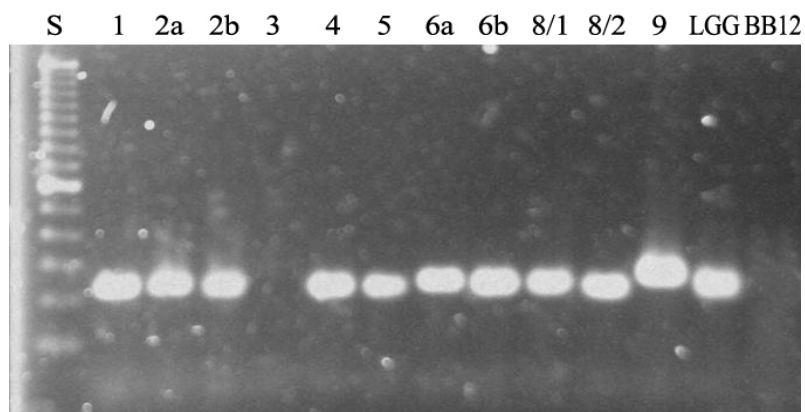
profila ustanovljeno je podudaranje bakterijskih sojeva izoliranih nakon rasta na MRS hranjivoj podlozi, koji su sadržani u probiotičkim pripravcima PP4 i PP5, a koji prema deklaraciji proizvoda sadrže isti soj *Lactobacillus reuteri* (Slika 17.). RAPD DNA profili sojeva iz probiotičkih pripravaka PP1 i PP2 se također podudaraju, a prema deklaraciji sadrže *L. rhamnosus* soj. Iz istog pripravaka nakon kultivacije na TOS hranjivoj podlozi izoliran je soj koji je imenovan 2B uz pretpostavku da se možda radi o *Bifidobacterium* vrsti, no DNA profil se podudara s DNA profilom soja 2A, koji je izoliran nakon uzgoja na MRS hranjivom agaru, i koji pokazuje sličnost s *Lactobacillus* vrstom, prema tome se može pretpostaviti da je soj 2B vjerojatno isti soj, odnosno mješovita kultura jer sadrži dodatni DNA fragment.



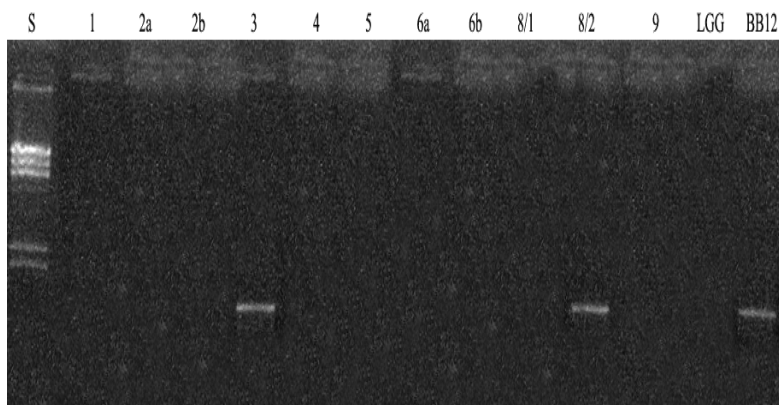
Slika 17. a) Agarozni gel slučajno umnoženih fragmenata DNA bakterijskih sojeva roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* primjenom RAPD metode; S – standard λ -HindIII i Gene ruler 100 pb DNA Ladder (100-1000 pb) (veličina bendova izražena je kao broj parova baza); **b)** DNA profili različitih bakterija mliječne kiseline dobivenih nasumičnim umnažanjem početnicama 5'ACGAGGCAC3' i 5'ACGCGCCCT5'; S - standard 100pb; 2 - *L. helveticus* M92; 3 - *L. plantarum* L4; 4 - *E. faecium* L3; 5 - *L. rhamnosus* GG; 6 - *L. rhamnosus* GR-1; 7 - *L. reuteri* RC-14 kao referentnih sojeva.

Preliminarna identifikacija na razini roda potvrđena je amplifikacijom ciljanih sekvenci DNA pomoću početnica specifičnih za rod *Lactobacillus* (Slika 18. a) odnosno rod *Bifidobacterium* (Slika 18. b). Ciljana sekvenca Im3 (5`-CGGGTGCTI\*CCCACCTTTCATG-3`) specifična za rod *Bifidobacterium* nalazi se u V9 varijabilnog regiji 16S rRNA. Umnažanjem para početnica LbLMA1-rev/R16-1 rezultiralo je amplifikacijom i detekcijom specifičnih PCR produkata kod svih *Lactobacillus* sojeva (Slika 18. a)).

a



b

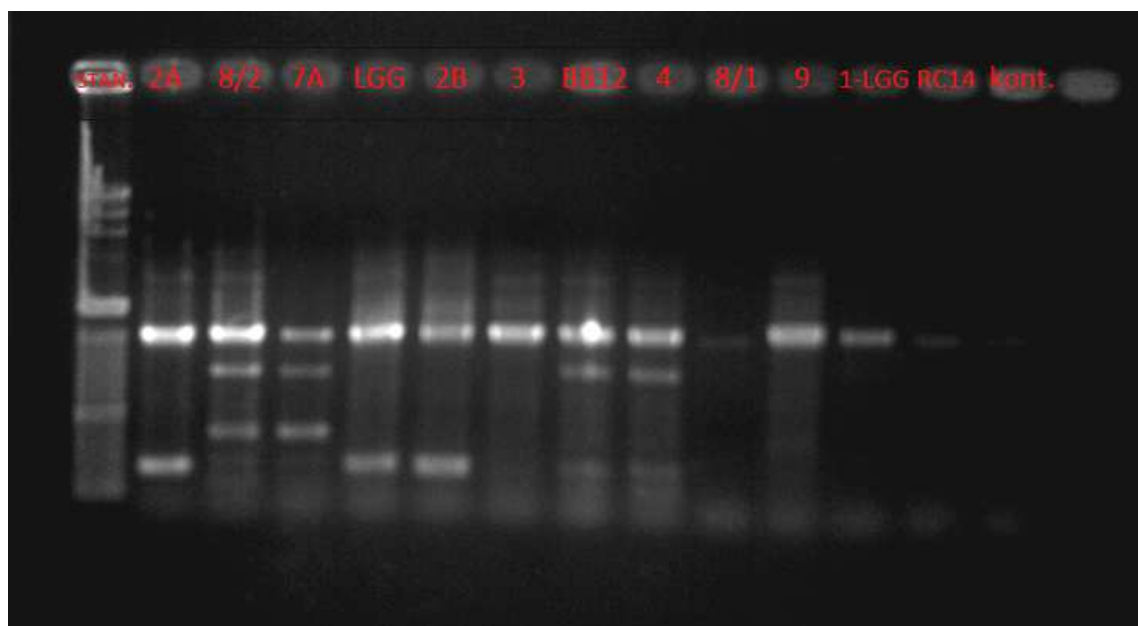


Slika 18. a) DNA fragmenti probiotičkih bakterija iz pripravaka dobivenih PCR metodom s početnicama za rod *Lactobacillus*; S - standard λ -HindIII i Gene ruler 100 bp; LGG® - *L. rhamnosus* GG (pozitivna kontrola); BB12 - *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (negativna kontrola)

b) DNA fragmenti probiotičkih sojeva iz pripravaka dobivenih PCR metodom s početnicama za rod *Bifidobacterium*; S - standard λ -HindIII i Gene ruler 100 bp; LGG - *L. rhamnosus* GG (negativna kontrola); BB12 – *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 (pozitivna kontrola).

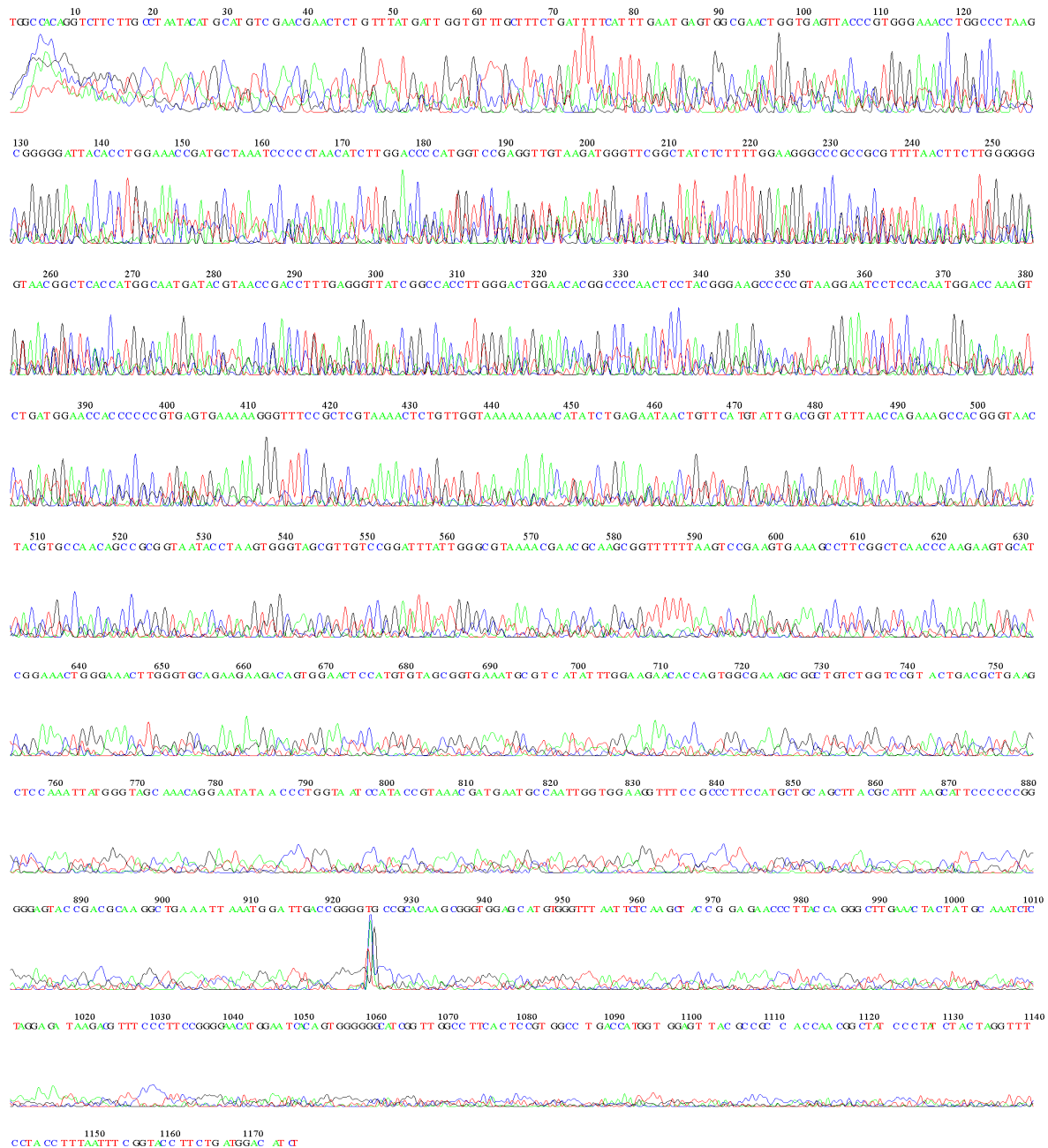
Primjenom početnice lm26 i lm3, umnožena je ciljana V9 sekvenca 16S rRNA očekivane veličine hibridizacijom s DNA bakterijskih sojeva iz pripravaka PP3 i PP8, na kojim je navedena prisutnost *Bifidobacterium* vrsta, te s DNA referentnog soja *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12[®], ali za *Lactobacillus* sojeve iz preostalih pripravaka nije ustanovljena prisutnost PCR amplikona što ide u prilog pouzdanosti primjene ove molekularne metode (Slika 18.b).

16S rRNA sekvencioniranje je pouzdana metoda identifikacije u taksonomskim istraživanjima, te se često primjenjuje u kliničkim dijagnozama za identifikaciju patogenih sojeva, no vrlo često i za identifikaciju *Lactobacillus* vrsta, pa i za njihovu reidentifikaciju u probiotičkim pripravcima (Foschi i sur., 2017). Nakon što su PCR produkti pročišćeni provedeno je sekvencioniranje 16S rRNA regije. Uspješnost provedbe umnažanje ciljane sekvence genomske DNA bakterijskih sojeva potvrđena je analizom PCR produkata pomoću DNA elektroforeze (Slika 19.).



Slika 19. Analiza PCR produkata dobivenih amplifikacijom ciljane sekvence DNA s UNI16 S početnicama na elektroforezom DNA u agaroznom gelu.

Bakterijski sojevi su identificirani na razini vrste sekvencioniranjem V2-V3 regije 16S rRNA gena i usporedbom dobivenih sekvenci MegaBLAST-NIH pretraživanjem sa sekvencama u bazi GenBank (Tablica 24.).



Slika 20. Elektroferogram 16S rDNA soja iz probiotičkog pripravka PP1. Sekvencioniranje provedeno u akreditiranoj instituciji MACROGEN (Amsterdam, Nizozemska).

TGGCCACAGGTCTTCTTGCCTAATACATGCATGTCGAACGAACTCTGTTT
ATGATTGGTGTGTTGCTTTCTGATTTTCATTTGAATGAGTGGCGAACTGGT
GAGTTACCCGTGGGAAACCTGGCCCTAAGCGGGGGATTACACCTGGAAAC
CGATGCTAAATCCCCCTAACATCTTGGACCCCATGGTCCGAGGTTGTAAG
ATGGGTTCGGCTATCTCTTTTGAAGGGCCCGCCGCGTTTAACTTCTTG
GGGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAACCGACCTTTGAGGGT
TATCGGCCACCTTGGGACTGGAACACGGCCCCAACTCCTACGGGAAGCCC
CCGTAAGGAATCCTCCACAATGGACCAGTCTGATGGAACACCCCCCG
TGAGTGAAAAAGGGTTTCCGCTCGTAAACTCTGTTGGTAAAAAAAACA
TATCTGAGAATAACTGTTTCATGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCAC
GGGTAACACTACGTGCCAACAGCCGCGGTAATACCTAAGTGGGTAGCGTTGT
CCGGATTTATTGGGCGTAAACGAACGCAAGCGGTTTTTTAAGTCCGAAG
TGAAAGCCTTCGGCTCAACCCAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTG
GGTGCAGAAGAAGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTCAT
ATTTGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTGGTCCGTACTGACGC
TGAAGCTCCAAATTATGGGTAGCAAACAGGAATATAACCCTGGTAATCCA
TACCGTAAACGATGAATGCCAATTGGTGGAAAGGTTTCCGCCCTTCCATGC
TGCAGCTTACGCATTTAAGCATTCCCCCGGGGAGTACCGACGCAAGGC
TGAAATTAAATGGATTGACCGGGGTGCCGCACAAGCGGGTGGAGCATGTG
GGTTTAATTCTCAAGCTACCGGAGAACCCTTACCAGGGCTTGAAACTACT
ATGCAAATCTCTAGGAGATAAGACGTTTCCCTTCCGGGGAACATGGAATC
ACAGTGGGGGGCATCGGTTGGCCTTCACTCCGTGGCCTGACCATGGTGGGA
GTTACGCCGCCACCAACGGCTATCCCTATCTACTAGGTTTCCTACCTTTA
ATTCGGTACCTTCTGATGGACATCT

Slika 21. Redoslijed nukleotida u 16S rRNA amplikonu duljine 1413 pb bakterijskog soja iz probiotičkog pripravka PP1 prema kojem je soj reidentificiran kao *Lactobacillus rhamnosus*.

Rezultati identifikacije sekvencioniranjem 16S rRNA gena prikazani su u Tablici 24. Za pretraživanje homologije primijenjeno je MEGABLAST napredno pretraživanje baze podataka optimirano s ciljem detekcije najbližnjih nukleotidnih sekvenci.

Tablica 24. Identifikacija sekvencioniranjem 16S rRNA gena.

Probiotički proizvod	Formulacija proizvoda	16S rRNA identifikacija	Postotak identifikacije (%)
PP1	kapi	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	82,91
PP2	liofilizirani pripravak (mliječna formula)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	89,29
		<i>Lactobacillus reuteri</i>	88,84
		<i>Bifidobacterium bifidum</i>	75,41
PP3	liofilizirani pripravak	<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	78.16
PP4	kapsule	<i>Lactobacillus gasseri</i>	88.78
PP7	kapsule	<i>Lactobacillus plantarum</i>	79,69
PP8	kapsule	<i>Lactobacillus plantarum</i>	n.o.
PP9	kapi	<i>Lactobacillus plantarum</i>	89,00

4.2. *In vitro* evaluacija funkcionalnih svojstava probiotičkih sojeva iz pripravaka

Promjene sastava intestinalne mikrobiote u odnosu na sastav mikrobioma zdravih osoba povezuju se s različitim funkcionalnim poremećajima GIT. Mnogi su sojevi iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* okarakterizirani kao probiotici zbog dokazanih kliničkih učinaka na zdravlje domaćina, te se primjenjuju u obliku probiotičkih pripravaka za ponovno uspostavljanje narušene ravnoteže mikrobioma (Gibson i sur., 2011; Hill i sur., 2018). Sa spoznajama o važnosti intestinalne mikrobiote za zdravlje, istražuju se nove terapijske strategije za modulaciju sastava crijevne mikrobiote, što uključuje i primjenu probiotičkih bakterija kao živih bioterapeutika (Martin i Lagnella, 2019). Za funkcionalne učinke, probiotičke bakterije uz nepovoljne uvjete u GIT, prije konačne primjene, trebaju zadržati funkcionalna svojstva tijekom industrijske proizvodnje te poslije tijekom vremenskog perioda skladištenja konačne formulacije pripravka (Fenster i sur., 2019). Stoga su u ovom radu, prema strategiji za izbor probiotičkih sojeva primjenom niza *in vitro* testova, ispitane funkcionalne karakteristike bakterijskih sojeva iz probiotičkih proizvoda.

U GIT, koji je ciljno mjesto djelovanja probiotika, prisutni su nepovoljni uvjeti mikrookoliša. Osim izlučivanja različitih defenzina, u intestinalnom mikrookolišu prisutne su ekstremno niske pH vrijednosti, te brz protok i visoke koncentracije toksičnih žučnih soli u lumenu (Ruiz i sur., 2013). Da bi mogli doprinijeti zdravlju intestinalnog trakta i iskazati funkcionalnost, probiotički sojevi moraju prilagoditi stanične mehanizme, kako bi preživjeli u GIT. Osim ekstremno niskih pH vrijednosti u želucu, na broj unesenih probiotičkih bakterijskih stanica u GIT može utjecati i aktivnost probavnih enzima pepsina ili pankreatina (Kos i sur., 2003). Stoga je ispitano preživljavanje bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka u eksperimentima *in vitro* simulacijom uvjeta GIT (Tablica 25. a i b). Bakterijske stanice su inkubirane u simuliranom želučanom soku pH vrijednosti 2,0, a zatim u simuliranom soku tankog crijeva, gdje se izlučuje sok gušterače i žuč. Smrtnost bakterijskih stanica, izražena kao CFU/ml, izračunata kao razlika početnog broja bakterijskih stanica i broja bakterijskih stanica određenog nakon njihovog izlaganja nepovoljnim uvjetima GIT, se razlikovala s obzirom na soj (Tablica 25. a. i b).

Tablica 25. a) Preživljavanje probiotičkih sojeva iz pripravaka tijekom direktnog prijelaza iz simuliranog želučanog soka u simulirani sok tankog crijeva.

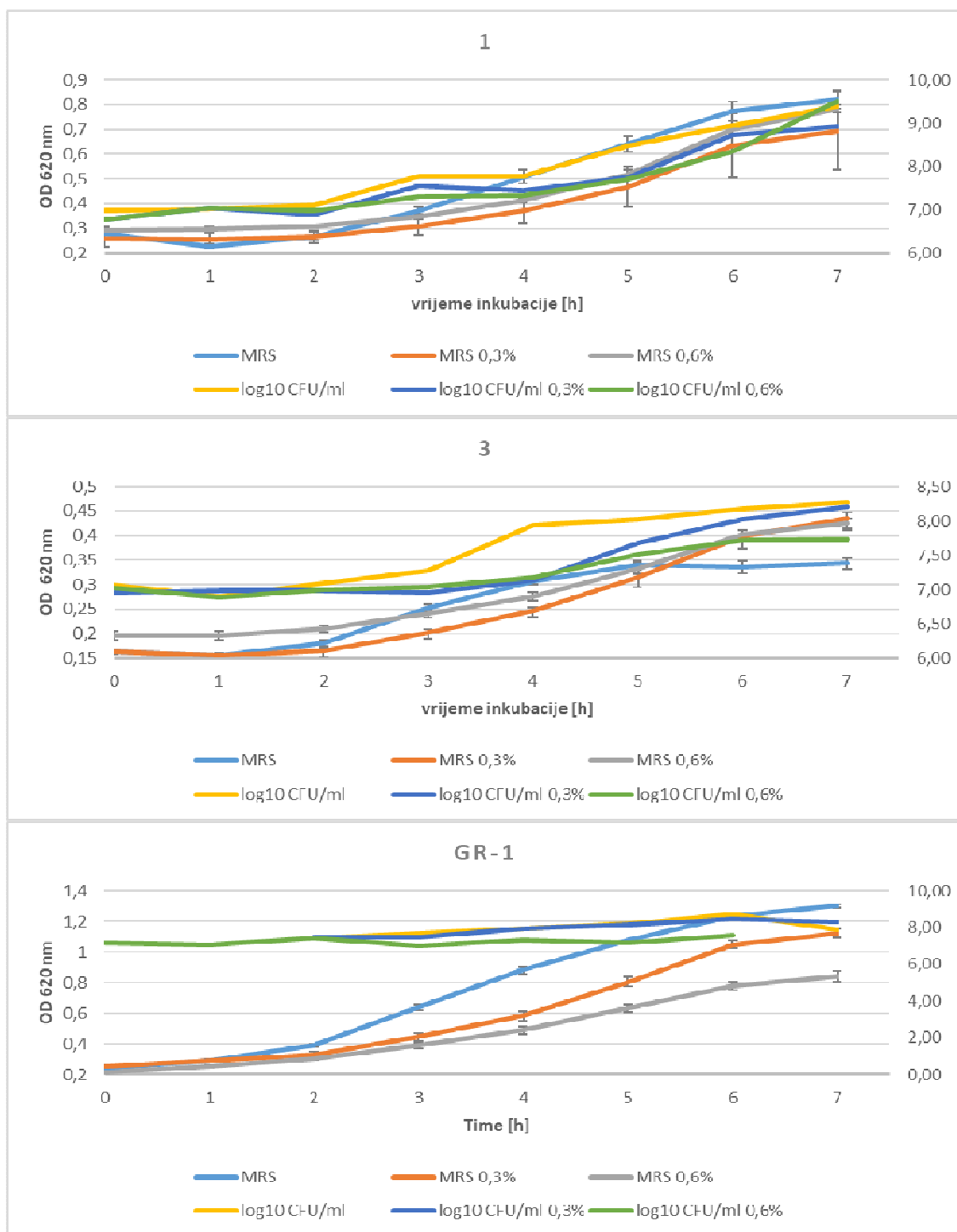
Bakterijski sojevi	Simulirani uvjeti GIT			
	Želučani sok 0 h	Želučani sok 2 h	Sok tankog crijeva 4 h	Δlog CFU/mL (0-6 h)
1	3,41x10 ⁸	1,64x10 ⁸	2,63x10 ⁷	1,11
2A	3,53x10 ⁸	8,14x10 ⁷	2,96x10 ⁷	1,08
2B	2,12x10 ⁸	5,21x10 ⁶	9,78x10 ⁵	2,34
3	2,52x10 ⁸	7,50x10 ⁷	1,75x10 ⁵	3,16
4	1,43x10 ⁸	3,83x10 ⁷	1,45x10 ⁶	2,00
5/1	3,89x10 ⁸	3,41x10 ⁷	1,04x10 ⁶	2,57
6B	1,94x10 ⁸	5,84x10 ⁶	4,25x10 ⁵	2,6
7A	3,65x10 ⁸	1,03x10 ⁸	4,13x10 ⁷	0,94
8/1	4,38x10 ⁸	8,48x10 ⁷	7,48x10 ⁶	1,77
	2,27x10 ¹²	3,50x10 ¹¹	8,60x10 ¹⁰	
8/2	2,71x10 ⁸	1,04x10 ⁸	3,41x10 ⁶	1,90
	0,96x10 ¹²	10 ⁶	10 ⁵	
9	1,84x10 ⁸	6,13x10 ⁷	2,15x10 ⁶	1,93
	1,21x10 ¹²	4,70x10 ¹¹	1,39x10 ¹⁰	
13A	10 ¹¹	10 ⁹	10 ⁶	5,00
BB-12	3,40x10 ⁸	9,51x10 ⁷	5,94x10 ⁶	1,76

b) *In vitro* procjena preživljavanja probiotičkih sojeva iz pripravaka tijekom 6 h izlaganja simuliranim uvjetima GIT (sojevi u tablici su poredani na osnovi vrijednosti smrtnosti stanica).

Bakterijski sojevi	GIT tranzit			
	Broj živih stanica (log cfu /mL) u simuliranim uvjetima želuca		Broj živih stanica (log cfu/ml) u simuliranim uvjetima tankog crijeva	Smrtnost stanica (Δ log CFU/mL)
	0 h	2 h	4 h	0-6 h
7A	8,56	8,01	7,62	0,94
2A	8,55	7,91	7,47	1,08
1	8,53	8,21	7,42	1,11
8/1	8,64	7,93	6,87	1,77
8/2	8,43	8,01	6,53	1,90
9	8,26	7,79	6,33	1,93
4	8,16	7,58	6,16	2,00
2B	8,33	6,72	5,99	2,34
5/1	8,59	7,53	6,02	2,57
6B	8,29	7,77	5,63	2,60
3	8,40	7,88	5,24	3,16
BB-12	8,53	7,98	6,77	1,76

Razlika u broju poraslih bakterijskih kolonija prije i nakon inkubacije probiotičkih sojeva ($\Delta \log$ CFU/mL) tijekom 6 sati u simuliranim uvjetima GIT bila je unutar raspona vrijednosti od 0,94 do 3,16 log CFU/ml. Pri tome je u simuliranim uvjetima GIT za sojeve *Lactobacillus* iz PP1 i *Lactobacillus* 2A iz PP2 i za probiotičke sojeve u pripravku PP7 ustanovljeno najuspješnije preživljavanje (Tablica 25. b). Preživljavanje soja *Bifidobacterium* iz PP3 u usporedbi s preostalim ispitanim sojevima je bilo najslabije te broj poraslih kolonija nakon direktnog prijelaza iz simuliranog želučanog soka u simulirani sok tankog crijeva iznosio $1,75 \times 10^5$ CFU/ml, što nije zanemariv broj bakterijskih stanica. Potrebno je istaknuti da eksperimentalno određene vrijednosti smrtnosti bakterijskih sojeva upućuju generalno na uspješno preživljavanje sojeva iz pripravaka, jer je broj određen nakon 6 sati inkubacije u nepovoljnim uvjetima GIT za većinu bakterijskih sojeva iznosio iznad 10^6 CFU/ml, što je u skladu sa zahtjevima za probiotičke sojeve.

Osim niskog pH i probavnih enzima, prepreku preživljavanja u GIT mogu činiti i visoke koncentracije žučnih soli. Tolerancija na visoke koncentracije žuči je značajno svojstvo probiotičkih bakterija, budući da ima učinak na preživljavanje u tankom crijevu, a time i na iskazivanje funkcionalnih svojstava u GIT (Ruiz i sur., 2013). Otpornost bakterijskih sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* na žučne soli ispitana je karakterizacijom rasta u dodatku 0.3% ili 0.6% žučnih soli u optimalnim hranjivim podloge za rast, te je uspoređen s rastom sojeva pri optimalnim uvjetima praćenjem krivulje rasta tijekom 7 sati inkubacije pri 37°C i određivanjem smrtnosti stanica (Slika 22.). Prema rezultatima dodatak određene koncentracije žučnih soli u MRS hranjivu podlogu utjecao je na smanjenje prirasta biomase u usporedbi s kontrolnim rastom (Slika 22.). Između ispitivanih sojeva odabrana su tri probiotička soja o *Lactobacillus* 1, *B. longum* 3 i *L. rhamnosus* 13, koji pokazuju najmanju razlike u bakterijskom rastu u prisutnosti žučnih soli u usporedbi s kontrolnim rastom, između ispitivanih sojeva iz pripravaka tijekom 7 sati inkubacije pri 37 °C (Slika 22.). Učinak žučnih soli je dodatno ispitan osim mjerenjem bakterijskog rasta turbidimetrijski i naciepljivanjem alikvota suspenzije bakterijskih stanica tijekom 7 sati u intervalima od sat vremena na MRS kruti hranjivi agar. Rezultati su bili u skladu s rezultatima određivanja učinka određenih koncentracija žučnih soli na bakterijski rast pomoću turbidimetrijske metode praćenjem gustoće bakterijskih stanica (rezultati nizu prikazani). Proporcionalno s povećanjem koncentracije žučnih soli u mediju uočeno smanjenje rasta u odnosu na rast u optimalnim uvjetima.



Slika 22. Broj bakterijskih stanica (CFU/ml) i smrtnost stanica ($\Delta \log \text{CFU/mL}$) tri odabrana soja nakon rasta u optimalnoj hranjivoj podlozi uz dodatak 0,3% odnosno 0,6% (w/v) žučnih soli tijekom 7 sati inkubacije pri 37°C.

Pretpostavlja se da su za toleranciju bifidobakterija i laktobacila na žučne soli značajne aktivnosti efluks pumpe koje su uobičajeni mehanizmi detoksikacije koji koriste bakterije (González-Rodríguez i sur., 2013).

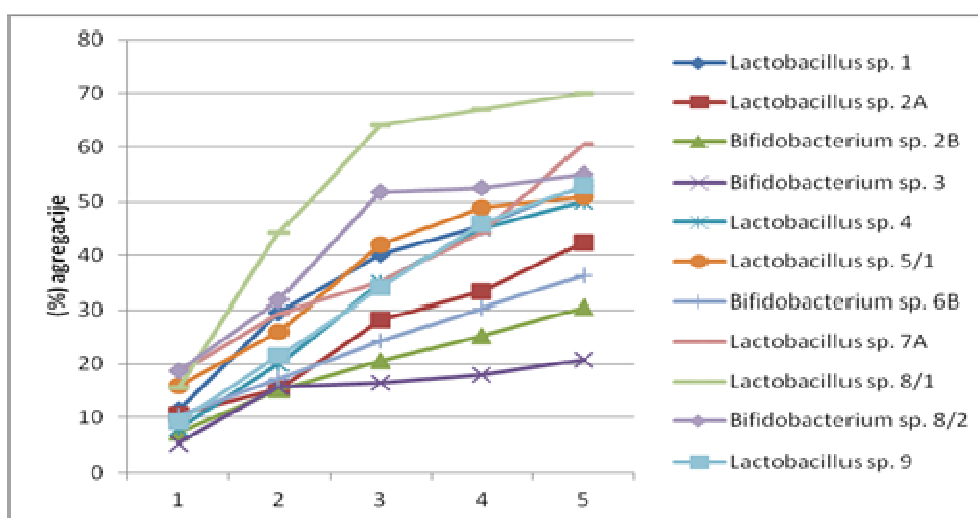
Zanimljivo je da se hidrolaza žučne soli, enzim koji ima funkciju dekonjugacije žučne soli, prekomjerno sintetizira u sojevima *B. animalis* subsp. *lactis*, koje su otporne na žuč (González-Rodríguez i sur., 2013; Singhal i sur., 2019, Ryan i sur., 2019). Kako je asimilacija kolesterola upravo enzimskim djelovanjem hidrolaze žučnih soli, mehanizam hipokolesterolemijskog učinka probiotičkih bakterija, provedene su *in vitro* analize asimilacije kolesterola s bakterijskim sojevima probiotičkih pripravaka. Provedeno je kvantitativno određivanje kolne kiseline koja nastaje dekonjugacijom taurokolata dodanog u MRS tekuću podlogu tijekom 24 sata inkubacije ispitivanih sojeva (Tablica 26.). Probiotički sojevi pokazuju slabu aktivnost hidrolaze žučnih soli jer su dekonjugirali 10-15% taurokolata dodanog u hranjivu podlogu za rast.

Tablica 26. Hidrolazna aktivnost probiotičkih sojeva iz pripravaka u prisutnosti 2 mg/mL natrijevog taurokolata.

Bakterijski sojevi	Rast (A ₆₂₀)	Kolna kiselina (g/L)	Dekonjugacija taurokolata (%)
1	0,370	0,27	13,5
2A	0,219	0,20	10,0
2B	0,253	0,25	12,5
3	0,220	0,20	10,0
4	0,730	0,27	13,5
5/1	0,840	0,27	13,5
6B	0,813	0,30	15,0
7A	0,945	0,28	14,0
8/1	0,300	0,26	13,0
8/2	0,350	0,30	15,0
9	0,935	0,30	15,0

Na temelju rezultata može se zaključiti da se bakterijski sojevi iz probiotičkih pripravaka mogu prilagoditi i preživjeti u uvjetima GIT *in vitro* gdje su prisutni u relativno visokom broju bakterijskih stanica, koje imaju mogućnost adhezije bilo na intestinalnu sluznicu ili intestinalne epitelne stanice. Adhezija bakterijskih stanica unutar niša GIT omogućuje privremenu

kolonizaciju, što je značajno za interakciju probiotičkih bakterija s intestinalnom mikrobiotom i intestinalnim epitelnim stanicama (Jensen i sur., 2014; Monteagudo-Mera i sur., 2019). Za procjenu adhezijskih svojstava bakterijskih sojeva iz pripravaka primijenjeno je nekoliko eksperimentalnih pristupa. U prvom redu prisutnost autoagregacijskih fenotipa s obzirom na svojstvo bakterijskih sojeva *Lactobacillus* vrsta da formiraju agregate bakterijskih stanica, što se naziva fenomenom autoagregacije, koji je povezan s adhezijskim svojstvima (Malik i sur., 2013). Za preliminarnu provjeru mogućih adhezivnih svojstva bakterijskih izolata ispitali smo prisutnost fenotipa autoagregacije probiotičkih stanica iz pripravaka u fosfatnom puferu (pH=7,2) tijekom 5 sati inkubacije.



Slika 23. Usporedba autoagregacije bakterijskih stanica sojeva iz probiotičkih pripravaka tijekom 5 sati inkubacije. Izraženo kao % agregacije.

Bakterijske stanice sojeva imaju sposobnost spontane autoagregacije iako u različitom postotku, koji iznosi između 20 % do 70 %. Prema rezultatima stanice *Lactobacillus* sojeva, u usporedbi sa stanicama *Bifidobacterium*, uspješnije autoagregiraju (Slika 23.).

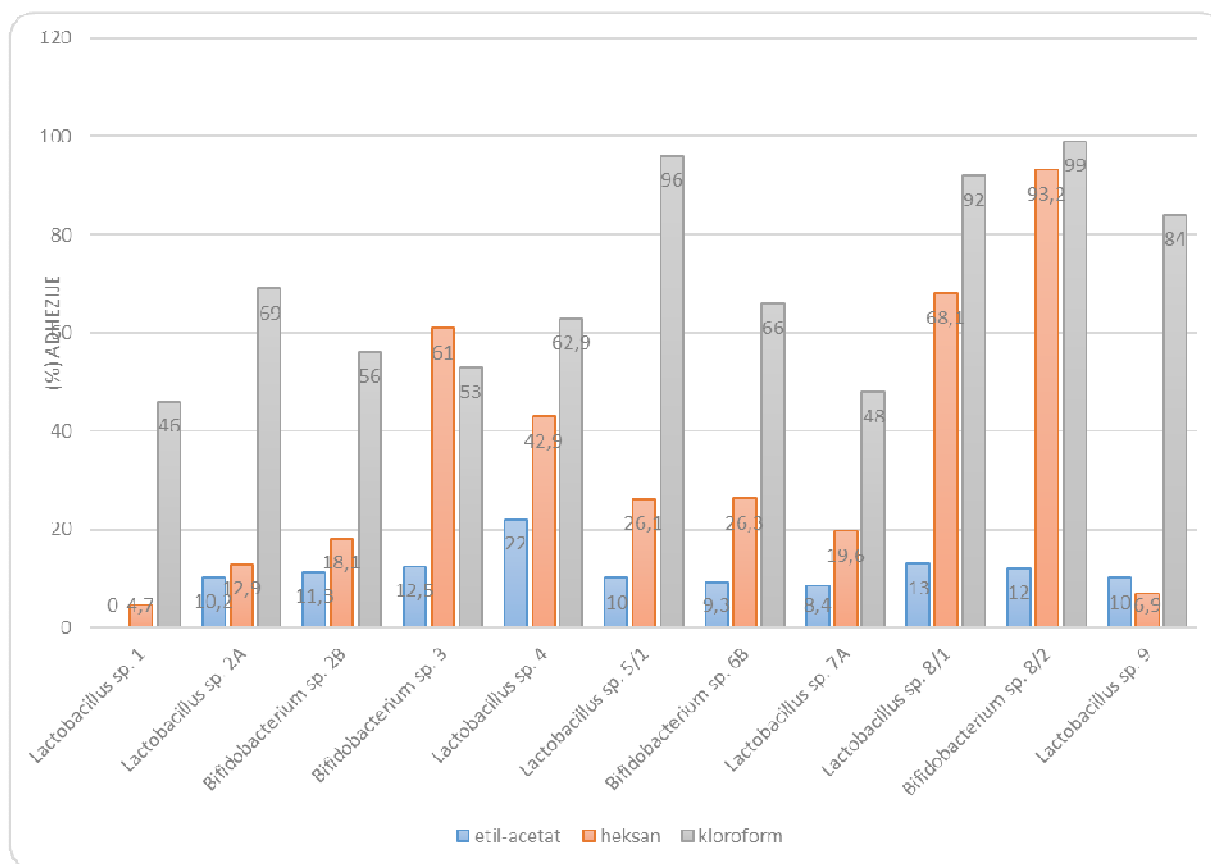
No uz svojstvo autoagregacije, za funkcionalne učinke probiotičkih sojeva značajno je i svojstvo koagregacije i kompetitivne ekskluzije patogenih sojeva, koji su značajni za eliminaciju/inhibiciju nepoželjnih bakterijskih sojeva i time modulaciju sastava intestinalne mikrobiote *in situ*. Kako bi definirali da li sojevi imaju svojstvo koagregacije, u eksperimentima je provedena inkubacija parova bakterija s potencijalnim enteropatogenima *E. coli* 3014 i *S.*

typhimurium FP1 (Tablica 26.). Ispitivani bakterijski sojevi vrste *Bifidobacterium* u najvećem postotku koagregiraju sa stanicama *S. enterica* serovar Typhimurium FP1 (35% odnosno 13%), a u manjem postotku sa stanicama *E. coli* 3014 (23% odnosno 5%).

Tablica 26. Koagregacija parova bakterija nakon 5 h inkubacije na sobnoj temperaturi u fosfatnom puferu (pH=7,2).

Bakterijski sojevi	Koagregacija (%)	
	<i>E. coli</i> 3014	<i>S. typhimurium</i> FP1
1	46,21	52,40
2A	54,28	50,52
2B	5,87	10,58
3	4,45	12,40
4	11,80	7,55
5/1	16,24	9,12
6B	35,31	11,54
7A	58,24	46,24
8/1	40,20	30,45
8/2	36,24	5,16
9	15,30	10,50
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	23,51	34,50
<i>B. longum</i> BB536	4,45	12,40

Svi sojevi pokazuju slaba kiselinska svojstva s afinitetom vezanja na etil-acetat manjim od 25%, te u značajnom omjeru svojstva baza s afinitetom prema kloroformu (45-99%) što je u skladu s rezultatima istraživanja Kos i sur. (2003) za soj *L. helveticus* M92 i istraživanjima Valeriano i sur (2014) za soj *Lactobacillus mucosae* LM1.

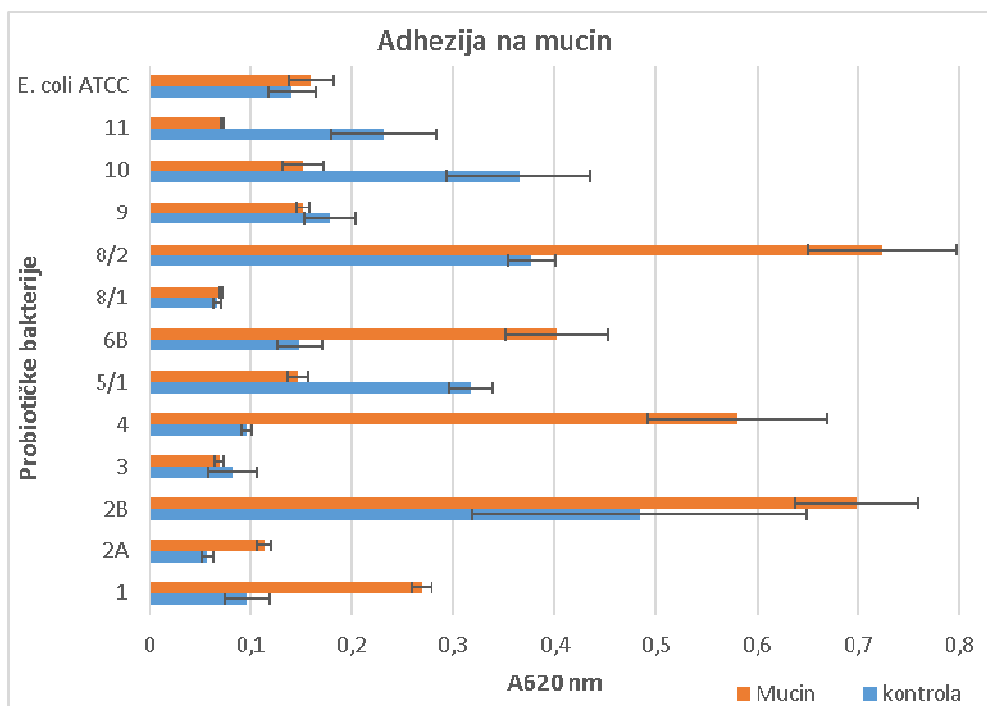


Slika 24. Adhezija stanica sojeva iz probiotičkih pripravaka na otapala etil-acetat, heksan i kloroform.

Rezultati upućuju da sojevi, u usporedbi s druga dva otapala, etil-acetatom ili heksanom, iskazuju veći afinitet za kloroform. Prema literaturi sojevi koji imaju izrazitiji adhezijski potencijal pokazuju bazična svojstva površine stanice i svojstva elektron donora što objašnjava preferenciju vezanja na kloroform (Valeriano i sur., 2014).

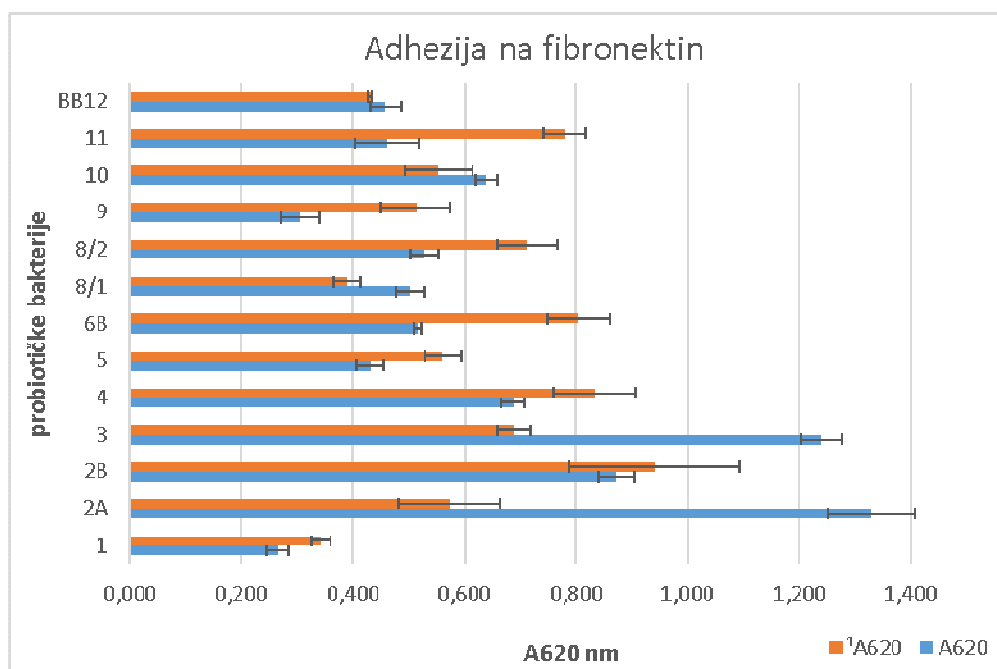
Prilikom adhezije na crijevni epitel bakterijska stanica specifično prepoznaje različite strukture intestinalnih epitelnih stanica ili sluznice kao moguće receptore. Mucini su osnovna strukturna komponenta mukusa u lumenu GIT kojeg izlučuju Goblet stanice, a pojedini probiotički sojevi imaju mogućnost adhezije na polimerizirane strukture ovog glikoproteina i to putem specifičnih mucin-vezujućih proteina (*engl.* mucin-binding proteins). *In vitro* adhezija bakterijskih sojeva iz pripravaka određena je u eksperimentalnom modelu mucina imobiliziranog na površinu polistirenskih mikrotitarskih pločica. Prema rezultatima, sojevi *Bifidobacterium* sp. 8/2, *Bifidobacterium* sp. 6B, *Lactobacillus reuteri* iz PP4, što je u skladu s istraživanjima Jensena i

sur. (2014) i *Bifidobacterium* sp. 2B iskazuju mogućnost interakcije s mucinom u usporedbi s ostalim i bakterijskim sojevima (Slika 25.).

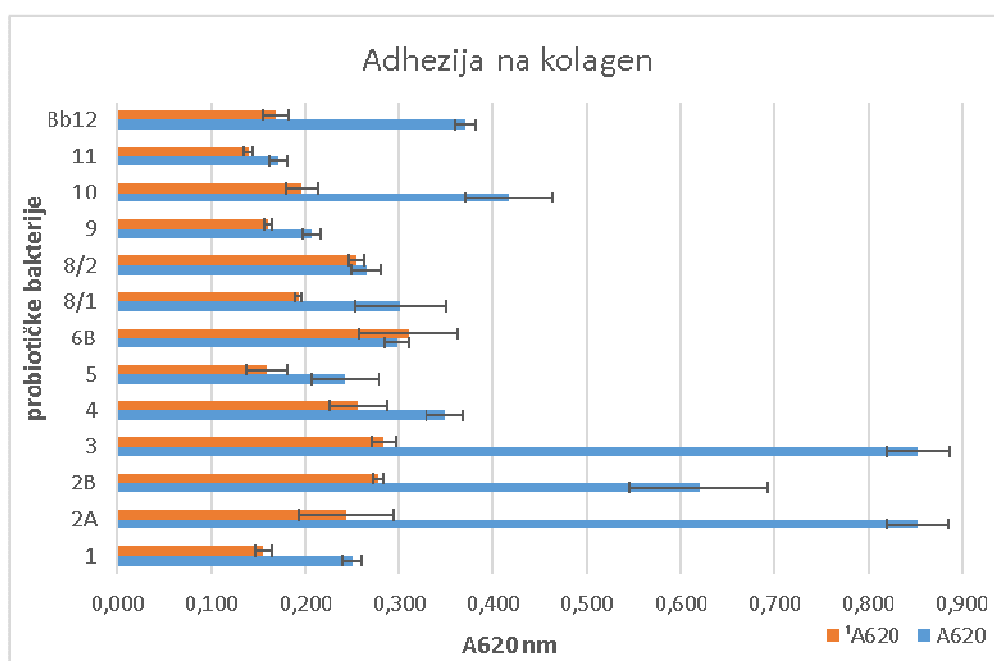


Slika 25. *In vitro* adhezija bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka na glikoprotein mucin imobiliziran na površinu polistirenskih mikrotitarskih pločica.

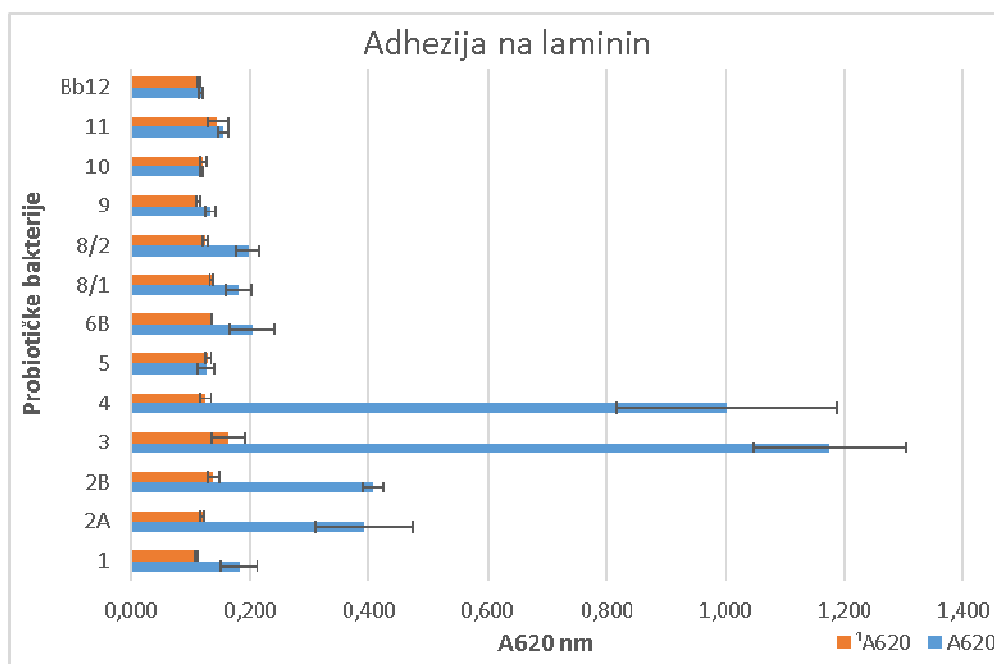
Provedeni su eksperimenti *in vitro* adhezije bakterijskih stanica na specifične komponente ekstracelularnog matriksa, proteine kolagen, fibronektin i laminin. Površinskih proteini bakterijskih stanica probiotičkih sojeva su okarakterizirani kao adhezini, te posreduju u interakciji mikrobnih stanica s proteinima ekstracelularnog matriksa domaćina, te su provedeni i eksperimenti adhezija istih sojeva nakon ekstrakcije površinskih proteina djelovanjem s proteinazom K. Bakterijski sojevi pokazali su mogućnost adhezije na fibronektin, kolagen i laminin (Slike 26. do 28.). Nakon ekstrakcije površinskih proteina, ustanovljeno je da je sposobnost adhezije bakterijskih stanica značajno slabija, što upućuje na funkcionalnu ulogu površinskih proteina bakterijskih stanica, čiji je proteom, kako je navedeno u prethodnim rezultatima, analiziran SDS-PAGE metodom nakon inkubacije s proteinazom K, u vezanju na specifične proteine.



Slika 26. *In vitro* adhezija bakterijskih stanica iz pripravaka na fibronektin imobiliziran na površinu polistirenske mikrotitrarske pločice. ¹) Adhezija na fibronektin nakon tretmana bakterijskih stanica proteinazom K.



Slika 27. *In vitro* adhezija bakterijskih stanica iz pripravaka na kolagen. ¹) Adhezija na kolagen nakon tretmana bakterijskih stanica proteinazom K.



Slika 28. *In vitro* adhezija bakterijskih stanica iz pripravaka na laminin. ¹) Adhezija na laminin nakon tretmana bakterijskih stanica proteinazom K.

Adhezijska svojstva mogu doprinijeti antagonističkom djelovanju prema patogenim bakterijama, ali i prema pojedinim sojevima srodnih BMK, što može upućivati na bakteriocinsku aktivnost. Mogućnost sinteze bakteriocina, s obzirom na svojstvo inhibicije srodnih bakterijskih vrsta, značajno je okarakterizirati unutar aspekta primjene probiotičkog pripravka koji sadrži mješovitu kulturu bakterija. Jedna od osnovnih uloga inestinalne mikrobiote jest da predstavlja mikrobnu fizičku barijeru za patogene mikroorganizme i time antimikrobnim djelovanjem doprinosi sustavu obrane GIT domaćina (Šušković i sur., 2010). Metaboliti BMK inhibiraju rast mnogih mikrobnih vrsta. Antimikrobno djelovanje uglavnom se temelji na sinergističkom djelovanju nekoliko različitih staničnih faktora (Common i sur., 2014). Tijekom fermentacije šećera, probiotičke BMK proizvodeći acetaldehid, diacetil, etanol, vodikov peroksid i bakteriocine, iskazuju antagonističku aktivnost u prisutnosti nepoželjni bakterijskih vrsta (Šušković i sur., 2010). Stoga je za funkcionalnu karakterizaciju eksperimentalno određena antibakterijska aktivnost probiotičkih sojeva iz pripravaka prema *E. coli* 3014, *S. aureus* 3048 i *S. enterica* serovar Typhimurium FP1, te antagonističko međudjelovanje prema BMK iz različitih rodova:

Lactobacillus plantarum LMG 9206, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LMG 9450 i *Enterococcus faecium* ATCC 9430 pomoću nekoliko metoda. Primjer su metoda dvostrukog sloja agara, metoda difuzije iz agar i turbidimetrijska metoda. Kako se spomenuti metaboliti BMK s antimikrobnim djelovanjem izlučuju ekstracelularno u okolni medij, ispitano je i inhibicijsko djelovanje supernatanta kulture prema učestalim kontaminantima koji mogu narušiti ravnotežu GIT, *S. aureus* 3048, *S. aureus* K-144, *E. coli* 3014, *S. Typhimurium* FP1, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* TM2 i *Bacillus subtilis* ATCC6633.

U preliminarnom probiru sojeva s antimikrobnim učinkom kvalitativno je određena mogućnost inhibicije odabranih test-mikroorganizama i sojevi su iskazali antimikrobni potencijal sa specifičnim učinkom, koji se razlikovao ovisno o soju (Tablica 27.).

Tablica 27. Antimikrobno djelovanje probiotičkih sojeva izoliranih iz pripravaka prema srodnim bakterijama mliječne kiseline, određeno metodom dvostrukog sloja agara.

Test mikroorganizam	1A	2A	3	4	5/1	6B	7A	8	8/1	9
<i>L. rhamnosus</i>	++	++	++	+	+	+	++	-	++	+
<i>L. lactis</i>	++	++	++	+	++	++	++	-	++	+
<i>E. faecium</i>	++	++	++	+	+	++	++	-	++	++
<i>L. mesenteroides</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	++	++	+	+	++	+	+	+	++	+
<i>S. aureus</i>	++	++	+	+	+	+	+	++	++	+
<i>Salmonella</i>	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++

* -nema inhibicije rasta; + umjerena inhibicija rasta; ++ inhibicija rasta

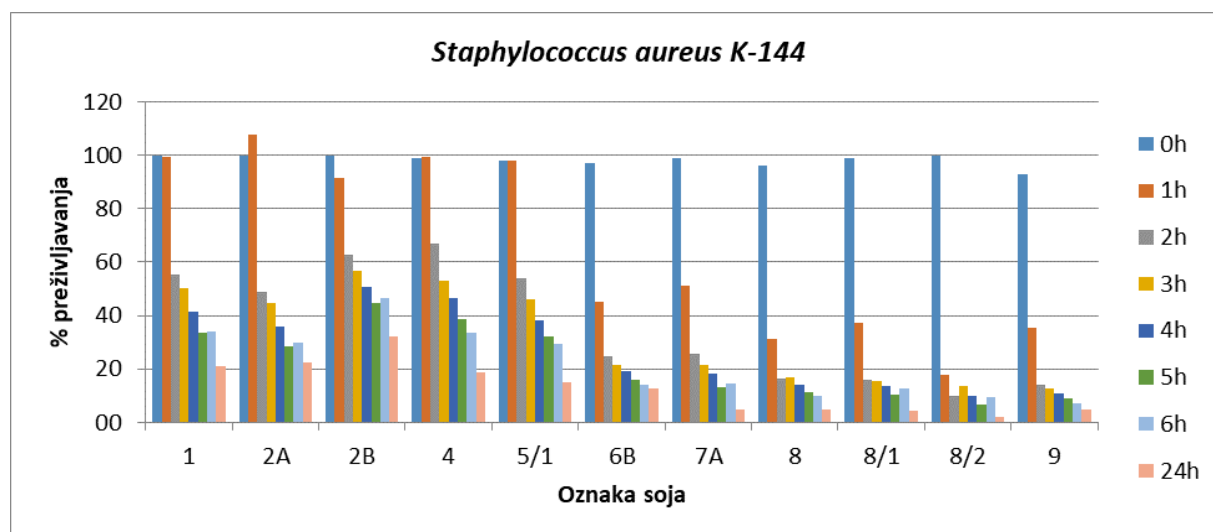
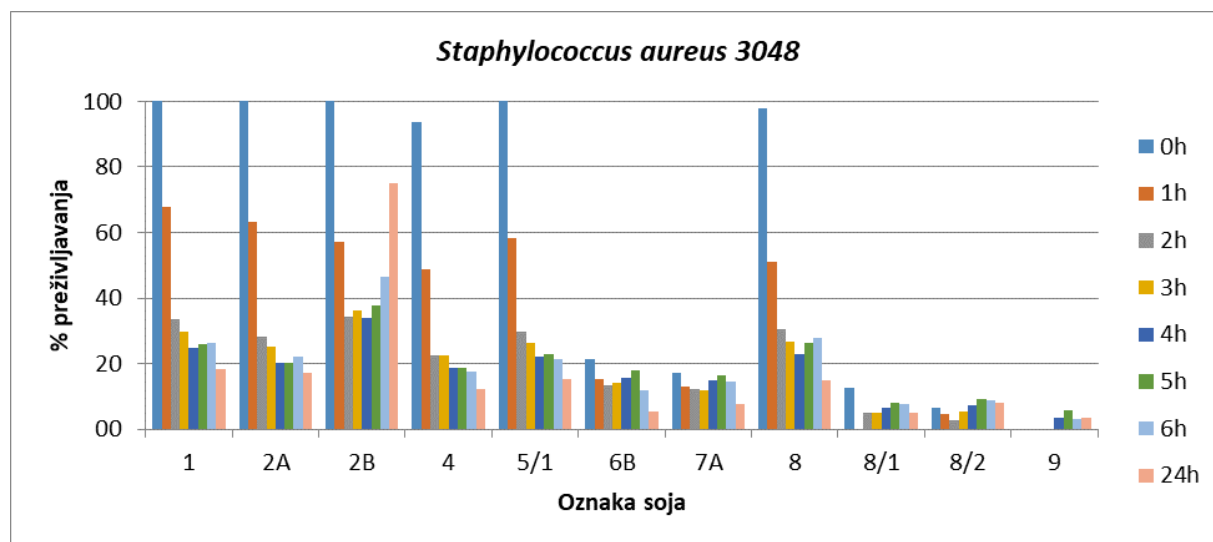
Kako se većina antimikrobnih metabolita izlučuje u vanstanični prostor, određivanje antagonističkog djelovanja sojeva iz probiotičkih pripravaka, prema odabranim test mikroorganizmima, određeno je metodom difuzije u agar nakon izdvajanja supernatanta kulture probiotičkog soja (Tablica 28.). Sojevi iz probiotičkih pripravaka iskazuju antagonističko djelovanje i prema Gram-pozitivnim i prema Gram-negativnim bakterijama. Iako prema rezultatima postoje razlike s obzirom na inhibicijski učinak prema pojedinom test-mikroorganizmu, razlike u inhibicijskom djelovanju nisu značajne. No prema literaturi

probiotičke BMK generalno iskazuju značajnije inhibicijsko djelovanje prema Gram-pozitivnim bakterijama (Coman i sur., 2014).

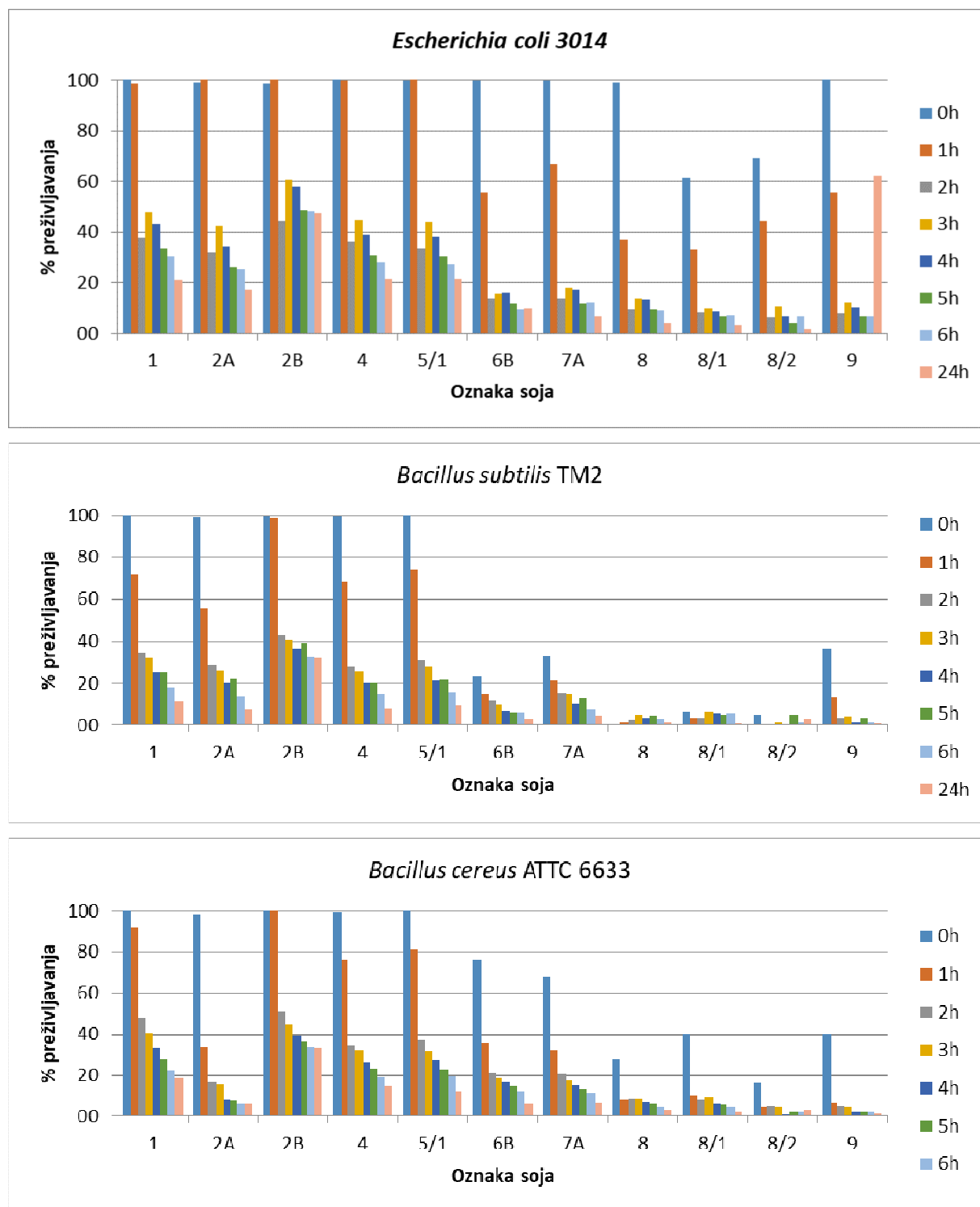
Tablica 28. Antimikrobno djelovanje supernatanta kulture sojeva iz probiotičkih pripravaka prema odabranim test mikroorganizmima ispitano metodom difuzije s rupama u agaru. Vrijednosti inhibicije izražene u centimetrima kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija minimalno tri ponovljena eksperimenta.

Oznaka soja	1A	2A	3	4	5/1	6B	7A	8	9
<i>S. aureus</i> 3048	14,7 $\pm$ 2,3	14,0 $\pm$ 6,0	16,3 $\pm$ 4,0	17,0 $\pm$ 3,6	6,5 $\pm$ 0,7	11,3 $\pm$ 3,8	14,7 $\pm$ 6,5	10,3 $\pm$ 4,0	14,0 $\pm$ 1,7
<i>E. coli</i> 3014	17,3 $\pm$ 3,3	14,8 $\pm$ 2,4	15,6 $\pm$ 2,2	15,3 $\pm$ 3,3	6,5 $\pm$ 2,1	11,8 $\pm$ 2,2	15,4 $\pm$ 3,7	9,5 $\pm$ 3,5	10,0 $\pm$ 1,4
<i>S. Typhimurium</i> FP1	15,6 $\pm$ 4,8	14,2 $\pm$ 2,0	16,6 $\pm$ 4,56	12,7 $\pm$ 3,2	7,5 $\pm$ 0,7	13,0 $\pm$ 1,7	16,0 $\pm$ 3,6	13,5 $\pm$ 3,5	14,5 $\pm$ 0,7
<i>B. cereus</i> TM2	16,5 $\pm$ 0,7	12,0 $\pm$ 1,4	15,0 $\pm$ 1,4	18,0 $\pm$ 1,4	6,5 $\pm$ 0,7	12,7 $\pm$ 0,6	16,0 $\pm$ 3,6	12,0 $\pm$ 0	13,0 $\pm$ 2,8
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	18,0 $\pm$ 7,1	14,5 $\pm$ 0,7	20,0 $\pm$ 1,4	19,0 $\pm$ 5,7	7,0 $\pm$ 0	13,5 $\pm$ 3,5	13,5 $\pm$ 3,5	12,0 $\pm$ 1,4	12,5 $\pm$ 2,1

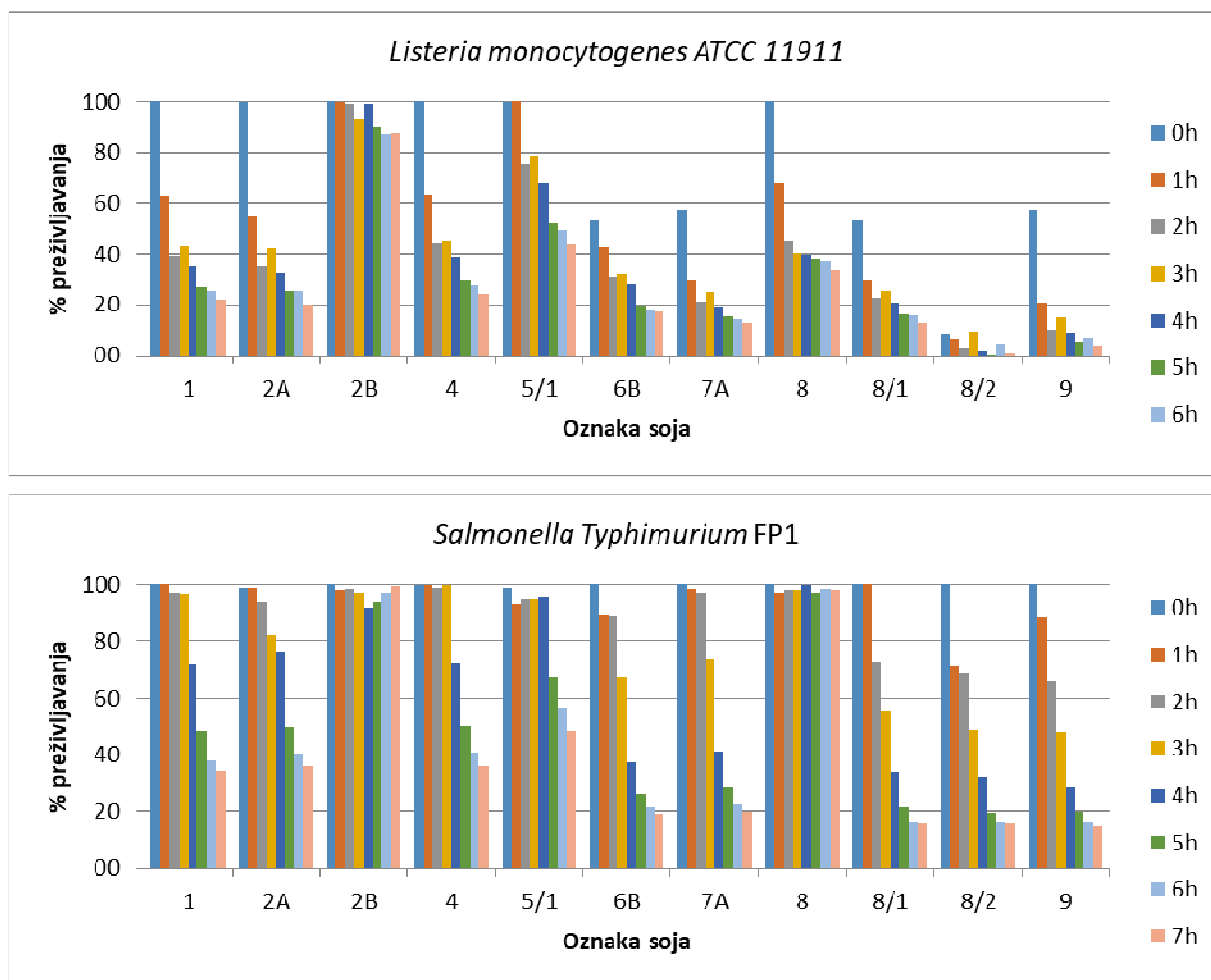
Rezultati eksperimentalnog određivanja inhibicijskog učinka sojeva iz probiotičkih pripravaka metodom difuzije u agaru su potvrđeni i turbidimetrijskom metodom, praćenjem rasta odnosno određivanjem optičke gustoće u određenim vremenskim intervalima pomoću čitača mikrotitarskih pločica, koja omogućuje usporedbu rasta dva antagonistička soja. Ciljani patogeni soj i probiotičke kulture su u kokultivaciji. Usporedbom krivulje rasta test-mikroorganizma u tekućoj hranjivoj podlozi i tijekom kokultivacije s probiotičkim sojem, ustanovljena je značajna inhibicija rasta većine nepoželjnih mikroorganizama, no slabiji inhibicijski učinak ustanovljen je prema Gram-negativnoj bakteriji *S. Typhimurium* FP1 (Slika 29.).



Slika 29. Inhibicija rasta test-mikroorganizama u prisutnosti 50 % (v/v) supernatanta kulture sojeva iz probiotičkih pripravaka.



Slika 29. Inhibicija rasta test-mikroorganizama u prisutnosti 50 % (v/v) supernatanta kulture sojeva iz probiotičkih pripravaka.



Slika 29. Inhibicija rasta test-mikroorganizama u prisutnosti 50 % (v/v) supernatanta kulture sojeva iz probiotičkih pripravaka.

Značajan je inhibicijski učinak odabranih sojeva prema učestalom kontaminantu hrane *S. aureus* u mesnim ili mliječnim proizvodima. Sojevi su inhibirali rast bakterije *S. aureus* 3048 (Slika 29.) Pretpostavlja se da inhibicijski učinak probiotičkih BMK proizlazi iz združenog antimikrobnog djelovanja uslijed acidifikacije mikrookoliša, sinteze vodikovog-peroksida ili mogućnosti sinteze bakteriocina. Kako je bakterija *S. aureus* acidotolerantna i može rasti pri niskim pH vrijednostima nižim od 4, pretpostavlja se da druge antimikrobne komponente koje sintetiziraju probiotički sojevi združenim učinkom inhibiraju rast *S. aureus* (Chalier i sur., 2009; Leebert i sur., 2020).

Metoda dvostrukog sloja agara, utemeljena na inokulaciji test-mikroorganizama u jednom sloju agara, te probiotičkog soja u drugom sloju agara, za određivanje antimikrobnog djelovanja

bakterijskih stanica učinkovita je za analizu inhibicijskog djelovanja probiotičkih bakterija (Köhler i sur., 2012; Comon i sur., 2014). Prednost ove metode, u usporedbi s preostalim metodama definiranja antimikrobnog učinka, a kojima se određuje antibakterijska aktivnost supernatanta kulture probiotičkog soja, je u što mikroorganizam producent tijekom rasta izlučuje antimikrobne supstancije direktno u podlogu na kojoj se testira inhibicija rasta test-mikroorganizma. Eksperimentalno određene zone inhibicije označavaju antibakterijsko djelovanje soja prema test mikroorganizmima. Vrijednosti efektivnih inhibicijskih omjera (EIR), koji se izračunavaju iz izmjerenih promjera zona porasle probiotičke kulture, čije se antimikrobno djelovanje ispituje i promjera zona inhibicije odabranih test-mikroorganizama *S. Typhimurium* FP1 i *E. coli* 3014, upućuju da većina sojeva umjereno inhibiraju (vrijednosti EIR=0,71-1,22) ili značajnije inhibiraju test-mikroorganizme (vrijednosti EIR=1,57-2,43) s iznimkom sojeva iz probiotičkih pripravaka PP4 odnosno PP5 koji nisu inhibirali rast *S. Typhimurium* FP1 (Tablica 29.). Na temelju određenih vrijednosti EIR ustanovljeno je da odabrani sojevi imaju različiti spektar antimikrobnog djelovanja prema srodnim bakterijama iz roda *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Enterococcus* (Tablica 29.). Pri tome su vrijednosti EIR, u usporedbi s dobivenim vrijednostima inhibicije patogenih bakterijama općenito manje te se mogu okarakterizirati kao slaba ili umjerena inhibicija. Stoga se pretpostavlja da ne iskazuju značajno inhibicijsko djelovanje prema srodnim bakterijama čiji predstavnici mogu biti zastupljeni kao dio bakterijske populacije intestinalne mikrobiote.

Tablica 29. a) Antagonističko međudjelovanje bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka s test-mikroorganizmima određeno metodom dvostrukog sloja agara; **b)** Antagonističko međudjelovanje sojeva iz probiotičkih pripravka i odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline izraženo određivanjem vrijednosti efektivnog inhibicijskog omjera (EIR).

a)

Bakterijska kultura	EIR	
	<i>S. Typhimurium</i> FP1	<i>E. coli</i> 3014
1	2,00	1,22
2A	1,00	2,43
2B	1,67	2,25
3	0,71	1,57
4	nema inhibicije rasta	1,71
5	nema inhibicije rasta	nema inhibicije rasta
6	1,17	2,33
8/1	2,14	1,60
8/2	1,00	0,80
9	1,00	nema inhibicije rasta

b)

Bakterijski kultura	EIR		
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. lactis</i>	<i>E. faecium</i>
1	1,20±0,95	0,89±0,76	1,56±1,46
2A	1,63±0,84	1,02±0,47	1,00±1,64
2B	0,23±0,11	1,40±0,00	1,00±0,00
3	0,52±0,33	1,00±0,71	0,73±0,00
4	0,27±0,03	1,25±0,00	0,80±0,67
5	1,00±0,00	0,60±0,57	0,81±0,28
6	0,37±0,03	0,70±0,38	0,91±0,53
7	0,51±0,23	0,47±0,36	0,59±0,71
8/1	0,25±0,19	0,82±0,54	0,25±0,49
8/2	0,21±0,53	0,60±0,00	0,23±0,07
9	0,15±0,23	nema inhibicije rasta	0,43±0,11

Interpretacija eksperimentalno dobivenih vrijednosti EIR < 0,5 slaba inhibicija rasta; EIR 0,5 do 1,5 srednja inhibicija rasta; EIR >1,5 značajna inhibicija rasta. Eksperimenti su ponovljeni minimalno tri puta za statističku analizu rezultata.

Dodatno je i turbidimetrijskom metodom ispitano antimikrobno djelovanje nerazijeđenog supernatanta kulture, te 75%, 50% i 25%-tnog supernatanta kulture u MRS hranjivoj podlozi

probiotičkih sojeva prema test-mikroorganizmima *E. coli* 3014 i *S. Typhimurium* FP1 (Tablica 30.).

Tablica 30. Inhibicijsko djelovanje supernatanta kultura bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka prema test-mikroorganizmima *S. Typhimurium* FP1 i *E. coli* 3014 određeno turbidimetrijskom metodom.

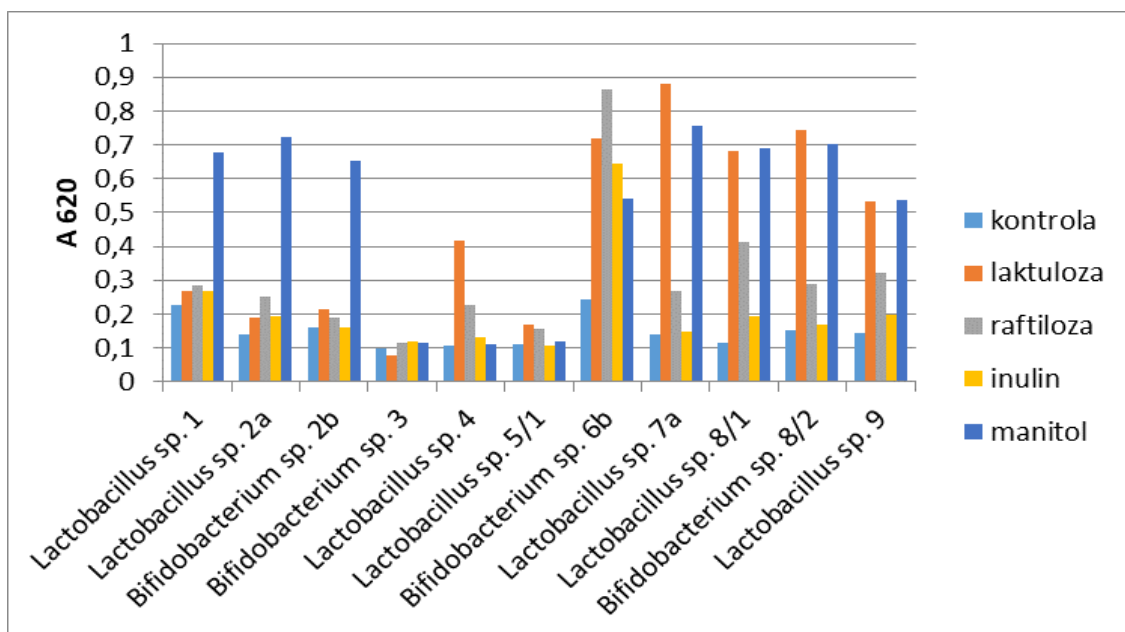
Bakterijska kultura	Promjer zone inhibicije rasta (mm)									
	<i>S. typhimurium</i> FP1					<i>E. coli</i> 3014				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
1	22	21	14	12	10	15	11	10	-	-
2A	21	14	12	11	10	16	12	10	10	9
2B	20	13	11	10	-	14	11	9	-	-
3	24	14	12	10	10	14	12	11	9	-
4	12	-	-	-	-	10	-	-	-	-
5	12	10	-	-	-	10	-	-	-	-
6	19	14	12	11	10	15	12	11	10	-
8/1	21	13	12	10	-	15	12	11	10	-
8/2	12	-	-	-	-	9	-	-	-	-
9	12	10	-	-	-	9	-	-	-	-

Razrijeđenja supernatanta kulture:

- a - 50 µl supernatanta kulture
- b - 40 µl supernatanta kulture + 10 µl hranjivog bujona
- c - 30 µl supernatanta kulture + 20 µl hranjivog bujona
- d - 20 µl supernatanta kulture + 30 µl hranjivog bujona
- e - 10 µl supernatanta kulture + 40 µl hranjivog bujona
- nema inhibicijskog djelovanja

Narazrijeđeni supernatant probiotičkih sojeva inhibirao je rast oba ispitana test-mikroorganizama ali pri tome značajnije *S. typhimurium* FP1 u usporedbi s *E. coli* 3014. Inhibicijski učinak razrijeđenih 50 i 25%-tnih supernatanta kulture zadržan je kod većine probiotičkih sojeva i proporcionalno razrijeđenju supernatanta se smanjuje.

Jedan od pristupa za pojačanje kolonizacijskog potencijala probiotičkih sojeva u GIT jer primjena prebiotičkog koncepta, odnosno združena primjena probiotičkog soja s prebiotičkim supstratom. Prebiotici se definiraju kao supstrati koji mikroorganizmi domaćina selektivno koriste i tako poboljšavaju zdravlje domaćina (Gibson i sur., 2011). Upravo pojedini prebiotički supstrati potiču rast *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrsta iz intestinalne mikrobiote, stoga je određena mogućnost bakterijskih sojeva iz pripravaka da asimiliraju odabrane supstrate iz hranjive podloge kako bi se procjenio potencijal za sinbiotičku primjenu (Slika 30).



Slika 30. Asmilacija prebiotičkih supstrata laktuloze, raftiloze, inulina i manitola pomoću bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka.

Pojedini prebiotički supstrati imaju ujedno i zaštitni učinak kao lioprotektori tijekom procesa liofilizacije za pripremu liofiliziranih probiotičkih pripravaka, pa se njihovom primjenom osim doprinosa funkcionalnosti probiotičkih sojeva može utjecati i na tehnološka svojstva tijekom biotehnološke proizvodnje na industrijskog razini.

Nakon funkcionalne karakterizacije bakterijskih sojeva, provedena je liofilizacija bakterijske biomase. Probiotički pripravci na tržištu uglavnom su dostupni u suhim, praškastim oblicima, proizvedeni su različitim metodama sušenja koje mogu, uslijed tehnoloških parametara, utjecati na smanjenje broja živih bakterijskih stanica u završnom pripravku. Nakon revitalizacije sojeva u optimalnim medijima za rast, proveden je proces liofilizacije: uklanjanje unutarstanične vode sublimacijom iz duboko zamrznute koncentrirane biomase pod vakuumom. Empirijski se ovim procesom postiže visok broj živih probiotičkih stanica po gramu pripravka. Liofilizacija bakterijskih sojeva provedena je uz dodatak različitih krioprotektora i lioprotektora te je određen stupanj preživljavanja za svaki uzorak, a odabran je najučinkovitiji lioprotektor, obrano mlijeko, kojime je postignuto najuspješnije preživljavanje probiotičkih bakterija u pripravku (Tablica 31. a i b).

Postotak preživljavanje probiotičkih bakterija iz pripravaka je u rasponu vrijednosti $80,42 \pm 0,17$ do $95,91 \pm 0,05$ %. Prema tome proces liofilizacije može se smatrati pogodnom metodom za pripremu liofiliziranih praškastih pripravaka probiotičkih bakterija.

Tablica 31. a) Preživljavanje probiotičkih sojeva izoliranih iz probiotičkih pripravaka na hrvatskom tržištu nakon procesa liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka

Bakterijska kultura	log CFU/mL (prije liofilizacije)	log CFU/ml (nakon liofilizacije)	Smrtnost stanica	Preživljavanje sojeva (%)
1A	$9,63 \pm 1,16$	$9,20 \pm 0,69$	$0,43 \pm 0,49$	$95,91 \pm 0,05$
2A	$10,84 \pm 1,36$	$9,60 \pm 2,15$	$1,24 \pm 1,24$	$88,10 \pm 0,11$
2B	$9,85 \pm 0,07$	$67,92 \pm 1,65$	$3,15 \pm 0,72$	$80,42 \pm 0,17$
3	$9,51 \pm 0,80$	$8,73 \pm 0,46$	$0,79 \pm 1,22$	$92,37 \pm 11,63$
4	$9,97 \pm 0,47$	$8,87 \pm 0,56$	$1,1 \pm 0,77$	$89,11 \pm 7,60$
5/1	$9,29 \pm 0,62$	$8,29 \pm 0,40$	$1,0 \pm 1,02$	$89,57 \pm 10,28$
6B	$9,81 \pm 0,14$	$9,20 \pm 0,23$	$0,61 \pm 0,13$	$93,77 \pm 1,40$
7A	$10,04 \pm 1,91$	$9,04 \pm 1,47$	$1,0 \pm 0,44$	$90,28 \pm 2,52$
8	$9,74 \pm 0,22$	$8,82 \pm 0,48$	$0,92 \pm 0,262$	$90,48 \pm 2,87$
8/1	9,00	8,69	0,31	96,56
9	$9,65 \pm 0,40$	$8,85 \pm 0,94$	$0,8 \pm 0,56$	$91,53 \pm 6,34$

b) Preživljavanje *L. reuteri* i *L. rhamnosus* iz probiotičkog pripravka PP13 nakon procesa liofilizacije u obranom mlijeku.

Mikroorganizmi	N (prije liofilizacije)	N (poslije liofilizacije)	Preživljavanje (%)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	$1,15 \times 10^9$	$2,91 \times 10^7$	82,34
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	$1,71 \times 10^9$	$1,69 \times 10^8$	89,06

Time je finaliziran protokol reidentificiranja i redefiniranja deklariranih probiotičkih pripravaka prema smjernicama znanstvene zajednice, prema kojima probiotički sojevi moraju zadovoljiti stroge izborne kriterije s općeg, tehnološkog i funkcionalnog aspekta.

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

5.1. Identifikacija probiotičkih sojeva iz pripravaka

Probiotički sojevi sadržani u pripravcima na tržištu moraju zadržati funkcionalna svojstva na temelju kojih su prilikom ispitivanja zadovoljili stroge izborne kriterije, a prema kojima su sigurni za primjenu, zadovoljavajuće kvalitete i učinkovitosti *in vivo*. Glavni je zahtjev za primjenu probiotičkih pripravaka da konačni proizvod sadrži točno definiran broj živih probiotičkih stanica naveden na deklaraciji. Probiotički pripravci se većinom prodaju kao dodaci prehrani, te ne podliježu zakonodavstvu lijekova, iako postoje intenzivna nastojanja znanstvene zajednice u suradnji s farmaceutskim kompanijama za njihovu primjenu kao bioterapeutika utemeljenu na kliničkim studijama. Stoga su standardi industrijske proizvodnje, odnosno dobre proizvođačke prakse i kontrole kvalitete različito definirani u usporedbi s onima u proizvodnji lijekova. Davis (2014) u preglednom znanstvenom radu navodi nekoliko znanstvenih istraživanja kojima je ustanovljeno da broj probiotičkih stanica u pripravku prema deklaraciji probiotički proizvoda nije točan, te su ustanovljene znatno niže koncentracije bakterijskih stanica od navedenih. U prvom redu, za učinkovitost probiotičkih pripravaka neophodno je osigurati preciznu taksonomsku identifikaciju na razini soja, te jasno navesti na deklaraciji sadržane sojeve i definirati preživljavanje i praćenje kvalitete formulacije proizvoda tijekom vremena (Lewis i sur., 2016). Probiotički proizvodi dostupni na tržištu uključuju fermentirane prehrambene proizvode ili dodatke prehrani koji sadrže jedan ili više probiotičkih sojeva. Međutim, nije uspostavljena i definirana validacija nadzora kvalitete ovih pripravaka na državnoj razini, štoviše prisutna je neusklađenost u nadzoru kvalitete na međunarodnoj razini (de Simone, 2018). I na hrvatskom tržištu dostupna je široka ponuda probiotičkih proizvoda. Stoga su u ovom radu provedena istraživanja koja su omogućila rezultate o broju bakterijskih stanica, sastavu mikrobnih kultura okarakteriziranih kao probiotičkih i *in vitro* funkcionalnosti sojeva u probiotičkim pripravcima. U središtu istraživanja je uspostavljanje metodološkog pristupa za robusnu analizu probiotičkih pripravaka kako bi se ustanovila točnost taksonomske nomenklature i koncentracije bakterijskih stanica, preciznost identifikacije soja, uz definiranje sigurnosti primjene i evaluacije funkcionalnih svojstava *in vitro*.

Iz 13 probiotičkih pripravaka (PP) su izolirani bakterijski sojevi kako bi se ustanovilo da li deklaracije proizvoda ispravno navode podatke o sadržanim vrstama iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Ustanovljeno je da bakterijske kulture koje su navedene na deklaraciji većinom pripadaju probiotičkim sojevima koji su među najistraživanijim sojevima međunarodnih istraživačkih timova, te su okarakterizirani u znanstvenim istraživanjima i kliničkim studijama s aspekta funkcionalnosti. Radi se o probiotičkim bakterijama poput *L. rhamnosus* GG®, prema posljednjoj nomenklaturi preimenovan u *Lacticaseibacillus rhamnosus*, koji se primjenjuje za profilaksu i terapiju niza gastrointestinalnih infekcija ili jačanje imuniteta. Među deklariranim sojevima je i *L. reuteri* DSM 17938 koji se pojedinačno ili u kombinaciji s drugim sojem *L. reuteri* preporuča za održavanje ravnoteže sastava mikrobiote usne šupljine. Isto tako probiotički pripravak namijenjen djeci sadrži *Bifidobacterium longum*, a zapravo se precizno radi o soju *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 koji je izvorno prvi puta izoliran iz fecesa zdravog dojenčeta (Boon Wong i sur., 2019). Liofilizirani pripravci koji sadrže pojedinačne ili nekoliko različitih sojeva probiotičkih bakterija su značajno prisutni na tržištu, a kako se radi o proizvodima koji se primjenjuju za profilaksu ili ublažavanje simptoma različitih intestinalnih poremećaja, osim kod odraslih, i kod djece i dojenčadi, neophodna je ispravna taksonomska identifikacija na razini soja i označavanje prisutnih bakterijskih sojeva, te određivanje broja poraslih kolonija (CFU/ml ili CFU/g), o čemu je prema nadzoru kvalitete, zakonodavstvu i smjernicama EFSA potrebno izvjestiti na deklaraciji proizvoda. Probiotički pripravci najčešće sadrže jedan ili više sojeva bakterijskih vrsta iz rodova BMK, koje su izvorno izolirane iz različitih fermentiranih proizvoda ili GIT čovjeka: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* i *Lactococcus*. No pojedini pripravci sadrže i *Bacillus* vrste te *Saccharomyces boulardii* i najčešće su dostupni u finalnom praškastom obliku u vrećicama, unutar kapsula ili tablete ili u formulaciji kapi (Patro i sur., 2016). Dostupni su čitavi konzorciji mikrobnih vrsta unutar pripravaka komercijalnog imena VSL#3 koji sadrži sojeve: *Streptococcus thermophilus*, *Eubacterium faecium*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* te *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*, koji se pokazao učinkovit u terapiji ulceroznog kolitisa (Hage i sur., 2017). U novije vrijeme intenzivno se provode i istraživanja na tkz. novoj generaciji probiotičkih sojeva *Akkermansia muciphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis* i *Bacteroides uniformis*, čiji je značaj proizašao iz omičkih

istraživanja intestinalnog mikrobioma, ali pripravci ovih bakterija još nisu dostupni na tržištu (Hage i sur., 2017).

Zbog velike komercijalizacije probiotičkih pripravaka, EFSA (2012) je izdala upute za provjeru zdravstvenih tvrdnji koje se navode na deklaraciji proizvoda. Analiza sastava i broja mikrobnih stanica pokazala je da je značajan udio probiotičkih proizvoda s deklaracijama na kojima informacije i vrijednosti odstupaju od navedenih (Jackson i sur., 2019). Stoga je u Europi pokrenuta inicijativa reidentifikacije bakterijskih sojeva koji se koriste kao probiotici s ciljem osnivanja banke probiotičkih sojeva kao temelja za daljnja istraživanja (Gibson i sur., 2011). Budući da su brojna znanstvena istraživanja koja upućuju na čestu pojavu neispravnog označavanja probiotičkih sojeva u komercijalnim proizvodima (Lewis i sur., 2016; Patro i sur., 2016; Ansari i sur., 2019; Ullah i sur., 2020) sakupljeni su probiotički pripravci na hrvatskom tržištu, kako bi se provela reidentifikacija bakterijskih sojeva koji su prisutni u tim proizvodima prema deklaraciji. No, prije definiranja funkcionalnih učinaka, najvažniji opći kriterij za odabir probiotičkih sojeva je ispravna taksonomska identifikacija. Stoga je provedena identifikacija bakterijskih sojeva iz probiotičkih pripravaka primjenom fenotipskih metoda kao brzih, učinkovitih i ekonomičnih pristupa za rutinsku analizu velikog broja bakterijskih sojeva. Korištene su konvencionalne mikrobiološke metode za definiranje fizioloških i metaboličkih svojstava i fenotipske metode poput API 50 CHL i BBL CRYSTAL ANR testova za određivanje fermentacijskih profila različitih metabolita, te SDS-PAGE analiza ukupnih staničnih i površinskih proteina.

Naime, na deklaracijama sakupljenih probiotičkih pripravaka, navedeno je da sadrže čistu probiotičku kulturu ili konzorcij bakterijskih sojeva koji pripadaju rodu *Lactobacillus*, odnosno *Bifidobacterium*, zbog čega su prilikom kultivacije pojedinačnih kolonija korištene MRS hranjiva podloga selektivna za rast *Lactobacillus* vrsta, te TOS-propionat podloga koja se koristi kao optimalna podloga za rast *Bifidobacterium* vrsta. Prema navedenim informacijama o sojevima odabrani su uvjeti rasta odnosno optimalne temperature, te inkubacija u mikroaerofilnim ili anaerobnim uvjetima. Zbog praktičnosti bakterijske kulture su označene redom prema probiotičkom pripravku unutar kojeg su sadržani: 1, 2A, 2B, 3, 4, 5, 6B, 7A, 8/1, 8/2, 9, 13A i 13B. Sojevi 2A i 2B, te 8/1 i 8/2, su izolirani iz istih pripravaka, ali nakon uzgoja na različitim hranjivim podlogama odabirom morfološki različitih bakterijskih kolonija, zbog čega

se pretpostavljalo da pripadaju različitim rodovima, što je ispitano i primjenom molekularnih metoda analizom DNA.

Prema fiziološkim svojstvima bakterijski sojevi su definirani kao Gram-pozitivne, nepokretne i nesporigene bakterije, morfologije štapića ili koka, koje ne eksprimiraju enzim katalazu, te su preliminarno klasificirane kao BMK. Bakterijski sojevi su sintetizirali visoke koncentracije mliječne kiseline te u skladu s tim snizili pH vrijednost mikrookoliša i time utjecali na acidifikaciju hranjive podloge. Tijekom rasta i fermentacije, BMK i bakterije roda *Bifidobacterium* proizvode značajne količine organskih kiselina, u najvišem postotku mliječnu kiselinu. Mliječna kiselina je primarni metabolit koji se sintetizira u eksponencijalnoj fazi rasta BMK (Šušković i sur., 2010). Sinteza mliječne kiseline, osim što može upućivati na pripadnost jednom od rodova BMK doprinosi i antimikrobnom djelovanju. Lipofilna kiselina, kao što je mliječna u nedisociranom obliku, može prodrijeti u stanicu mikroorganizma i interferirati s osnovnim staničnim metabolizmom, te sniziti intracelularni pH u stanici patogenog soja (Šušković i sur., 2010). Određivanjem mogućnosti bakterijskih stanica da stvaraju plin može se ustanoviti da li se radi o heterofermentativnim ili homofermentativnim bakterijama što je doprinos za karakterizaciju osnovnih fizioloških svojstava. Primjerice obligativne homofermentativne vrste su: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovarus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri* i *L. johnsonii* koji se primjenjuju kao probiotici. Temeljem ove metode većina bakterijskih stanica iz probiotičkih pripravaka ne stvara plin te se smatra da su vjerojatno homofermentativne bakterije.

Kako se prema osnovnim fiziološkim svojstvima bakterijske kulture iz probiotičkih pripravaka mogu okarakterizirati kao BMK, provedena je daljnja fenotipska karakterizacija. Određena je učinkovitosti fermentacije različitih izvora ugljika primjenom API 50 CHL testa za identifikaciju *Lactobacillus* vrsta. Na temelju eksperimentalno dobivenih profila fermentacije ugljikohidrata i postojeće baze podataka API sustava identificirani su bakterijski sojevi. Sojevi iz PP5 i PP13: 13A su identificirani kao *L. fermentum*, te druga prisutna bakterijska kultura 13B kao *L. rhamnosus*, što je u skladu s deklaracijom liofiliziranog pripravka. Na temelju fermentacijskih profila soj 8/1, porastao na MRS, je identificiran kao *L. plantarum*, iako se prema deklaraciji radi od *L. acidophilus*, dok je soj 6 identificiran kao *L. rhamnosus*. Prema deklaraciji PP8 sadrži i *Bifidobacterium* koji stoga nije analiziran API50 CHL testom, koji se prema uputama proizvođača primjenjuje za karakterizaciju samo *Lactobacillus* sojeva. U probiotičkom pripravku PP6 sadržane su tri različite *Lactobacillus* vrste. Za sojeve 1 i 2A je potvrđeno da se radi o istom

soju iz roda *Lactobacillus* i identifikacijom API 50 CHL testom ustanovljeno je da se radi o *L. rhamnosus*, što je i navedeno na deklaraciji. Prilikom identifikacije bakterijskih vrsta iz pripravaka PP4 i PP9 primjenom API sustava ustanovljen je neprihvatljiv profil, no vjerojatno pripadaju vrsti *L. reuteri*, budući da u bazi podataka API sustava ne postoji fermentacijski profil za ovu vrstu, a na temelju eksperimentalno dobivenih podataka možemo definitivno potvrditi da se radi o bakterijskim sojevima iz roda *Lactobacillus*. Potrebno je istaknuti da je primjena analize fermentacijskih profila niza supstrata API 50 CHL testom doprinjela karakterizaciji fenotipskih svojstava za identifikaciju *Lactobacillus* sojeva, no ustanovljena su i ograničenja primjerice prilikom razlikovanja *L. rhamnosus* koji je filogenetski vrlo srodan soju *L. paracasei* (Hill i sur., 2018), no isto tako otežana je identifikacija *L. acidophilus* (Herbel i sur., 2013) i stoga je u daljnjem ekperimentalnim pristupu obuhvaćena primjena molekularnih analiza za učinkovitiju fenotipsku, ali i genotipsku karakterizaciju.

Dodatno s aspekta sigurnosti primjene probiotičkih pripravaka u kontekstu antibiotičke rezistencije, određena je osjetljivost bakterijskih sojeva na 12 različitih antibiotika za koje su definirane mikrobiološke granične vrijednosti prema EFSA smjernicama (2012). Pojava bakterija rezistentnih na više antibiotika, odnosno mutantnih sojeva koje više različitih antibiotika ne može inhibirati, kao posljedica pretjerane i nepropisane primjene antibiotika širokog spektra u terapijske svrhe, kao i za poticanje rasta životinja na farmama, predstavlja globalni zdravstveni problem. Zbog mogućnosti prijenosa gena za antibiotičku rezistenciju primjerice putem horizontalnog prijenosa gena među bakterijama, osim kontrole antibiotičke rezistencije patogenih bakterija, neophodno je provoditi i ispitivanja prisutnosti rezistencije kod nepatogenih, komenzalnih bakterija, i osobito probiotičkih bakterija. Upravo zato je ispitana osjetljivost sojeva iz probiotičkih pripravaka na 9 različitih antibiotika (ampicilin, vankomicin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin i kloramfenikol) i još dodatno na 14 odabranih antibiotika koji se primjenjuju u različitim terapijama. Devet antibiotika je odabrano prema smjernicama Europske agencije za sigurnost hrane (engl. European Food Safety Authority, EFSA) iz 2012., prema kojima se zahtjeva karakterizacija osjetljivost probiotičkih sojeva na antibiotike namijenjenih za primjenu kod ljudi i životinja. Eksperimentalne vrijednosti promjera zona inhibicije određene za pojedine sojeve disk-difuzijskom metodom su uspoređeni sa standardima Instituta za kliničke i laboratorijske studije (engl. Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI). Kod pojedinih bakterijskih sojeva prisutna je fenotipska rezistencija na

kanamicin ili streptomycin, ili kod pojedinih na aminoglikozide klindamicin ili tetraciklin, te na vankomicin. Rezistencija na vankomicin je kodirana genima na bakterijskom “kromosomu” prema tome se opisuje kao neprenosiva (Leboš Pavunc i sur., 2013). Prilikom definiranja rezistencije probiotičkih sojeva na antibiotike presudno je razlikovanje urođene od stečene rezistencije. Značajno je razumijevanje rezistencije na antibiotike uslijed slučajnih genetičkih promjenama u genomu poput primjerice inaktivacije topoizomomerase koja rezultira rezistencijom bakterijskog soja na kinolone ili pak promjena na ribosomima koje rezultiraju rezistencijom na rifampicin, od prenosive rezistencije poput rezistencije na tetraciklin čiji se geni obično nalaze na pokretnim genetičkim elementima, plazmidima ili transpozonima (Sanders i sur., 2010). Evaluacija profila osjetljivosti *Lactobacillus* sojeva na glikopeptid vankomicin je ujedno minoran doprinos za identifikaciju jer je tipična za sojeve *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*. Ova vrsta rezistencije laktobacila na vankomicin ne smatra se rizičnom jer su geni za rezistenciju locirani na kromosomu i prema tome njihova rezistencija nije prenosiva na druge bakterijske sojeve, za razliku od stečene rezistencije posredovane plazmidima i transpozonima koja ima veliki potencijal za prenošenje na druge bakterijske vrste, što je slučaj kod pojedinih vankomicin – rezistentnih vrsta iz roda *Enterococcus*. Otpornost *Lactobacillus* sojeva na vankomicin proizlazi iz reakcije prilikom koje se terminalni D-Ala-D-Ala dipeptid, peptidoglikana na koji se veže vankomicin s citoplazmatske strane stanične stijenke bakterije, zamjenjuje D-Ala-D-laktatom ili D-Ala-D-serinom, što sprječava vezanje vankomicina s vanjske citoplazmatske strane stanične stijenke bakterijske stanice (Gueimonde i sur., 2013). Još jedan razlog zbog kojeg se rezistenciju na aminoglikozidne antibiotike smatra urođenom kod *Lactobacillus* sojeva je što bakterijske stanice nemaju mogućnost transporta elektrona posredovanjem citokromoma, a koji sudjeluje u transportu odnosno unosu antibiotika u unutarstanični prostor (Gueimonde i sur., 2013). Sveukupno, rezultati analize profila rezistencije na antibiotike su u skladu s podacima drugih istraživanja o osjetljivosti probiotičkih *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium* sojeva na antibiotike.

Za daljnju fenotipsku karakterizaciju analizirani su profili ukupnih topljivih staničnih i površinskih proteina pomoću SDS-PAGE metode. UPGMA analizom generirani su dendrogrami. Naime proteom površinskih proteina odnosno specifični proteini dostupni na površini bakterijskih stanica probiotičkih bakterija često se opisuju kao značajni čimbenici za funkcionalnosti probiotičkih sojeva jer se smatra da upravo proteini s vanjske strane stanične

stijenke imaju zaštitu ulogu tijekom nepovoljnih uvjeta mikrookoliša. To prvenstveno podrazumijeva protektivnu funkciju prilikom tranzita kroz GIT, zatim interakcije sa stanicama domaćina putem vezanja na mucin odnosno intestinalni epitel što može utjecati na kolonizacijski potencijal, a pri tome i u interakciji s imunološkim stanicama, odnosno tkivima, u intestinalnoj sluznici što sve doprinosi jačanju funkcije intestinalne barijere. Time karakterizacija površinskih proteina osim doprinosa identifikaciji, može i značajnije doprinjeti definiranju molekularnih mehanizama funkcionalnosti probiotičkih sojeva. Analizom međusobne sličnost proteinskih profila sojeva iz probiotičkih pripravaka ustanovljene su tri skupine prema kojima su grupirani analizirani probiotički sojevi. Koeficijent podudarnosti odnosno sličnost proteinskih profila sojeva unutar skupine iznosio je 90 %. Koeficijenti korelacije između pojedinih grupacija probiotičkih sojeva na dendrogramu su iznad 85%, te su sojevi u konačnici svrstani u dva roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Fenotipska identifikacija sojeva, na temelju analize fermentacijskih profila šećera i specifičnih supstrata te analizom proteinskih profila SDS-PAGE elektroforezom topljivih staničnih i površinskih proteina, potvrdila je prisutnost *Lactobacillus* odnosno *Bifidobacterium* vrsta u probiotičkim pripravcima.

Fenotipsku karakterizaciju potrebno je nadopuniti analizom genetičkih svojstava, stoga je u ovoj disertaciji, primjenom različitih molekularno-genetičkih metoda RAPD, PCR sa specifičnim početnicama za vrste *Lactobacillus* ili *Bifidobacterium*, te 16S rDNA sekvencioniranje, provedeno razlikovanje i identifikacija sadržanih probiotičkih sojeva. Biotipizacija sadržanih probiotičkih sojeva provedena je amplifikacijom V9 regije 16S rRNA *Bifidobacterium* sojeva lančanom reakcijom polimeraze sa specifičnim početnicama lm26 i lm3 za vrstu, odnosno umnažanjem 16S/23S intergenske rRNA „spacer“ regije za *Lactobacillus* vrstu sa specifičnim parom početnica LbLMA1-rev i R16-1. Ustanovljeno je da se primjenom specifičnih početnica za *Bifidobacterium* vrste može omogućiti brzo i precizno razlikovanje bifidobakterija pomoću PCR metode. Nadalje primjena 16S rRNA sekvencioniranja pokazala se učinkovitom u identifikaciji sadržanih probiotičkih sojeva, te je značajna jer metode lako izvediva, a prikladna je za rutinske analize velikog broja uzoraka probiotičkih pripravaka, te prilikom uvođenja metode u laboratorij ne zahtjeva značajna investicijska ulaganja. Ipak treba istaknuti da iako se primjena ove metode pokazala učinkovitom za identifikaciju sojeva *Lactobacillus* vrste, prilikom identifikacije je otežano razlikovanje vrlo srodnih vrsta ili podvrsta poput *L. casei* i *L. paracasei* ili *L. plantarum* i *L. pentosus*, odnosno *L. delbrueckii* i *L. paracasei* zbog značajne sličnosti

sekvenci 16S rRNA gena, te se nije pokazala učinkovitom (Foschi i sur., 2017). No osim provjere ispravnosti identifikacije probiotičkog soja, precizna taksonomska identifikacija je nužna s obzirom na funkcionalnost i iskazivanje poželjnih učinaka na zdravlje domaćina i jedan od najvažnijih općih zahtjeva probiotičkog koncepta jer je temelj za funkcionalnu karakterizaciju soja.

S obzirom na dostupnost potpuno sekvencioniranih genoma mnogih probiotičkih sojeva za definiranje sastava tržišnih pripravaka, Lewis i sur. (2016) primjenili su tehnologiju sekvencioniranja sljedeće generacije (*engl.* next-generation sequencing) (Lewis i sur., 2016). Metodologija podrazumijeva primjenu visokosofisticiranih tehnika značajne preciznosti u taksonomskoj identifikaciji, te je omogućila identifikaciju soja čija je veličina genoma značajno manja u probiotičkom pripravku, a koji prema deklaraciji sadrži *B. longum* subsp. *infantis*, ATCC 15697, veličine 2.83 Mb (Lewis i sur., 2016). Iako ovakav pristup omogućava preciznu identifikaciju do razine soja, potrebno je istaknuti da je utemeljen na metagenomičkoj analizi i nije uključivao eksperiment kultivacije sadržanih bakterijskih kultura na optimalnoj podlozi za rast. Ovakav pristup iako omogućuje preciznost taksonomske identifikacije probiotičkog soja zahtjeva značajnu investiciju i teško je izvediv za rutinsku validaciju velikog broja bakterijskih sojeva s aspekta kontrole kvalitete u neovisnim institucijama. Prilikom validacije sastava probiotičkih pripravaka očito je učestalo prisutna neispravna deklaracija *Bifidobacterium* vrsta. Također treba uzeti u obzir da do gubitka stabilnosti soja u takvim pripravcima može doći tijekom dužeg vremenskog perioda skladištenja, a pri tome je razlikovanje dvaju sojeva *B. longum* subsp. *longum* i *B. longum* subsp. *infantis* otežano. Dodatno i pri samoj validaciji probiotičkih pripravaka velika je vjerojatnost pogrešne identifikacije sojeva iz roda *Bifidobacterium*, koji se međusobno značajno razlikuju s obzirom na metaboličku aktivnost i sposobnost kolonizacije, što može rezultirati pogrešnim interpretacijama u kliničkim ispitivanjima, te neučinkovitom primjenom kod pacijenata (Lewis i sur., 2016). Iz GIT čovjeka izolirane su dvije podvrste *B. longum* koje je teško razlikovati, *B. longum* subsp. *longum* i *B. longum* subsp. *infantis*. Dva soja se ne mogu razlikovati uobičajenom metodom sekvencioniranja 16S rRNA gena. Na probiotičkom pripravku koji je prema deklaraciji sadržavao *B. longum* subsp. *longum* i *B. longum* subsp. *infantis*, izmijenjen je podatak o prisutnosti dviju podvrsta, te je deklarirana prisutnost pojedinačnog soja *B. animalis* subsp. *lactis*. Reklasifikacija je uzrokovala nesporazum jer je dostupan niz rezultata koji definiraju probiotički učinak upravo

združene kulture. Vjerojatnost pogrešne identifikacije vrsta i podvrsta je visoka, upravo zbog detekcije dviju podvrsta *B. longum*, koje su potvrđene i sekvencioniranjem genoma (Lewis i sur., 2016). Ovakve neispravnosti otežavaju i provjeru povezanosti prisutnih mikrobnih kultura u probiotičkim pripravcima s relevantnim znanstvenim istraživanjima o funkcionalnosti i primjeni pojedinih probiotičkih sojeva (Ansari i sur., 2019).

Postoji inicijativa ekspertnih skupina da proizvođač na deklaraciji proizvoda ili javnodostupnoj mrežnoj stranici dodatno informira potrošače o primjeni metodologije za osiguranje kontrole kvalitete proizvoda, u prvom redu zbog dokazivanja točnog broja bakterijskih stanica i mikrobiološke čistoće pripravka.

I drugi pristupi poput analiza primjenom sustava Biolog Microbial Identification koriste se za fenotipsko profiliranje i identifikaciju probiotičkih sojeva (Ansari i sur., 2019). Ansari i sur. (2019) su usporedili različite eksperimentalne pristupe za provjeru točnosti deklaracije navedene na probiotičkim pripravcima i napitcima, od kojih su neki prema deklaraciji, osim sojeva BMK, sadržavali i sojeve kvasca. Za identifikaciju su primjenili 16S rRNA sekvencioniranje, MALDI-ToF i Biolog Microbial Identification sustav za analizu fermentacije ugljikohidrata. Unutar probiotičkih pripravaka i napitaka učestalo su identificirali bakterije vrsta *B. coagulans*, *B. subtilis*, *L. plantarum* i *L. rhamnosus* i kvasac *S. boulardii*. Isto tako sekvencioniranje cijelog genoma probiotičkog soja značajno je za točnu identifikaciju bakterijskog soja i definiranje mogućih kontaminacija, no ovakva metodologija prvenstveno se primjenjuje u istraživačke svrhe, te je teško izvediva za rutinsku provjeru kvalitete probiotičkih pripravaka.

Fenotipska karakterizacija, te odabir molekularne metodologije za preciznu taksonomsku identifikaciju poput sekvencioniranja 16S rRNA gena primjenjenjih u ovom radu omogućili su procijenu mirobnog sastava probiotičkih pripravaka odnosno definiranje da li sadrže probiotičke bakterije za koje se tvrdi da su prisutne u količinama označenim na deklaraciji, a osim toga predstavljaju metodologiju koja je utemeljena na primjeni učinkovitih i ekonomski dostupnih eksperimentalnih pristupa za provjeru tržišnih pripravaka od strane neovisne institucije.

5.2. *In vitro* evaluacija funkcionalnih svojstava probiotičkih sojeva iz pripravaka

Intestinalna mikrobiota zdrave odrasle osobe se smatra uravnoteženog sastava i doprinosi vitalnom funkcioniranju organizma te ima niz značajnih učinaka na zdravlje pojedinca (Šušković i sur., 2009). Uslijed infekcije patogenim mikroorganizama ili dugotrajne terapije antibioticima ili utjecajem drugih egzogenih čimbenika, može nastupiti narušavanje sastava uravnotežene intestinalne mikrobiote, što vodi nepoželjnim fiziološkim učincima na organizam i fiziološki se manifestira kao funkcionalni poremećaj probavnog sustava. No prema trenutnim znanstvenim spoznajama povezuje se i s drugim poremećajima u anatomske udaljenim dijelovima tijela od GIT (Cani, 2018). Primjena probiotičkih sojeva sa znanstveno dokazanim funkcionalnim učincima jedan je od pristupa za mikrobnu terapiju modulacije sastava mikrobiote i obuhvaća, prema najnovijem izrazu, koncept primjene biomodulatora (Martin i Langella, 2019). Potencijal bakterija iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, osim kao industrijski značajnih mikroorganizama, koji imaju mogućnost biotehnoške proizvodnje specifičnih metabolita, prepoznat je i kao probiotičkih kultura s brojnim zdravstvenim učincima na organizam domaćina, što usmjerava njihovu primjenu kao bioterapeutika (Šušković i sur., 2010). Učinkovitost i funkcionalnost probiotičkih bakterija, kao što su preživljavanje u GIT (tolerancija na kisele pH vrijednosti i žučne soli), adhezija na crijevne stanice, kompeticija s patogenima i stvaranje bioaktivnih spojeva, razlikuju se između pojedinih sojeva. S obzirom da su istraživanja koja definiraju učinak postojećih probiotika u svakoj regiji GIT teško izvediva i dugotrajna, u ovoj disertaciji primijenjen je pristup selektivnog probira *in vitro* za karakterizaciju specifičnih svojstava. Bioraznolikost odabranih probiotičkih sojeva prisutnih u tržišnim probiotičkim pripravcima istražena je primjenom konvencionalnih *in vitro* testova, te je ispitana tolerancija sojeva prilikom prolaska kroz GIT i sposobnost adhezije pri interakciji s proteinima izvanstaničnog matriksa, te s glikoproteinom mucinom.

Prilikom primjene ovih sojeva kod domaćina, prvu prepreku za iskazivanje funkcionalnih učinaka predstavlja preživljavanje nepovoljnih uvjeta GIT. Prisutni su uvjeti niskih pH vrijednosti te probiotičke stanice moraju imati sposobnost preživljavanja u uvjetima takvog mikrokoliša. Osim toga poboljšanje otpornosti probiotičkih sojeva na visoke koncentracije kiseline ključno je u primjeni BMK kao bioterapeutika (Kos i sur., 2003; Šušković i sur., 2009). Javno dostupni potpuno sekvencionirani genomi BMK doprinose razjašnjavanju molekularne

biologije BMK, a primjena post-genomičkih pristupa doprinjela je karakterizaciji gena i proteina koji su ključni za stanični odgovor i prilagodbu na različite nepovoljne stresne uvjete. Ove spoznaje doprinose razvoju strategija koje će omogućiti povećanu otpornost BMK u nepoželjnim uvjetima, a što je osobito značajno prilikom iskazivanja funkcionalnosti probiotičkih sojeva u GIT čovjeka. Sistematični pristup uz primjenu mikrobioloških i molekularno-genetičkih tehnika omogućuje razvoj BMK s povećanom otpornošću na nepovoljne uvjete, s ciljem osiguravanja funkcionalnosti probiotičkih sojeva s bioterapijskim učincima (Martin i Langella, 2019).

Slijedeći cilj istraživanja bio je provjera funkcionalnih svojstava identificiranih bakterijskih sojeva, sukladno preporukama Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), za znanstveno dokazivanje zdravstvenih tvrdnji navedenih na probiotičkim pripravcima. Preživljavanje u nepovoljnim uvjetima prisutnim u GIT je jedan od prvih izbornih kriterija prilikom odabira pojedinog bakterijskog soja kao probiotičkog (Serrazanetti i sur., 2009, Šušković i sur., 2010). U prvom redu preliminarno je ispitana tolerancija bakterijskih sojeva na žučne soli dodane u optimalne hranjive podloge, a nakon toga i preživljavanja izoliranih probiotičkih sojeva iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* u *in vitro* simuliranom želučanom soku i simuliranom soku tankog crijeva. Ispitane probiotičke bakterije su otporne i mogu rasti u prisutnosti žučnih soli. Sojevi *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* GR-1 i *B. longum* i uspješno podnose prisutne koncentracije žučne soli. Žučne soli, jedna od najvažnijih sastojaka žuči, imaju svojstva detergenta sa snažnim antimikrobnim učinkom, koji uzrokuje oštećenja stanične membrane te oksidativni stres prvenstveno oštećujući genomsku DNA. Žuč je značajna u fiziologiji i funkcionalnosti intestinalnih bakterija *in situ* i njena prisutnost može inducirati ekspresiju specifičnih bakterijskih proteina. U mikrookolišu GIT prisutna je ova fiziološka tekućina, te je poželjno da ne inhibira probiotičke bakterije jer se time sprječavaju pozitivni učinci. Prisutnost žučnih soli utječe na aktivnosti intestinalnih laktobacila i bifidobakterija te su aktivnosti poput asimilacije kolesterola, izravno povezani s metabolizmom žučne soli kod tih bakterija. Hidrolazna aktivnost probiotičkih bakterija se povezuje s mogućnošću da asimiliraju kolesterol, što je još jedno poželjno svojstvo potencijalnog probiotičkog soja. Aktiviranje molekularnih mehanizama prilagodbe na oksidativni i kiselinjski stres također su uobičajeni kao stanični odgovor u okolišu žuči (Ruiz i sur., 2013). Bakterije često primjenjuju efluks pumpe kao detoksifikacijski mehanizam. Za detoksifikaciju žuči opisanse su dvije efluks pumpne nazvane, BetA i Ctr kod *Bifidobacterium* vrsta. Gen *betA* je reguliran promotorom koji se inducira u

prisutnosti žuči što je značajno prilikom prolaska kroz GIT gdje upravo visoke koncentracije žuči mogu potaknuti ekspresiju ovog gena (Ruiz i sur., 2013). Također u mikroololišu gdje je visoki sadržaj žuči kod *Bifidobacterium* vrsta se prekomjerno eksprimiraju brojni transportni proteini primjerice soja *Bifidobacterium breve* UCC2003 koji sudjeluju u toleranciji odnosno adaptaciji stanica na žučne soli (González-Rodríguez i sur., 2013).

No stanice sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* osim što koriste sustav efluksa žuči mogu provoditi i modifikacije žuči djelovanjem hidrolaza žučne soli (Ruiz i sur., 2013). Upravo sudionici intestinalne mikrobiote enzimatskom aktivnošću niza hidrolaza žučnih soli, koje dekonjugiraju žučne soli do žučnih kiselina, mogu imati učinke na promjene metabolizma lipida domaćina (Ryan i sur., 2019). Induciranje sinteze hidrolaza žučnih soli intestinalne mikrobiote upravo je rezultat mehanizama adaptacije bakterijskih stanica na uvjete GIT pri čemu dolazi do odvajanja amino-grupe žučnih kiselina, čime se osigurava daljnja razgradnja molekule djelovanjem bakterijskih enzima, primjerice 7- α -dehidroksilaza. Ove reakcije doprinose učinku smanjene reapsorpcija žučnih kiselina u ileumu čime se istovremeno potiče *de novo* sinteza žučnih kiselina (Ryan i sur., 2019). Bakterije iz roda *Bifidobacterium* imaju sposobnost dekonjugacije žučnih kiselina. Dekonjugirane žučne kiseline se izlučuju iz probavnog sustava puno brže nego konjugirane zbog čega se troši kolesterol za sintezu novih žučnih kiselina pa na taj način sudjeluju u kontroli razine kolesterola u krvi.

Ispitani sojevi uspješno preživljavaju u želučanom soku i soku tankog crijeva, što upućuje da mogu tolerirati niske pH vrijednosti prisutne u tim uvjetima. Treba naglasiti da je za sojeve *L. rhamnosus* LGG-1, *Lactobacillus* sp. 2A i *Lactobacillus* sp. 8 eksperimentalno određena značajno niža smrtnost (log CFU/ml) te se može pretpostaviti da su adaptirali i otporni na simulirane uvjete GIT, dok su u usporedbi bakterije *B. longum*, *Lactobacillus* sp. 5/1 i *Bifidobacterium* sp. 6B osjetljivije na simulirane uvjete GIT. Prema González-Rodríguez i sur. (2013) prilagodba *B. animalis* subsp. *lactis* i *B. longum* na uvjete kiselinskog šoka uvjetuje prekomjernu sintezu podjedinica F₀-F₁-ATPaze, povećava aktivnost transporta vodikovih iona van stanice i time sprječava akumulaciju vodikovih iona. Analiza broja bakterijskih stanica u uvjetima GIT sojeva iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* pokazuje da svi sojevi uspješno preživljavaju u uvjetima kiselog okoliša pri visokim koncentracijama žučne soli i u prisutnost probavnih enzima. Može se zaključiti da analizirani sojevi zadovoljavaju važan selektivni kriterij primjene probiotičkih sojeva. Bakterije roda *Bifidobacterium* predstavljaju jednu od dominantnih

bakterijskih grupa mikrobiote GIT djece. Komparativnom genomskom analizom ustanovljeno je da *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* u usporedbi s *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ima značajniji kolonizacijski potencijal u GIT nedonoščadi. *B. longum* subsp. *infantis* može metabolizirati širok spektar oligosaharida majčinog mlijeka jer sadrži enzime za vezanje, transport i razgradnju oligosaharida, a koji nisu prisutni u genomu *B. animalis* subsp. *lactis*. *B. longum* subsp. *infantis* smanjuje propusnost crijevnog epitela i ima antimikrobne učinke prilikom primjene kod nedonoščadi (Lewis i sur., 2016). Genom soja *B. breve* UCC2003 sadrži gensku nakupinu za sintezu dva egzopolisaharida (O'Connell i sur., 2011). EPS, kojeg proizvodi soj *B. breve* UCC2003 doprinosi prilagodbi bakterije na žučni stres i niske pH vrijednosti i time olakšava inicijalnu kolonizaciju soja u crijevima eksperimentalnih životinja te potiče blaži adaptivni imunološki odgovor u usporedbi s delecijским mutantnim sojem u genu za egzopolisaharid. Primjena soja *B. breve* UCC2003 utjecala je na smanjenje infekcije miševa s *Citrobacter rodentium* (Fanning i sur., 2012). I egzopolisaharidi laktobacila posreduju u apsorpciji faga, te mogu imati uloge u interakciji s površinskim proteinima ili imunomodulacijske učinke (Leeber i sur., 2020).

Adhezija na površinu epitelnih stanica sljedeće je značajno funkcionalno svojstvo i preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u GIT što omogućava učinak na promjenu sastava intestinalne mikrobiote i imunološki sustav domaćina (Kos i sur., 2003; Frece i sur., 2009; Monteagudo-Mera i sur., 2019). Za procjenu svojstva adhezije probiotičkih bakterija primijenjeno je nekoliko različitih *in vitro* metoda. Za određivanje hidrofobnosti i svojstva Lewisovih kiselina odnosno baza koja su temelj za adheziju bakterija na biotičke ili abiotičke površine, provedene su analize MATS metodom. Za karakterizaciju površinskih svojstava stanica bakterijskih sojeva primijenjena je učinkovita i kvantitativna metoda adhezije na otapala (engl. microbial adhesion to solvents, MATS) utemeljena na svojstvu bakterijske stanice s obzirom na afinitete za polarno ili nepolarno otapalo. Mikrobna adhezija na heksan (nepolarno otapalo) odraz je hidrofobnosti stanične površine, dok mikrobna adhezija na kloroform (akceptor elektrona) ukazuje na bazična (elektron-donorska) svojstva, a mikrobna adhezija na etil-acetat (donor elektrona) upućuje na kisela (elektron-akceptorska) svojstva površine ispitivanih bakterijskih stanica (Šušćković i sur., 2020). Određena je mogućnost adhezije sojeva iz probiotičkih pripravaka na heksan kao nepolarno otapalo za procjenu hidrofobnih ili hidrofilnih svojstava površine bakterijske stanice, na etil acetat kao bazično otapalo i donor elektrona i na kloroform kao elektron akceptor kako bi

se procijenila svojstva Lewisovih baza ili kiselina. Bakterijska adhezija dijelom ovisi o reverzibilnim i ireverzibilnim interakcijama. U početnoj reverzibilnoj fazi adhezije posreduju kompleksne fizikalno-kemijske interakcije, koje definiraju površinska svojstva stanica i uključuju hidrofobnost i naboje, za koje se smatra da su nespecifični i time sveprisutni kod bakterijskih vrsta. Svi sojevi pokazuju slaba kiselinska svojstva s afinitetom vezanja na etil acetat te u značajnijem omjeru svojstva baza s afinitetom prema kloroformu što je u skladu s rezultatima istraživanja Kos i sur. (2003) za soj *L. helveticus* M92 i istraživanjima Valeriano i sur. (2014) za soj *Lactobacillus mucosae* LM1.

Mogućnost autoagregacije probiotičkih sojeva također se smatra preduvjetom adhezije. Sojevi iz probiotičkih pripravaka pokazuju svojstvo autoagregacije, koje se s vremenom inkubacije, što je i pretpostavljen rezultat, povećava tijekom 5 sati eksperimentalnog određivanja. Svojstvo autoagregacije probiotičkih sojeva može upućivati na mogućnost uspješne adhezije na intestinalne epitelne stanice, dok sposobnost koagregacije sa štetnim mikroorganizmima može spriječiti kolonizaciju patogenih mikroorganizama (Malik i sur., 2013; Lebeer i sur., 2020). Mackenzie i sur. (2013) su ustanovili da proteini ovisni o sortazi, koji se vežu na intestinalnu sluznicu, posreduju u autoagregaciji soja *L. reuteri* ATCC 53608 koji je izoliran iz GIT čovjeka, a prema Jensen i sur. (2014) radi se o CmbA odnosno mucin-vezujućem proteinu A. Osim autoagregacije i koagregacije analizirana je i mogućnost *in vitro* adhezije bakterijskih sojeva na glikoprotein mucin. Mucin je prisutan kao jedna od strukturnih komponenta na površini sluznice GIT koja je značajna u održavanju funkcije intestinalne barijere, a pretpostavlja se da ima ulogu receptora za adhezine probiotičke bakterije. Mucini su glikoproteini sluznice i dio su dinamičnog, interaktivnog obrambenog sustava sluznice, odnosno predstavljaju mukozalnu barijeru između lumena i intestinalnih epitelnih stanica. Kao takvi mogu biti dio receptora intestinalnog tkiva domaćina kojeg prepoznaju različite makromolekule na površini bakterijske stanice probiotičkih sojeva. Analizirani sojevi većinom nemaju svojstvo vezanja na mucin *in vitro*. Ipak, prema rezultatima probiotički sojevi *Bifidobacterium* sp. 8/2, *Bifidobacterium* sp. 6B, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938-4 i *Bifidobacterium* sp. 2B iskazuju mogućnost interakcije s ovim glikoproteinom. Adhezija na površinu intestinalne sluznice interakcijom bakterijskih stanica s mucinom ili proteinima ekstracelularnog matriksa može biti važan preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u intestinalnom lumenu, koji može omogućiti ovim bakterijama i kompetitivnu prednost pred drugim mikroorganizmima u takvom ekosustavu (Šušćević i sur.,

2010; Monteagudo-Mera i sur., 2019). Kako se sloj mukusa u GIT neprestano obnavlja zbog funkcionalnosti, prednost je da probiotičke bakterije pokazuju svojstva vezanja na različite komponente intestinalne površine, što omogućuje dulje zadržavanje u GIT i time doprinosi interakcijama s intestinalnim epitelnim stanicama i imunostanicama. Stoga su u ovom doktorskom radu provedena i istraživanja *in vitro* adhezije na specifične proteine ekstracelularnog matriksa. Bakterijski sojevi iskazuju razlike u mogućnosti adhezije na fibronektin, kolagen i laminin, no zanimljivo je istaknuti da je ekstrakcija površinskih proteina, odnosno inkubacija bakterijskih stanica s proteinazom K, utjecala na promjene svojstava adhezije jer je zabilježeno smanjeno vezanje bakterijskih stanica. Ovakvi rezultati upućuju da se može pretpostaviti da upravo površinski proteini posreduju u interakcijama bakterijske stanice sa specifičnim proteinima ekstracelularnog matriksa. Upravo površinski protein CmbA soja *L. reuteri* ATCC PTA 6475 posreduje u adheziji bakterijskih stanica na Caco-2 staničnu liniju i mukus u lumenu GIT (Jensen i sur., 2014). Unutar probiotičkog koncepta opće je poznato da se probiotička svojstva razlikuju s obzirom na soj što objašnjava rezultate istraživanja. Bakterije roda *Lactobacillus* imaju jedinstvenu građu stanične stijenke koja određuje i funkcionalna svojstva ovih sojeva kao probiotika. Pretpostavlja se da struktura stanične stijenke i sastav lipoteihonske kiseline ima važnu ulogu u adheziji, ali i imunomodulacijskom kapacitetu jer proteini adhezije probiotičkih stanica sudjeluju i u poticanju imunološkog odgovora domaćina (Lebeer i sur., 2012). Isto tako širok raspon polisaharida, od kojih su značajni oligosahardi majčinog mlijeka, a koje koriste bakterije vrste *B. longum* potpomažu adheziji i u uspješnosti rane kolonizacije crijeva dojenčadi.

Znanstvena istraživanja upućuju na antimikrobni učinak probiotika prilikom kolonizacije domaćina, posebice putem inhibicije adhezije enteropatogena u GIT, što se naziva kompetitivnom ekskluzijom patogena (Common i sur., 2014; Liévin-Le Moal i Servin, 2014). Sojevi iz probiotičkih pripravaka iskazuju antimikrobno djelovanje prema odabranim test-mikroorganizmima, te se može pretpostaviti da imaju širok spektar inhibicijskog djelovanja koji je vjerojatno izraženiji prema Gram-pozitivnim bakterijama poput *S. aureus*. Pretpostavlja se da su inhibicijski mehanizmi utemeljeni na kompeticiji laktobacila i patogenih sojeva za iste receptore adhezije. Antipatogeni učinak *L. rhamnosus* GG, prema novoj taksonomiji *Lactobacillus rhamnosus* GG, osim inhibicijskog djelovanja i kompetitivne ekskluzije utemeljen je i na sprječavanju stvaranja biofilмова patogenih bakterija te učinka na smanjenje

ekspresije komponenata morfogeneze patogenih sojeva, primjerice na formiranje hifa kod gljivice *Candida albicans* (Lebeer i sur., 2020). Naime bakterijske stanice *L. rhamnosus* GG pokazale su potencijal za smanjenje upalnog odgovor u monocitima, izazvanog dugotrajnom infekcijom *S. aureus* te se pretpostavlja da su rezultat sintetiziranja mliječne kiseline. Vjerojatno su interakcije patogena i receptora nespecifične, čime se otvara mogućnost kompetitivne ekskluzije patogena djelovanjem probiotičkih sojeva, imunomodulacije, poticanja sinteze mucina i antimikrobnih molekula (Liévin-Le Moal i Servin, 2014). Pri tome su osobito značajni specifični metaboliti bakteriocini, peptidi koji se sintetiziraju na ribosomu, a izlučuju se ekstracelularno, te imaju baktericidna ili bakteriostatsko djelovanje. Proizvodnja bakteriocina važna je karakteristika probiotičkih sojeva koja doprinosi kolonizaciji GIT. Imaju i funkciju signalnih peptida, koji putem *quorum sensing* modela i interakcije s mikrobiološkim zajednicama, prenose signale ostalim bakterijama te stanicama imunološkog sustava domaćina (Dobson i sur., 2012). Bakteriocini probiotičkih sojeva inhibiraju Gram-pozitivne bakterije poput bakterije *L. monocytogenes* (Field i sur., 2018).

Određeno je i inhibicijsko djelovanje prema srodnim BMK za procjenu mogućeg antimikrobnog učinka prilikom primjene probiotičkih bakterija u GIT, s obzirom da komensalne bakterije intestinalne mikrobiote čine predstavnici iz rodova *Lactobacillus*. Isto tako kod primjene probiotičkih pripravaka koji sadrže mješovitu kulturu odnosno odabrani konzorcij probiotičkih sojeva ključno je isključiti međusobno antagonističko međudjelovanje prisutnih sojeva. Na temelju vrijednosti efektivnih inhibicijskih omjera (EIR) ustanovljeno je da se odabrani sojevi odlikuju različitim spektrom antimikrobnog djelovanja, prema kojem bakterijske kulture iz probiotičkih pripravaka ne iskazuje značajno inhibicijsko djelovanje prema srodnim bakterijama iz roda *Lactobacillus*. Antimikrobno djelovanje potječe prvenstveno od nespecifičnog inhibicijskog utjecaja mliječne kiseline i octene kiseline, ali može biti i posljedica proizvodnje specifičnih supstancija, bakteriocina. Turbidimetrijskom metodom je dodatno potvrđeno inhibicijsko djelovanje prema navedenim sojevima pri čemu je dokazano da je inhibicijski učinak supernatanata kultura toliko učinkovit da se može primijeniti i u razrijeđenom obliku, odnosno u mediju gdje je potrebno antimikrobno djelovanje ispitivanog bakterijskog soja. Interakcije domaćina i probiotičkih sojeva uzrokuju promjene u ekspresiji gena u epitelnim stanicama GIT i stanicama imunološkog sustava, a time promjenu mukozalnih i sistemskih imunofunkcija. Zdravstveni učinci probiotičkih bakterija proizlaze iz fiziološke aktivnosti ovih

bakterija unutar intestinalne mikrobiote te doprinose funkcijama intestinalne barijere, čije je djelovanje utemeljeno upravo na inhibiciji kolonizacije patogena i imunomodulaciji (Kleerebezem i sur., 2010; Tao i sur., 2013). Fiziološke karakteristike domaćina i fiziologija mikroorganizama te međusobne interakcije bakterijskih stanica i stanica domaćina doprinose uravnoteženom sastavu intestinalne mikrobiote (Lebeer i sur., 2020).

Funkcionalnost bakterijskih sojeva potrebno je zadržati i tijekom industrijske proizvodnje. Većina probiotičkih pripravaka upravo je dostupna u praškastom obliku priređenom liofilizacijom. Liofilizacija je metoda sušenja stanica koja se često koristi za industrijsku primjenu BMK. Tijekom liofilizacije stanice se zamrzavaju, a zatim suše pod vakuumom, te se tijekom tih procesa iz stanica izdvaja voda. Izdvajanjem vode dolazi do oštećenja brojnih makromolekula prisutnih u bakterijskoj stanici poput DNA, proteina te stanične stijenke. Iako je metoda liofilizacije skupa često se koristi jer se njome postižu najbolja svojstva koncentriranih probiotičkih kultura. Tijekom biotehnološke proizvodnje liofiliziranih probiotičkih kultura jedan od glavnih ciljeva je proizvesti bakterijske kulture koje sadrže visoku koncentraciju živih aktivnih stanica, što podrazumijeva postizanje minimalnog odumiranja stanica tijekom zamrzavanja, odnosno liofilizacije, čime će se omogućiti zadržavanje funkcionalnih svojstava probiotika tijekom njihove proizvodnje, skladištenja i primjene. Liofilizirani probiotički pripravci imaju prednosti u odnosu na formulacije pripremljene drugim tehnikama zbog mogućnosti njihovog dugotrajnog čuvanja, zadržavanja metaboličke aktivnosti probiotičkih stanica te prikladnosti u primjeni. Preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom liofilizacije i skladištenja je značajno, jer niske vrijednostima smrtnosti stanica doprinosi optimiranju tehnološkog i ekonomskog aspekta tijekom industrijske proizvodnje. U procesu liofilizacije, tijekom zamrzavanja i sušenja pod vakuumom, može doći do brojnih oštećenja biološkog sustava što utječe na preživljavanje stanica. Kako bi se oštećenja probiotičkih stanica maksimalno smanjila probiotičke stanice se liofiliziraju uz dodatak lioprotektora, od kojih je za liofilizaciju probiotičkih bakterija prema literaturi osobito učinkovito obrano mlijeko, no pojedini specifični supstrati imaju i učinak prebiotika, koji različitim mehanizmima sprječavaju oštećenja stanica tijekom zamrzavanja, sušenja i skladištenja. Upravo stoga je u ovom doktorskom radu ispitan je učinak samog obranog mlijeka na preživljavanje probiotičkih kultura tijekom liofilizacije. Pretpostavlja se da su zaštitni mehanizmi obranog mlijeka kao lioprotektora utemeljeni na

smanjenju letalnog učinka uslijed koncentriranja otopine tijekom liofilizacije, i na mogućnosti sprječavanja stvaranja leda unutar bakterijske stanice i time njegovog učinka na smrtnost stanica uslijed uspostavljanja vodikovih veza s vodom i različitim staničnim strukturama (Butorac i sur., 2021).

Fiziologija mikroorganizama može doprinijeti prepoznavanju „probiotičkih“ fenotipova, koji ovise o izvorima hranjivih tvari i molekularnim čimbenicima u mikrookolišu, koji sudjeluje u reguliranju ekspresije proteina i metabolita te čak i svojstava agregacije i stvaranja biofilma. U složenom ekosustavu probavnog trakta, metaboličko profiliranje pojedinih mikroorganizama i mikrobnih zajednica doprinosi karakterizaciji molekularnih interakcija koje mogu objasniti mehanizme djelovanja primjene prebiotika i probiotika na modulaciju sastava intestinalnog mikrobioma, a time i zdravstvenih učinaka na pojedinca. Za precizno definiranje/validaciju funkcionalnosti probiotičkih sojeva potrebno je provesti *in vivo* studije, upravo temeljem kojih su sojevi iz probiotičkih pripravaka okarakterizirani, ali koje nisu primjenjive za robusnu provjeru probiotičkih pripravaka u neovisnim laboratorijima. No za validaciju probiotičkih pripravaka moguće je primijeniti integrirani pristup, postavljen u ovoj disertaciji, koji obuhvaća fenotipsku karakterizaciju i primjenu molekularne metodologije za identifikaciju sadržanih sojeva, te *in vitro* eksperimenata, što omogućuje validaciju prisutnosti navedenih probiotičkih bakterija odnosno isključivanja prisutnost neprobiotičkih bakterija. Predloženi *in vitro* eksperimentalni modeli doprinose su sustavnom pristupu za validaciju probiotičkih bakterija iz raznovrsnih tržišnih probiotičkih pripravaka koji, usprkos značajnim bioterapijskim učincima za modulaciju sastava intestinalnog mikrobioma, ili mikrobiote drugih dijelova čovjekova organizma, uslijed komercijalizacije i nedostatka sustava kontrole kvalitete, nemaju definiranu uniformnu primjenu prvenstveno zbog nedostatka definiranih zakonskih propisa na nacionalnoj odnosno neusklađenosti legislative na međunarodnoj razini, što u konačnici umanjuje potencijal primjene probiotičkih bakterija kod ciljanih skupina.

6. ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. Deklarirani sojevi prisutni su u visokim koncentracijama bakterijskih stanica u komercijalnim probiotičkim pripravcima što je u skladu s deklaracijom navedenom na proizvodu, te je potvrđena mikrobiološka ispravnost pripravaka i isključena prisutnost kontaminirajućih neprobiotičkih bakterija.
2. Razvijen je integrirani pristup primjenom fenotipske karakterizacije i molekularne metodologije za identifikaciju sadržanih sojeva za validaciju prisutnosti navedenih probiotičkih bakterija, što im osigurava GRAS status prema US FDA, odnosno QPS status prema EFSA.
3. Predloženi *in vitro* eksperimentalni modeli doprinose sustavnom pristupu za validaciju probiotičkih bakterija iz raznovrsnih pripravaka koji, usprkos značajnim bioterapijskim učincima na modulaciju sastava intestinalnog mikrobioma, uslijed masovne industrijske proizvodnje i limitiranog nadzora, nemaju definirani sustav kontrole kvalitete prvenstveno zbog nedostatka definiranih zakonskih propisa na nacionalnoj odnosno neusklađenosti legislative na međunarodnoj razini.

7. LITERATURA

Altermann, E., Russell, W. M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R., Klaenhammer, T. R. (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *PNAS*. **102**(11), 3906-3912.

Ansari, J. M., Colasacco, C., Emmanouil, E., Kohlhepp, S., Harriott, O. (2019) Strain-level diversity of commercial probiotic isolates of *Bacillus*, *Lactobacillus* and *Saccharomyces* species illustrated by molecular identification and phenotypic profiling. *PLoS One*. **14**(3):e0213841. doi: 10.1371/journal.pone.0213841

Antikainen, J., Kuparinen, V., Lähteenmäki, K., Korhonen, T. K. (2007) Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **51**, 526–534.

Antikainen, J., Kuparinen, V., Lähteenmäki, K., Korhonen, T. K. (2007) pH-dependent association of enolase and GAPDH of *Lactobacillus crispatus* with the cell wall and lipoteichoic acids. *J. Bacteriol.* **189** (12), 4539–4543.

Azcarate-Peril, M. A., Altermann, E., Hoover-Fitzula, R. L., Cano, R.J., Klaenhammer, T. R. (2004) Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5315-5322.

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*. **93**, 257-267.

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), 43-54.

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

Berggren, A., Lazou Ahrén, I., Larsson, N., Önning, G. (2011) Randomised, double-blind and placebo-controlled study using new probiotic lactobacilli for strengthening the body immune defence against viral infections. *Eur. J. Nutr.* **50**(3), 203-210.

Bergonzelli, G. E., Granato, D., Pridmore, R. D., Marvin-Guy, L. F., Donnicola, D., Corthésy-Theulaz, I. E. (2006) GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **74**, 425-434.

Boekhorst, J., Helmer, Q., Kleerbezem, M., Siezen, R. J. (2006) Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* **152**, 273-280.

Butorac, K., Banić, M., Novak, J., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Durgo, K., Oršolić, N., 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 Factories* **19**, 106. doi: 10.1186/s12934-020-01365-6106.

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 Factories* **20**(1), 85. doi: 10.1186/s12934-021-01575-6.

Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K., McAuliffe, O., Sangrador-Vegas, A., Slattery, L., Fitzgerald, G. F., Beresford, T., Ros, R. P. (2008) Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J. Bacteriol.* **190**(2), 727–735.

Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., O'Toole, P. W., (2018) Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**(1), e01738-18. doi: 10.1128/AEM.01738-18

Cani, P. D. (2018) Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* **67**(9), 1716–1725.

Castaldo, C., Siciliano, R. A., Muscariell, L., Marasco, R., Sacco, M., (2006) CcpA affects expression of the gro ESL and dnaK operons in *Lactobacillus plantarum*. *Microb. Cell Factories* **5**, 35. doi: 10.1186/1475-2859-5-35

Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y. (2009) Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. *Int .J. Food Microbiol.* **131(1)**, 30–39.

Coman, M. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Boyko, N., Cresci, A. (2014) In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®) , *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYN BIO(®) against pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **117(2)**, 518–527.

Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., Gahan, C. G. M. (2007) Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *PNAS.* **104(18)**, 7617–7621.

Cotter, P. D., Hill, C. (2003) Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 429-453.

da Silva, L.A., Lopes Neto, J.H.P., Cardarelli, H.R. (2019) Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria. *Ann. Microbiol.* **69**, 1497–1505.

Davis, C. (2014) Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J. Microbiol. Methods* **103**, 9-17.

De Angelis, M., Gobbetti, M. (1999) *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: manganese, oxygen, superoxide dismutase and metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 358-363.

De Angelis, M., Gobbetti, M. (2004) Environmental stress responses in *Lactobacillus*. *Proteomics* **4**, 106-122.

De Simone, C. (2019) The Unregulated Probiotic Market. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 809–817.

Derzelle, S., Hallet, B., Francis, K. P., Ferain, T., Delcour, J., Hols, P. (2000) Changes in *cspL*, *cspP* and *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **182**, 5105-5113.

Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., Ross, R. P. (2001) Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *Int. Dairy J.* **11**, 801-808.

De Vuyst, L., Leroy, F. (2011) Cross-feeding between bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria explains bifidobacterial competitiveness, butyrate production, and gas production. *Int. J. Food Microbiol.* **149**, 73-80.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Calasso, M., Vicentini, O., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., De Vincenzi, M., Dessì, M., Guerzoni, M. E., Gobbetti, M. (2010) Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics* **7**, 2647-2673.

Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2012) Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(1), 1-6.

EFSA (2009) Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA): Briefing document for Member States and European Commission on the evaluation of Article 13.1 health claims on request of EFSA. *J. EFSA* 2009. **7**(11):1386. doi:10.2903/j.efsa.2009.1386. Pristupljeno 15. rujna 2012.

EFSA (2011) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *J. EFSA* 2011. **9**(12):2497. doi:10.2903/j.efsa.2011.2497. Pristupljeno 15. rujna 2012.

El Hage, R., Hernandez-Sanabria, E., Van de Wiele, T. (2017) Emerging Trends in "Smart Probiotics": Functional consideration for the development of novel health and industrial applications. *Front. Microbiol.* **8**, 1889. doi: 10.3389/fmicb.2017.01889

Fanning, S., Hall, L. J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M. O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., van Sinderen, D. (2012) Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *PNAS*. **109(6)**, 2108-2113.

FAO/WHO (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations/WHO - World Health Organization, London, Ontario. www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf. Pristupljeno 15. rujna 2012.

Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., Ouwehand, A. C. (2019) The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms* **7(3)**, 83. doi: 10.3390/microorganisms7030083

Field, D., Ross, R. P., Hill, C. (2018) Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives, *Curr. Opin. Food Sci.*. **20**, 1-6.

Fiocco, D., Capozzi, V., Goffin, P., Hols, P., Spano, G. (2007) Improved adaptation to heat, cold, and solvent tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 909-915.

Foroni, E., Serafini, F., Amidani, D., Turrone, F., He, F., Bottacini, F., O'Connell Motherway, M., Viappiani, A., Zhang, Z., Rivetti, C., van Sinderen, D., Ventura, M. (2011) Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium*. *Microb. Cell Factories* **10(1)**, S16. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S16

Foschi, C., Laghi, L., Parolin, C., Giordani, B., Compri, M., Cevenini, R., Marangoni, A., Vitali, B. (2017) Novel approaches for the taxonomic and metabolic characterization of lactobacilli: Integration of 16S rRNA gene sequencing with MALDI-TOF MS and 1H-NMR. *PloS one* **12(2)**, e0172483. doi: 10.1371/journal.pone.0172483

Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šušković, J. (2009) Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *Res. J. Dairy Sci.*, **76(1)**, 98-104.

-
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Mrša, V., Šušković, J. (2005) Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Micro.* **98(2)**, 285–292.
- Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., Ohno, H. (2011) Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543–547.
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D., Reid, G. (2002) Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9(1)**, 92–96.
- Glaasker, E., Tjan, F. S. B., Tergesteeg, P. F., Konings, W. N., Poolman, B. (1998) Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *J. Bacteriol.* **180**, 4718–4723.
- Gibson, G. R., Brummer, R. J., Isolauri, E., Lochs, H., Morelli, L., Ockhuizen, T., Rowland, I. R., Schrezenmeir, J., Stanton, C., Verbeke, K. (2011) The design of probiotic studies to substantiate health claims. *Gut microbes* **2(5)**, 299–305.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F., Limitone, A. (2007) Cell-cell communication in food related bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 34–45.
- Goh, Y., Klaenhammer, T. R. (2009) Genomic features of *Lactobacillus* species. *Front Biosci.* **14**, 1362–1386.
- González-Rodríguez, I., Ruiz, L., Gueimonde, M., Margolles, A., Sánchez, B. (2013) Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.*, **340(1)**, 1–10.
- Gouesbert, G., Jan, G., Boyaval, P. (2001) *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* thermotolerance. *Lait* **81**, 301–309.
-

Grill, J. P., Cayuela, C., Antoine, J. M., Schneider, F. (2000) Isolation and characterization of a *Lactobacillus amylovorus* mutant depleted in conjugated bile salt hydrolase activity: relation between activity and bile salt resistance. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 553-563.

Grześkowiak, Ł., Isolauri, E., Salminen, S., Gueimonde, M. (2011) Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *Br. J. Nutr.* **105**, 887–894.

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

Herbel, S. R., Vahjen, W., Wieler, L. H., Guenther, S. (2013) Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut pathog.* **5(1)**, 27. doi:10.1186/1757-4749-5-27

Hertel, C., Schmidt, G., Fisher, M., Oellers, K., Hammes, W. P. (1998) Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene *katA* of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1359-1365.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S. (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**, 506-514.

Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., Ross, R. P. (2018) The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. *Front. Microbiol.* **9**, 2107. doi: 10.3389/fmicb.2018.02107.

Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Swings, J. (2006) Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res. Microbiol.* **157(9)**, 803–810.

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

Jackson, S. A., Schoeni, J. L., Vegge, C., Pane, M., Stahl, B., Bradley, M., Goldman, V. S., Burguière, P., Atwater, J. B., Sanders, M. E. (2019) Improving end-user trust in the quality of commercial probiotic products. *Front.Microbiol.* **10**, 739. doi: 10.3389/fmicb.2019.00739

Jensen, H., Roos, S., Jonsson, H., Rud, I., Grimmer, S., van Pijkeren, J. P., Britton, R. A., Axelsson, L. (2014) Role of *Lactobacillus reuteri* cell and mucus-binding protein A (CmbA) in adhesion to intestinal epithelial cells and mucus in vitro. *Microbiology (Reading, England)* **160(Pt 4)**, 671–681.

Johnson-Henry, K. C., Hagen, K. E., Gordonpour, M., Tompkins, T. A., Sherman, P. M. (2007) Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol.* **9(2)**, 356-367.

Kankainen, M., Paulin, L., Tynkkynen, S., von Ossowski, I., Reunanen, J., Partanen, P., Satokari, R., Vesterlund, S., Hendrickx, A. P. A., Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C. J., Vanderleyden, J., Hämäläinen, T., Laukkanen, S., Salovuori, N., Ritari, J., Alatalo, E., Korpela, R., Mattila-Sandholm, T., Lassig, A., Hatakka, K., Kinnunen, K. T., Karjalainen, H., Saxelin, M., Laakso, K., Surakka, A., Palva, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., de Vos, V. M. (2009) Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *PNAS.* **106(40)**, 17193–17198.

Kapczynski, D. P., Meinersmann, R. J., Lee, M. D. (2000) Adherence of *Lactobacillus* to intestinal 407 cells in culture correlates with fibronectin binding. *Curr. Microbiol.* **41**, 136-141.

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. J. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *PNAS.* **100**, 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**,199–230.

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**(6), 981–987.

Köhler, G. A., Assefa, S., Reid, G. (2012) Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2012**, 636474. doi: 10.1155/2012/636474

Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L. P., Verhoeven, T. L. A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., de Vos, W. M., De Keersmacker, S. C. J., Vanderleyden, J. (2012) Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(1), 185–193.

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

Leboš Pavunc, A., Turk, J., Beganović, J., Frece, J., Mahnet, S., Kirin, S., Šušković, J. (2009) Proizvodnja fermentiranih probiotičkih napitaka od permeata mlijeka obogaćenih retentatom sirutke i identifikacija prisutnih bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **59**(1), 11–19.

Lee, I. C., Tomita, S., Kleerebezem, M., Bron, P. A. (2013) The quest for probiotic effector molecules - Unraveling strain specificity at the molecular level. *Pharmacol Res.* **69**(1), 61–74.

Lewis, Z. T., Shani, G., Masarweh, C. F., Popović, M., Frese, S. A., Sela, D. A., Underwood, M. A., Mills, D. A. (2016) Validating bifidobacterial species and subspecies identity in commercial probiotic products. *Pediatr. Res.* **79**(3), 445–452.

Liévin-Le Moal, V., Servin, A. L. (2014) Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**(2), 167–199.

Lorca, G. L., Font de Valdez, G. (2009) *Lactobacillus* stress responses. U: *Lactobacillus molecular biology: From genomics to probiotics* (Ljunhg, A., Waldström, T., ured.). Caister Academic Press, Norfolk, str. 115-137.

Lugli, G. A., Mangifesta, M., Mancabelli, L., Milani, C., Turrone, F., Viappiani, A., van Sinderen, D., Ventura, M. (2019) Compositional assessment of bacterial communities in probiotic supplements by means of metagenomic techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **294**, 1–9.

Malik, S., Petrova, M. I., Claes, I. J., Verhoeven, T. L., Busschaert, P., Vaneechoutte, M., Lievens, B., Lambrichts, I., Siezen, R. J., Balzarini, J., Vanderleyden, J., Lebeer, S. (2013). The highly autoaggregative and adhesive phenotype of the vaginal *Lactobacillus plantarum* strain CMPG5300 is sortase dependent. *Appl. Environ. Microbiol.* **79(15)**, 4576–4585.

Martín, R., Langella, P. (2019) Emerging health concepts in the probiotics field: streamlining the definitions. *Front. Microbiol.* **10**, 1047. doi:10.3389/fmicb.2019.01047

Marty-Teyssset, C., De La Torre, F., Garel, J. R. (2000) Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 262-267.

Mercenier, A., Pavan, S., Pot, B. (2003) Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 99–100.

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(16)**, 6463-6472.

Morelli, L., Gibson, G. R., Brummer, R. J., Isolauri, E., Lochs, H., Ockhuizen, T., Rowland, I. R., Schrezenmeir, J., Stanton, C., Verbeke, K. (2011) The design of probiotic studies to substantiate health claims. *Gut Microbes*, 299-305.

Moslehi-Jenabian, S., Vogensen, F. K., Jespersen, L. (2011) The quorum sensing *luxS* gene is induced in *Lactobacillus acidophilus* NCFM in response to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **149(3)**, 269-273.

O'Connell Motherway, M., Zomer, A., Leahy, S. C., Reunanen, J., Bottacini, F., Claesson, M. J., O'Brien, F., Flynn, K., Casey, P. G., Munoz, J. A., Kearney, B., Houston, A. M., O'Mahony, C., Higgins, D. G., Shanahan, F., Palva, A., de Vos, W. M., Fitzgerald, G. F., Ventura, M., O'Toole, P. W., van Sinderen, D. (2011) Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *PNAS*. **108**, 11217–11222.

Patro, J. N., Ramachandran, P., Barnaba, T., Mammel, M. K., Lewis, J. L., Elkins, C. A. (2016) Culture-independent metagenomic surveillance of commercially available probiotics with high-throughput next-generation sequencing. *mSphere* **1(2)**, e00057-16. doi: 10.1128/mSphere.00057-16.

Pavlović, M., Hörmann, S., Vogel, R. F., Ehrmann, M. A. (2008) Characterisation of a piezotolerant mutant of *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Z. Naturforsch* **63b**, 791-797.

Peña, J.A., Versalovic, J. (2003) *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol.* **5(4)**, 277-285.

Perea Vélez, M., De Keersmaecker, S. C. J., Vanderleyden, J. (2007) Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract, *FEMS Microbiol. Lett.* **276(2)**, 140–148.

Peters, V., van de Steeg, E., van Bilsen, J., Meijerink, M. (2019) Mechanisms and immunomodulatory properties of pre- and probiotics. *Benef. Microbes* **10(3)**, 225–236.

Petrova, M. I., Macklaim, J. M., Wuyts, S., Verhoeven, T., Vanderleyden, J., Gloor, G. B., Lebeer, S., Reid, G. (2018) Comparative genomic and phenotypic analysis of the vaginal probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1. *Front. Microbiol.* **9**, 1278. doi:10.3389/fmicb.2018.01278

Reid, G., Bruce, A. W. (2006) Probiotics to prevent urinary tract infection: the rationale and evidence. *Microbes Infect.* **4**, 319-324.

-
- Reunanen, J., von Ossowski, I., Hendrickx, A. P. A., Palva, A., de Vos, W. M. (2012) Characterization of the SpaCBA pilus fibers in the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Appl. Environ. Microbiol.* **78** (7), 2337-2344.
- Ruiz, L., Margolles, A., Sánchez, B. (2013) Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front. Microbiol.* **4**, 396. doi:10.3389/fmicb.2013.00396
- Ryan, P. M., Stolte, E. H., London, L. E. E. Wells, J. M., Long, S. L., Joyce, S. A., Gaham, C. G. M., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Caplice, N. M., Stanton, C. (2019) *Lactobacillus mucosae* DPC 6426 as a bile-modifying and immunomodulatory microbe. *BMC Microbiol.* **19**, 33. doi: 10.1186/s12866-019-1403-0
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G., Huys, G., Levy, D. D., Lutgendorff, F., Mack, D., Phothirath, P., Solano-Aguilar, G., Vaughan, E. (2010) Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes* **1**(3), 164–185.
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G. Rastall R. A (2019) Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 605–616.
- Schmidt, G., Hertel, C., Hammes, W. P. (1999) Characterisation of the dnaK operon of *Lactobacillus sakei* LTH681. *System. Appl. Microbiol.* **22**, 321-328.
- Schwarz-Linek, U., Höök, M., Potts, J. R. (2004) The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol. Microbiol.* **52**:631–641.
- Segers, M. E., Lebeer, S. (2014) Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG--host interactions. *Microb Cell Fact.* **29**, 13 Suppl 1(Suppl 1):S7. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S7
- Serrano, L. M., Molenaar, D., Wels, M., Teusink, B., Bron, P. A., de Vos, W. M., Smid, E. J. (2007) Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microb. Cell Fact* **6**,29. doi: 10.1186/1475-2859-6-29
-

Simark-Mattsson, C., Emilson, C. G., Håkansson, E. G., Jacobsson, C., Roos, K., Holm, S. (2007) *Lactobacillus*-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur. J. Oral Sci.* **115**(4), 308–314.

Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., Gobbetti, M. (2007) Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria isolated from Italian cheese varieties. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(22), 7283-7290.

Smeets, A., Varmanen, P., Palva, A. (1998) Molecular characterisation of a stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus*. *J. Bacteriol.* **180**, 6148-6153.

Spacova, I., O'Neill, C., Lebeer, S. (2020) *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG inhibits infection of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* through mechanisms involving cell surface molecules and pH reduction. *Benef. microbes* **11**(7), 703–715.

Stentz, R., Loizel, C., Mallert, C., Zagorec, M. (2000) Development of genetic tools for *Lactobacillus sakei*: disruption of the β -galactosidase gene and use of *lacZ* as a reporter gene to study regulation of the putative copper ATPase, AtkB. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4272-4278.

Stolz, P., Böcker, G., Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995) Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. II. *Lactobacillus pontis*, *L. reuteri*, *L. amylovorus*, *L. fermentum*. *Z. Lebensm. Unter Forsch.* **201**, 402-410.

Sturme, M. H., Francke, J. C., Siezen, R. J., de Vos, W. M., Kleebezem, M. (2007) Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology* **153**, 3939-3947.

Sturme, M. H., Nakayama, J., Molenaar, D., Murakami, Y., Kunugi, R., Fujii, T., Vaughan, E. E., Kleebezem, M., de Vos, W. M. (2005) An agr-like twocomponent regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of a novel cyclic peptide and regulation of adherence. *J. Bacteriol.* **187**, 5224-5235.

Singhal, N., Maurya, A. K., Mohanty, S., Kumar, M., Viridi, J. S. (2019) Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from rhizosphere. *Front.Microbiol.* **10**, 1567. doi: 10.3389/fmicb.2019.01567

Suokko, A., Poutanen, M., Savijoki, K., Kalkkinen, N., Varmanen, P. (2008) ClpL is essential for induction of thermotolerance and is potentially part of the HrcA regulon in *Lactobacillus gasseri*. *Proteomics* **8**, 1029-1041.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48(3)**, 296-307.

Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. (2009) Crijevna mikroflore, prehrana i zdravlje. U: *Značenje prehrane u prevenciji i liječenju bolesti* (Delaš, I., Čačić Hribljan, M., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 17-25.

Šušković J., Kos B., Novak J., Leboš Pavunc A. (2020., 03. studeni) Laboratorijske vježbe - Interna skripta iz Mikrobne ekologije. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_biokemijsko_inzenjerstvo/laboratorij_za_tehnologiju_antibiotika_enzima_probiotika_i_starter_kultura/mikrobna_ekologija>. Pristupljeno 01. travnja 2021.

Šušković, J., Kos, B., Šantek, B., Kniewald, Z., Mrša, V., Hruškar, M., Frece, J., Gaurina Srček, V., Slavica, A., Novak, J., Leboš Pavunc, A. (2019) Biotehnologija u Hrvatskoj - povijesna baština i suvremeni trendovi. *Annual of the Croatian Academy of Engineering*, **2019(1)**, 438-484.

Tao, J., Drabik, K. A., Waypa, T. S., Musch, M. W., Alverdy, J. C., Schneewind, O., Chang, E. B., Petrof, E. O. (2006) Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Cell Physiol.* **290**, C1018-C1030.

Ullah, M., Raza, A., Ye, L., Yu, Z. (2019) Viability and composition validation of commercial probiotic products by selective culturing combined with next-generation sequencing. *Microorganisms* **7(7)**, 188. doi: 10.3390/microorganisms7070188

Uroić, K., Novak, J., Hynönen, U. E. E., Pietilä, T. E., Leboš Pavunc, A., Kant, R., Kos, B., Palva, A. M., 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.* **69**, 623-632.

Valeriano, V. D., Parungao-Balolong, M. M., Kang, D. K. (2014) In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *J. Appl. Microbiol.* **117**(2), 485–497.

van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A., Loux, V., Dervyn, R., Bossy, R., Bolotin, A., Batto, J. M., Walunas, T., Gibrat, J. F., Bessieres, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., Maguin, E. (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 9274-9279.

van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., Maguin, E. (2002) Stress responses in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek.* **82**, 187-216.

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**, 4143-4153.

Vermeulen, M., Mulder, K. W., Denissov, S., Pijnappel, W. W., van Schaik, F. M., Varier, R. A., Baltissen, M. P., Stunnenberg, H. G., Mann, M., Timmers, H. T. (2007) Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* **131**(1), 58–69.

Walker, D. C., Girgis, H. S., Klaenhammer, T. R. (1999) The *groESL* chaperone operon of *Lactobacillus johnsonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3033-3041.

Weizman, Z., Asli, G., Alsheikh, A. (2005) Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics* **115**, 5-9.

Wong, C. B., Odamaki, T., Xiao, J.-Z. (2019) Beneficial effects of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536 on human health: Modulation of gut microbiome as the principal action, *J. Funct. Foods* **54**, 506-519.

Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., Jenkins, D. J. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **40**, 235-243.

Zúniga, M., Champomier-Verges, M., Zagorec, M., Pérez-Martinez, G. (1998) Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sakei*. *J. Bacteriol.* **180**, 4154-4159.

8. ŽIVOTOPIS

8. ŽIVOTOPIS

Petra Džidara, dipl. ing., zaposlena je od 2006. godine u Odjelu za mikrobiologiju hrane i predmeta opće uporabe u Centru za kontrolu namirnica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je smjer Biologija - Ekologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, nakon čega se 2002. zapošljava u Laboratoriju za mikoplazme, Imunološkog zavoda d.d., a u periodu 2004.-2006. godine voditeljica je Odjela kontrole kvalitete bakterijskih cjepiva i krvnih pripravaka. Stručno se usavršavala 2004. u istraživačkim laboratorijima Eurofins Microsafe, Leiden, Nizozemska tijekom 3 mjeseca, te je pohađala niz stručnih radionica, a sudjelovala je i na tečaju znanstvenog usavršavanja pod naslovom "Metodološki tečajevi u biologiji i medicini "DNA and RNA" u organizaciji Instituta Ruđer Bošković, 2007. Kao koautor posterskih prezentacija sudjelovala je na nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Članica je Sekcije za mikrobiologiju hrane, Hrvatskog mikrobiološkog društva. Koautor je 4 znanstvena rada iz područja detekcije nepoželjnih mikroorganizama u hrani. Znanstveni interes obuhvaća mikrobiološko ispitivanje hrane, kontrolu mikrobiološke čistoće objekata, nadzor kritičnih kontrolnih točaka (HACCP), analizu prisutnosti bakterijskih toksina u hrani, mikrobiološko ispitivanje predmeta opće uporabe, razvoj i validaciju metoda, stručne konzultacije i edukacije unutar laboratorija za analizu hrane, hrane za životinje i predmeta opće uporabe sukladno normi HRN EN ISO/IEC 17025.

Znanstveni radovi

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

Topić Popović, N., Benussi Skukan, A., Džidara, P., Čož-Rakovac, R., Strunjak-Perović, I., Kozačinski, L., Jadan, M., Brlek-Gorski, D., (2010) Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. *Vet. Med. (Praha)* **55(5)**, 233-241.

Petrović, M., Debeljak, Ž., Kezić, N., Džidara, P. (2015) Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils. *Food Chem.* **170**, 218–225.

Topić Popović, N., Benussi Skukan, A., Džidara, P., Strunjak-Perović, I., Kepec, S., Barišić, J., Čož-Rakovac, R. (2015) Prediction of *Listeria monocytogenes* growth as a function of environmental factors. *Acta Aliment.* **44**, 443-453.