

# Probiotička karakterizacija bakterija mliječne kiseline izoliranih iz stolice dojenčeta

---

**Vodjerek, Mia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**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:159:337546>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

Mia Vodjerek  
1426/USH

**PROBIOTIČKA  
KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA  
MLIJEČNE KISELINE  
IZOLIRANIH IZ STOLICE  
DOJENČETA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jadranke Frece te uz pomoć Denija Kostelca, mag. ing. biotechn.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jadranki Frece na stručnom vodstvu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Posebna zahvala asistentu Deniju Kostelcu, mag. ing. biotechn. na pomoći i brojnim vrijednim savjetima tijekom izvođenja i pisanja ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima što su me podržavali i nisu dopustili da odustanem kada je bilo teško, bez njih sve ovo ne bi bilo ostvareno.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Upravljanje sigurnošću hrane

## PROBIOTIČKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANIH IZ STOLICE DOJENČETA

Mia Vodjerek 1426/USH

**Sažetak:** Mikrobiološka raznolikost crijevne mikrobiote omogućava odvijanje ključnih metaboličkih procesa, ravnotežu imunskog sustava, otpor patogenim mikroorganizmima te mnoge druge korisne učinke. Ako je mikrobná ravnoteža narušena može doći do razvoja bolesti i mnogih zdravstvenih poremećaja. Način života, prehrana, stres, lijekovi i mnogi drugi čimbenici imaju direktan utjecaj na navedenu ravnotežu. Dokazano je da probiotički preparati mogu povoljno djelovati na narušenu crijevnu mikrobiotu, uspostavljajući ravnotežu, inhibirajući patogene mikroorganizme, potičući imunski sustav te ispoljavajući mnoge druge korisne učinke. Korišteni probiotici moraju zadovoljiti niz kriterija kako bi se osiguralo željeno djelovanje na ciljanom mjestu u domaćinu i otklonili mogući negativni utjecaji. Kako bi se navedeno osiguralo, provodi se probiotička karakterizacija s ciljem ispitivanja probiotičkih kandidata na niz kriterija te procjena njihove uspješnosti i konačno probiotičkog potencijala. Stolica dojenčeta smatra se dobrim izvorom potencijalnih probiotika jer su mnoga istraživanja pokazala kako je to mjesto kvalitetnih probiotičkih sojeva koji su dokazali svoje korisne učinke na zdravlje. U ovom radu, provedena je probiotička karakterizacija deset izolata bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta. Odabran je najbolji soj, *Lactobacillus plantarum* B12, koji je pokazao visoko preživljenje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava, antimikrobnú aktivnost i koagregaciju s patogenima, antioksidativnu aktivnost i hidrofobnost stanične površine. *L. plantarum* B12 zadovoljio je sve sigurnosne kriterije te je liofiliziran s 96 % uspješnosti te se kao takav može uključiti u probiotičke proizvode.

**Ključne riječi:** probiotici, probiotička karakterizacija, stolica dojenčeta, liofilizacija, *Lactobacillus*

**Rad sadrži:** 41 stranicu, 6 slika, 7 tablica, 78 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

**Pomoć pri izradi:** Deni Kostelac, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc Ksenija Markov
2. Prof.dr.sc Jadranka Frece
3. Prof.dr.sc Blaženka Kos
4. Prof.dr.sc Jasna Novak (zamjena)

**Datum obrane:** 29. ruján 2021.

## BASIC DOCUMENT CARD

Graduated Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Safety Management

### **PROBIOTIC CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM INFANT FECES**

Mia Vodjerek, 1426/USH

**Abstract:** The microbiological diversity of the intestinal microbiota enables the development of key metabolic processes, the balance of the immune system, resistance to pathogenic microorganisms, and many other beneficial effects. If the microbial balance is disturbed, diseases and many health disorders can develop. Lifestyle, diet, stress, medications, and many other factors have a direct impact on this balance. It has been proven that probiotic preparations can have a beneficial effect on the disturbed intestinal microbiota, restoring balance, inhibiting pathogenic microorganisms, stimulating the immune system, and exhibiting many other beneficial effects. The probiotics used must meet a number of criteria to ensure the desired action at the target site in the host and to eliminate possible adverse effects. To ensure the above, probiotic characterization is carried out to examine probiotic candidates on a number of criteria and assess their success, and finally probiotic potential. Infant stool is considered a good source of potential probiotics because many studies have shown it to be a place of quality probiotic strains that have proven their beneficial effects on health. In this study, a probiotic characterization of ten lactic acid bacterial isolates from infant stool was performed. The best strain, *Lactobacillus plantarum* B12, was selected, which showed high survival in simulated conditions of the gastrointestinal system, antimicrobial activity and coaggregation with pathogens, antioxidant activity, and hydrophobicity of the cell surface. *L. plantarum* B12 met all safety criteria and was lyophilized with 96% success and as such can be included in probiotic products.

**Keywords:** probiotics, probiotic characterization, infant, lyophilization, *Lactobacillus*

**Thesis contains:** 41 pages, 6 figures, 7 tables, 78 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:**

Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

**Technical support and assistance:** Deni Kostelac, mag. ing.

**Reviewers:**

1. PhD. Ksenija Markov, Full professor
2. PhD. Jadranka Frece, Full professor
3. PhD. Blaženka Kos, Full professor
4. PhD. Jasna Novak, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 29th september 2021.

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
2.1. LJUDSKA MIKROBIOTA .....	3
2.2. MIKROBIOTA DOJENČETA .....	4
2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE .....	6
2.5. PROBIOTICI.....	8
2.5.1. Probiotici izolirani iz stolice dojenčeta .....	9
2.6. KRITERIJI ZA ODABIR PROBIOTIKA.....	10
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>12</b>
3.1. MATERIJALI.....	12
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	12
3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije .....	12
3.1.3. Aparatura i pribor .....	14
3.2. METODE RADA .....	14
3.2.1. Čuvanje i uzgoj bakterijskih izolata .....	14
3.2.2. Priprema suspenzije bakterijskih stanica.....	15
3.2.3. Priprema unutarstaničnog sadržaja.....	15
3.2.4. Ispitivanje otpornosti na niske pH vrijednosti.....	15
3.2.5. Hemolitička aktivnost izolata .....	15
3.2.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti .....	15
3.2.7. Sposobnost koagregacije .....	16
3.2.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti bakterijskih izolata.....	16
3.2.9. Određivanje osjetljivosti na antibiotike.....	17
3.2.10. Hidrofobnost stanične površine .....	18
3.2.12. Preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava.....	19
3.2.11. Preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom liofilizacije .....	19



3.2.12. Identifikacija odabranog probiotičkog izolata (API 50 CHL).....	20
3.2.13. Statistička obrada podataka .....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>21</b>
4.1. OTPORNOST NA NISKE pH VRIJEDNOSTI.....	21
4.2. HEMOLITIČKA AKTIVNOST .....	22
4.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST .....	23
4.4 SPOSOBNOST KOAGREGACIJE .....	25
4.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST .....	26
4.5.1. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala .....	26
4.5.2. Mjerenje unutarstanične koncentracije glutaciona.....	27
4.6. ODREĐIVANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE .....	28
4.6. HODROFOBNOŠĆ STANIČNE POVRŠINE .....	29
4.7. PREŽIVLJENJE PROBIOTIČKIH SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA .....	30
4.2. PREŽIVLJENJE PROBIOTIČKOG SOJA B12 TIJEKOM LIOFILIZACIJE ..	31
4.3. IDENTIFIKACIJA ODABRANOG PROBIOTIČKOG IZOLATA (API 50 CHL) .....	32
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>33</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>34</b>

# 1. UVOD

Crijevna mikroflora ili mikrobiota velika je bakterijska zajednica koja kolonizira crijeva, s metaboličkom aktivnošću koja utječe na fiziologiju i patologiju imunosnog sustava sluznice domaćina. Crijevna mikrobiota ima vrlo važnu ulogu u zdravlju regulirajući probavu i imunosni sustav te mnoge druge aspekte zdravlja. Narušavanje ravnoteže u crijevne mikrobiote može rezultirati povećanjem tjelesne težine, visokim šećerom u krvi, visokom razinom kolesterolu i mnogim drugim poremećajima. Crijevnu mikrobiotu karakterizira visoka dinamičnost te sadrži približno 150 puta više gena nego cjelokupni ljudski genom (Ursell i sur., 2014). U slučaju bolesti, kompozicija mikrobiote može biti narušena te su takvi primjeri vidljivi u slučajevima zaraznog proljeva, gdje promjena u sastavu mikroflora i prisutnost patogenih mikroorganizama često uzrokuje bolest (Frece, 2007). Probiotici mogu utjecati na mikrobiotu tijekom prolaska kroz probavni sustav, koristeći slične mehanizme kao i prirodno prisutni mikroorganizmi rezultirajući poboljšanjem zdravlja i ponovnom uspostavom homeostaze. Probiotici mogu i indirektno utjecati na crijevnu mikrobiotu, primjerice modulirajući imunosni sustav. Probiotici se definiraju kao živi mikroorganizmi koji kada se primjene u odgovarajućim količinama djeluju korisno na zdravlje domaćina (FAO/WHO, 2002). Probiotička karakterizacija važan je niz postupaka kojima se ispituju sposobnosti sojeva da zadovolje stroge kriterije. Kriteriji obuhvaćaju sigurnosne provjere kako bi se ustanovilo da predloženi probiotik ne predstavlja ugrozu za zdravlje te ne pridonosi razvoju antibiotske rezistencije. Nadalje, probiotici moraju zadovoljiti određena funkcionalna svojstva kako bi se ostvario preduvjet njihova korisnog učinka na zdravlje. Značajna je i tehnološka sposobnost sojeva da ukoliko se uključuju u određene namirnice mogu preživjeti proizvodne i skladišne uvjete te posljedično nakon konzumacije ispoljiti spomenute korisne učinke. Do danas, probiotički su okarakterizirani brojni mikroorganizmi, no najčešće korištene su bakterije mliječne kiseline, posebice rodovi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Camargo Prado i sur., 2015). Obzirom na adaptiranost sojeva na uvjete humanog gastrointestinalnog sustava preporuča se korištenje probiotika humanog porijekla. Literaturno su istaknuti izolati iz stolice dojenčeta jer su iskazali značajnu imunomodulacijsku aktivnost i druge probiotičke karakteristike (Oh i sur., 2018)

Cilj ovog rada bio je provesti detaljnu probiotičku karakterizaciju deset izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz stolice zdravog dojenčeta. Ispitani su sigurnosni kriteriji hemolitičke aktivnosti i osjetljivosti na antibiotike te funkcionalna svojstva koja uključuju antioksidativnu aktivnost, antimikrobnu aktivnost naspram odabranih patogena te koagregaciju s patogenim bakterijama, sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima

gastrointestinalnog sustava i hidrofobnost stanične površine. Na osnovu navedenih ispitivanja cilj je bio odabrati onaj soj koji iskaže najveći probiotički potencijal te ispitati mogućnost liofilizacije soja kako bi se mogao duže skladištiti te potencijalno uključiti u prehrambeni proizvod.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. LJUDSKA MIKROBIOTA

Ljudsko tijelo dom je stotini trilijuna simbiotskih organizama koji obitavaju na tijelu čovjeka ili se nalaze unutar tijela, te imaju važnu ulogu u očuvanju ljudskog zdravlja, u obrani od velikog broja bolesti te u očuvanju homeostaze. Područja koja su izraženo nastanjena velikim brojem mikroorganizama su: usna šupljina, dišni put, koža, reproduktivni organi i gastrointestinalni trakt (Lloyd-Price i sur., 2016). Ljudska mikrobiota, posebno crijevna, u novije se vrijeme zbog svoje važnosti razmatra za uvrštavanje na popis "osnovnih organa" (O'Hara i Shanahan, 2006). Unutar crijevne mikrobiote nalazi se približno 150 puta više gena nego u cjelokupnom ljudskom genomu (Ursell i sur., 2014), a što je jedan od temeljnih razloga zašto bi se mikrobiota mogla smatrati zasebnim organom.

Mnogi faktori mogu utjecati na razvoj i sastav mikrobiote na koži, u ustima i crijevima, a to su učestalost kontakta sa drugim ljudima i životinjama, prehrana, genetika, kao i utjecaj okoliša i njegovih čimbenika. Sastav ljudske mikrobiote nije konstantan, te je podložan učestalim promjenama. Naime, radi se o izrazito dinamičnom i kompleksnom sustavu koji varira ovisno o načinu prehrane, korištenju lijekova te generalno načinu života. Ovisno o navedenim čimbenicima, sastav mikrobiote različit je od čovjeka do čovjeka. Istraživanja su pokazala kako i jednojajčani blizanci imaju različit sastav crijevne mikrobiote (Zoetendal i sur., 2001).

Ljudsku mikrobiotu, procijenjeno je, čini otprilike  $10^{13} - 10^{14}$  mikrobnih stanica, a taj broj stavlja ih u omjer 1:1 sa stanicama ljudskog tijela (Sender i sur., 2016). Debelo crijevo je organ unutar kojeg je ustanovljena najveća ukupna gustoća bakterijskih stanica, čak  $3,8 \times 10^{13}$  bakterija (Sender i sur., 2016). Mikrobiotu gastrointestinalnog trakta čini velik broj različitih vrsta bakterija, no najučestalije su iz tri glavna reda, a to su *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacter* (Tap i sur., 2009). Samo unutar debelog crijeva može biti prisutno više od 500 različitih vrsta bakterija, a koje čine od 35-50 % volumena u ukupnom sadržaju debelog crijeva. Crijevna mikrobiota vrlo je važna za ukupno funkcioniranje organizma, što veliki naglasak stavlja na simbiotsku vezu između mikrobiote i samog domaćina. Takva simbiotska veza regulirana je i stabilizirana pomoću složene mreže interakcija između metaboličkog, imunološkog i neuroendokrinog sustava.

Crijevna mikrobiota veoma je važna u procesu fermentacije neapsorbiranih molekula škroba i topljivih prehrambenih vlakana. Navedeni sustav u okviru svojih normalnih funkcija tijekom jednog dana proizvede 50-100 mmol/L kratkolančanih masnih kiselina. Kratkolančane masne

kiseline kao što su maslačna kiselina, propionska, acetatna i pentanoatna kiselina u tijelu čovjeka služe kao jedan od izvora energije (Salminen i sur., 1998) i time osiguravaju dodatnih 10 % energije dobivene iz hrane, a koja se iskorištava u brojnim metaboličkim procesima (Payne i sur., 2012). Od kratkolančanih masnih kiselina koje nastaju kao produkti mikrobne sinteze u gastrointestinalnom traktu dobiva se 70 % molekula ATP-a u debelom crijevu, a maslačna kiselina preferirani je reaktant za kolonocite (Donohoe i sur., 2011). Uz to što sintetizira kratkolančane masne kiseline, crijevna mikrobiota sintetizira i mikronutrijente koji su od velike važnosti za pravilno funkcioniranje metabolizma čovjeka. Vitamin K proizvode anaerobne bakterije *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium lentum*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens* i *Enterococcus faecium* (Cooke i sur., 2006), a koje nalazimo u crijevu čovjeka. Vitamini B<sub>5</sub> i B<sub>12</sub> sintetizirani su isključivo djelovanjem crijevne mikrobiote. Spomenuti vitamini veoma su važni koenzimi u velikom broju biokemijskih reakcija. Nedostatak vitamina B<sub>5</sub> i B<sub>12</sub> povezuje se sa nekoliko poremećaja kao što su nesаница, te neuropsihološki i hematološki poremećaji (Gominak, 2016). Crijevna mikrobiota pruža svojevrsan otpor kolonizaciji neželjenih i potencijalno opasnih patogenih mikroorganizama. Samim time, ona sprječava da se neželjene bakterije koje dospiju u organizam domaćina razmnože iznad određenih granica i postanu opasnost. Mikrobiota ima ključnu ulogu u razvoju crijevne sluznice i imunskog sustava čovjeka (Bouskra i sur., 2008; Rakoff-Nahoum i Medzhitov, 2008). Studije koje su rađene na životinjama koje su uzgajane u izoliranim, sterilnim uvjetima, pokazale su važnu ulogu mikrobiote u razvoju imunološkog sustava preko poticanja sazrijevanja imunoloških stanica i normalnog razvoja ostalih funkcija imunskog sustava (Bouskra i sur., 2008). Studije su također pokazale da ukoliko dođe do poremećaja crijevne mikrobiote to može imati utjecaj na pojavu brojnih bolesti, primjerice, bolesti jetre, metabolički poremećaji, bolesti dišnog sustava, mentalne i psihološke bolesti, autoimune bolesti, razne infekcije, razvoj zloćudnih tumora i drugo (Finegold i sur., 2002; Liu i sur., 2004; Sartor, 2008; Scanlan i sur., 2008; Verhulst i sur., 2008). Novija istraživanja otkrila su značajnu povezanost između crijevne mikrobiote i njezinog utjecaja razvoju pretilosti (Wang i sur., 2017).

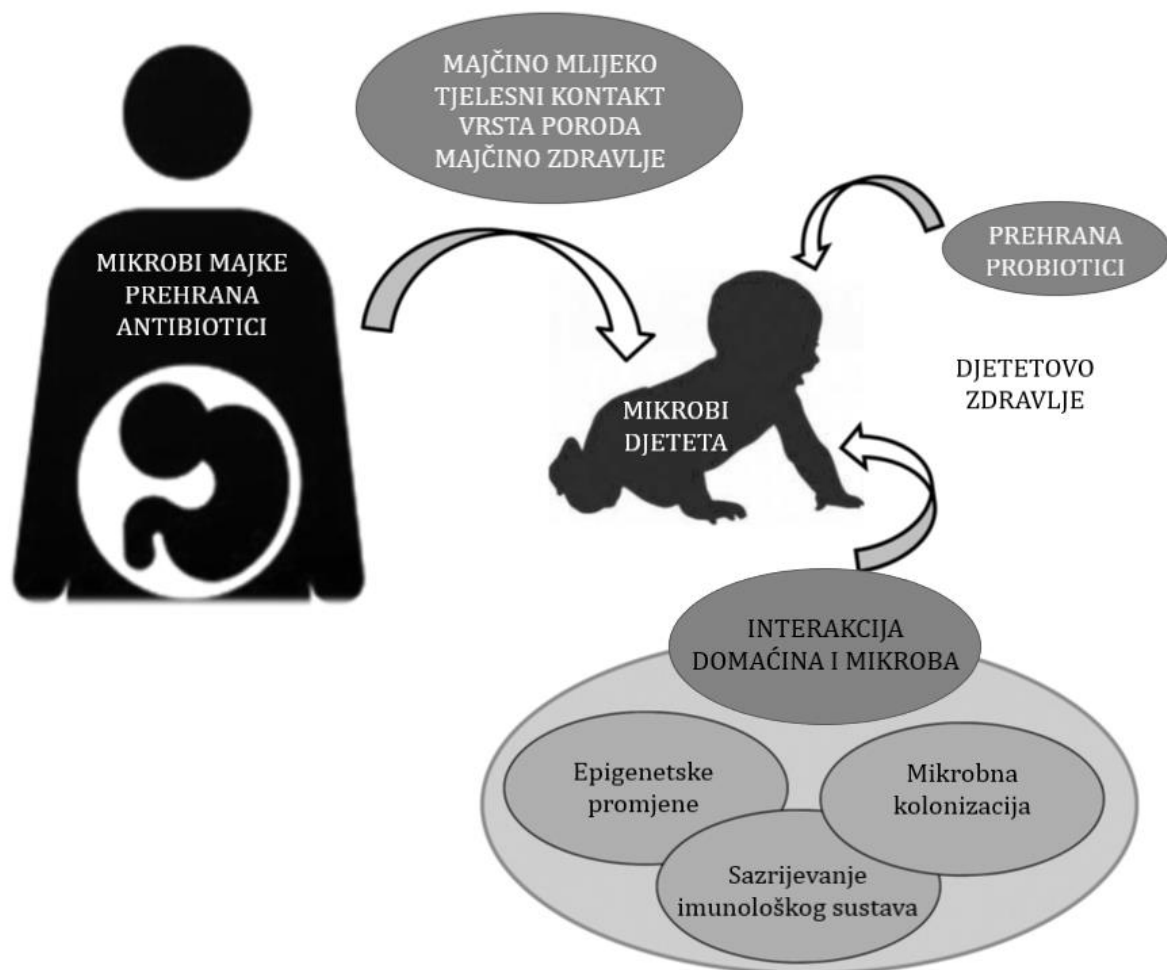
## 2.2. MIKROBIOTA DOJENČETA

Razvoj mikrobiote složen je proces koji započinje rođenjem. Tijekom rođenja, dijete dolazi u kontakt sa majčinom mikrobiotom, a koju nastavlja razvijati i mijenjati tijekom čitavog svog života. Samim rođenjem novorođenče je izloženo velikom broju novih mikroorganizama

koji postupno počinju kolonizirati probavni trakt. Među prvim mikroorganizmima koji koloniziraju debelo crijevo dojenčeta su fakultativni anaerobi kao što su enterobakterije, laktobacili, koliformne bakterije i streptokoki koji svoju kolonizaciju započinju drugi i treći dan života dojenčeta (Mshvildadze i Neu, 2010). Dojenče je na samom početku svog života ovisno o majci, a način prehrane, bilo to majčinim mlijekom ili umjetnim formulama ima značajan utjecaj na sastav crijevne mikrobiote. Dojenče putem majčinog mlijeka u svoj organizam unosi uz mlijeko i kolostrum koji sadrži žive mikroorganizme, a to su u velikom udjelu bakterije mliječne kiseline, te široki spektar bioaktivnih supstanci. Kao posljedica unosa svih navedenih tvari koje dojenče dobiva hraneći se majčinim mlijekom, tijekom odvikavanja od mlijeka i prelaska na drugi način prehrane, promjene u sastavu mikrobiote su značajnije i veće nego u dojenčadi koja je hranjena umjetnim formulama (Palmer i sur., 2007).

Razvoj mikrobiote svakog dojenčeta je veoma brz proces i ovisi o prvom inokulumu, majčinoj mikrobioti, vrsti porođaja (prirodni porođaj ili carski rez), načinu prehrane, utjecaju okoliša i upotrebi anti-mikrobnih tvari (Adlerberth i Wold, 2009) (Slika 1). Još u prošlom desetljeću smatralo se da kolonizacija gastrointestinalnog trakta različitim mikroorganizmima započinje djetetovim rođenjem, no novija istraživanja pokazuju kako bi sam proces mogao započeti i ranije nego što se smatralo. Toj tvrdnji ide u prilog činjenica da su određeni mikroorganizmi pronađeni u pupčanoj vrpci, posteljici, amniotskoj tekućini i mekoniju (prva stolica novorođenčeta) (Jiménez i sur., 2005; Satokari i sur., 2009). Kako je fetus na više načina povezan sa majkom, utvrđeno je da i način prehrane majke tijekom trudnoće ima utjecaja na to kakvi će mikrobi biti prisutni u prvoj stolici dojenčeta (Collado i sur., 2012). Razlika u sastavu mikrobiote ovisno o načinu porođaja imat će utjecaja na rani stadij neonatalne mikrobne kolonizacije (Dominguez-Bello i sur., 2010). Dojenčad koja su na svijet donesena carskim rezom imaju drugačiji sastav mikrobiote od dojenčadi koja je rođena prirodnim putem (Neu i Rushing, 2011). Tijekom prirodnog porođaja dojenče dolazi u kontakt s majčinom vaginalnom i fekalnom mikrobiotom, te će kolonizaciju u debelog crijevu započeti mikrobi koji se nalaze u majčinom porođajnom kanalu. Kolonizacija debelog crijeva dojenčadi koja su na svijet došla carskim rezom dogoditi će se nešto kasnije nego u djece rođene prirodnim putem. Debelo crijevo djece porođene carskim rezom češće je kolonizirano klostridijama i bakteroidima, a mnogo manje bifidobakterijama i laktobacilima (Marques i sur., 2010; J. Penders i sur., 2006; John Penders i sur., 2006). Zabilježeno je da u djece koja su rođena carskim rezom postoji povećani rizik od razvoja bolesti kao što su astma, alergijski rinitis, celijakija i drugo (Decker i sur., 2010; Dominguez-Bello i sur., 2010; Thavagnanam i sur., 2008). Studije su pokazale da su bifidobakterije dominantne u sastavu mikrobiote dojenčadi kojoj je glavni i jedini izvor

hrane majčino mlijeko, što pokazuje i udio bifidobakterija koji može doseći 60-90 % od ukupne fekalne mikrobiote (Luoto i sur., 2010; Roger i sur., 2010). Uz bifidobakterije, mikroorganizmi koji su pronađeni u fecesu dojenčeta su i stafilokoki, streptokoki, korinebakterije, laktobacili, mikrokoki i propionske bakterije koje potječu iz mliječnih kanala i s površine kože (Collado i sur., 2012).



**Slika 1.** Faktori koji utječu na rano formiranje mikrobiote dojenčeta i faktori koji utječu na zdravlje dojenčeta. Prilagođeno prema Collado i sur., (2012).

### 2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Od kada su po prvi put izolirane iz mlijeka, bakterije mliječne kiseline (BMK) upotrebljavaju se u mnogobrojne svrhe, kao starter kulture (Frece i sur., 2010, 2014), u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, te kao probiotici (Frece i sur., 2009). Podijeljene su u jedan red te šest porodica i pripadaju koljenu Firmicutes. Rodovi koji spadaju u bakterije mliječne kiseline su *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*,

*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* i *Weissella*. Bakterije mliječne kiseline imaju GRAS status te se smatraju sigurnima za konzumaciju (Parada i sur., 2007). Česta je upotreba ovih bakterija u prehrambenoj industriji, ne samo iz razloga jer omogućavaju brzo zakiseljavanje određenih proizvoda kada su dodane, već i zato jer imaju sposobnost proizvodnje različitih metabolita kao što su etanol, različite arome i egzopolisaharida. Određeni sojevi proizvode antagonističke supstance, bakteriocine, koji već u malim količinama aktivno djeluju inhibirajući rast patogena. Bakterije mliječne kiseline omogućavaju da na tržištu bude dostupna široka paleta proizvoda s različitim nutritivnim, senzorskim i organoleptičkim svojstvima (Leroy i De Vuyst, 2004). Osim u mlijeku nalaze se u širokoj paleti proizvoda kao što su mliječni proizvodi (sir, smrznuti deserti, jogurt, acidofilno mlijeko), povrće, razna pića, pekarski proizvodi, čokoladi i žitaricama. Bakterije mliječne kiseline uobičajeno se nalaze u tlu, vodi, prirodnom gnojivu, silaži i biljkama. Uz navedeno, bakterije mliječne kiseline sastavni su dio mikrobiote gastrointestinalnog trakta, kože, usne šupljine, urinarnog trakta i spolnih organa čovjeka. Kao dio gastrointestinalnog trakta ove bakterije imaju brojne povoljne učinke na ljudsko zdravlje kao što su održavanje zdrave mikroflore crijeva, stimulacije imunosnog sustava, inhibicije rasta patogenih organizama, snižavanje razine kolesterola, poboljšanje iskorištenja laktoze, sprječavanje dijareje i konstipacije, te apsorpcije kalcija i sinteze vitamina (Li i sur., 2009). Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne, nesporogene, štapićaste ili kuglaste stanice kojima je krajnji metabolički produkt fermentacije mliječna kiselina (Stiles i Holzapfel, 1997). Mliječna kiselina koju proizvode ove bakterije u crijevima stvara nepovoljne uvjete za rast patogenih bakterija. Bakterije mliječne kiseline otporne su na uvjete kojima su izložene tijekom prolaska gastrointestinalnim traktom, na soli žuči, imaju sposobnost adhezije na intestinalnu mukozu, te poboljšavaju djelovanje intestinalne mikrobiote (Abushelaibi i sur., 2017). Pojedini sojevi BMK iskazuju antikancerogeno djelovanje, te mogu biti korisni u liječenju narušene crijevne mikroflore i povećane propusnosti crijeva (Feucht i Kwak, 2013). Tri soja bakterija mliječne kiseline koji su identificirani kao *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus fermentum* pokazali su tijekom provedbe *in vivo* testova sposobnost da reduciraju kolesterol (Wang i sur., 2012). Uzevši u obzir činjenice da su bakterije mliječne kiseline pokazale brojne povoljne učinke na zdravlje čovjeka, često se koriste kao probiotici. Sojevi koji se najčešće upotrebljavaju u probiotičke svrhe su *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. gasseri* i *L. plantarum* (Deogade, 2015; Krasaekoopt i sur., 2003).



## 2.5. PROBIOTICI

Službenu definiciju probiotika postavila je radna skupina za evaluaciju probiotika u hrani (FAO/WHO, 2002), prema kojoj su probiotici „živi organizmi koji, kada se primjenjuju u određenim količinama, djeluju korisno na zdravlje domaćina“. Ova definicija odobrena je i od strane Međunarodnog znanstvenog udruženja za probiotike i prebiotike (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISSAP) i trenutno je to najčešće korištena definicija probiotika od strane znanstvenika (Reid, 2006). Uspješni probiotički sojevi koji su uglavnom članovi rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, a koji su inače prirodno prisutni u ljudskom probavnom sustavu, primjenjuju se u fermentiranim mliječnim proizvodima, te su sastavni dio kako funkcionalne hrane (Frece i sur., 2014), tako i za zdravlje korisnih proizvoda (Kullen i Klaenhammer, 2000; Šušković i sur., 2000). Živi organizmi koji su okarakterizirani kao probiotici moraju posjedovati GRAS (Generally Recognized as Safe) status, ne smiju biti patogeni niti biti uzročnici bolesti kao što je poremećaj gastrointestinalnog trakta ili infektivni endokarditis.

Mnogo je različitih kriterija koje mikrobnji sojevi moraju ispuniti prije nego ih se svrsta u skupinu probiotika. Spomenuti kriteriji mogu se podijeliti u tri skupine, a to su sigurnosni, funkcionalni i tehnološki kriteriji (Gibson i Fuller, 2000). Kada se probiotik nađe u organizmu čovjeka, on ne smije izazivati imunološku reakciju, odnosno, domaćin mora imati određenu toleranciju na probiotik (Havenaar i Huis In't Veld, 1992). Nadalje, probiotik ne smije biti nosioc gena za otpornost na antibiotike, a koji bi mogli, ukoliko ih probiotik sadrži, biti preneseni na patogene organizme (Collins i sur., 1998). Poželjno je da probiotik posjeduje antikancerogena i antimutagena svojstva, te ne smije izazivati bilo kakvu vrstu upala (Collins i sur., 1998), također mora biti genetički stabilan bez mogućnosti horizontalnog prijenosa gena (Ziemer i Gibson, 1998).

Kako bi probiotici ispunili svoju zadaću nakon što su uneseni u organizam, oni moraju posjedovati određenu otpornost prema uvjetima u kojima se nađu tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Otpornost na djelovanje kiseline jedno je od važnih obilježja probiotika koje omogućava da ovi organizmi prežive djelovanje želučane kiseline i probavnih sokova dok ne dođu do ciljanog mjesta djelovanja. Kada stignu na svoje ciljano mjesto djelovanja, probiotik bi se morao moći vezati i kolonizirati epitelne stanice (Parracho i sur., 2007). Sposobnost probiotika da se prihvate za stanice epitela omogućava im da ostanu na određenom mjestu bez da budu otklonjeni djelovanjem crijevne peristaltike.

Brojni organizmi se u današnje vrijeme koriste kao probiotici, no oni koji su najčešće korišteni pripadaju rodu *Lactobacillus* i to je prva i najveća skupina mikroorganizama koju se

definira kao probiotike (Mombelli i Gismondo, 2000). Sljedeća skupina mikroorganizama koja se po učestalosti nalazi odmah iza roda *Lactobacillus* je rod *Bifidobacterium*. Navedene skupine bakterija prirodno su dio mikrobiote čovjeka (Bielecka i sur., 2002). U novije vrijeme kao probiotici se koriste bakterije mliječne kiseline iz rodova *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* i *Pediococcus*. Također, u svrhu probiotičkog djelovanja mogu se koristiti i bakterije kao što su ne patogeni soj *E.coli* Nissle 1917 i *Clostridium butyricum*, plijesni i nitaste gljive (*Aspergillus oryzae*). (Mombelli i Gismondo, 2000; Harish i Varghese, 2006)

Probiotici se mogu unositi u organizam ili tijekom konzumacije određene hrane čiji su dio ili kao ne prehrambeni preparati. Prehrambeni proizvodi koji sadrže probiotike dobili su naziv „funkcionalna hrana“. Međunarodni institut za biološke znanosti (The International Life Sciences Institute, Washington DC) definirao je funkcionalnu hranu kao hranu koja, zbog toga što sadrži fiziološki aktivne komponente, pruža zdravstvene koristi uz temeljne nutrijente (Hasler, 2002). Većina probiotika inkorporirana je u mliječne proizvode kao što su mlijeko u prahu, jogurt, meki, polutvrđi i tvrdi sirevi i sladoled (Desmond i sur., 2002; Dinakar i Mistry, 1994). To su proizvodi koji pružaju probioticima povoljne uvjete za preživljenje i rast. Pojedini mliječni proizvodi kao što su fermentirana mlijeka i sirevi dobri su nosioci probiotika do njihovog mjesta djelovanja i to zbog svoje pH vrijednosti, puferskih svojstava i udjela masti koji pružaju svojevrsnu zaštitu probioticima tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt, te poboljšavaju njihovo djelovanje (Özer i sur., 2009). Iako su mliječni proizvodi najčešće konzumirane namirnice koje sadrže probiotičke bakterije, zbog visokog udjela kolesterola, prisutnosti laktoze, te potreba za čuvanjem na temperaturi hladnjaka, javila se potreba za proizvodima ne mliječnog podrijetla koji bi također bili pogodni i za vegetarijance i vegane, te osobe koje nisu tolerantne na laktozu. Na tržištu se danas mogu naći proizvodi iz te kategorije, a koji uključuju sokove, ne mliječne napitke, proizvode na bazi čokolade ili žitarica koji također sadrže probiotičke bakterije, a mogu ih konzumirati osobe čija prehrana ne uključuje mliječne proizvode.

#### 2.5.1. Probiotici izolirani iz stolice dojenčeta

Probiotičke bakterije najčešće se izoliraju iz biljnih materijala i gastrointestinalnog trakta čovjeka. Kako je potražnja i upotreba probiotika u stalnom porastu, tako se javlja i potreba za pronalaskom novih izvora probiotičkih bakterija. U posljednjem desetljeću u stalnom je porastu broj istraživanja koja se provode kako bi se ustvrdilo koji sojevi izolirani iz stolice dojenčeta

pokazuju najbolju probiotičku aktivnost. Dojenčad koja je hranjena isključivo majčinim mlijekom u svom probavnom traktu uz brojne ostale bakterije sadrži i bifidobakterije i laktobacile. Određeni sojevi bakterije iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* pokazali su dobre probiotičke sposobnosti i u širokoj su upotrebi kao probiotici.

Kirtzalidou i suradnici (2011) proveli su istraživanje u kojem su iz fecesa 63 dojenčeta izolirali bakterije u potrazi za onima s izraženim probiotičkim potencijalom. Bakterije koje su izolirali identificirane su uglavnom kao *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. paracasei*, *L. salivarius* i *L. fermentum*. Kako bi ustvrdili koje od izoliranih sojeva imaju probiotički karakter pratili su njihovu otpornost na djelovanje kiseline i soli žuči, osjetljivost na djelovanje antibiotika, antimikrobnu aktivnost i sposobnost prianjanja. Sojevi koji su pokazali najveći probiotički potencijal su *L. salivarius* i *L. rhamnosus*. Uz spomenuto istraživanje, u novije vrijeme provodi se sve veći broj istraživanja u sklopu kojih se nastoji izolirati i dokazati probiotički potencijal bakterijskih sojeva izoliranih iz fecesa dojenčeta. Pokazalo se kako stolica dojenčeta, uz konvencionalne izvore probiotika, također može biti odličan izvor probiotičkih sojeva.

## 2.6. KRITERIJI ZA ODABIR PROBIOTIKA

Upotreba probiotika u današnje vrijeme u sve je većem porastu, ne samo u prehrambenoj industriji gdje se koriste kao starter kulture ili kao dodaci prehrambenim proizvodima koji na taj način postaju okarakterizirani kao funkcionalna hrana, već i u ostalim granama industrije. Odabir adekvatnog probiotičkog soja za određenu svrhu od velike je važnosti jer nisu svi probiotički proizvodi isti, niti imaju ista nutritivna i terapijska svojstva, stoga je bitno da u određenom probiotičkom proizvodu bude soj koji će ispuniti svoju svrhu pri određenim uvjetima i u određenim koncentracijama. Proteklih godina, znanje o gastrointestinalnoj mikrobioti, prehrani, imunitetu i mehanizmima djelovanja se značajno povećalo, te u kombinaciji sa saznanjima o ljudskom genomu stvorili su prostor za izolaciju i karakterizaciju novih probiotika sa specifičnim mjestom djelovanja. I uz veliki napredak metoda i stečenih novih spoznaja svaki bakterijski soj prolazi selekciju prema određenim kriterijima kako bi se ustvrdilo da li je on pogodan izbor kao probiotički soj. Kriteriji prema kojima se odabire probiotički soj su opći, tehnološki i funkcionalni kriteriji (Tablica 1).

**Tablica 1.** Zahtjevi za izbor probiotičkih sojeva (Kullen i Klaenhammer, 1999; Kos, 2001; Šušković i sur., 2001, Frece, 2007).

<b>Opći kriteriji</b>	1.	Točna taksonomska identifikacija
	2.	Humano podrijetlo za humane probiotike
	3.	Netoksičnost i nepatogenost
	4.	Genetička stabilnost (nema prijenosa plazmida)
	5.	Otpornost prema žučnim solima
	6.	Otpornost prema niskim pH vrijednostima
<b>Tehnološki kriteriji</b>	7.	Stabilnost poželjnih karakteristika tijekom pripreme kulture, skladištenja i isporuke
	8.	Visoka razina broja živih bakterija u probiotičkom proizvodu ( $10^6$ - $10^8$ mL <sup>-1</sup> ili g <sup>-1</sup> ), npr. 100 g proizvoda osigurava $10^8$ - $10^{10}$ živih stanica
	9.	Brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje, koncentriranje, smrzavanje i liofiliziranje tijekom procesa pripreme probiotičkih kultura, te visok stupanj preživljavanja za vrijeme čuvanja i distribucije
	10.	Dobivanje željenih organoleptičkih svojstava kad su uključeni u fermentacijske procese /
<b>Funkcionalni kriteriji</b>	11.	Sposobnost preživljavanja, razmnožavanja i metabolizamske aktivnosti u "ciljanom" području primjene u organizmu
	12.	Sposobnost adhezije i kolonizacije crijevnog epitela
	13.	Produkcija antimikrobnih supstancija, uključujući bakteriochine, vodikov peroksid i organske kiseline
	14.	Antagonistička aktivnost prema patogenim i bakterijama uzročnicima karijesa
	15.	Mogućnost kompeticije sa sudionicima normalne mikroflore, uključujući iste ili srodne vrste, otpornost prema bakteriocinima, kiselinama ili drugim antimikrobnim supstancijama koje proizvodi autohton mikroflora
	16.	Imunomodulacijski učinak
	17.	Sposobnost iskazivanja jednog ili više klinički dokumentiranih korisnih učinaka na zdravlje

Soj koji se odabire kao potencijalni probiotik mora moći preživjeti uvjete niskog pH, enzime probavnog sustava i žučne soli u tankom crijevu. Soj mora imati visok stupanj preživljenja i treba biti stabilan tijekom skladištenja pri niskim temperaturama i u suhim bakterijskim pripravcima, preživljenje također mora biti visoko i kod čuvanja u dužem vremenskom periodu. Probiotički sojevi trebaju biti prisutni u minimalnoj koncentraciji od  $10^6$  do  $10^8$  stanica po gramu proizvoda. Soj ne smije proizvoditi okuse koji nisu svojstveni hrani u kojoj se nalaze

ni joj davati neželjenu teksturu kada bude inkorporiran u istu. Važno je da odabrani sojevi imaju antagonističko djelovanje prema patogenim organizmima koji također imaju sposobnost adhezije na mukozni sloj. Poželjno je da kada se nađe u tijelu odabrani soj potiče imunosni odgovor čime značajno doprinosi zdravlju domaćina (Frece i sur., 2009)

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. MATERIJALI**

##### **3.1.1. Radni mikroorganizmi**

U radu su korišteni izolati bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta prikupljeni tijekom lipnja 2020. godine koji su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica PBF-a.

Oznake korištenih izolata u ovom istraživanju: A1, A2, A3, A4, A5, A7, A12, B3, B6 i B12.

##### **3.1.2. Hranjive podloge i kemikalije**

###### **3.1.2.1. Hranjive podloge**

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- BH bujon sastav (g/L): brain heart infusion solids 17,5; peptokompleks 10; glukoza 2; natrijev klorid 5; dinatrijev hidrogenfosfat 2,5; agar 15. Potrebno je resuspendirati 52 g u 1000 mL hladne destilirane vode. Zagrijavati do otapanja, te sterilizirati u autoklavu na temperaturi od 121°C u vremenu od 15 minuta.
- BSM bujon sastav: natrijev klorid 3,62 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,26 g; (NH<sub>4</sub>)Cl 0,08 g; NaNO<sub>3</sub> 0,85 g; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 g; otopina elemenata u tragovima 1,00 mL; otopina vitamina 10,00 mL; Na-DL-laktat 1,12 g; ekstrakt kvasca 0,20 g; destilirana voda 936,50 mL, NaHCO<sub>3</sub> (8%) 52,50 mL.

Navedene sastojke potrebno je otopiti (osim vitamina i elemenata u tragovima) u destiliranoj vodi i kuhati 1-2 minute, te zatim ohladiti na sobnu temperaturu ispod 100% N<sub>2</sub>, sadržaj razdijeliti u posude za uzgoj kultura, te staviti u autoklav. Nakon sterilizacije dodati NaHCO<sub>3</sub>, vitamine i elemente u tragovima koji su prethodno pripremljeni. Podesiti pH na 8,2 i dodati natrijev sulfid (Na<sub>2</sub>S) iz sterilne anoksične otopine te postići finalnu koncentraciju od 100 μM prethodne inokulacije.

Otopina elemenata u tragovima, sastav: HCl (25%; 7,7 M) 10,00 mL; FeCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 1,50 g; MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 3,00 g; CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 0,10 g; ZnCl<sub>2</sub> 70 mg; MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O 100 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6 mg; CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 190 mg; CuCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 2,00 mg; NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 24 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 36 mg; destilirana voda 990 mL. Prvo otopiti FeCl<sub>2</sub> u HCl, zatim razrijediti u vodi, dodati i otopiti ostale soli. Pripraviti 1000,0 mL otopine.

- Podloga za određivanje hemolitičke aktivnosti Columbia krvni agar sastava: peptokompleks 10 g/l; triptoza 10 g/l; pepton 3 g/l; kukuruzni škrob 1 g/l; natrijev klorid 5 g/l; agar 12 g/l. Sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15 min. pH vrijednost podloge je 7,3. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodana 5% defibrirana ovčja krv, sadržaj je dobro promiješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

### 3.1.2.2. *Kemikalije*

- dikalijev fosfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- dinatrijev hidrogenfosfat dodekahidrat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- Ellmanov reagens (DTNB), „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD
- etanol, 70%, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- etanolna otopina DPPH radikala, „Sigma“, St. Louis, SAD
- kalijev fosfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- magnezijev fosfat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, „Kemika“, Zagreb, Hrvatska
- PBS pufer
- urea, „Merck“, Kenilworth, New Jersey, SAD

U radu su korišteni sljedeći antibiotici: amoksicilin, ampicilin, eritromicin, gentamicin, kanamicin, klindamicin, kloromfenikol, meticilin, neomicin, streptomycin, tetraciklin i vankomicin.

Za ispitivanje osjetljivosti izoliranih bakterijskih sojeva na antibiotike metodom difuzije korišteni su filter diskovi s poznatom koncentracijom određenog antibiotika.

### 3.1.3. Aparatura i pribor

- automatske pipete „Eppendorf“, Enfield, SAD
- čitač mikrotitarskih pločica, „Tecan“, Männedorf, Švicarska
- kiveta, „Eppendorf“, Enfield, SAD
- laboratorijske čaše (50, 100, 200 i 300 mL)
- laboratorijske epruvete i stalci
- magnetska miješalica MS-H-S
- menzure (10,50, 100 i 1000 mL)
- mikrotitarske pločice (sa 96 jažica)
- petrijeve zdjelice
- pH-metar „Mettler Toledo“, Zürich, Švicarska
- stalci za epruvete
- staklene kuglice ( $r = 2 \text{ mm}$ )
- centrifuga Z 206 A „Hermle“, Njemačka
- vaga analitička, „Sartorius“, Göttingen, Njemačka
- vibro-mješač EV-102, „Tehtnica“ Podplat, Slovenija

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Čuvanje i uzgoj bakterijskih izolata

Bakterijski izolati korišteni u ovom istraživanju bili su pohranjeni na  $-20 \text{ °C}$  u 30 % glicerolu te su uzgojeni tijekom 24 – 48 h u MRS i BSM hranjivom bujonu u termostatu na  $37 \text{ °C}$  prije početka eksperimenta. Izolati s oznakom A uzgajani su u MRS bujonu, dok su izolati s oznakom B uzgajani u BSM bujonu. Različiti uzgoji rezultat su izolacije čistih kultura pomoću različitih selektivnih podloga koja je prethodila izradi ovog diplomskog rada, a proveli su je djelatnici Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica PBF-a.

### 3.2.2. Priprema suspenzije bakterijskih stanica

Uzgojene stanice bakterija mliječne kiseline centrifugirane su pri 6000 o/min u vremenskom periodu od 10 minuta, a zatim isprane s 9 mL sterilne vode. Postupak se ponavlja još dva puta. Isprana masa resuspendirana je u sterilnoj deioniziranoj vodi formirajući konačnu suspenziju.

### 3.2.3. Priprema unutarstaničnog sadržaja

Unutarstanični sadržaj prekonočne biomase dobiven je u trostruko ponovljenom tretmanu s 2 ml suspenzije stanica i staklenih kuglica na vibromješaču uz 1 min hlađenja na ledu između tretmana. Nakon tretmana, razbijene stanice i staklene kuglice odvojene su od unutarstaničnog sadržaja centrifugiranjem 6000 o/min u vremenu od 10 min.

### 3.2.4. Ispitivanje otpornosti na niske pH vrijednosti

Ispitivani sojevi uzgojeni su prekonočno na MRS i BSM hranjivim podlogama. Uzgojeni sadržaj je centrifugiran 15 minuta na 6000 o/min. Nakon centrifugiranja dobiveni sadržaj je ispran sterilnom vodom i pripravljena je suspenzija u 8 mL sterilnog 0,5 NaCl. 2 mL suspenzije prebačeno je u 0,5% NaCl čiji je pH 1,5, te ostavljeno dva sata. Nakon tretmana iz uzorka koji sadrži bakterijske stanice pripravljena su decimalna razrjeđenja u destiliranoj vodi. Hranjiva podloga u Petrijevoj zdjelici nacijepljena je sa 100 µL šestog, sedmog i osmog decimalnog razrjeđenja. Nakon 48 sati inkubacije na temperaturi od 37°C izbrojane su porasle kolonije i izračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka (CFU/mL).

### 3.2.5. Hemolitička aktivnost izolata

Bakterijski izolati nacijepljeni su na ploče s krvnim agarom i inkubirani na 30 °C tijekom 24-48 h. Prozirne zone oko poraslih kolonija znak su da je došlo do hemolize krvi.

### 3.2.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost supernatanta sojeva A3, A4, A7, A12, A13 i A16 uzgojenih aerobno na MRS podlozi određuje se spram patogenih mikroorganizama *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Salmonella typhimurium* ATCC 27853 i *Listera monocytogenes* ATCC 2356. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti provodi se tako da se 140 µL supernatanta BMK, 130 µL BH bujona i 10 µL prethodno uzgojenih test mikroorganizama doda u jažice mikrotitarske ploče. Tijekom inkubacije od 48h na 37°C



mjerena je apsorbancija pri 620 nm uz pomoć čitača mikrotitarskih pločica. Promatran je rast mikroorganizama i određena je inhibicija prema sljedećem izrazu:

$$\text{postotak inhibicije (\%)} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) * 100$$

gdje je:

$A_t$  = apsorbancija u vremenu t

$A_0$  = apsorbancija u vremenu 0

Kontrolni uzorci su pripremljeni bez dodatka supernatanta bakterija mliječne kiseline, a slijepe probe su bili uzorci bez dodatka mikroorganizama.

### 3.2.7. Sposobnost koagregacije

Sposobnost koagregacije bakterijskih sojeva provedena je za bakterijske sojeve uzgojene na agaru tako da se porasle kulture pažljivo prikupe, te se pripremi suspenzija bakterijskih stanica u otopini fosfatnog pufera (PBS) čiji je pH 7,2. Bakterije koje su uzgojene u BS bujonu centrifugirane su pri 3000 o/min 5 minuta, isprane i resuspendirane u istom puferu. Za određivanje koagregacijske sposobnosti sojeva potrebno je pomiješati 2 ml probiotičkog soja i 2 mL suspenzije patogena u staklenoj epruveti, te vorteksirati. Koagregacija se određuje mjerenjem apsorbancije uzorka pri 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Mjerenje se provodi tako da se s površine suspenzija koja je ostavljena da miruje, u određeno vrijeme uzmu uzorci od 0,1 mL te se prenesu u jažice u mikrotitarskoj pločici. Apsorbancija je mjerena odmah nakon što se uzorak prenese u jažice, te nakon 24 sata.

Postotak koagregacije izračuna se iz formule:

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

gdje je:

$A_t$  – apsorbancija u vremenu (nakon 1,2,3,4, ili 5 sati)

$A_0$  – apsorbancija u vremenu 0

### 3.2.8. Određivanje antioksidativne aktivnosti bakterijskih izolata

#### 3.2.8.1. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala

Antioksidativna aktivnost izolata A4, A7, A12 i B12 uzgojenih anaerobno na BSM brothu tijekom 48 sati određuje se tako da je 1 mL pripremljene stanične kulture ( $\sim 10^8$ ) dodan u 2 mL etanolne otopine DPPH radikala (0,07 mM). Otopina je dobro izmiješana i prebačena

na inkubaciju 30 minuta u mraku. Uzorak se zatim centrifugira 5 minuta na 6000 o/min, nakon čega je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 517 nm. Za mjerenje je pripravljena slijepa proba koja sadrži etanol i stanice, a kontrole sadrže deioniziranu vodu i otopinu DPPH. Preostali DPPH postotak uklanjanja radikala izračunat je prema jednadžbi:

$$\text{postotak uklanjanja radikala (\%)} = \left[ 1 - \left( A_{UZ} - \frac{A_{bl}}{A_c} \right) \right] * 100$$

gdje je:

$A_{uz}$  = apsorbancija uzorka

$A_{bl}$  = apsorbancija slijepa probe

$A_c$  = apsorbancija kontrolnog uzorka

### 3.2.8.2. Mjerenje unutarstanične koncentracije glutationa

Za određivanje koncentracije glutationa (GSH) koristi se DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina), poznat pod nazivom Ellmanov reagens koji služi za određivanje tiolnih skupina u biološkim uzorcima. Potrebno je pripremiti 10 mM otopinu DTNB-a tako da se odvaži 0,037 g DTNB-a i pomiješa s 10 mL pufera te se otopina razrijedi još deset puta. Također, potrebno je pripremiti 0,3 molarni natrij fosfatni pufer tako da se pomiješa 10,744 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  i 4,68 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  u 100 mL destilirane vode. Pufere je potrebno pomiješati tako da konačni pH iznosi 5,1.

Supernatant je potrebno razrijediti šest puta tako da se u 50  $\mu\text{L}$  supernatanta dodaje 205  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera. 2500  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka pomiješa se s 200  $\mu\text{L}$  10 mM DTNB-a te se odmah spektrofotometrijski mjeri optička gustoća uzorka na valnoj duljini od 412 nm prema slijepoj probi. Slijepa proba umjesto uzorka sadrži 2500  $\mu\text{L}$  vode. Na temelju apsorbancije indirektno se dobiva podatak o koncentraciji, a koja se računa prema formuli:

$$c = \frac{A}{\epsilon}$$

gdje je:

$c$  = koncentracija GSH u uzorku

$A$  = apsorbancija na 412 nm

$\epsilon$  =  $14,10 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

### 3.2.9. Određivanje osjetljivosti na antibiotike

Ispitivanje osjetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike provedeno je metodom difuzije na krutim hranjivim podlogama. Prekonoćna bakterijska kultura (100  $\mu\text{L}$ ), čija se osjetljivost

ispituje, nacijepljena je u epruvetu koja sadrži 12 mL MRS-agar hranjive podloge koja je prethodno otopljena i ohlađena na 50°C. Tako inokulirana podloga izlije se u Petrijeve zdjelice. Kad se hranjiva podloga skrutne, sterilnom pincetom nanose se filter-diskovi s antibioticima. Petrijeve ploče su inkubirane pri 37°C preko noći, nakon čega slijedi mjerenje promjera zone inhibicije, uključujući i promjer diska.



**Slika 2.** Zone inhibicije vidljive nakon prekonocne inkubacije pri 37°C (vlastita fotografija).

### 3.2.10. Hidrofobnost stanične površine

Hidrofobnost stanične površine sojeva A4, A7 i B12 provodi se tako da se ispituje adhezivnost sojeva na odabrane ugljikovodike. Bakterijske kulture u svojoj log fazi centrifugirane su na 8000 o/min u trajanju od 10 minuta. Stanice se nakon centrifugiranja ispiru deioniziranom vodom i resuspendiraju u fosfat urea magnezij sulfatnom puferu. Pufer se priprema tako da se pomiješa 2, 22 g  $K_2HPO_4$ , 0,726 g  $KH_2PO_4$ , 0,18 g uree i 0,02 g  $MgSO_4$ . 3 mL stanične suspenzije prebaci se u staklenu epruvetu, te doda 1 mL ugljikovodika. Za ispitivanje hidrofobnosti korištena su tri različita ugljikovodika, butan, toluen i ksilen. Epruvete u kojima se nalazi pripravljena stanična suspenzija stave se na inkubaciju na temperaturu od 37°C 10 minuta, te se nakon provedene inkubacije sadržaj vorteksira 15 sekundi. Stanična

suspenzija se zatim ponovno stavlja na inkubaciju pri istoj temperaturi u vremenu od 30 minuta kako bi došlo do odvajanja faza. Donja vodena faza pažljivo se sakupi, te se mjeri apsorbancija na valnoj duljini od 600 nm.

Postotak hidrofobnosti računa se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ hidrofobnosti} = \left( \frac{OD_i - OD_t}{OD_t} \right) \times 100$$

Gdje je:

$OD_i$  = apsorbancija izmjerena u vremenu  $t=0$

$OD_t$  = apsorbancija izmjerena u vremenu  $t = 30 \text{ min}$

### 3.2.12. Preživljavanje u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava

Simulirani uvjeti usne šupljine ostvareni su u obliku otopine različitih soli: KCl (0,8946 g/L),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,8878 g/L),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1,680 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (1,680 g/L) i  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (0,1981 g/L) kojoj je pH podešen na 6,83 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

Simulirani želučani sok pripremljen je suspendiranjem pepsina (3 g/L) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 g/L), KCl (0,8946 g/L),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,8878 g/L),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1,680 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (1,680 g/L),  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (0,1981 g/L) kojoj je pH podešen na 3,03 s koncentriranom kloridnom kiselinom.

Simulirani sok tankoga crijeva pripremljen je suspendiranjem pankreatina (1 g/L) i žučnih soli (3,0 g/L) u otopini sljedećih soli: NaCl (9 g/L), KCl (0,8946 g/L),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,8878 g/L),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (1,680 g/L),  $\text{NaHCO}_3$  (1,680 g/L),  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (0,1981 g/L) kojoj je pH podešen na 7,09 s koncentriranom kloridnom kiselinom

### 3.2.11. Preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom liofilizacije

Bakterijske kulture uzgojene na MRS hranjivoj podlozi su centrifugirane (4000 o/ 10 min), isprane sterilnom destiliranom vodom i resuspendirane u obranom mlijeku (10 %). Tako priređene suspenzije stanica zamrznute su na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  preko noći, a zatim su liofilizirane u liofilizatoru (model Alpha 1–2 LD Plus; Christ, Osterode am Harz, Njemačka). Preživljavanje stanica nakon procesa liofilizacije određeno je indirektnom metodom koja se provodi tako da se pripremljena decimalna razrijeđenja uzorka koji sadrži bakterijske stanice u sterilnoj destiliranoj vodi nacijspe na MRS hranjivu podlogu u Petrijevoj zdjelici. Inkubacija se provodi na  $37^\circ\text{C}$  u vremenskom period od 48 sati. Nakon inkubacije izbrojane su porasle kolonije te je

izračunat broj bakterijskih stanica po mililitru uzorka (CFU/mL) te se uspješnost liofilizacije usporedi s početnim brojem stanica u suspenziji.

### 3.2.12. Identifikacija odabranog probiotičkog izolata (API 50 CHL)

Ispitivana bakterijska kultura uzgojena je na MRS agaru anaerobno tijekom 24 sata pri 37 °C. Pomoću mikrobiološke ušice se u kivetu koja sadrži API 50 CHL medij, dodalo nekoliko kolonija s MRS agara. Gustoća inokuluma mjerena je u denzimetru, te je iznosila 2 McF. Pripremljena suspenzija se prebacila u epruvete API 50 CH V5.1 stripa koji sadrži 49 različitih ugljikohidrata. Nakon dodatka mineralnog ulja koje osigurava anaerobne uvjete, provedena je inkubacija pri 37 °C kroz 48 sati, nakon čega su očitani rezultati. Prema uputama proizvođača praćene su promjene boje u žuto, uslijed acidifikacije i prisutnosti bromkrezol purpurnog indikatora. Biokemijski profil je identificiran pomoću programa na računalu koji sadrži bazu podataka (V 5.1). Razina pouzdanosti izražena je kao izvrsna ( $\geq 99.9\%$ ), veoma dobra ( $\geq 99.0\%$ ), dobra ( $\geq 90.0\%$ ), prihvatljiva ( $\geq 80\%$ ) ili neprihvatljiva identifikacija ( $< 80\%$ ).

### 3.2.13. Statistička obrada podataka

Svi pokusi provedeni su u triplikatu. Za statističku obradu podataka korišten je program STATISTICA v.7.1. za Windows 10 (Stat-Soft, Tulsa, OK, SAD). Prije statističke obrade rezultati dobiveni u istraživanjima su pripremljeni i uređeni u programu Microsoft Office Excel 2013.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je probiotička karakterizacija bakterija prethodno izoliranih iz stolice dojenčeta pohranjenih u Zbirci mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Istraženi izolati pohranjeni su i istraživani pod navedenim oznakama: A1, A2, A3, A4, A5, A7, A12, B3, B6 i B12. Cilj rada bio je pronaći najbolje sojeve koji zadovoljavaju probiotičke kriterije te se mogu primijeniti u probiotičkim proizvodima.

Prilikom navedenog, istraživanim sojevima ispitani su odabrani tehnološki, sigurnosni i funkcionalni kriteriji te je na osnovu rezultata odabran soj s najvećim probiotičkim potencijalom.

### 4.1. OTPORNOST NA NISKE pH VRIJEDNOSTI

Početni kriterij probiotičkog potencijala istraživanih sojeva bio je ispitivanje otpornosti na niske pH vrijednosti kako bi se odabrali oni izolati koji mogu preživjeti u uvjetima niskog pH želuca te tako kasnije nakon prolaska ispoljiti korisne učinke. Rezultati preživljenja prikazani su u tablici 2. Sedam od deset sojeva je preživjelo stresne uvjete niskog pH te time iskazalo probiotički potencijal. Određen je i konačan broj preživjelih stanica te je iz rezultata vidljivo da je pad broja stanica ovisan o ispitivanom soju te je najmanji kod izolata s oznakom A3. Ostali izolati iskazali su statistički značajno smanjenje broja no stupanj preživljenja je na dovoljnoj razini kako bi ih se uključilo u daljnja istraživanja.

Mantzourani i sur. (2019) proveli su istraživanje koje je uključivalo 48 bakterijskih sojeva, od kojih je 39 okarakterizirano da pripadaju rodu *Lactobacillus*. Sojevi su naknadno izloženi uvjetima u kojima je pH ispod 3. Šest sojeva pokazalo je dobro preživljenje pri pH 3, dok su dva soja pokazala dobro preživljenje pri pH 2. Sojevi koji su u navedenoj studiji pokazali dobro preživljenje pri izrazito niskom pH 2, nakon provedenog niza testova pokazali su se i kao sojevi koji imaju najbolji probiotički karakter.

Istraživanje u sklopu kojeg su Grosu-Tudor i Zamfir (2012) testirali šest sojeva bakterija mliječne kiseline na niske uvjete pH (2-4) pokazalo je kako svi sojevi mogu preživjeti uvjete u kojima je pH 3 i pH 4. Preživljenje sojeva koji su 24 sata bili izloženi navedenim pH vrijednostima kretalo se između  $10^9$  CFU/mL i  $10^{12}$  CFU/mL. Izloženi uvjetima još niže pH vrijednosti četiri testirana soja pokazala su dobro preživljenje nakon 3 sata tretmana pri pH 2, a čije preživljenje je iznosilo najmanje  $10^8$  CFU/mL. Soj koji je identificiran kao *Lactobacillus brevis* pokazao je mogućnost preživljenja ( $10^4$  CFU/mL) na pH 2 u trajanju od 24 sata. Koliko će biti preživljenje soja kada je izložen djelovanju niskog pH ovisi od soja do soja, te je stoga

vrlo važno da se prilikom karakterizacije eliminiraju sojevi koji ne zadovoljavaju navedeni kriterij.

**Tablica 2.** Otpornost pri niskim pH vrijednostima (pH 2) ispitivanih izolata bakterija mliječne kiseline iz stolice dojenčeta prikazana kao konačni broj stanica nakon tretmana u odnosu na početni broj stanica.

ISPITIVANI SOJ	POČETNI BROJ	PROSUTNOST NAKON TRETMANA	KONAČNI BROJ	PROBIOTIČKI POTENCIJAL
A1	>10 <sup>6</sup>	-	-	NE
A2	>10 <sup>6</sup>	-	-	NE
A3	>10 <sup>6</sup>	+	1x10 <sup>6</sup>	DA
A4	>10 <sup>6</sup>	+	3,5x10 <sup>4</sup> *	DA
A5	>10 <sup>6</sup>	-	-	NE
A7	>10 <sup>6</sup>	+	1,8x10 <sup>5</sup> *	DA
A12	>10 <sup>6</sup>	+	1,8x10 <sup>5</sup> *	DA
B3	>10 <sup>6</sup>	+	3,9x10 <sup>5</sup> *	DA
B6	>10 <sup>6</sup>	+	2,5x10 <sup>5</sup> *	DA
B12	>10 <sup>6</sup>	+	3,1x10 <sup>4</sup> *	DA

\* statistički značajno smanjenje broja stanica (p<0.05)

#### 4.2. HEMOLITIČKA AKTIVNOST

Nacjeppljivanjem na krvni agar određen je sigurnosni probiotički kriterij za ispitivane sojeve. Porastom na krvnom agaru, ukoliko dođe do pojava obojanih ili prozirnih zona oko poraslih kolonija, vidljiva je hemolitička aktivnost. Rezultati ispitivanja hemolitičke aktivnosti prikazani su u tablici 3. Jedino je kod soja pod oznakom B16 bila prisutna svijetla zona što je ukazalo na hemolitičku aktivnost pa je posljedično tome soj uklonjen iz daljnjih istraživanja. Svijetla zona pokazatelj je oslobađanja staničnih sastojaka iz eritrocita, trombocita i leukocita u izvanstaničnu tekućinu. Sukladno dobivenom rezultatu može se zaključiti kako soj B16 nije prihvatljiv kao probiotički soj jer postoji opasnost za ljudsku upotrebu. Ostali ispitivani sojevi zadovoljili su navedeni sigurnosni kriterij jer oko poraslih kolonija nisu bile vidljive zone koje bi upućivale na hemolizu krvi.

**Tablica 3.** Hemolitička aktivnost ispitivanih izolata bakterija mliječne kiseline.

<b>BAKTERIJSKI SOJ</b>	<b>REZULTAT</b>
<b>A3</b>	NZ
<b>A4</b>	NZ
<b>A7</b>	NZ
<b>A12</b>	NZ
<b>B3</b>	NZ
<b>B6</b>	SVIJETLA ZONA
<b>B12</b>	NZ

nz – nema vidljive zone

Nekoliko je studija je provedeno kako bi se utvrdila hemolitička aktivnost određenih sojeva bakterija mliječne kiseline. Hemolitička aktivnost izoliranih sojeva procijenjena je i klasificirana obzirom na tip lize crvenih krvnih stanica oko poraslih kolonija u krvnom agaru. Oko poraslih kolonija mogu se uočiti zelene zone ( $\alpha$ -hemoliza), čiste zone ( $\beta$ -hemoliza) ili nema pojave zona ( $\gamma$ -hemoliza) nastalih na krvnom agaru. Samo oni sojevi kod kojih je utvrđena  $\gamma$ -hemoliza su sigurni. Ispitivanje hemolitičke aktivnosti posebice je važno prilikom karakterizacije sojeva iz novih izvora. Hemolitičku aktivnost novih probiotika roda *Lactobacillus* izoliranih iz mlijeka kopitara određivali su Kostelac i sur. (2021). Yasmin i sur. (2020) navedeno su proveli za bakterije roda *Bifidobacterium*. U obje navedene studije hemolitička aktivnost bila je važan pokazatelj sigurnosti i mogućnosti sojeva da se koriste u ljudskoj prehrani.

#### 4.3. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

Inhibicija patogenih mikroorganizama u prisutnosti supernatanta ispitivanih izolata BMK prikazana je u tablici 4 Antimikrobna aktivnost iskazana je kao postotak inhibicije test mikroorganizma nakon 24 h uzgoja u prikladnim hranjivim podlogama. Razina inhibitornog djelovanja različita je za svaki istraživani izolat i patogenu bakteriju. Najveći stupnjevi inhibicije primijećeni su kod *L. monocytogenes* gdje su četiri istraživana izolata (A4, A7, A12 i B12) inhibirala rast navedenog patogena preko 70 %. Izolat A7 je inhibirao je rast *L. monocytogenes* preko 90 %. Niži stupnjevi inhibicije primijećeni su kod *E. coli* i maksimum je bio 52 % (izolat A12). Slična maksimalna inhibicija primijećena je kod *S. typhimurium* i iznosila je oko 50 % (B12) te kod *S. aureus* gdje je maksimalna inhibicija bila oko 66 % (B12). Rezultati ukazuju da je sumarnu najvišu inhibiciju patogena iskazao izolat pod oznakom B12.



**Tablica 4.** Postotak inhibicije kao mjera antibakterijskog djelovanja odabranih bakterijskih sojeva prema test-mikroorganizmima: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932, *Salmonella typhimurium* ATCC 27853 i *Listeria monocytogenes* ATCC 2356.

Inhibicija rasta test-mikroorganizma (%)				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>A3</b>	2,33	1,75	4,46	8,88
<b>A4</b>	8,54	43,44	50,76	84,95
<b>A7</b>	21,99	28,40	29,67	91,31
<b>A12</b>	31,98	42,11	50,53	78,43
<b>B3</b>	4,36	22,95	12,07	4,70
<b>B12</b>	52,40	51,55	65,90	71,29

Pregledom rezultata danih u tablici 4 može se zaključiti kako sojevi A3 i B3 nemaju veliku sposobnost inhibicije odabranih test-mikroorganizama što nije poželjna karakteristika kod sojeva sa probiotičkim potencijalom. Stoga se sojevi A3 i B3 nisu koristili u daljnjem istraživanju.

U istraživanju provedenom od strane Frece i sur. (2014) *Lactococcus lactis* spp. *lactis* pokazao je najslabiju antimikrobnu aktivnost spram patogena na koje su testirani i sojevi unutar ovog rada, sa sojem B12. Naime, *L. lactis* ssp. *lactis* izolat inhibirao je rast testnog patogena unutar 72 sata u sljedećim postotcima: *E. coli* 73,4 - 85,4 %, *Salmonella* spp. 62,7 - 88,6 %, *S. aureus* 51,5 - 87,0 % i *L. monocytogenes* 61,0 - 82,4 %. Najveća odstupanja u usporedbi sa navedenim izolatom koji ima iznimno dobro antimikrobno djelovanje primijećena su kod izolata A3 i B3. Kos i sur. (2008) u svom su istraživanju testirali su antimikrobno djelovanje tri odabrana soja BMK. Određeno je djelovanje sojeva *L. plantarum*, *E. faecium* L3 i *L. acidophilus* M92 spram patogena *Salmonella typhimurium* i *L. monocytogenes*. Sva tri soja pokazala su jaku antimikrobnu aktivnost na korištene patogene. Najbolje antimikrobno djelovanje spram *L. monocytogenes* u ovom radu pokazao je soj A7, čak 91 %. Kostelac i sur. (2021) odredili su antimikrobno djelovanje dva soja BMK, *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9. Prema njihovom istraživanju inhibicijsko djelovanje *L. plantarum* M2 prema *Salmonella typhimurium* izmjereno je u postotku od 68,18 %, dok je isti soj pokazao inhibicijsko djelovanje prema *S. aureus* u postotku od 57,23 %. *L. plantarum* KO9 inhibirao je rast *S. typhimurium* 81,29 %. Niti jedan od sojeva čije se antimikrobna aktivnost mjerila u ovom radu nije pokazao tako visoko inhibitorno djelovanje prema *S. typhimurium*. Iz navedenog se može zaključiti kako je antimikrobna aktivnost važno svojstvo te ovisi o soju.

#### 4.4 SPOSOBNOST KOAGREGACIJE

Sposobnost koagregacije bakterijskih sojeva koji su pokazali probiotički potencijal prilikom provedbe prethodnih pokusa prikazana je u tablici 5. Kod svih istraživanih izolata primijećena je koagregacija s patogenim mikroorganizmima. Sposobnost koagregacije očekivano varira među ispitivanim sojevima. Sumarno je izolat pod oznakom A4 pokazao najveći stupanj koagregacije sa svim patogenima i to vrlo visokih 90 % nakon 24 h tretmana. Izolati pod oznakama A7 i B12 također su iskazali značajan stupanj koagregacije, preko 60 %, u svim slučajevima. Najniži stupnjevi primijećeni su kod izolata A12 (do 30 %).

**Tablica 5.** Postotak koagregacije odabranih bakterijskih sojeva sa odabranim test-mikroorganizmima *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 i *Listeria monocytogenes* ATCC 2356.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>A4</b>	88,90	87,44	93,28	88,45
<b>A7</b>	69,44	64,61	71,41	85,05
<b>A12</b>	39,48	21,74	31,63	32,33
<b>B12</b>	74,04	75,26	75,48	62,45

Koagregacija omogućava probiotičkim sojevima da inhibiraju potencijalne patogene bakterije tako što osigurava blisku interakciju sa patogenim bakterijama, odnosno između dva različita bakterijska soja.

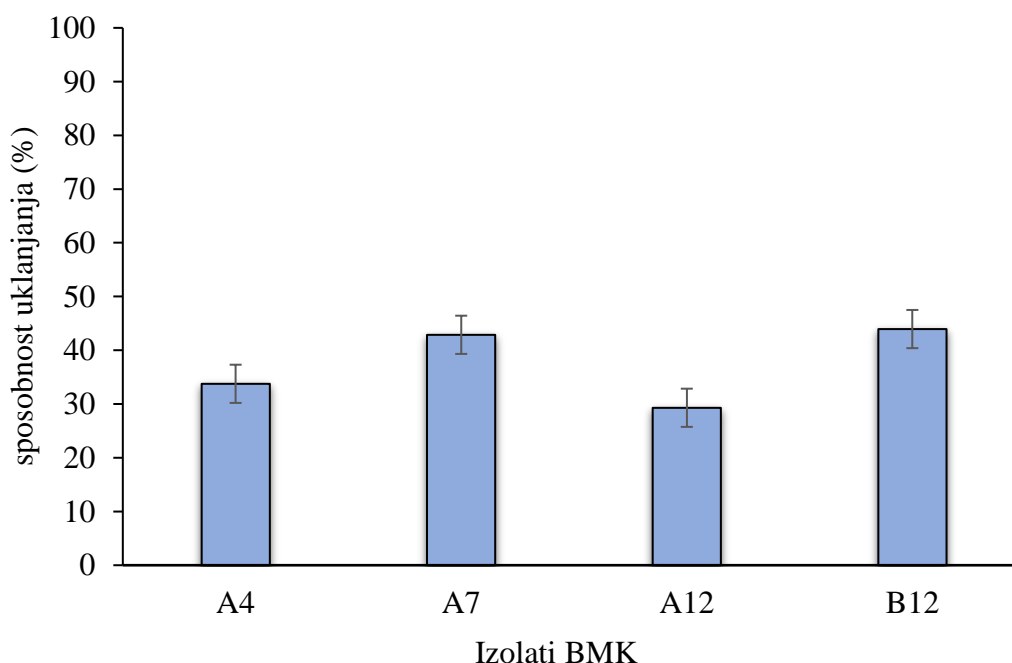
Kos i sur. (2003) ispitali su koagregaciju soja *L. acidophilus* M92 i dva enteropatogena, *S. typhimurium* i *E. coli*. Dobiveni rezultati pokazali su kako je postotak koagregacije nakon pet sati, sa *E. coli* 15,11 %, a sa *S. typhimurium* 15,70 %. Svi sojevi čija se koagregacija s patogenima ispitala u ovom radu imaju veći postotak koagregacije nego soj *L. acidophilus* M92. Koagregacija sojeva *L. plantarum* M2 i *L. plantarum* KO9 ispitana je s odabranim patogenima (*E.coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*) u periodu od 24 sata u istraživanu provedenom od strane Kostelac i sur. (2021). Najbolju koagregaciju soj *L. plantarum* M2 od 27,53 %, ostvario je s patogenom *S. aureus*, dok *L. plantarum* KO9 najveći postotak koagregacije od 48,17 % ima sa *E.coli*. Svi sojevi čiji se stupanj koagregacije mjerio u ovom radu imaju veći stupanj koagregacije sa patogenom *S. aureus*, dok jedino soj A12 ima manji postotak koagregacije (39,48) sa *E. coli* nego *L. plantarum*.

## 4.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Antioksidativna aktivnost sposobnost je pojedinih sojeva bakterija mliječne kiseline da neutraliziraju lančane reakcije slobodnih radikala, sprječavaju nastanak bolesti koje su posljedica oksidacijskog stresa i štite organizam od štetnog djelovanja prooksidansa.

### 4.5.1. Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala

DPPH metoda korištena je za ispitivanje antioksidativne aktivnosti i sposobnosti komponenata da se ponašaju kao „hvatači“ radikala ili donori vodika. Rezultati sposobnosti uklanjanja DPPH slobodnih radikala prikazana je na slici 3. Izolati A7 i B12 uklonili su najveći postotak slobodnih radikala (približno 43 %) te među njihove sposobnosti nije bilo statistički značajne razlike. Izolati A4 i A12 uklonili su značajno manje radikala (približno 30 %).



**Slika 3.** Sposobnost uklanjanja DPPH slobodnih radikala bakterija izoliranih iz stolice dojenčeta izražena kao postotak uklanjanja  $\pm$  standardna devijacija.

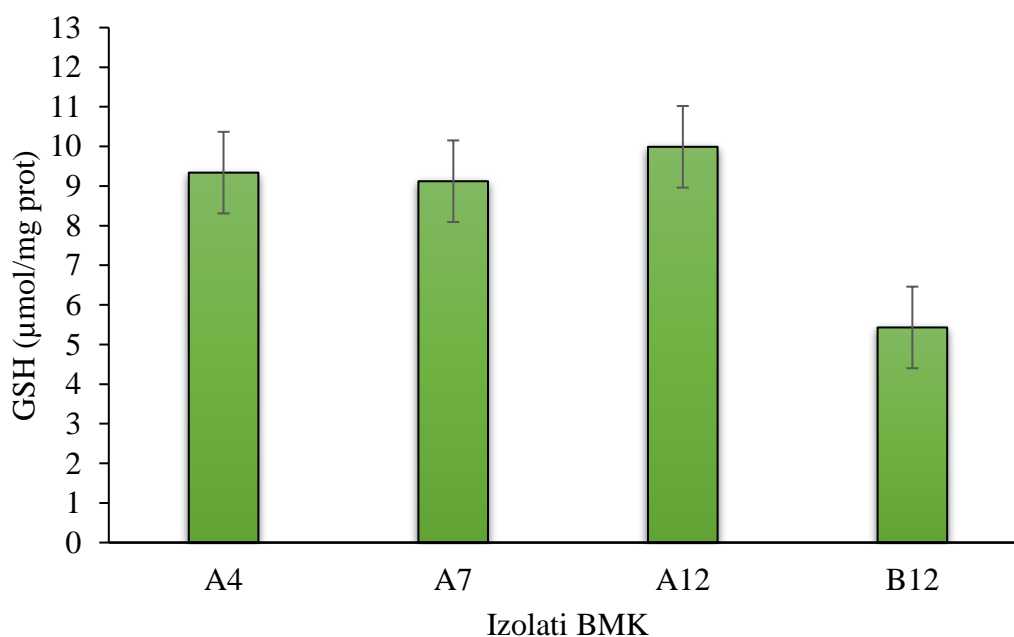
Sposobnost uklanjanja DPPH sojeva izoliranih iz stolice dojenčeta znatno je manja u usporedbi sa postotkom uklanjanja DPPH sojeva *Bifidobacterium* u istraživanju Yasmin i sur. (2020). U spomenutom istraživanju pokazalo se kako soj b-11 ima najbolju sposobnost uklanjanja DPPH, što u postotku iznosi 87,72 %. U ovom radu, sojevi B12 i A7 uklonili su približno 43% slobodnih radikala što je znatno manje u usporedbi sa sojem b-11. Ostali sojevi

*Bifidobacterium* kojima se mjerila sposobnost uklanjanja DPPH pokazali su iznimno velike postotke uklonjenog DPPH ( $> 70\%$ ).

#### 4.5.2. Mjerenje unutarstanične koncentracije glutaciona

Glutation štiti bitne stanične komponente od slobodnih radikala i peroksida, te je jedna od najvažnijih molekula u antioksidativnoj zaštiti. Izmjerena unutarstanična koncentracija glutaciona istraživanih izolata BMK prikazana je na slici 4. Izolati A4, A7 i A12 nisu pokazali statistički značajnu razliku u proizvodnji unutarstaničnog glutaciona te je ona iznosila približno  $9\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ . Izolat B12 je pokazao najnižu vrijednost unutarstaničnog glutaciona od približno  $5\ \mu\text{mol}/\text{mg}$ .

Kullisaar i sur. (2010) proveli su istraživanje u sklopu kojeg su mjerili koncentraciju unutarstaničnog glutaciona probiotičkog soja *Lactobacillus fermentum* ME-3. Izmjerena je koncentracija glutaciona u *L. fermentum* ME-3 nakon inkubacije u MRS-u ili mlijeku, u trajanju od 9 i 24 sata. Rezultati su pokazali da je sinteza glutaciona u *L. fermentum* ME-3 najveća kada je kultura porasla u mlijeku tijekom 24 sata, a koncentracija glutaciona je iznosila  $20,0 \pm 10,0$  nmol GSH/mg proteina. Izolati iz stolice dojenčeta kojima je u ovom radu mjerena unutarstanična koncentracija glutaciona pokazali su znatno veću sposobnost da zaštite stanice od slobodnih radikala i peroksida.



**Slika 4.** Izmjerena unutarstanična koncentracija glutaciona odabranih sojeva BMK izoliranih iz stolice dojenčeta izražena kao  $\mu\text{mol}/\text{mg prot} \pm$  standardna devijacija.

#### 4.6. ODREĐIVANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE

Važan sigurnosni kriterij prilikom probiotičke karakterizacije je ispitivanje osjetljivosti na antibiotike. Naime, kako bi se spriječio razvoj rezistencije na antibiotike ili eventualan prijenos gena odgovornih za rezistenciju na pojedine antibiotike. Kako probiotički mikroorganizmi ne bi sudjelovali u navedenim neželjenim procesima, važno je ispitati njihovu osjetljivost na antibiotike.

Ispitana je osjetljivost odabranih probiotičkih sojeva na dvanaest antibiotika (amoksicilin, ampicilin, eritromicin, gentamicin, kanamicin, klindamicin, kloramfenikol, meticilin, neomicin, steptomycin, tetraciklin i vankomicin). Rezultati antibiograma su prikazani u tablici 6.

**Tablica 6.** Tablica rezultata osjetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike metodom difuzije na krutim hranjivim podlogama izražena kao promjer zone inhibicije.

Antibiotici	A4	A7	A12	B12
<b>Amoksicilin</b>	14 mm	26 mm	21 mm	kompletna inh.
<b>Ampicilin</b>	16 mm	kompletna inh.	18 mm	kompletna inh.
<b>Eritromicin</b>	19 mm	22 mm	17 mm	kompletna inh.
<b>Gentamicin</b>	3 mm	-	2 mm	kompletna inh.
<b>Kanamicin</b>	-	-	-	kompletna inh.
<b>Klindamicin</b>	18 mm	kompletna inh.	16 mm	kompletna inh.
<b>Kloramfenikol</b>	21 mm	15 mm	15 mm	kompletna inh.
<b>Meticilin</b>	5 mm	5 mm	7 mm	kompletna inh.
<b>Neomicin</b>	5 mm	4 mm	9 mm	kompletna inh.
<b>Steptomycin</b>	7 mm	13 mm	-	kompletna inh.
<b>Tetraciklin</b>	18 mm	kompletna inh.	17 mm	kompletna inh.
<b>Vankomicin</b>	-	25 mm	-	kompletna inh.

- nije zabilježena inhibicija rasta

Između četiri soja kojima se određivala osjetljivost na dvanaest učestalih antibiotika, soj koji je pokazao najveću osjetljivost na djelovanje svih korištenih antibiotika je B12. Pregledom hranjivih podloga unutar kojih su bili postavljeni antibiotikom natopljeni diskovi, uočena je pojava kompletne inhibicije na rast bakterijskog soja. Sukladno tome, može se

zaključiti da soj B12 nije razvio rezistentnost ni prema jednom od antibiotika koji su korišteni za ispitivanje. Preostala tri soja kojima je mjerena otpornost na djelovanje antibiotika pokazali su različite rezultate ovisno o antibiotiku. Najmanju osjetljivost sva tri soja pokazala su prema Kanamicinu, što je vidljivo nakon pregleda ploča, prema tome što nema zone inhibicije. Mala zona inhibicije uočena je i oko diska natopljenog antibiotikom Gentamicinom, a kod soja A7 zona inhibicije nije ni prisutna. Veliku otpornost sojevi A4, A7 i A12 imaju i na djelovanje Metecilina i Neomicina.

U sklopu potencijalne probiotičke karakterizacije bakterije mliječne kiseline Alkalbani i sur. (2019) proveli su ispitivanje kakva je otpornost izoliranih sojeva na odabrane antibiotike. Ispitana je osjetljivost trinaest izoliranih sojeva na djelovanje pet učestalih antibiotika. Deset od trinaest sojeva pokazalo je veliku osjetljivost na djelovanje Ampicilina. Dobiveni rezultat u skladu je sa provedenim istraživanjem u sklopu ovoga rada koje je pokazalo kako Ampicilin potpuno inhibira djelovanje dva ispitana soja, B12 i A7, od četiri soja kojima je određivana osjetljivost.

#### 4.6. HODROFOBNOST STANIČNE POVRŠINE

Rezultati hidrofobnosti stanične površine prikazani su u tablici 7. Najviši stupanj hidrofobnosti primijećen je kod izolata B12 na butanolu dok je isti izolat pokazao nešto niži stupanj hidrofobnosti na toulenu i ksilenom. Izolati A4 i A7 su iskazali značajno manju hidrofobnost pri sva tri istraživana ugljikovodika dok su vrijednosti izolata A7 vrlo niske te time nije zadovoljio probiotički kriterij.

**Tablica 7.** Hidrofobnost stanične površine bakterijskih sojeva na odabrane ugljikovodike (butanol, toluen i ksilen) izražena kao postotak  $\pm$  standardna devijacija.

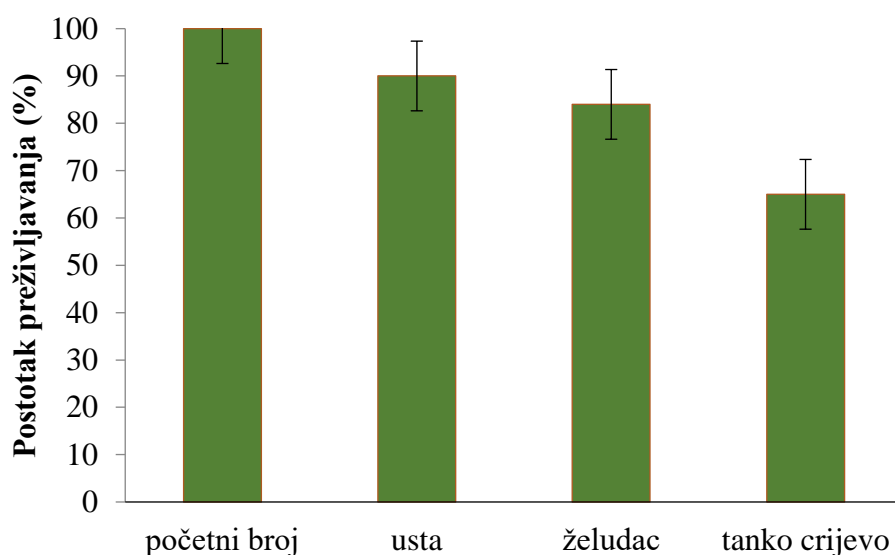
	Hidrofobnost (%)		
	A4	A7	B12
<b>OD<sub>POČ</sub> (OD<sub>i</sub>)</b>			
<b>OD<sub>t</sub> Butanol</b>	12,6 %	1,6 %	22,8 %
<b>OD<sub>t</sub> Toulene</b>	6,8 %	3,7 %	8,3 %
<b>OD<sub>t</sub> Xylene</b>	8,2 %	2,1 %	9,9 %

Hidrofobnost stanične površine sojeva A4, A7 i B12 koja je ispitana u ovom radu u skladu je sa rezultatima dobivenim u istraživanju koje je provedeno od strane Alkalbani i sur. (2019). Rezultati njihova istraživanja pokazali su relativno nisku hidrofobnost, izuzev dva soja

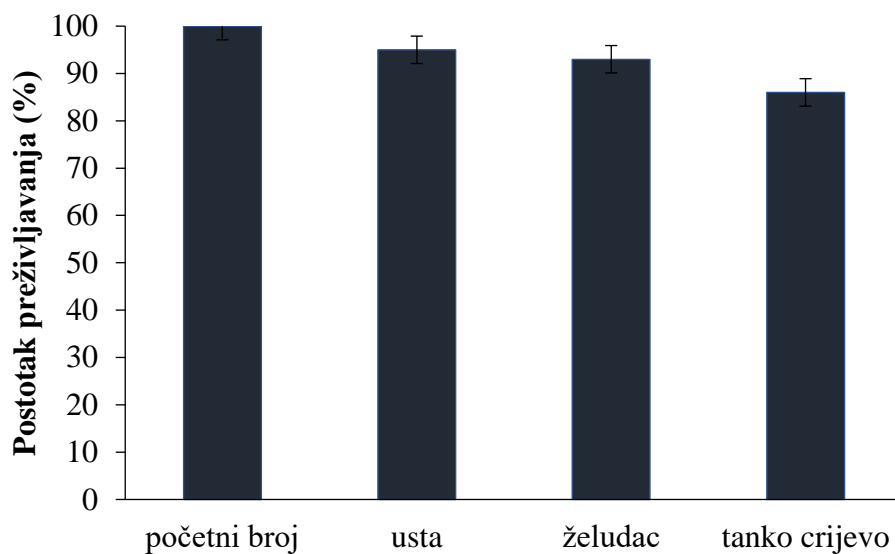
kod kojih je hidrofobnost bila  $> 44\%$  i  $> 27\%$ . Najveću hidrofobnost od testiranih sojeva u ovom radu pokazao je soj B12,  $22\%$ .

#### 4.7. PREŽIVLJENJE PROBIOTIČKIH SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Ispitano je preživljenje potencijalnih probiotičkih sojeva A4 i B12 u simuliranim uvjetima usne šupljine, simuliranom želučanom soku te simuliranom soku tankog crijeva koji sadrži sok gušterače i žuč. Rezultati su prikazani na slici 5 za izolat A4 te na slici 6 za izolat B12.



**Slika 5.** Preživljenje potencijalnog probiotičkog izolata A4 u simuliranim uvjetima usne šupljine, simuliranom želučanom soku i simuliranom soku tankog crijeva izraženo kao postotak  $\pm$  standardna devijacija.



**Slika 6.** Preživljenje potencijalnog probiotičkog izolata B12 u simuliranim uvjetima usne šupljine, simuliranom želučanom soku i simuliranom soku tankog crijeva izraženo kao postotak  $\pm$  standardna devijacija.

Oba soja pokazala su visok stupanj preživljenja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog sustava. Najveći pad broja zabilježen je u simuliranim uvjetima želuca. Konačan stupanj preživljenja kod navedenih sojeva je 86 % za izolat B12 te 65 % za izolat A4. Dobiveni rezultati u skladu su sa istraživanjima koja su proveli Naissinger da Silva i sur. (2021) i Millette i sur. (2013). Navedena istraživanja također su pokazala da je pad broja živih stanica bakterija mliječne kiseline najveći u uvjetima želuca kao što je slučaj i u ovom radu.

#### 4.2. PREŽIVLJENJE PROBIOTIČKOG SOJA B12 TIJEKOM LIOFILIZACIJE

Provedena je liofilizacija probiotičkog soja B12 koji je tijekom svih prethodno provedenih testova pokazao najbolje karakteristike, te zadovoljio sve preduvjete koje nužno mora ispuniti probiotički soj. Kod liofilizata B12 određeno je preživljenje nakon rehidracije kako bi se izračunala uspješnost provedenog procesa. Nakon liofilizacije, izračunata je uspješnost liofilizacije koja je iznosila 92 %.

Liofilizacija je proces koji se često provodi unatoč stresnim uvjetima kojima je stanica izložena tijekom samog procesa. Ukoliko je potrebno, dodaju se različiti lioprotektori kako bi se povećao postotak preživjelih stanica. U ovom slučaju, kao lioprotektor dodano je obrano mlijeko i vidljivo je da soju B12, čiji je postotak preživljenja 92 %, odgovara korišteni lioprotektor. Bolla i sur. (2011) u svojem su istraživanju pokazali kako postoje značajne razlike u preživljenju ovisno o korištenom lioprotektoru. Sukladno toj tvrdnji, u istraživanju



Savedboworn i sur. (2017) liofilizirali su *L. plantarum* TISTR 2075 i kao lioprotektor korišten je proteini. Preživljenje ovog soja uz navedeni lioprotektor bilo je svega 23,45 %, dok je najveće preživljenje uočeno kada je kao lioprotektor korištena trehaloza. Primijećeni pad preživjelih stanica soja B12 u skladu je sa dostupnom literaturom u sklopu koje se pojavljuju različite razine preživljenja ovisno o liofiliziranom soju i samoj tehnici prilikom liofilizacije.

#### 4.3. IDENTIFIKACIJA ODABRANOG PROBIOTIČKOG IZOLATA (API 50 CHL)

Bakerijski izolat koji je odabran nakon provedene probiotičke karakterizacije kao soj s izraženim probiotičkim potencijalom identificiran je preko biokemijskog profiliranja. Soj B12 je identificiran je s > 99.9 % podudarnosti kao *Lactobacillus plantarum*.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata ovog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Uspješno je provedena probiotička karakterizacija deset bakterijskih izolata iz stolice dojenčeta. Samo je dio izolata zadovoljio sigurnosne, tehnološke i funkcionalne kriterije za odabir probiotika.
2. Među izolatima koji su zadovoljili probiotičke kriterije, uočene su razlike u ispoljavanju ispitanih funkcionalnih svojstava te iz toga proizlazi kako su pojedina svojstva specifična za pojedini soj, a ne za izvor iz kojega su izolirani.
3. Odabrani izolat B12 pokazao je najveći probiotički potencijal zadovoljivši sve tehnološke, funkcionalne i sigurnosne probiotičke kriterije te je nakon usporedbe s dostupnom literaturom okarakteriziran kao izolat visokog probiotičkog potencijala. Navedeni izolat je uspješno identificiran kao *Lactobacillus plantarum*.
4. Stolica zdravog dojenčeta potencijalan je izvor probiotičkih bakterija.

## 6. LITERATURA

- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., Ayyash, M. (2017) Characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk, *LWT - Food science and Technology*, **79**, 316–325. doi: 10.1016/j.lwt.2017.01.041
- Adlerberth, I., Wold, A. E. (2009) Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, **98(2)**, 229–238. doi:10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x
- Alkalbani, N. S., Turner, M. S., Ayyash, M. M. (2019) Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and in vitro investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage. *Microbial Cell Factories*, **18(1)**, 1–12. doi: 10.1186/s12934-019-1239-1
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Majkowska, A. (2002) Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, **35(2–3)**, 125–131. doi: 10.1016/S0963-9969(01)00173-9
- Bolla, P. A., De Los Angeles Serradell, M., De Urza, P. J., De Antoni, G. L. (2011) Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, **78(1)**, 15–22. doi: 10.1017/S0022029910000610
- Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. G., Eberl, G. (2008) Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, **456(7221)**, 507–510. doi: 10.1038/nature07450
- Camargo Prado, F., De Dea Lindner, J., Inaba, J., Thomaz-Soccol, V., Kaur Brar, S., Soccol, C. R. (2015) Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, **12**, 489–497. doi: 10.1016/j.jff.2014.12.020
- Collado, M. C., Cernada, M., Bäuerl, C., Vento, M., Pérez-Martínez, G. (2012) Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*, **3(4)**. doi: 10.4161/gmic.21215
- Collins, J. K., Thornton, G., Sullivan, G. O. (1998) Selection of probiotic strains for human

- applications. *International Dairy Journal*, **8(5–6)**, 487–490. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00073-9
- Cooke, G., Behan, J., Costello, M. (2006) Newly identified vitamin K-producing bacteria isolated from the neonatal faecal flora. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **18(3–4)**, 133–138. doi: 10.1080/08910600601048894
- Decker, E., Engelmann, G., Findeisen, A., Gerner, P., Laaß, M., Ney, D., Posovszky, C., Hoy, L., Hornef, M. W. (2010) Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics*, **125(6)**. doi: 10.1542/peds.2009-2260
- Deogade, S. C. (2015) Probiotics: Contributions to Oral and Dental Health Probiotics: Mechanism of Action. *Journal of Oral Health and Dental Management*, **14(3)**, 145–154.
- Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., Paul Ross, R. (2002) Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal*, **12(2–3)**, 183–190. doi: 10.1016/S0958-6946(02)00040-7
- Dinakar, P., Mistry, V. V. (1994) Growth and Viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, **77(10)**, 2854–2864. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77225-8
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107(26)**, 11971–11975. doi: 10.1073/pnas.1002601107
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O’Connell, T. M., Bunger, M. K., Bultman, S. J. (2011) The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metabolism*, **13(5)**, 517–526. doi: 10.1016/j.cmet.2011.02.018
- Feucht, A., Kwak, H. S. (2013) Microencapsulation of lactic acid bacteria (LAB). *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **33(2)**, 229–238. doi: 10.5851/kosfa.2013.33.2.229
- Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M. L., Bolte, E., McTeague, M., Sandler, R., Wexler, H., Marlowe, E. M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Summanen, P.,

- Baysallar, M., Tomzynski, T. J., Read, E., Johnson, E., Rolfe, R., Nasir, P., Kaul, A. (2002) Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical Infectious Diseases*, **35**, 6–16. doi: 10.1086/341914
- Frece, J., (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3. Doktorska disertacija. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu
- Frece, J., Čvek, D., Kovačević, D., Gobin, I., Krcivoj, T., Markov, K. (2010) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz “slavonskog kulena” kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso*. **12**, 210 – 216.
- Frece, J., Cvrtila, J., Topič, I., Delaš, F., Markov, K. (2014) *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as potential functional starter culture. *Food Technology and Biotechnology*, **52(4)**, 489–494. doi: 10.17113/ftb.52.04.14.3794
- 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. *Journal of Dairy Research*, **76(1)**, 98–104. doi: 10.1017/S0022029908003737
- Gibson, G. R., Fuller, R. (2000) Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, **130(2)**, 391–395. doi: 10.1093/jn/130.2.391s
- Gominak, S. C. (2016) Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a “pro-inflammatory” state associated with atherosclerosis and autoimmun. *Medical Hypotheses*, **94**, 103–107. doi: 10.1016/j.mehy.2016.07.007
- Grosu-Tudor, S. S., Zamfir, M. (2012) Probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from Romanian fermented vegetables. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, **17(1)**, 234–239.
- Harish, K., Varghese, T. (2006) Probiotics in humans—evidence based review. *Calicut Med J*, **4(4)**, e3.
- Hasler, C. M. (2002) Functional foods: Benefits, concerns and challenges - A position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition*, **132(12)**, 3772–

3781. doi: 10.1093/jn/132.12.3772

- Havenaar, R., Huis In't Veld, J. H. J. (1992) Probiotics: A General View. *The Lactic Acid Bacteria Volume 1*, **1**, 151–170. doi: 10.1007/978-1-4615-3522-5\_6
- Jiménez, E., Fernández, L., Marín, M. L., Martín, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J., Rodríguez, J. M. (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*, **51(4)**, 270–274. doi: 10.1007/s00284-005-0020-3
- Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M., Kyriacou, A. (2011) Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, **17(6)**, 440–443. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.05.007
- Kos, B. (2001) Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24(5)**, 699–707. doi: 10.1007/s11274-007-9528-y
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, **94(6)**, 981–987. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x
- Kostelac, D., Gerić, M., Gajski, G., Markov, K., Domijan, A. M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Svetec, I. K., Žunar, B., Frece, J. (2021) Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal*, **112**. doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104828
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, **13(1)**, 3–13. doi: 10.1016/S0958-6946(02)00155-3
- Kullen, M. J., Klaenhammer, T. R. (2000) Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Molecular Biology*, **2(2)**, 41–50. doi: 10.21775/cimb.002.041
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Aunapuu, M., Kilk, K., Arend, A., Mikelsaar, M., Rehemaa, A.,

- Zilmer, M. (2010) Complete Glutathione System in Probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **46(5)**, 481–486. doi: 10.1134/S0003683810050030
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. 67–78.
- Li, X. Y., Chen, X. G., Cha, D. S., Park, H. J., Liu, C. S. (2009) Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginategelatin and its properties. *Journal of Microencapsulation*, **26(4)**, 315–324. doi: 10.1080/02652040802328685
- Liu, Q., Duan, Z. P., Ha, D. K., Bengmark, S., Kurtovic, J., Riordan, S. M. (2004) Synbiotic Modulation of Gut Flora: Effect on Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients with Cirrhosis. *Hepatology*, **39(5)**, 1441–1449. doi: 10.1002/hep.20194
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C. (2016) The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, **8(1)**, 1–11. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y
- Luoto, R., Kalliomäki, M., Laitinen, K., Isolauri, E. (2010) The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: Follow-up study from birth to 10 years. *International Journal of Obesity*, **34(10)**, 1531–1537. doi: 10.1038/ijo.2010.50
- Mantzourani, I., Chondrou, P., Bontsidis, C., Karolidou, K., Terpou, A., Alexopoulos, A., Bezirtzoglou, E., Galanis, A., Plessas, S. (2019) Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kefir grains: evaluation of adhesion and antiproliferative properties in in vitro experimental systems. *Annals of Microbiology*, **69(7)**, 751–763. doi: 10.1007/s13213-019-01467-6
- Marques, T. M., Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Ryan, C. A., Stanton, C. (2010) Programming infant gut microbiota: Influence of dietary and environmental factors. *Current Opinion in Biotechnology*, **21(2)**, 149–156. doi: 10.1016/j.copbio.2010.03.020
- Millette, M., Nguyen, A., Amine, K. M., Lacroix, M. (2013). Gastrointestinal survival of bacteria in commercial probiotic products. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, **8(4)**, 149–156.
- Mombelli, B., Gismondo, M. R. (2000) The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **16(4)**, 531–536. <https://doi.org/10.1016/S0924->

- Mshvildadze, M., Neu, J. (2010) The infant intestinal microbiome: Friend or foe? *Early Human Development*, **86** (1), 67–71. doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.01.018
- Naissinger da Silva, M., Tagliapietra, B. L., Flores, V. do A., Pereira dos Santos Richards, N. S. (2021) In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Current Research in Food Science*, **4** , 320–325. doi: 10.1016/j.crfs.2021.04.006
- Neu, J., Rushing, J. (2011) Cesarean Versus Vaginal Delivery: Long-term Infant Outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clinics in Perinatology*, **38**(2), 321–331. doi: 10.1016/j.clp.2011.03.008
- O’Hara, A. M., Shanahan, F. (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, **7**(7), 688–693. doi: 10.1038/sj.embor.7400731
- Oh, N. S., Joung, J. Y., Lee, J. Y., Kim, Y. (2018) Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PLoS ONE*, **13**(2), 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0192021
- Özer, B., Kirmaci, H. A., Şenel, E., Atamer, M., Hayaloğlu, A. (2009). Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *International Dairy Journal*, **19**(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.07.001>
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., Brown, P. O. (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, **5**(7), 1556–1573. doi: 10.1371/journal.pbio.0050177
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., Socol, C. R. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. In *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **50** (3), 521–542. doi: 10.1590/s1516-89132007000300018
- Parracho, H., McCartney, A. L., Gibson, G. R. (2007) Probiotics and prebiotics in infant nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, **66**(3), 405–411. doi: 10.1017/S0029665107005678
- Payne, A. N., Chassard, C., Banz, Y., Lacroix, C. (2012) The composition and metabolic activity of child gut microbiota demonstrate differential adaptation to varied nutrient loads



- in an in vitro model of colonic fermentation. *FEMS Microbiology Ecology*, **80(3)**, 608–623. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01330.x
- Penders, J., Stobberingh, E. E., Thijs, C., Adams, H., Vink, C., Van Ree, R., Van Den Brandt, P. A. (2006) Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing. *Clinical and Experimental Allergy*, **36(12)**, 1602–1608. doi: 10.1111/j.1365-2222.2006.02599.x
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., Van Den Brandt, P. A., Stobberingh, E. E. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, **118(2)**, 511–521. doi: 10.1542/peds.2005-2824
- Rakoff-Nahoum, S., Medzhitov, R. (2008) Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal Immunology*, **1**, 10–14. doi: 10.1038/mi.2008.49
- Reid, G. (2006) Safe and efficacious probiotics: what are they? *Trends in Microbiology*, **14(8)**, 348–352. doi: 10.1016/j.tim.2006.06.006
- Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L., McCartney, A. L. (2010) Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology*, **156(11)**, 3329–3341. doi: 10.1099/mic.0.043224-0
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron, M.-C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M., Rowland, I. (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, **80(1)**, 147–171. doi: 10.1079/bjn19980108
- Sartor, R. B. (2008) Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, **134(2)**, 577–594. doi: 10.1053/j.gastro.2007.11.059
- Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. (2009) Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Letters in Applied Microbiology*, **48(1)**, 8–12. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02475.x
- Savedboworn, W., Kerdwan, N., Sakorn, A., Charoen, R., Tipkanon, S., Pattayakorn, K. (2017) Role of protective agents on the viability of probiotic Lactobacillus plantarum during freeze drying and subsequent storage. *International Food Research Journal*, **24(2)**, 787–794.
- Scanlan, P. D., Shanahan, F., Clune, Y., Collins, J. K., O'Sullivan, G. C., O'Riordan, M.,

- Holmes, E., Wang, Y., Marchesi, J. R. (2008) Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environmental Microbiology*, **10(3)**, 789–798. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01503.x
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, **14(8)**, 1–14. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533
- Stiles, M. E., Holzapfel, W. H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. In *International Journal of Food Microbiology*, **36(1)**, 1–29. doi: 10.1016/S0168-1605(96)01233-0
- Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol*, **39**, 227-235.
- Šušković, J., Kos, B., Matošić, S., Besendorfer, V. (2000) The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16(7)**, 673–678. doi: 10.1023/A:1008909505651
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D. L. E., Nalin, R., Dore, J., Leclerc, M. (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, **11(10)**, 2574–2584. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x
- Thavagnanam, S., Fleming, J., Bromley, A., Shields, M. D., Cardwell, C. R. (2008). A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, **38(4)**, 629–633. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02780.x
- Ursell, L. K., Haiser, H. J., Van Treuren, W., Garg, N., Reddivari, L., Vanamala, J., Dorrestein, P. C., Turnbaugh, P. J., Knight, R. (2014) The intestinal metabolome: An intersection between microbiota and host. *Gastroenterology*, **146(6)**, 1470–1476. doi: 10.1053/j.gastro.2014.03.001
- Verhulst, S. L., Vael, C., Beunckens, C., Nelen, V., Goossens, H., Desager, K. (2008) A longitudinal analysis on the association between antibiotic use, intestinal microflora, and wheezing during the first year of life. *Journal of Asthma*, **45(9)**, 828–832. doi: 10.1080/02770900802339734
- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., Li, L. (2017) The Human Microbiota in Health and

Disease. *Engineering*, **3(1)**, 71–82. doi: 10.1016/J.ENG.2017.01.008

Wang, J., Zhang, H., Chen, X., Chen, Y., Menghebilige, Bao, Q. (2012) Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. In *Journal of Dairy Science*, **95 (4)**, 1645–1654. doi: 10.3168/jds.2011-4768

Yasmin, I., Saeed, M., Khan, W. A., Khaliq, A., Chughtai, M. F. J., Iqbal, R., Tehseen, S., Naz, S., Liaqat, A., Mehmood, T., Ahsan, S., Tanweer, S. (2020) In vitro probiotic potential and safety evaluation (Hemolytic, cytotoxic activity) of bifidobacterium strains isolated from raw camel milk. *Microorganisms*, **8(3)**. doi: 10.3390/microorganisms8030354

Ziemer, C. J., Gibson, G. R. (1998) An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, **8(5–6)**, 473–479. doi: 10.1016/S0958-6946(98)00071-5

Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., Akkermans-van Vliet, W. M., De Visser, J. A. G. M., De Vos, W. M. (2001) The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **13(3)**, 129–134. doi: 10.1080/089106001750462669

## IZJAVA O IZVORNOSTI

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izborima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

*Vodjende Hra*

---