Uloga površinskih proteina tijekom preživljavanja probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Jakša, Ivona

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:914077

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ivona Jakša
6428/BT

ULOGA POVRŠINSKIH PROTEINA TIJEKOM PREŽIVLJAVANJA PROBIOTIČKIH SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 4
Mentor: Prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Zagreb, 9. rujna 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

ULOGA POVRŠINSKIH PROTEINA TIJEKOM PREŽIVLJAVANJA PROBIOTIČKIH SOJEVA U SIMULIRANIM UVJETIMA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA

Ivona Jakša, 6428/BT

Sažetak: Cilj ovoga rada bio je ispitati ulogu površinskih S-proteina u *in vitro* preživljavanju *Lactobacillus* sojeva tijekom inkubacije u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT), te istražiti njihovu ulogu u *in vitro* adheziji bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa. Prema dobivenim rezultatima, dokazana je zaštitna uloga S-proteina u preživljavanju *Lactobacillus* sojeva u simuliranim uvjetima GIT-a. Kod svih ispitanih sojeva sposobnost preživljavanja u navedenim uvjetima je vidljivo smanjena nakon uklanjanja S-proteina s površine bakterijskih stanica, gvanidin hidrokloridom. Dokazana je također uloga S-proteina u povećanoj sposobnosti adhezije na proteine ekstracelularnog matriksa. Uklanjanje S-proteina uzrokovalo je smanjenje adhezije svih sojeva na kolagen, laminin i fibronektin. Sposobnost adhezija stanica soja *L. plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine znatno je manja u usporedbi sa sojevima koji sadrže S-proteine na površini stanica.

Ključne riječi: S-proteini, gastrointestinalni trakt, adhezija

Rad sadrži: 29 stranica, 3 slike, 2 tablice, 50 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Jagoda Šušković

Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. Jasna Beganović, dr. sc. Ksenija Uroić

Rad predan: 02. rujna 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Antibiotics, Enzymes,

Probiotics and Starter Cultures Technology

THE ROLE OF SURFACE PROTEINS DURING SURVIVAL OF PROBIOTIC STRAINS IN SIMULATED CONDITIONS OF GASTROINTESTINAL TRACT

Ivona Jakša, 6428/BT

Abstract: The aim of this study was to examine the role of surface S-proteins in *in vitro* survival of *Lactobacillus* strains during incubation in simulated conditions of gastrointestinal tract, and to examine their role in *in vitro* adhesion of bacterial cells to extracellular matrix proteins. The results have proved the protective role of S-proteins in survival of *Lactobacillus* strains in simulated conditions of GIT. All of examined strains had lower survival abilities in mentioned conditions after removal of S-proteins from the surface of bacterial cells, using guanidine hydrochloride. The role of S-proteins in better adhesion ability to extracellular matrix proteins, have also been proved. Removal of S-proteins caused a reduction in the adhesion of all strains to collagen, laminin and fibronectin. The binding capability of the *Lactobcillus plantarum* D13 strain, which doesn't contain S-proteins, is much lower compared to strains that contain S-proteins on cell surface.

Keywords: S-proteins, gastrointestinal tract, adhesion

Thesis contains: 29 pages, 3 figures, 2 tables, 50 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Jagoda Šušković, Professor

Technical support and assistance: Assoc. prof. Jasna Beganović, PhD Ksenija Uroić

Thesis delivered: September, 2nd 2015.

SADRŽAJ:

1. UVOD

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *In vitro* analize probiotičkih sojeva …….. 2.

2.1.1.Preživljavanje probiotika u nepovoljnim uvjetima u domaćinu ..... 2.

2.1.2.Ispitivanje sigurnosti probiotičkih sojeva …….. 6.

2.1.3.Kolonizacija domaćina kao preduvjet za iskazivanje pozitivnog učinka na zdravlje. 7.

2.1.4.Ispitivanje antimikrobnog djelovanja probiotičkih sojeva ……. 9.

2.1.5.Imunomodulacijsko djelovanje probiotičkih sojeva …….. 10.

2.1.6.Budućnost primjene *in vitro* testova u probiotičkim istraživanjima……..... 11.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Materijali……. 12.

3.1.1. Mikroorganizmi……. 12.

3.1.2. Hranjive podloge…… 12.

3.1.3. Kemikalije……..…..... 12.

3.1.4. Aparature i pribor……... 13.

3.2. Metode…… 13.

3.2.1. Čuvanje mikroorganizama……. 13.

3.2.2. Uzgoj mikroorganizama……..... 13.

3.2.3. Uklanjanje S-proteina s površine *Lactobacillus* sojeva……. 14.

3.2.4. SDS-poliakrilamidna gel-elektoforeza *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina….. 14.

3.2.5. Ispitivanje preživljavanja *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta……..... 14.

3.2.5.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva…… 14.

3.2.5.2. Inkubiranje stanica *Lactobacillus* sojeva u simuliranim sokovima gastrointestinalnog sustava……... 15.

3.2.5.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom……..... 15.

3.2.6. Adhezija na ekstracelularni matriks……... 15.

4. **REZULTATI**

4.1. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranim uvjetima GIT-a.... 17.

4.2. Adhezija *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina na proteine ekstracelurarnog matriksa 19.

5. RASPRAVA

5.1. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranim uvjetima GIT-a.... 21.

5.2. Adhezija *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina na proteine ekstracelurarnog matriksa 22.

6. ZAKLJUČAK..... 24.

7. LITERATURA..... 25.

1. UVOD

Proteklih nekoliko desetljeća, prehrambena industrija osobiti značaj stavlja na razvoj proizvodnje funkcionalne hrane zbog svijesti potrošača o važnosti odabira hrane za održavanje zdravlja čovjeka. Po definiciji probiotici sadrže žive mikoorganizme u dovoljnoj količini kako bi imali korisne učinke za zdravlje potrošača (Šušković, 2014). Brojni probiotički sojevi su prisutni na tržištu u obliku komercijalnih probiotičkih pripravaka. Unatoč tome, još uvijek znanstvena zajednica istražuje kako ispitati probiotički potencijal pojedinog mikroorganizama, što je osobito od važnosti jer je broj proglašenih probiotika, prema literaturi, u stalnom porastu. Većina probiotičkih mikoorganizama su bakterije prirodno prisutne u hrani ili komensalne bakterije iz gastrointestinalnog trakta čovjeka, koje se smatraju sigurnima, uočen je porast znanstvenih radova u kojima se probiotici iz različitih ekoloških izvora ispituju kao potencijalni sigurnosni ili regulatorni problemi. Potencijalni probiotici su odabrani nakon *in vitro* i *in vivo* analiza za definiranje karakteristika poput rezistencije na kisele uvjete, rezistencije na žuč ili procjene utjecaja na složene funkcije domaćina poput poticanja imunosti, metaboličkih funcija ili međudjelovanja probavnog i moždanog sustava. Dok se krajnja klinička ispitivanja smatraju obavezna za potvrdu da navedeni probiotici imaju povoljan učinak na zdravlje, svega je nekoliko mikroorganizama s pozitivnim učincima odobreno od ovlaštenih institucija. Stoga je pozornost usmjerena na ispravnost evaluacije pojedinog mikroorganizma prilikom njegove karakterizacije kao probiotika (Papadimitriou i sur., 2015). *In vitro* i *in vivo* pristupi se najčešće primjenjuju za analizu prilikom odabira probiotika, a osobito je značajna pojava tehnologija sa sufiksom -omika koje doprinose razumijevanju mehanizama probiotičkog djelovanja. Cilj ovog završnog rada je upravo ispitati moguću ulogu površinskih proteina tijekom preživljavanja probiotičkih sojeva u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta (GIT).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *In vitro* analize probiotičkih sojeva

2.1.1. Preživljavanje probiotika u nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta domaćina

Temelj početnih istraživanja probiotika su *in vitro* analize za odabir probiotičkih sojeva zbog jednostavnosti izvedbe i niskih cijena takvih pristupa (Tablica 1). To su postali konvencionalni testovi, koji se još uvijek koriste za brzi rutinski odabir velikog broja sojeva kao potencijalnih probiotičkih kandidata. Jedna od najvažnijih prednosti *in vitro* analiza je njihova mogućnost ispitivanja više kultura mikroorganizama istovremeno. Prema sadašnjim definicijama probiotici bi trebali biti živi iako ponekad i mrtve stanice mogu imati pozitivne učinke za zdravlje. Također je preporučljivo, da probiotici moraju dospjeti živi do ciljanih mjesta djelovanja u organizmu domaćina. Početni odabir mikroorganizama utemeljen na različitim analizama tolerancije na stresne uvjete (Upadrasta i sur., 2011). Zbog toga, usvojeni su prikladni *in vitro* testovi za selekciju mikroorganizama na temelju sposobnosti mikroorganizama da prežive prolaz kroz različite regije gastrointestinalnog trakta (GIT-a) (Joint FAO/WHO Working Group, 2002). Preživljavanje potencijalnih probiotičkih bakterija u stimuliranim uvjetima GIT-a detaljno se istražuje i značajne su različitosti između sojeva. Nakon konzumacije, probiotici se prvo susreću s teškim uvjetima u želucu jer moraju preživjeti ekstramno kisele uvjete i aktivnosti probavnih enzima. Poznato je da pH želuca varira između 1-2 do 4-5 nakon konzumacije hrane, ali većina *in vitro* analiza je usmjerena na odabir kultura mikroorganizama koje podnose ekstremno niske pH vrijednosti. Najuobičajenija metodologija uključuje eksperimente koji proučavaju preživljavanje kultura u uvjetima bez dodatnih hranjivih tvari, kao što su fosfatni pufer ili modificirana podloga za rast, kojima je pH vrijednost podešena na niske vrijednosti. Testovi tolerancije na kiselost među najjednostavnijim su testovima za izvođenje jer omogućavaju rutinsko ispitivanje velikog broja mikroorganizama. Nerealno visoke pH vrijednosti namještene tijekom tih testova mogu dovesti do gubitka probiotičkih kandidata relativno osjetljivih na kiselost. Mikroorganizmi osjetljivi na kiselost mogu uspješnije preživljavati u uvjetima niske kiselosti želuca zbog ublažavajućih karakteristika hrane koja se probavlja ili specifičnih sastojaka hrane. Nadalje, mikroorganizmi se najčešće ispituju kao čiste kulture nakon log ili stacionarne faze rasta dok se u stvarnosti probiotici konzumiraju od strane domaćina nakon produžene faze fermentacije, uvjeta procesiranja hrane i skladištenja. Ta faza pred-stresa za probiotike može utjecati na povećanje ili smanjenje rezistencije na stres

tijekom prolaska kroz GIT domaćina, što je specifično za bakterijsku vrstu, odnosno probiotički soj.

Tablica 1: *In vitro* analize koje se primjenjuju u istaživanjima novih probiotičkih mikroorganizama

Probiotička svojstva	Analize
Preživljavanje stresnih uvjeta unutar domaćina	Niske vrijednosti pH i žuč (npr. simulirani želučani i gušteračini sokovi i GIT simulatori)
Ispitivanje sigurnosti	Rezistencija na antibiotike Hemolitička aktivnost Adhezija na stanice sisavaca Proizvodnja enzima (npr. glikozidaza) Proizvodnja toksina (npr. citolizin) Proizvodnja biogenih amina
Kolonizacija domaćina	Hidrofobnost površine stanica Adhezija na sluz (npr. adhezija na mucin, enzimska aktivnost GAPDH) Istraživanje autoagregacije Adhezija na intestinalni epitel (npr. stanične linije, tkivni fragmenti i modeli cijelog tkiva)
Antimikrobne analize	Proizvodnja antimikrobnih metabolita poput organskih kiselina i bakteriocina (npr. jednostavan test inhibicije, turbidometrijske analize, analize bioluminiscencije, metode linije) Koagregacija s patogenima Poboljšanje intestinalne obrambene funkcije (npr. TER mjerenje, imunoflourescencija čvrsto vezanih proteinskih protutijela, fosforilacija čvrsto vezanih proteina)
Imunomodulacija	Translokacija bakterija u GIT Modeli ko-kultura koji oponašaju *in vivo* uvjete (npr. modeli ko-kultura ili modeli tri komponente s epitelnim stanicama, imunim stanicama i bakterijom) Interakcije imunog sustava domaćina s bakterijskim spojevima (npr. lipoteihonske kiseline i peptidoglikan) Regulacija epitelnih čvrstih veza Antiupalna imunostimulirajuća svojstva (npr. ublažavanje upalnih bolesti crijeva i alergijskih simptoma) Analize otpuštanja β-heksaminidaza (ublažavanje alergijskih reakcija)
Kardiovaskularne bolesti	Dekonjugacija žučnih soli (npr. aktivnost hidrolaze žučnih soli) Konverzija kolesterola u koprostanol Svojstva bakterijskog metabolizma s inhibitorskom aktivnošću angiotenzin-konvertirajućeg enzima
Antitumorski učinci	Ames-ov test Comet analiza Analiza razgradnje nitrozamina Prevencija invazije stanica crijevnog tumora Indukcija apoptaze tumorskih stanica Vezanje za mutagene spojeve (HCAs) Uklanjanje toksina i toksičnih metala Bakterijska fermentacija i proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina
Dodatne pogodnosti za zdravlje	Aktivnost β-galaktozidaze Proizvodnja vitamina Test linolenske kiseline Razgradnja oksalata

Osim tih pojednostavljenih testova za preživljavanje, simulirani želučani sok i sok gušterače se primjenjuju za simuliranje *in vivo* uvjeta. Zabilježeno je preživljavanje u humanim želučanim sokovima. Općenito, sintetski želučani i gušteračini sokovi sadrže enzime pepsin i pankreatin, a kontrolirana inkubacija mikroorganizama u tim sokovima provodi se u skladu s vremenom koje probiotici provode u gornjem i donjem dijelu GIT (Lavermicocca i sur., 2008). Žuč koja se izlučuje u tankom crijevu smanjuje preživljavanje bakterija remeteći strukturu stanične membrane, te izazivajući razgradnju i denaturaciju proteina i molekule DNA. Hidrolaza žučne soli je enzim koji hidrolizira aminokiseline konjugirane soli žuči (glicin ili taurin) reducirajući njihovu toksičnost za bakterijsku stanicu. Za probiotike je preporučana tolerancija na koncentraciju žučnih soli između 0,15 i 0,5 % što je u rasponu fiziološke koncentracije u GIT. Analize tolerancije na žuč možda su jednostavne za izvođenje, ali ne olakšavaju osobito pouzdan odabir probiotika iz nekoliko razloga. Na primjer, u većini slučajeva mikroorganizmi se zasebno ispituju na toleranciju na kiselost i žuč unatoč činjenici da su ta dva stresa zapravo uzastopna tijekom prolaska kroz GIT, povećavajući stresni pritisak. Upotreba žuči koja nije humanog podrijetla je upitna budući da žuč goveda i svinje nemaju isti sastav pa tako niti isti utjecaj na mikroorganizme kao i žuč čovjeka (Begley i sur., 2005). Potreba za razrađenijim *in vitro* analizama za testiranje preživljavanja probiotičkih mikroorganizama u GIT uzrokovala je razvoj nekoliko simulatora GIT-a. Preciznije, višefunkcionalan dinamički model, upravljan putem računala, koji oponaša želudac i tanko crijevo korišten je za kvantifikaciju preživljavanja bakterija mliječne kiseline (BMK), a dobiveni podaci su poprilično usporedivi s rezultatima istraživanjima provedenim na čovjeku. U ostalim slučajevma *in vitro* sustavi ne oponašaju samo uvjete u želucu i tankom crijevu nego i one u usnoj šupljini, koristeći orogastrointestinalni sustav (Bove i sur., 2012). Simulator ljudskog crijevnog ekosustava razvijen je inokuliranjem humanog fekalnog materijala u simulator kojem je temelj bioreaktor s ciljem karakterizacije mikrobne populacije u GIT. Eksperimanti provedeni u simulatorima ljudskog crijevnog ekosustava pokazali su sličnu učestalost preživljavanja mikroorganizama onoj dobivenoj *in vitro* testovima (Cook i sur., 2012). Modifikacije simultora ljudskog crijevnog ekosustava uključuje unos mukoznog okoliša u simulator, što omogućuje reprezentativniju kolonizacijsku sposobnost za test mikroorganizme (Van den Abbeele i sur., 2012). Drugi sustav koji se temelji na dva odvojena fermentora kreiran je da bolje simulira fiziološke faze gutanja i probave u gornjem i donjem dijelu GIT-a. Koristeći taj sustav bilo je moguće ispitati preživljavanje probiotika kroz realističnije pH vrijednosti tj. one koji se postižu prije, tijekom i nakon obroka (Mainville i sur., 2005).

Očigledno simulatori uvjeta GIT pružaju mnoge prednosti pred nezavisnim *in vitro* testovima, te je selekcija probiotičkih mikroorganizama korištenjem tih sustava pouzdanija. Kako god, takvi simulatori ne dozvoljavaju brz odabir brojnih mikroorganizama i mogu biti relativno skupi za održavanje i rukovanje. Danas, napredak u mikroinkapsulacijskoj tehnologiji dozvoljava ciljanu primjenu probiotičkih mikroorganizama u različite djelove GIT u kojima su metabolički aktivni, neovisno o njihovoj otpornosti na stres.

2.1.2. Ispitivanje sigurnosti probiotičkih sojeva

Drugi važan aspekt u odabiru probiotičkih mikroorganizama je provjera statusa sigurnosti. Iako je u Europi QPS (engl. Qualified Presumption of Safety) regulacija identificirala mikroorganizme koji su sigurni za upotrebu u hrani, postoje aspekti sigurnosti koji se moraju procjenjeni prije nego što se probiotička kultura stavi na tržište (Join FAO/WHO Working Group, 2002). Laboratorijski testovi koji se primjenjuju u procjeni sigurnosti probiotičkih mikroorganizama, uključuju *in vitro* analize koje ispituju različita svojstva mikroorganizama. Prvi korak je određivanje, minimalne inhibitorske koncentracije (MIK) za najvažnije antibiotike i procjenjivanje primjenom protokola koje je propisala EFSA (engl. European Food Safety Authority) (EFSA, 2008.). Većinom se primjenjuju test mikrodilucije u hranjivom bujonu proveden na mikrotitarskim pločicama sa 96 jažica (Argyri i sur., 2013), metoda difuzije iz diska (Šušković i sur., 2014; Pisano i sur., 2014) i gotova komercijalna oprema (Delgado i sur., 2007) za određivanje vrijednosti minimalne inhibitorske koncentracije poznatih antibiotika za potencijalne probiotičke mikroorganizme. Hemolitička aktivnost također se ispituje (Join FAO/WHO Working Group, 2002). Bistre zone hidrolize, djelomične hidrolize ili bez reakcije oko linija mikroorganizama na krvnim agarima indiciraju hemolitičku sposobnost probiotika (Pisano i sur., 2014). Testovi *in vitro* ispitivanja mogućih patogenih svojstava odnose se na sposobnost bakterija da se vežu na stanice sisavaca, poput trombocita koji su povezani s fibronektinom, fibrinogenom i kolagenom. Proizvodnja određenih enzima poput glikozidaza, proteaza i gelatinaza također je potencijalno patogeno svojstvo (Bernardeau i sur., 2006). Mikroorganizme bi trebalo testirati prikladnim *in vitro* analizama, za proizvodnju učestalih toksina opasnih za čovjeka npr. citolizina (Tan i sur., 2013). Biogeni amini najčešće nastaju dekarboksilacijom odgovarajućih aminokiselina putem supstrat-specifične dekarboksilacije bakterija. Analize provedene na krutim podlogama temelje se na promjeni pH medija nakon rasta bakterija, što upućuje na pozitivnu

dekarboksilacijsku aktivnost. Kvantitativne analize biogenih amina su najčešće određene kromatografijom. *In vitro* testovi sigurnosti su općenito vrlo korisni za identificiranje i isključivanje potencijalnih patogenih mikroorganizama od korištenja kao probiotika. Na primjer, hemolitički ili toksin-producirajući mikroorganizmi mogu se lako identificirati i isključiti iz daljnjih analiza. Problem s *in vitro* analizama sigurnosti odnosi se na identificiranje lažno negativnih kultura. Virulentne značajke mogu jednostavno biti neaktivne pri specifičnim uvjetima analize i pri tome ostaju neuočene (npr. toksini koji mogu biti down-regulated *in vitro*). Virulentnost je kompleksno svojstvo mikroorganizama koje ponekad zahtjeva aktivno međudjelovanje s domaćinom da bi bilo potaknuto i iz tog razloga su *in vivo* modeli prikladniji. Ispitivanje bakterijskog genoma na prisutnost gena za virulentnost i rezistenciju također je način da se predvidi mogućnost neizraženih faktora rizika za sigurnost.

2.1.3. Kolonizacija domaćina kao preduvjet za iskazivanje pozitivnih učinaka na zdravlje

Iako istraživanja u području probiotika značajno napreduju, povezanost specifičnih mikroorganizama sa specifičnim zdravstvenim tvrdnjama o učincima na zdravlje domaćina je još uvijek nejasna. U relativno malom broju slučajeva specifične *in vitro* analize su osmišljene da bi istražile zaštitnu ili terapijsku ulogu probiotičkih kandidata protiv određenih bolesti. Najjednostavnija primjena je kompeticija probiotika s potencijalnim patogenima za molekule i mjesta adhezije u GIT. Adhezija za sluz i epitelne stanice još uvijek se smatra kontraverznom temom u probiotičkim istraživanjima. S jedne strane to je poželjno svojstvo probiotika budući da olakšava kolonizaciju domaćina i borbu protiv patogena, ali s druge strane smatra se rizikom za translokaciju. Potonje može biti posebno važno u izrazito osjetljivim populacijama imuno-kompromitiranih pacijenata kod kojih se primjena probiotika često razmatra (Sanders i sur., 2010). Hidrofobni fenotip površine bakterijske stanice povezan je s adhezijskim kapacitetom i kolonizacijom crijeva. Općenito, hidrofobnost površine stanice je određena prema kapacitetu bakterije da se podijeli na ugljikovodike (npr. heksadekan, ksilen, toluen) (Jena i sur., 2013), na taj način odbijajući nespecifične sposobnosti adhezije, povezane s karkteristikama površine stanice (Garcia-Cayuela i sur., 2014). Sporni rezultati ispitivanja hidrofobnosti pokazuju da je to svojstvo dvojbeno (Vinderola i sur., 2004). Općenito, ocjenjivanje mogućnosti adhezije probiotičkih

mikroorganizama utemeljeno na površinskoj hidrofobnosti, prilično je zastarjelo. Stoga se provode testovi adhezije probiotika na intestinalnu sluz čovjeka, uzorkovanu kod dojenčadi ili zdravog ljudskog fecesa (Ferreira i sur., 2011). Štoviše, metode ispitivanja visoke propusnosti temeljene na imobiliziranim, komercijalno dostupnim molekulama mucina također se primjenjuju (Laparra i Sanz, 2009). Mucini su velike molekule glikoproteina koje pojačavaju intestinalnu mukoznu površinu, oblikujući zaštitni štit za epitelne stanice, protiv štetnih okolišnih uvjeta. Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) na površini bakterijske stanice potpomaže vezanje na mucin iz ljudskog crijeva (Kinoshita i sur., 2013). Kao alternativa, ostala istraživanja su se usredotočila na sposobnost probiotičkih bakterija da oblikuju stanične nakupine pomoću auto-agregacija (Del Re i sur., 2000), mjerenjem apsorbancije bakterijskih suspenzija tijekom određenih vremenskih intervala (Collado i sur., 2008). Auto-agregacijski kapacitet bakterija mliječne kiseline povezan je s njihovom adhezijom na različite vrste stanica domaćina (Kos i sur., 2003), te se smatra poželjnom karakteristikom za preliminarna probiotička ispitivanja. Smatra se često da inestinalne epitelne stanične linije bolje predstavljaju uvjete u tkivima GIT (npr. sposobnost adhezije i kolonizacije probiotičkih mikroorganizama). Često se ispitivanja provode na epitelnim staničnim linijama čovjeka poput HT-29, HT-29MTX i Caco-2 za određivanje adhezije probiotičkih mikroorganizama (Beganović i sur., 2014). Općenito, *in vitro* ispitivanja adhezijskog potencijala su zahtjevna za provođenje zbog upitne reproducibilnosti. Ipak ovi testovi mogu rezultirati saznanjima o potencijalu mikroorganizama za *in vivo* adheziju. Resektirani fragmenti intestinalnog tkiva korišteni su neprocesirani ili imobilizirani na mikrotitarskim pločicama za analize adhezije (Vesterlund i sur., 2005). Konačno, svi tkivni modeli sastavljeni od epitelnog tkiva sa slojem sluzi u prisutnosti komensalne mikroflore, mogu omogućiti procjenu kompleksnijih adhezivnih međudjelovanja između probiotika i domaćina (Tassell i Miller, 2011). Identificirano je nekoliko molekula koje aktivno potpomažu vezanje za stanice domaćina. U većini slučajeva adhezija je ispitivana za jednu stanicu, stoga u odsutnosti dodatnih mikroorganizama koji bi oponašali mikrofloru crijeva. To je važan nedostatak za većinu analiza budući da postoji snažno natjecanje za adhezivna mjesta između različitih mikroorganizmima *in vivo*. Korištenje tumorskih stanica je također pomalo kontraverzno budući da se svojstva njihovog ekstracelularnog matriksa i površine značajno razlikuju od zdravih intestinalnih epitelnih stanica. Međutim, mikroorganizmi koji se vežu s visokom efikasnošću na ljudske stanice *in vitro* najčešće se ponašaju jednako u *in vivo* uvjetima.

2.1.4. Ispitivanje antimikrobnog djelovanja probiotičkih sojeva

Još jedno poželjno svojstvo probiotika je proizvodnja antimikrobnih spojeva. Narušavanje mikroflore GIT igra važnu ulogu u patofiziologiji gastrointestinalnih infektivnih bolesti. Probiotici mogu spriječiti gastrointestinalne poremećaje održavanjem homeostaze crijevne mikroflore ili kompetitivno inhibirajući rast patogena (Hickson, 2011). Selekcija probiotičkih bakterija za suzbijanje infektivne dijareje koja je uzrokovana virusima (npr. rotavirus ili norovirus) (Al Kassaa i sur., 2014) ili bakterijama (npr. *Escherichia coli, Salmonella* i *Campylobacter sp*.) ili infekcija s *Clostridium difficile* (Parkes i sur., 2009), najčešće se temelji na antimikrobnim svojstvima probiotičkih mikroorganizama. To se odnosi i na dijareju uzrokovanu korištenjem anibiotika (Cresci i sur., 2013) i *Helicobacter pylori* infekcijom (Chenoll i sur., 2011), kao i za infekcije u drugim tkivima ljudskog tijela koja nisu GIT, poput usne šupljine, gornjeg respiratornog sustava i urogenitalnog sustava (Papadimitriou i sur., 2015). Uz proizvodnju poznatih antimikrobnih metabolita poput organskih kiselina, probiotičke bakterije mogu također proizvoditi specifične inhibicijske komponente bakteriocine (Šušković i sur., 2010). Ciljani mikroorganizmi za bakteriocinsko djelovanje obično uključuju Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, kao i fungalne sojeve, dakle ne samo patogene bakterije nego i intestinalne mikroorganizme koji predstavljaju dio crijevne mikroflore čovjeka (Gagnon i sur., 2011). Baktriocinska aktivnost se ispituje *in vitro* korištenjem jednostavnih inhibicijskih testova provedenih na krutim medijima. Agar spot test, metoda difuzije iz diska i difuzija iz jažica u agar se vrlo često koriste kao metode za ocjenjivanje antimikrobne aktivnosti. Štoviše, inhiibicijski učinci filtrata probiotičkih mikroorganizama utvrđeni su pomoću automatske turbidimetrijske analize koja prati rast indikatorskih bakterija (Lahteinen i sur., 2010; Papadimitriou i sur., 2015). U nekim slučajevima, bioluminiscentni indikatorski mikroorganizmi su također korišteni da se istraži moguća proizvodnja antimikrobnih sastojaka kod probiotičkih bakterija (Lahtinen i sur., 2007). Analize koje koriste metode kose crte i radijalne crte su komparativno efikasnije kad je riječ o ispitivanju inhibicijskih svojstava intaktnih probiotičkih stanica , a ne samo svojstva pripisanih njihovim proizvodnim metabolitima (Coman i sur., 2014). Antimikrobna aktivnost probiotika odnosi se ne samo na proizvodnju antimikrobnih spojeva ili kiselina koje snizuju luminalnu pH vrijednost nego i na kompetitivno isključivanje patogena. Probiotici se mogu natjecati s patogenima za mjesta adhezije u GIT. U ovome kontekstu, bakterijska agregacija između različitih stanica mikroorganizama koagregacija je vrlo važna. Stoga, zaštitna svojstva probiotika protiv patogenih infekcija također mogu biti

procjenjena koagregacijskim analizama temeljenim ne samo na jednostavnim mjerenjima apsorbancije nego i na radiooznačavanju i flourescentnoj detekciji (Collado i sur., 2007). Antimikrobna svojstva probiotika su također povezana s poboljšanjem obrambene funkcije crijeva (Mennigen i Bruewer, 2009). Obrambena svojstva mogu biti istažena mjerenjem trans-epitelne elektrorezistencije prije i nakon apikalnog izlaganja intestinalnih epitelnih staničnih linija bakteriji (Zyrek i sur., 2007). Poticanje čvrsto spojenih integriteta, sprječava parcelularni transport patogenih bakterija. Promjene čvrsto spojenih proteina istražuju se *in vitro* ili imunoflourescencijom koristeći specifična antitijela ili procjenom kapaciteta probiotika da promjeni čvrsto spojeni spoj proteina fosforilacijom (Resta-Lenert i Barrett, 2003). *In vitro* proizvodnja antimikrobnih spojeva, ne može nam dati važne informacije o probiotičkoj primjeni *in vivo* jer ne možemo procijeniti ovim eksperimentima da li izabrani mikroorganizam ima mogućnost djelovanja unutar kompleksne intestinalne mikroflore i da li će mu uvjeti koji prevladavaju u GIT dozvoliti da proizvodi svoje antimikrobne spojeve u dovoljnoj količini da bi proizveli antimikrobni učinak . Najčešće, probiotički mikroorganizmi proizvode više od jednog antimikrobnog spoja koji možda djeluju sinergistički, povećavajući spektar ciljanih mikroorganizama. Ta svojstva mogu biti poželjna tako dugo dok je antimikrobni spektar ograničen na patogene mikroorganizme, ali ne može biti isključeno da neće utjecati i na sudionike mikroflore crijeva. Slično ostalim testovima, antimikrobne analize mogu dovesti do lažno negativnih ili lažno pozitivnih mikroorganizama koji mogu biosintetizirati antimikrobne metabolite, ali ih ne proizvode u *in vitro* uvjetima. Također, probiotičke antimikrobne molekule općenito se smatraju sigurnima i u većini slučajeva toksičnost za ljudske stanice je rijetko istražena. Postoji jasna potreba za složenijim analizama koje bi bolje sagledale kompleksno međudjelovanje između probiotika i mikroflore domaćina, za razumijevanje posljedica *in situ* proizvodnje antimikrobnih spojeva probiotičkih bakterija.

2.1.5. Imunomodulacijsko djelovanje probiotičkih sojeva

Pozitivan učinak na imuniteta domaćina jedno je od najčešće poželjnih učinaka probiotika na zdravlje. Selekcija probiotika koji štite protiv mikrobnih patogena povezuje se sa stimulacijom sekrecije antitijela kao i sa stanično posredovanim imunim odgovorom (Cross, 2002). Procjena bakterijske translokacije u GIT može se koristiti za provjeru potencijalnih probiotičkih mikroorganizama s obzirom da neki mikroorganizmi mogu biti sposobni da puštaju dendrične stanice ili M stanice iz Peyerovih ploča i pri tome uspiju prijeći

epitel (Corthesy i sur., 2007). U većini *in vitro* eksperimenata istraživači su pokušali uskladiti mehanizme na kojima se temelje složene, dinamičke imune interakcije crijeva koristeći modele ko-kulture (Cencic i Langerholc, 2010) ili 3D modele (Borchers i sur., 2013). Korištenje metode tri komponente (sluznica, imune stanice i mikroflora), vrlo dobro oponaša *in vivo* situaciju (Fontana i sur., 2013). Također, mnogi radovi ističu kompleksne interakcije između imunog sustava domaćina i različitih bakerijskih spojeva, uključujući kromosomalnu DNA, komponente stanične stijenke poput lipoteihonske kiseline i peptidoglikana kao i topljive metabolite (Corthesy i sur., 2007). U tim analizama, citokini kao IL-5, IL-10, IL-12b, IL-17a, IFN-γ, TNF-α i TGF-β kao i razina sekrecije imunogobulina tipa A (sIgA) koriste se za određivanje stimulacije imunog odgovora i upalnog statusa (Frece i sur., 2005; Steinberg i sur., 2014).

2.1.6. Budućnost primjene *in vitro* testova u probiotičkim istraživanjima

Postoji nekoliko *in vitro* analiza koje se primjenjuju za određivanje probiotičkih svojstva koje mogu upućivati na tvrdnje o pozitivnim učincima na zdravlje. Iako su takve analize korisne za odabir probiotičkih kandidata, one pokazuju promjenjivu učinkovitost. Ovlaštene institucije pokušale su standardizirati *in vitro* analize objavljivanjem detaljnih protokola i smjernica. No, pogledom literature očito je da se *in vivo* testovi izvode na relativno proizvoljan način. To otežava usporedbu rezultata različitih ispitivanja. Uočena je otežana reproducibilnost provedenih eksperimenata, što otežava pouzdavanje isključivo na rezultate *in vitro* testova za selekciju probiotičkih mikroorganizama. Očigledno, *in vivo* analize su prikladnije, ali u većini slučajeva se ne mogu koristiti za opsežne analize s velikim brojem uzoraka zbog povećanih troškova i iz etičkih razloga. Zbog toga, *in vitro* ispitivanje je neophodan dio u istraživanju novih probiotika. Potrebno je više istraživanja za unaprjeđenje i standardizaciju dostupnih eksperimentalnih protokola, namjenjenih za poboljšanje reproducibilnosti s ciljem smanjenja postotka lažno pozitivnih ili lažno negativnih mikroorganizama s probiotičkim potencijalom. Osim toga, novije bi se metode trebale razviti da prošire svojstva koja pridonose zdravlju trenutno utvrđena s *in vivo* testovima.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu ispitivani su probiotički sojevi *Lactobacillus paraplantarum* SF9B i *L. brevis* SF15B. Kao pozitivna kontrola u eksperimentima je korišten soj *L. helveticus* M92 koji posjeduje S-proteine, dok je kao negativna kontrola korišten soj *L. plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine. Navedeni sojevi izolirani su i identificirani u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Hranjive podloge

Tijekom rada korištene su podloge:

- za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline sljedećeg sastava:
- MRS agar: Man-Rogosa-Sharpe agar sastava (g/L): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1;
- $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05; Na-acetat 5; agar 20; u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija pri 121 °C/15 min
- MRS bujon: Man-Rogosa-Sharpe bujon istog sastava kao podloga MRS-agar, samo bez dodanog agara

3.1.3. Kemikalije

- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- agaroza, „Appligane“, Strasbourg
- pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- goveđa žuč (oxgall), „Difco“, SAD
- sterilna otopina natrijevog klorida, 0,5%
- gvanidin hidroklorid (Gua HCl), „AppliChem Gmbh”, Njemačka

- litij klorid (LiCl)
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- TEMED, „Sigma“, SAD
- akrilamid, „Sigma“, SAD
- metilensko modrilo, „Sigma“, SAD
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- kalijev nitrat, „Kemika“, Hrvatska

3.1.4. Aparature i pribor

- Vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- Vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- Centrifuga CENTAUR 2, „Sanyo“, Engleska
- Centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- Anaerocult® A. Merck, Njemačka
- Čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija
- PH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- Hamilton igle, „Hamilton Bonaduz AG“, Švicarska
- Automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Termostat, „Instrumentarija”, Hrvatska

3.2. Metode

3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

Svi korišteni mikroorganizmi čuvani su na -80 °C u odgovarajućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola.

3.2.2. Uzgoj mikroorganizma

Probiotički sojevi *L. helveticus* M92, *L. paraplantarum* SF9B, *L. brevis* SF15B, *L. plantarum* D13 su uzgojeni preko noći u MRS bujonu pri 37°C.

3.2.3. Uklanjanje S-proteina s površine *Lactobacillus* sojeva

Prekonoćne bakterijske kulture centrifugirane su pri 3500 o/min tijekom 15 minuta i dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom. Stanice su resuspendirane u fiziološkoj otopini te je suspenzija podijeljena u tri epice (tri paralele). Tome je slijedilo resuspendiranje stanica u 1 mL fiziološke otopine (prva paralela), u 1 mL 5M otopine litij-klorida (druga paralela) i u 1 mL 5M otopine gvanidin-hidroklorida (treća paralela), te inkubiranje svih uzoraka na temperaturi od 37°C kroz 1 sat. Nakon inkubacije stanice su ponovno centrifugirane pri 3500 o/min tijekom 15 min te dvaput isprane sterilnom fiziološkom otopinom. Na kraju, stanice su resuspendirane u odgovarajućim otopinama, ovisno o pokusu koji je slijedio.

3.2.4. SDS-poliakrilamidna gel-elektoforeza *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina

Bakterijske stanice, koncentrirane centrifugiranjem 5000 o/min tijekom 10 min i dva puta isprane sterilnom destiliranom vodom, resuspendirane su u 50 µL reducirajućeg reagensa i prokuhane 5 min. Nakon kuhanja, 30 µL uzorka je nanešeno je na 12 %-tni poliakrilamidni gel. SDS-PAGE je proveden u komori za elektroforezu (Sigma), na konstantnom naponu od 200V tijekom 45 min. Gel je potom obojan preko noći u 0,1 %-tnom metilenskom modrilu R-250 s 50% metanola i 7% octene kiseline. Nakon bojenja, gel je inkubiran u 7%-tnoj octenoj kiselini do obezbojenja pozadine.

3.2.5. Ispitivanje preživljavanja *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

3.2.5.1. Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva

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

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

3.2.5.2. Inkubiranje stanica *Lactobacillus* sojeva u simuliranim sokovima gastrointestinalnog sustava

Prekonoćne bakterijske kulture centrifugirane su pri 3300o/min tijekom 10 min i dva puta isprane sterilnom fiziološkom otopinom. Uzorak stanica kojima su skinuti S-proteini priređen je prema postupku opisanom u odjeljku 3.1.2.3. Stanice su potom resuspendirane u simuliranom želučanom soku te inkubirane pri 37°C tijekom 2 sata. Nakon toga, dio suspenzije je uzet za određivanje broja živih mikroorganizama, dok je ostatak suspenzije centrifugiran. Talog stanica je potom resuspendiran u simuliranom soku tankog crijeva te su tako priređene suspenzije inkubirane 4 sata pod istim uvjetima. Nakon tog vremena, ponovo je uzet uzorak za određivanje broja preživjelih bakterijskih stanica.

3.2.5.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz uzorka koji sadrži bakterijske stanice pripremljena su odgovarajuća decimalna razrjeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi. Petrijeve zdjelice s MRS hranjivom podlogom su nacijepljene sa po 100 µL odgovarajućeg razrijeđenja (četvrtog, petog, šestog, sedmog, osmog i devetog). Nakon 48 h inkubacije pri 37°C izbrojane su izrasle kolonije i proračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka.

3.2.6. Adhezija na ekstracelularni matriks

Adhezija *Lactobacillus* stanica na imobilizirani humani fibronektin/ laminin/ kolagen provodi se u Polysorp pločicama s 96 jažica ravnog dna koristeći bakterijske stanice uzgojene do kasne eksponencijalne faze (OD_{620nm} 3,5 – 4,0 što odgovara koncentraciji od $1{,}2 \cdot 10^9$ - $1{,}4 \cdot 10^9$ CFU/mL). Jažice sadrže 50 µg/mL imobiliziranog fibronektina/ laminina/ kolagena u karbonat/ bikarbonatnom puferu koncentracije 50 mmol/L, pH vrijednosti 9,6. Jažice se ispiru tri puta fosfatnim puferom i blokiraju tijekom 1 sata fosfatnim puferom sa dodatkom 1% Tween 20. 100 µL suspenzija pojedinog *Lactobacillus* soja dodaje se u svaku jažicu nakon čega slijedi prekonoćna inkubacija na 4°C. Nakon uklanjanja neadheziranih stanica ispiranjem tri puta s 200 µl fosfatnog pufera koji sadrži 0,05% Tween 20, ploče se pažljivo osuše kroz otprilike sat vemena. Adhezirane bakterijske stanice detektiraju se bojanjem kristal violetom (1 mg/mL tijekom 45 min). Nakon ispiranja, bojilo se otpušta dodavanjem 100 µl citratnog pufera (50 mmol/L, pH 4,0) u svaku jažicu. Apsorbancija se određuje pri 620 nm u čitaču za mikrotitarske pločice. Prazne jažice bez vezanog fibronektina/ laminina/ kolagena

koriste se kao kontrola u svim eksperimentima te se njihove vrijednosti apsorbancije oduzimaju od vrijednosti za jažice s imobiliziranim fibronektinom/ lamininom/ kolagenom. Eksperimenti se provode u triplikatu te u tri ponavljanja s bakterijskim stanicama uzgojenim iz neovisnih kultura.

Učinak 5M GHCl tretmana na adheziju *Lactobacillus* stanica ispitan je nakon ekstrakcije površinskih proteina iz bakterijskih stanica kao što je opisano u poglavlju 3.2.3.

Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta te su rezultati izraženi kao srednje vrijednosti tri neovisna pokusa ± standardna devijacija (SD).

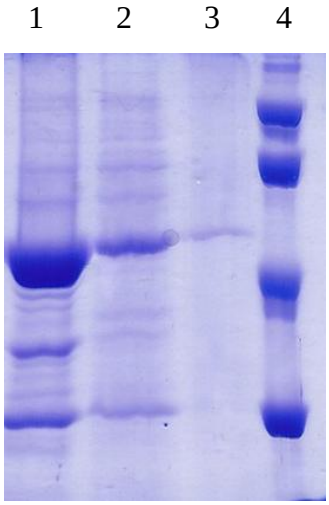
4. REZULTATI

4.1. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranim uvjetima GIT-a

Napravljena je SDS-PAGE elektroforeza radnih mikroorgnizama te su proteinski profili uspoređeni programom Gel Compar (Bionumerics) (Slika 1), te je ispitan utjecaj litijevog klorida i gvanidin hidroklorida na uklanjanje sloja S-proteina (Slika 2).

Preživljavanje nepovoljnih uvjeta GIT-a neophodna je karakteristika probiotičkih sojeva. Glavna prepreka u njihovom preživljavanju čine niske pH vrijednosti želuca, žučne soli i probavni enzimi kao što su lizozim, pepsin i enzimi gušterače. Poznato je da proteini prisutni s vanjske strane stanične stijenke bakterija, poput S-layer proteina, imaju funkcionalnu ulogu kod nekih probiotičkih sojeva te su istraživanja ukazala na važnost ovih proteina za preživljavanje nepovoljnih uvjeta GIT-a. U ovom radu ispitano je preživljavanje *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranom soku želuca i soku tankog crijeva.

Slika 1. Dendrogram proteinskih profila sojeva sa S-proteinom *Lactobacillus paraplantarum* SF9B, *L. brevis* SF15B te kontrolnih sojeva *L. helveticus* M92 i *L. plantarum* D13.



Slika 2. SDS-PAGE analiza soja *Lactobacillus paraplantarum* SF9B koji eksprimira S-proteine. Suspenzija stanica soja SF9B u fiziološkoj otopini (1), stanice istog soja tretirane otopinom litijevog klorida (2), stanice soja tretirane otopinom gvanidin hidroklorida (3), S-standard male molekulske mase (4).

Tablica 2. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranim uvjetima GIT-a

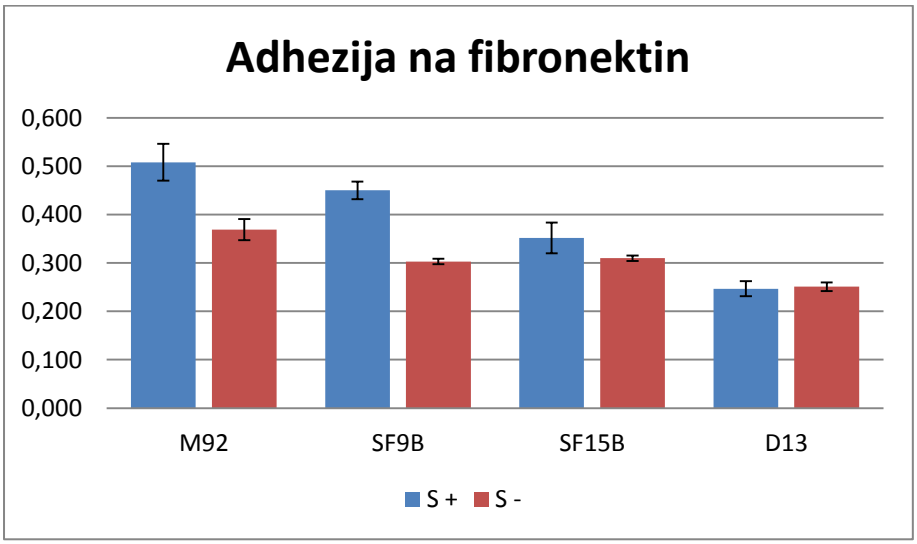
S-protein +	početni CFU/ml	CFU/ml poslije ŽS	CFU/ml poslije STC	
SF9B	$3,20*10^{10}$	$2,30*10^{8}$	$1,10*10^{8}$	
SF15B	$3,20*10^{10}$	$3,20*10^{9}$	$9,70*10^{7}$	
M92	$5,00*10^{10}$	$1,50*10^{7}$	$4,00*10^{6}$	
D13	$4,70*10^{10}$	$7,30*10^{4}$	$1,30*10^{4}$	
S-protein +		Δlog(CFU/ml)	Δlog(CFU/ml)	Δlog(CFU/ml)
SF9B		2,143	2,464	0,320
SF15B		1,000	2,518	1,518
M92		3,523	4,097	0,574
D13		5,809	6,558	0,749
		početni-nakon ŽS	početni-nakon STC	nakon ŽS-nakon STC
S-protein +		% preživjelih ŽS/poč	% preživjelih STC/poč	% preživjelih STC/ preživjelih ŽS
SF9B		80%	77%	96%
SF15B		90%	76%	84%
M92		67%	62%	92%
D13		46%	39%	85%
S-protein -	početni CFU/ml	CFU/ml poslije ŽS	CFU/ml poslije STC	
SF9B	$9,20*10^{10}$	$4,20*10^{3}$	$2,87*10^{1}$	
SF15B	$8,60*10^{9}$	$8,70*10^{2}$	$3,45*10^{1}$	
M92	$6,60*10^{9}$	$5,51*10^{3}$	$6,50*10^{2}$	
D13	$4,90*10^{10}$	$3,30*10^{3}$	$6,30*10^{2}$	
S-protein -		Δlog(CFU/ml)	Δlog(CFU/ml)	Δlog(CFU/ml)
SF9B		7,341	9,506	2,165
SF15B		6,995	8,397	1,402
M92		6,078	7,007	0,928
D13		7,172	7,891	0,719
		početni-nakon ŽS	početni-nakon STC	nakon ŽS-nakon STC
S-protein -		% preživjelih ŽS/poč	% preživjelih STC/poč	% preživjelih STC/ preživjelih ŽS
SF9B		33%	13%	40%
SF15B		30%	15%	52%
M92		38%	29%	75%
D13		33%	26%	80%

ŽS – želučani sok; STC – sok tankog crijeva

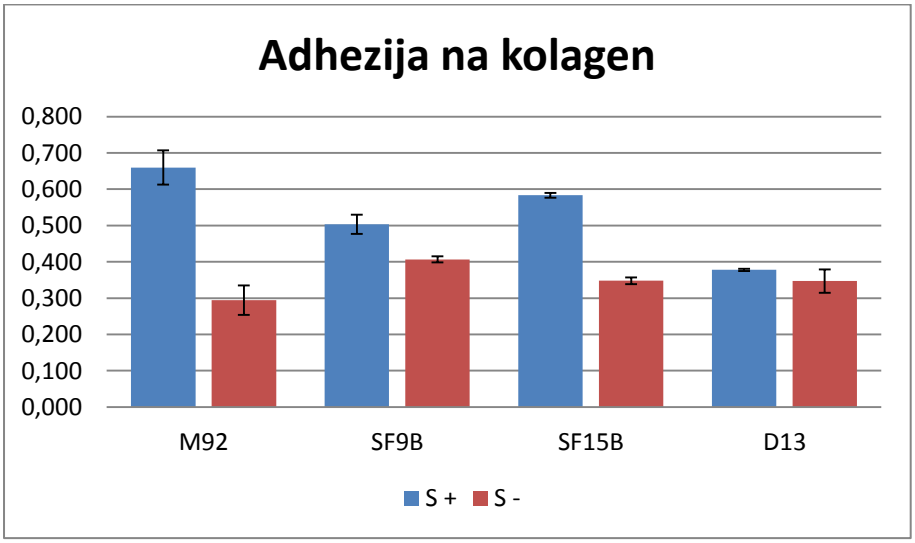
4.2. Adhezija *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina na proteine ekstracelularnog matriksa

Na temelju prethodnih istraživanja u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pretpostavlja se funkcionalna uloga S-proteina u adheziji probiotičkih sojeva na površinu epitelnih stanica. Uspješna adhezija omogućuje njiihovu kolonizaciju te zadržavanje u debelom crijevu domaćina gdje će iskazati poželjne učinke na njegovo zdravlje. Stoga je provedeno ispitivanje *in vitro* adhezije pojedinih *Lactobacillus* sojeva na proteine ekstracelularnog matriksa, laminin, fibronektin i kolagen, koji okružuju intestinalne epitelne stanice.

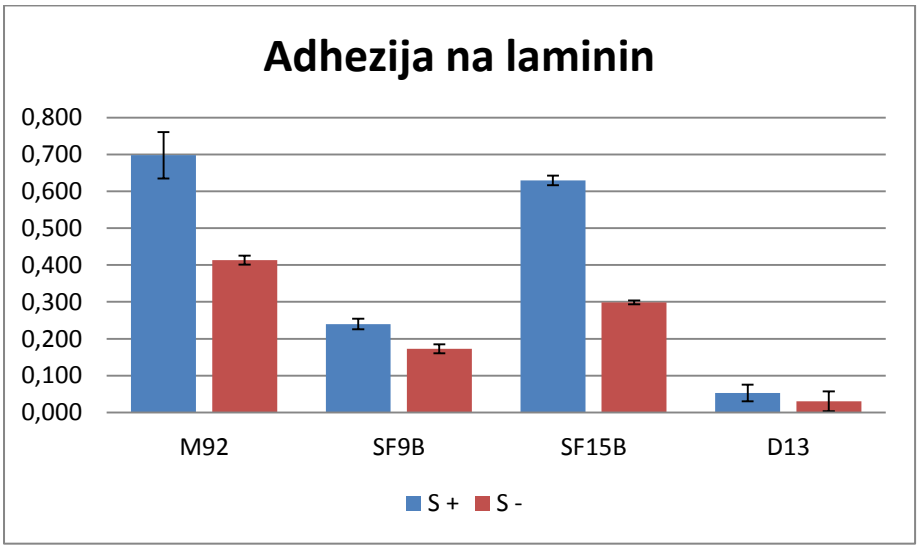
a)



b)



c)



Slika 3. Adhezija *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina na a) fibronektin, b) kolagen, c) laminin

5. RASPRAVA

5.1. Preživljavanje *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina u simuliranim uvjetima GIT-a

SDS-PAGE metodom potvrđena je prisutnost S-proteina na površini stanica sojeva *Lactobacillus paraplantarum* SF9B i *L. brevis* SF15B. Proteinski profili navedenih sojeva uspoređeni su s onima sojeva *L. helveticus* M92 i *L. plantarum* D13, na temelju čega je konstruiran dendrogram sličnosti (Slika 1). U svrhu uklanjanja S-proteina s površine stanica korišteni su litij klorid i gvanidin hidroklorid. Vidljivo je kako sa stanica koje su tretirane litij kloridom nije u potpunosti uklonjen sloj S-proteina, dok je primjenom gvanidin hidroklorida, on u cijelosti odstranjen (Slika 2). Stoga je u daljnjim ispitivanjima funkcionalne uloge sloja S-proteina za njegovo uklanjanje s površine stanica *Lactobacillus* sojeva korišten gvanidin hidroklorid.

Da bi se odredio utjecaj prisutnosti S-proteina na preživljavanje bakterijskih stanica u simuliranim uvjetima GIT-a, ispitivanju su podvrgnute stanice sojeva *Lactobacillus paraplantarum* SF9B i *L. brevis* SF15B, soja *Lactobacillus helveticus* M92 koji posjeduje sloj S-proteina kao pozitivne kontrole te soja *L. plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine kao negativne kontrole. Sojevi su ispitivani prije i nakon tretmana s 5M otopinom gvanidin hidroklorida kojim se sloj S-proteina uklonja s površine stanica. Smrtnost stanica određivana je nakon 2 sata inkubacije stanica u simuliranom želučanom soku sa direktnim prijelazom u simulirani sok tankog crijeva gdje je inkubacija trajala dodatna 4 sata, pri čemu početni broj stanica odgovara broju stanica koje su preživjele inkubaciju u simuliranom soku želuca. Smrtnost stanica iskazana je razlikom logaritama početnog i konačnog broja stanica (Δlog (CFU/ml)). Što je razlika logaritama manja, određeni soj bolje preživljava u zadanim uvjetima, tj. smrtnost mu je manja.

Prema dobivenim rezultatima, prisutnost S-proteina na površini stanica kod sojeva *Lactobacillus paraplantarum* SF9B, *L. brevis* SF15B te soja *L. helveticus* M92 ima pozitivan utjecaj na preživljavanje u uvjetima GIT-a. Kod navedenih sojeva uočena je značajno manja smrtnost stanica u simuliranim uvjetima GIT-a u odnosu na broj preživjelih stanica soja *L. plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine. Uspoređujući smrtnost stanica sojeva *Lactobacillus paraplantarum* SF9B, *L. brevis* SF15B i *L. helveticus* M92 s prisutnim S-proteinima i nakon uklanjanja S-proteina s površine stanica, vidljivo je da je preživljavanje stanica veće ako su S-proteini prisutni (Tablica 2).

Na temelju rezultata, dokazano je da prisutnost S-proteina na površini bakterijskih stanica *Lactobacillus* sojeva omogućuje stanicama veću stabilnost u preživljavanju uvjeta niskih pH vrijednosti GIT-a, te im je smrtnost manja u odnosu na iste sojeve s uklonjenim S-proteinima.

Ciljno mjesto djelovanja probiotika, prebiotika te njihove združene primjene u obliku sinbiotika, kao funkcionalnih dodataka hrani, je gastrointestinalni sustav. Definicija podrazumijeva da probiotik treba preživjeti prolaz kroz probavni sustav te kolonizirati epitel domaćina. Različita specifična svojstva bakterijskog soja imaju važnu ulogu u preživljavanju prolaza kroz GIT, od kojih je najvažnija tolerancija na kisele uvjete prisutne u želucu te na visoku koncentraciju žučnih soli u tankom crijevu. Navedena svojstva zbog toga predstavljaju najvažnije kriterije pri odabiru BMK za probiotičku primjenu. Probiotički pripravci, da bi izazvali pozitivne učinke na zdravlje domaćina moraju sadržavati žive mikrobne stanice u koncentracijama višim od 10^6 / gram proizvoda te je stoga kriterij preživljavanja nepovoljnih uvjeta u GIT-u prilikom odabira bakterija mliječne kiseline za probiotičku uporabu veoma bitan. Prema tome, stanice sa prisutnim slojem S-proteina u dovoljnoj mjeri preživljavaju u navedenim uvjetima, dok stanice sa uklonjenim S-proteinima više ne zadovoljavaju ovaj uvjet za izbor probiotičkih sojeva.

5.2. Adhezija stanica *Lactobacillus* sojeva sa i bez S-proteina na proteine ekstracelularnog matriksa

Adhezija je složen proces koji uključuje kontakt između bakterijske stanične membrane i površine s kojom dolazi u kontakt. Za *Lactobacillus* sojeve koji eksprimiraju S-protein ustanovljeno je da se vežu na intestinalne epitelne stanične linije sisavaca, intestinalne ili sluznice želuca i komponente ekstracelularnog matriksa, a sposobnost adhezije se međusobno razlikuje ovisno o soju i specifična je ovisno o proteinu ekstracelularnog matriksa.

Ekstracelularni matriks (ECM) je kompleksna struktura koja se nalazi s vanjske strane intestinalnih epitelnih stanica i sadrži različite proteine, od kojih su najzastupljeniji laminin, fibronektin i kolagen.

Za ispitivanje *in vitro* adhezije *Lactobacillus* sojeva na ekstracelularni matriks korištena su četiri soja: *Lactobacillus paraplantarum* SF9B, *L. brevis* SF15B, *Lactobacillus helveticus*

M92 kao pozitivna kontrola te *L. plantarum* D13 kao negativna kontrola. Pritom je svaki soj ispitivan prije i nakon uklanjanja S-proteina gvanidin hidrokloridom.

Rezultati pokazuju da uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih stanica uzrokuje smanjenje adhezije sojeva *Lactobacillus paraplantarum* SF9B, *L. brevis* SF15B i *L. helveticus* M92 na laminin, kolagen i fibronektin. Iznimka je jedino kod adhezije soja L-brevis SF15B na fibronektin te soja *L. paraplantarum* SF15B na laminin, gdje uklanjanje S-proteina nije imalo značajnu ulogu na adheziju stanica navedenih sojeva, sugerirajući da u tim slučajevima S-proteini nisu medijatori u adheziji ispitivanih stanica. Nadalje, ispitivani sojevi, s prisutnim S-proteinom na površini stanica, pokazuju znatno veću sposobnost adhezije na proteine ekstracelularnog matriksa u usporedbi sa sojem *L. plantarum* D13 koji ne eksprimira S-proteine (Slika 3).

Rezultati su dokazali da S-proteini prisutni na površini bakterijsih stanica sudjeluju u adheziji na proteine ekstracelularnog matriksa. Sposobnost adhezije je važan preduvjet za kolonizaciju probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu jer sprječava njihovo trenutno uklanjanje peristaltičkim djelovanjem te im daje prednost pri natjecanju u ekosustavu.

6. ZAKLJUČCI

1. Prisutnost S-proteina na površini bakterijskih stanica povećava preživljavanje stanica u nepovoljnim uvjetima GIT.

2. Sloj S-proteina na površini stanica *Lactobacillus* sojeva sudjeluje i doprinosi povećanju *in vitro* adhezije bakterijskih stanica na proteine ekstracelularnog matriksa.

7. LITERATURA

Al Kassaa,I.,Hober,D.,Hamze,M.,Chihib,N.E.,andDrider,D.(2014).Antivi ral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins. *ProbioticsAntimicrob. Proteins* 6, 177–185.doi:10.1007/s12602-014-9162-6

Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A., Tsakalidou, E., Nychas, G. J., Panagou, E. Z., et al. (2013). *Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests.* 282-291. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.005, Food Microbiol. 33,, n.d.

Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Jokić, M., Šušković, J. »Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures.« *Microbiol Res. 169,* 2014: 623-632.

Begley, M., Gahan, C. G., and Hill, C. (2005). »The interaction between bacteria and bile.« *FEMS Microbiol. Rev. 29,* n.d.: 625-651. doi: 10.1016/j.femsre.2004.09.003.

Bernardeau, M., Guguen, M., and Veroux, J. P. (2006). »Benificial lactobacili in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments.« *FEMS Microbiol. Rev. 30,* n.d.: 487-513. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x.

Borchers, A. T., Selmi, C., F. J., Keen, C. L., and Gershwin, M. E. (2009). »Probiotics and immunity.« *J. Gastroenterol 44,* n.d.: 26-46. doi: 10.1007/s00535-008-2296-0.

Bove, P., Gallone, A.,Russo, P., Capozzi, V., Albenzio, M., Spano, G., et. al. (2012). »Probiotic features of Lactobacillus plantarum mutantstrains.« *Appl. Microbiol. Biotechnol. 96,* n.d.: 431-441. doi:10.1007/s00253-012-4031-2.

Cencic, A., and Langerhole, T. (2010). »Functional cell models of gut and their applications in food microbiology-a review.« *Int. J. Food Microbiol. 141 (suppl. 1),,* n.d.: S4-S14. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.026.

Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Astals, P., Echevarria, J., Iglesias, J. R., et al. (2011). »Novel probiotic Bifidobacterium bifidium CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium Helicobacter pylori. .« *Appl. Environ. Microbiol. 77,,* n.d.: 1335-1343. doi: 10.1128/AEM.01820-10.

Collado, M., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2007). »Measurement of aggragation properties between probiotics and pathogens: in vitro evaluation of different methods.« *J. Microbiol. Methods 71,,* n.d.: 71-74. doi: 10.1016/j.mimet.2007.07.005.

Collado, M., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2008). »Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains.« *Eur. Food Res. Technol. 226,,* n.d.: 1065-1073. doi: 10.1007/s00217-007-0632-x.

Coman, M. M., Vedenelli, M. C., Cecchini, C., Silvi., Orpianesi, C., Boxko, N., et al. (2014). »In vitro evaluation of antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus IMC 501,

Lactobacillus paracasei IMC 502 and SYNBIOagainst pathogens.« *J. Appl. Microbiol. 117,*, n.d.: 518-527. doi: 10.1111/jam.12544.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., and Khutoryanskly, V. V. (2012). »Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. .« *J. Control Release 162,*, n.d.: 56-67. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.003.

Corthesy, B., Gaskins, H. R. and Mercenier. A. (2007). »Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system,.« *J. Nutr. 137,*, n.d.: 781S-790S.

Cresci, G., Nagy, L. E., and Ganapathy, V. (2013). »Lactobacillus GG and tributyrin supplementation reduce intestinal injury.« *J. Parenter. Enteral Nutr, 37.*, n.d.: 763-774. doi: 10.1177/0148607113486809.

Cross, M. L., (2002). »Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens.« *FEMS Immunol. Med. Microbiol. 34,*, n.d.: 245-253. doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00632.x.

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., and Palenzona, D. (2000). »Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum.« *Lett. appl. Microbiol. 31,*, n.d.: 438-442. doi: 1046/j.1365-2672.2000.00845.x.

Delgado, S., O'sullivan, E., Fitzgerald, G., and Mayo, B. (2007). »Subtractive screening for probiotic properties of Lactobacillus species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics.« *J. Food Sci. 72,*, n.d.: M310-M315. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00479.x.

Ferreira, C. L., Grzeskowiak, L., Collado, M. C., and Salminen, S. (2011). »In vitro evaluation of Lactobacillus gasseri strains of infant origin onadhesion and aggregation of specific pathogens.« *J. Food Prot. 74,*, n.d.: 1482-1487. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-074.

Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., and Gil, A. (2013). »Sources, isolation, characterisation, and evaluation of probiotics.« *Br. J. Nutr. 109(Suppl. 2),*, n.d.: S35-S50. doi: 10.1017/S0007114512004011.

Frece, J., Kos, B., Beganović, J., Vuković, S., Šušković, J. »In vivo testing offunctional properties of three selectedprobiotic strains.« *World J Microb Biot 21,* 2005: 1401-1408.

Gagnon, M., Zihler, A., Chassard, C., and Lacroix, C. (2011). »Ecology of probiotics and enteric protection,.« *Probiotic Bacteria and Enteric Infections, eds. J. J. Malago J. F. J. G. Koninks, and R. Marinsek-Logar (Netherlands: Springer),*, n.d.: 65-85. doi: 10.1007/978-94-007-0386-5_3.

Garcia-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., Gomez De Cadinanos, L. P.,Requena, T., Pelaez, C., et al. (2014). »Adhesion abilities of diary lactobacillus plantarum strains

showing an aggregation phenotype.« *Food Res. Int. 57,*, n.d.: 44-50. doi: 10.1016/j.fooders.2014.01.010.

Group., Joint FAO/WHO Working. *Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food:*. ON: FAO/WHO., London,: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food., (2002).

Hickson, M. (2011). *Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and Clostridium difficile infection.* 185-197. doi: 10.1177/1756283X11399115: Therap. Adv. Gastroenterol. 4,, n.d.

Jena, P. K., Trivedi, D., Thakore, K., Chaudhary, H., Giri, S. S., and Seshadri, S. (2013). *Isolation and characterization of probiotic properties of lactobacilli isolated from rat fecal microbiota.* 407-416. doi: 10.1111/1348-0421.12054, Microbiol. Immunol. 57,, n.d.

Kassaa, I., Hober, D., Hamze, M., Chihib, N. E., and Drder, D. (2014). *Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins.* 177-185. doi: 10.1007/s12602-014-9162-6, Probiotics Antimicrob. Proteins 6,, n.d.

Kinoshita, H., Imoto, S., Suda, Y., Ishida, M., Kawai, Y., et al. (2013). *Proposal of screening method for intestinal mucus adhesive lactobacilli using the enzymatic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).* 150-158. doi: 10.1111/j.1740-0929.2012.01054.x, Anim. Sci. J. 84,, n.d.

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

Lahteinen, T., Malinen, E., Koort, J. M., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N., et al. (2010). *Probiotic properties of Lactobacillus isolates originating from porcine intestine and feces.* 293-300. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.08.002, Anaerobe 16,, n.d.

Lahtinen, S. J., Jalonen, L., Ouwehand, A. C., and Salminen, S. J. (2007). *Specific Bifidobacterium strains isolated from elderly subjects inhibit growth of Staphylacoccus aureus.* 125-128. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.023, Int. J. Food Microbiol. 117,, n.d.

Laparra, J. M., and Sanz, Y. (2009). *Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium.* 695-701. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02729.x, Lett. Appl. Microbiol. 49,, n.d.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S. L., Di Leo, A., and Visconti, A. (2008). *Antagonistic activity of potential probiotic lactobacilli against the ureolytic pathogen Yersinia enterocolitica.* . 175-181. doi: 10.1007/s00284-007-9069-5, Curr. Microbiol. 56,, n.d.

Mainville, I., Arcand, Y., and Farnworth, E. R. (2005). *A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics.* 287-296. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020, Int. J. Food Microbiol. 99,, n.d.

Mennigen, R., and Bruewer, M. (2009). *Effect of probiotics on intestinal barrier function.* 183-189. doi: 10.1111/j.749-6632.2009.04059.x, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1165,, n.d.

Papadimitrou, K., Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B. and Tsakalidou, E. (2015). *Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches.* doi: 10.3389/fmicb.2015.00058, frontiers in microbiology, n.d.

Parkes, G. C., Sanderson, J. D., and Whelan, K. (2009). *The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhoea.* 237-244. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70059-3, Lancet Infect. Dis. 9,, n.d.

Pisano, M. B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, M. P., et al. (2014). *Preliminary evaluation of probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from Sardinian dairy products.* 2014:286390. doi: 10.1155/2014/286390, Biomed Res. Int. , n.d.

Resta-Lenert. S., and Barrett, K. E. (2003). *Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC).* 988-997. doi: 10.1136/gut.52.7.988, Gut 52,, n.d.

Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hormannsperger, G., et al. (2010). *Safety assessment of probiotics for human use.* 164-185. doi: 10.4161/gmic.1.3.12127, Gut Microbes 1,, n.d.

Steinberg, R. S., Silva, L. C., Souza, T. C., Lima, M. T., De Oliveira, N. L., Viera, L. Q., et al (2014). *Safety and protectiveeffectiveness of two strains of Lactobacillus with probiotic features in an experimental model of salmonellosis.* 8755-8776. doi: 10.3390/ijerph110908755, Int. J. Environ. Res. Public Health 11,, n.d.

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

Šušković, J., „Fermentacija kiselog kupusa“, Predavanja iz kolegija „Probiotici i starter kulture“, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilište u Zagrebu, 2014.

Tan, Q., Xu, Aguilar, Z. P., peng, S., Dong, S., Wang, B., et al. (2013). *Safety assessment and probiotic evaluation of Enterococcus faecium YF5 isolated from sourdough.* M587-M593. doi: 10.1111/1750-3841.12079, J. Food. Sci. 78,, n.d.

Tassell, M. L. V., and Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus adhesion to mucus.* 613-636. doi: 10.3390/nu3050613, Nutrients 3,, n.d.

Upadrasta, A., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G., and Ross, R. P. (2011). *Improving the stress tolerance of probiotic cultures: recent trends and future directions, in Stress Response of Lactic Acid Bacteria, eds E. Tsakalidou and K. Papadimitriou.* 395-438., New York: Springer,, n.d.

Van den Abbeele, P., Roos, S., Eeckhaut, V., Mackenzie, D. A., Derde, M., Verstraete, W., et al. (2012). *Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model rsults in a more respresentative colonization by lactobacilli.* 106-115. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00308.x, Microb. Biotechnol. 5,, n.d.

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., and Ouwehand, A. C., (2005). *Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: quantitative analysis of bacterial adhesion and viability.* 238-244. doi: 10.1016/j.resmic.2004.08.012, Res. Microbiol. 156,, n.d.

Vinderola, C. G., Medici, M., and Perdigon, G. (2004). *Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria.* 230-243. doi: 10.1046/j.1365-2672.2004.02158.x, J. appl. Microbiol.96,, n.d.

Zyrek, A. A., Cichon, C., Helms, S., Enders, C., Sonnenborn, U., and Schmidt, M. A. (2007). »Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherchia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair.« 804-816. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00836.x, Cell Microbiol. 9, n.d