

Prilagodba na uvjete liofilizacije i antioksidacijski potencijal *Levilactobacillus brevis* sojeva

Martinović, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:108889>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-11**



Repository / Repozitorij:

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



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

Petra Martinović
0058221284

**PRILAGODBA NA UVJETE LIOFILIZACIJE I ANTIOKSIDACIJSKI POTENCIJAL
LEVILACTOBACILLUS BREVIS SOJEVA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Zagreb, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Prilagodba na uvjete liofilizacije i antioksidacijski potencijal *Levilactobacillus brevis*
sojeva

Petra Martinović, 0058221284

Sažetak:

U ovom završnom radu analizirani su bakterijski sojevi *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20, izolirani iz majčinog mlijeka s prethodno evaluiranim funkcionalnim svojstvima. Cilj ovog rada bio je ispitati lioprotektivna svojstva, nusproizvoda mliječne industrije, permeata, slatke i kisele sirutke, kao medija tijekom liofilizacije biomase *L. brevis*. Dodatno je provedena preliminarna analiza antioksidacijskog potencijala *L. brevis* sojeva. Temeljem rezultata ustanovljeno je da tri od četiri soja imaju tendenciju većeg postotka uklanjanja DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Također, cilj je bio ustanoviti potencijalnu ulogu S-layer proteina, te usporediti sojeve *L. brevis*, prije i nakon ekstrakcije S-proteina, kako bi se odredila povezanost ovih proteina i zaštite stanične stijenke liofiliziranih stanica tijekom liofilizacije. SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) analizom potvrđena je prisutnost S-layer proteina u sojevima *L. brevis*. Analiza je pokazala da kada *L. brevis* ekspimiraju gene koji kodiraju za S-layer proteine iskazuju veću otpornost i prilagodbu na uvjete liofilizacije. Među analiziranim, soj *L. brevis* MB13, uz primjenu permeata kao lioprotektivnog medija, preživljava u najvišem broju bakterijskih stanica te s najmanjom razlikom u broju stanica prije i nakon liofilizacije, s vrijednošću $\Delta\log(\text{CFU/mL})=0,09$ što potiče daljnja istraživanja ponovnog iskorištenja ovog nusproizvoda unutar aspekata održivosti.

Ključne riječi: antioksidacijski potencijal, *Levilactobacillus brevis*, S-layer proteini, liofilizacija, permeat, sirutka

Rad sadrži: 24 stranica, 7 slika, 7 tablica, 25 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac

Datum obrane: 10. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Adaptation to lyophilization conditions and antioxidant potential of *Levilactobacillus brevis* strains

Petra Martinović, 0058221284

Abstract:

In this final work, bacterial strains *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 and MB20, isolated from human milk, with previously evaluated functional properties, were analyzed. The aim of this work was to examine the lioprotective properties of dairy industry by-products, permeate, sweet and sour whey, as a medium during lyophilization of *L. brevis* biomass. In addition, a preliminary analysis of the antioxidant potential of *L. brevis* strains was performed. Based on the results, it was established that three of the four strains have a tendency to a higher percentage of DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) radical removal. Also, the goal was to establish the potential role of S-layer proteins, and to compare *L. brevis* strains before and after extraction with S-proteins, in order to determine the association of these proteins in the protection of the cell wall of lyophilized cells during lyophilization. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) analysis confirmed the presence of S-layer protein in *L. brevis* strains. The analysis showed that S-layer expressing *L. brevis* show greater resistance and adaptation to lyophilization conditions. Among those analyzed, strain *L. brevis* MB13, when the use of permeate as a lioprotective medium, survives in the highest number of bacterial cells and with the lowest difference in the number of cells before and after lyophilization, with a value of $\Delta\log(\text{CFU/mL})=0,09$.

Keywords: antioxidative potential, *Levilactobacillus brevis*, S-layer proteins, lyophilization, permeate, whey

Thesis contains: 24 pages, 7 figures, 7 tables, 25 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Full Professor Jasna Novak

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD

Thesis defended: September 10, 2024

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. OPĆENITO O BAKTERIJAMA MLIJEČNE KISELINE	2
2.2. UČINCI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE NA IMUNOLOŠKI SUSTAV	2
2.3. ULOGA U ZAŠTITI CRIJEVNE EPITELNE BARIJERE	3
2.4. S-LAYER PROTEINI	5
2.4.1. STRUKTURA S-LAYER PROTEINA	5
2.4.2. ZAŠTITNI UČINAK S-LAYER PROTEINA KOD <i>LACTOBACILLUS</i> BAKTERIJA	6
2.5. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE	7
2.5.1. ORGANSKE KISELINE BMK	8
2.5.2. VODIKOV PEROKSID (H ₂ O ₂) BMK	8
2.5.3. UGLJIKOV DIOKSID (CO ₂)	9
2.5.4. MASNE KISELINE	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. MIKROORGANIZMI	10
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE	10
3.1.3. KEMIČALIJE	11
3.1.4. APARATURA I PRIBOR	11
3.2. METODE	13
3.2.1. ANALIZA POVRŠINSKIH PROTEINA SDS-PAGE-OM (ENGL. <i>SODIUM DODECYL SULPHATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS</i>)	13
3.2.2. PRIPRAVA SUHIH AKTIVNIH FORMULACIJA BAKTERIJSKIH STANICA LIOFILIZACIJOM	13
3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG POTENCIJALA	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. SDS-PAGE ANALIZA S-LAYER PROTEINA	17
4.2. LIOFILIZACIJA STANICA <i>L. BREVIS</i> SOJEVA	17

4.3. ISPITIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA <i>L. BREVIS</i>	20
5. ZAKLJUČCI	21
6. POPIS LITERATURE	22

1. UVOD

Majčino mlijeko pruža zaštitu novorođenčadi, što proizlazi iz evidentnih dokaza da je učestalost zaraznih bolesti znatno niža kod dojene djece u usporedbi s bebama hranjenim adaptiranim mlijekom. Nedavne studije pokazale su da ljudsko mlijeko nije sterilna tjelesna tekućina te da predstavlja izvrstan i kontinuiran izvor komenzalnih bakterija koje koloniziraju intestinalni trakt dojenčeta. Prisutne bakterijske vrste također mogu igrati važnu ulogu u smanjenju učestalosti i težine zaraznih bolesti kod dojene djece. Ovu hipotezu podržavaju relativno starije studije koje su izvijestile o izostanku antimikrobne aktivnosti nakon pasterizacije humanog mlijeka (Lara-Villoslada i sur., 2007). Početkom 21. stoljeća, dvije europske skupine neovisno su potvrdile prisutnost bakterija mliječne kiseline (BMK) u majčinom mlijeku i istražile njihov probiotički potencijal. Lara-Villoslada i sur. (2007) izvijestili su da bakterije iz humanog mlijeka štite i majku i novorođenče od infekcija uzrokovanih *Staphylococcus aureus*. Stoga su u ovom radu analizirana četiri različita soja *L. brevis* iz mikrobiote majčinog mlijeka.

Antioksidativna aktivnost sojeva *L. brevis* može biti značajna za smanjenje oksidativnog stresa i neutraliziranje slobodnih radikala, a prema literaturi probiotičke bakterije mogu utjecati, u određenoj razini, na smanjenje pojavnosti oboljenja povezanih s oksidativnim stresom posredovanjem u molekularnim procesima ograničavanja prekomjernih količina reaktivnih radikala što je od važnosti za funkcionalne učinke. Osim toga, pojedini sojevi BMK-a su od ključne važnosti u probavnom sustavu jer proizvode antimikrobne metabolite poput bakteriocina, čime učinkovito sprječavaju rast patogenih i infektivnih mikroorganizama. Stoga su predloženi kriteriji za potvrđivanje probiotičke aktivnosti, uključujući sposobnost proizvodnje korisnih metabolita, otpornost na kiseline i žučne soli, sposobnost prianjanja u crijevnom traktu te odsutnost otpornosti na antibiotike. Nekoliko BMK-a, posebno iz roda *Lactobacillus*, proizvodi bakteriocine.

U ovom radu provedeni su pokusi za procjenu prilagodbe bakterijskih stanica *Levilactobacillus brevis* na uvjete liofilizacije te pokusi procjene antioksidacijskog potencijala ovih sojeva. Prilikom istraživanja cilj je bio ispitati lioprotektivni učinak permeata, kisele i slatke sirutke tijekom liofilizacije sojeva *Levilactobacillus brevis*. Provedena je ekstrakcija S-proteina s površine bakterijskih stanica *L. brevis* primjenom gvanidin hidroklorida (GHCi), te su S-proteini detektirani SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) analizom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Općenito o bakterijama mliječne kiseline

BMK su bakterije koje kao glavni proizvod fermentacije stvaraju mliječnu kiselinu. Ova velika skupina bakterija uključuje *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* i *Leuconostoc*. Imaju ograničene biosintetske sposobnosti te stoga zahtijevaju kontinuiranu opskrbu purinima, pirimidinima, vitaminima i aminokiselinama. To su nesporelirajući, nepokretni mikroorganizmi koji energiju dobivaju fermentacijom šećera te su obično kategorizirani kao fakultativni anaerobi. BMK su široko rasprostranjene u probavnom sustavu različitih životinja kao autohtoni mikrobiom. Brojčano najveći broj sojeva identificiran je u rodu *Lactobacillus*, koji sadrži više od 260 vrsta (Qiao i sur., 2022).

Različitim istraživanjima se ispitivala sigurnost primjene BMK kod ljudi. Rod *Lactobacillus* evaluiran je kako bi se provjerila sigurnost bakterija. Kod bakterija ovog roda detektirana je postojanost, otpornost na antibiotike i mogućnost stvaranja biogenih amina u fermentiranim proizvodima što može dovesti do neželjenih nuspojava koje se rijetko javljaju. Utvrđeno je da se BMK smatraju sigurnima (Masood i sur., 2011).

2.2. Učinci bakterija mliječne kiseline na imunološki sustav

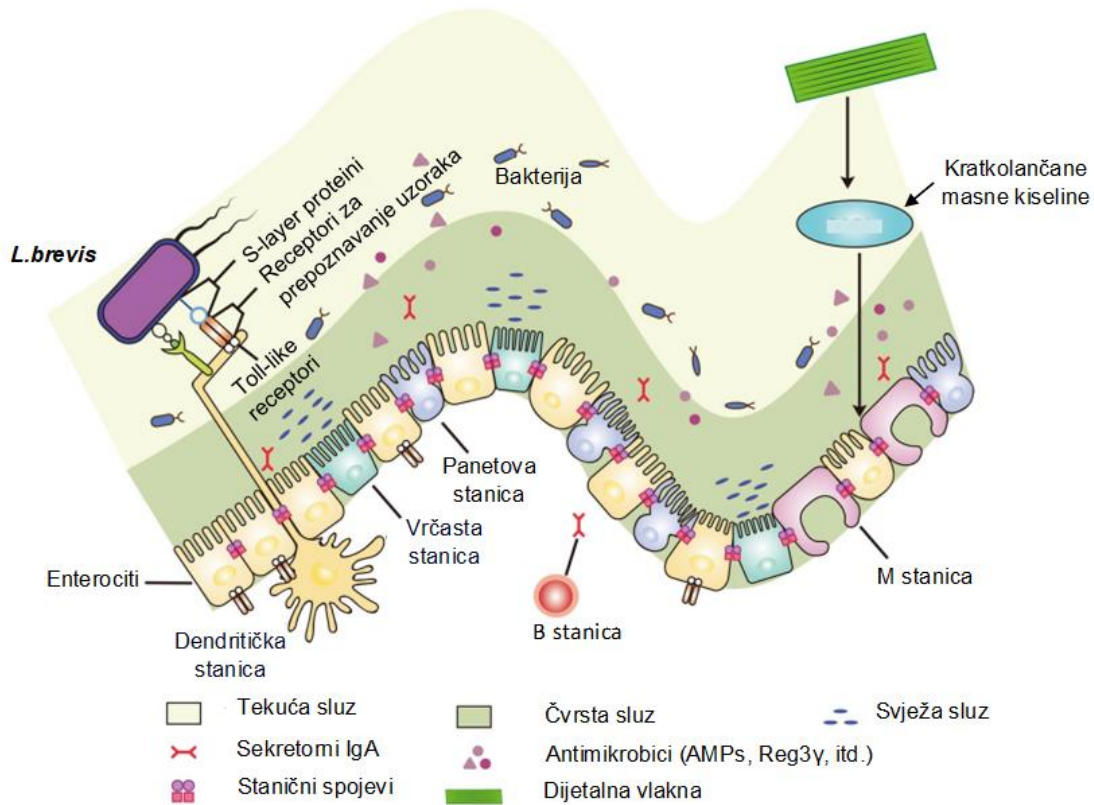
Imunitet je osnovno podijeljen na dvije vrste: urođeni i stečeni imunitet. Urođeni imunitet je nespecifična vrsta imuniteta, a uključuje mehaničke barijere i upalni odgovor. Dok je stečeni imunitet specifična vrsta imuniteta koja uključuje limfocite, specifične vrste proteina i antitijela koja brane tijelo (Vivier i Malissen, 2005). Antitijela su glavni sastojci imunološkog sustava i ona mogu biti monoklonska i poliklonska. Pojedini sojevi BMK-a ako se ubrizgaju u neaktivnom stanju mogu generirati nakupljanje povećanih koncentracija IgA. Antitijela proizvedena na ovaj način su poliklonska i mogu pružiti imunitet protiv različitih antigena. Iznenadujuće je da konzumacija kravljeg mlijeka može biti vrlo ekonomičan način imunizacije. Na taj način moguće je razviti imunitet protiv infekcija uzrokovanih bakterijom *Staphylococcus aureus* (Tempelmans Plat-Sinnige i sur., 2009).

BMK također imaju važnu ulogu u smanjenju alergijskih reakcija te u određenim uvjetima mogu potencirati njihove odgovore. Imunoglobulin E (IgE) uključen je u reakcije tipa I (rana preosjetljivost). Utvrđeno je da *Lactobacillus citreum* regulira stvaranje seruma IgE i kontrolira ukupnu proizvodnju antitijela. *L. citreum* može biti koristan u sprječavanju razvoja i napredovanja proizvodnje IgE antitijela te stoga može smanjiti reakcije preosjetljivosti (Masood i sur., 2011).

Istražena je uloga bakterija iz roda *Enterococcus* u agregaciji eozinofila. Bitno je naglasiti da eozinofili imaju ključnu ulogu u razvoju alergijskih reakcija. *Enterococcus faecalis* inhibira nakupljanje eozinofila, što ukazuje na doprinos bakterija iz roda *Enterococcus* u ublažavanju alergijskih reakcija (Masood i sur., 2011).

2.3. Uloga u zaštiti crijevne epitelne barijere

Probiotici su živi mikroorganizmi koji doprinose održavanju ravnoteže crijevne mikrobiote, te mogu imati specifične učinke poput doprinosa jačanju imuniteta domaćina. Upravo prvi kontakt nakon unošenja probiotičkih stanica u probavni sustav, predstavlja crijevna epitelna barijera koja se formira kao monosloj crijevnih epitelnih lizalnih stanica koja razdvaja sluz od mikrobiote (slika 1) (Liu i sur., 2020). Crijevna epitelna barijera je važna u obrani organizma od infekcija i virusa, a oštećenje njenog funkcionalnog sustava uzrokuje crijevne poremećaje poput upalne bolesti crijeva i dijabetesa. Kao prva prepreka u obrani protiv patogena djeluje sluz, izlučena od vrčastih stanica, koja prekriva crijevni epitel. Važan izvor energije za vrčaste stanice su kratkolanačane masne kiseline. Bitan dio crijevne epitelne barijere su i Panetove stanice koje izlučuju antimikrobne peptide i Reg3γ koji se zajedno sa sekretornim IgA luče u sluz i štite domaćina od komenzalnih patogena (Liu i sur., 2020). Površinske komponente probiotika, kao što su bičevi, pili, S-layer proteini, kapsularni polisaharid, lipoteihonska kiselina i lipopolisaharid, čine molekularne obrasce na površini mikroorganizma (engl. *Microbe-Associated Molecular Patterns, MAMPs*) (Lebeer i sur., 2018). Toll-slični receptori i receptori za prepoznavanje uzoraka (engl. *Pattern recognition receptors, PRRs*), poput NOD-sličnih receptora (Wells i sur., 2011), specifično se vežu na molekularne obrasce što potiče imunološki odgovor dendritičkih stanica kako bi se crijevna epitelna barijera zaštitila (tablica 1) (Liu i sur., 2020).



Slika 1. Prikaz strukture i funkcije crijevne epitelne barijere te probiotika *L. brevis* (prema Liu i sur., 2020)

Tablica 1. Primjeri interakcija između molekularnih obrazaca probiotičkih sojeva i receptora za prepoznavanje uzoraka domaćina (Liu i sur., 2020)

Molekularni obrasci na površini mikroorganizama	Probiotik			
	Receptori za prepoznavanje uzoraka	Lokacija receptora za prepoznavanje uzoraka	Koreceptor	Vrste
SlpA	DC-receptor	Stanična membrana	Nepoznat	<i>L. acidophilus</i>
Bičevi	TLR5	Stanična membrana	Nepoznat	<i>E. coli</i> Nissle 1917
Pili	TLR4	Stanična membrana	Glikoproteini s manozna jedinicama	<i>E. coli</i> Nissle 1917 (tip 1 pili)
Kapsularni polisaharid	Nepoznati	Nepoznata	Nepoznat	<i>B. thetaiotaomicron</i>

Lipoteihonska kiselina	TLR2	Stanična membrana	CD14 i CD36	<i>L. plantarum</i>
Peptidoglikan	TLR2-NOD1(ili NOD2)	Stanična membrana-citoplazma	CD14	<i>L. plantarum</i> DAP-PG
p40 p75	Nepoznati	Nepoznata	EGFR	<i>L. rhamnosus</i> GG
Indol	TLP4	Stanična membrana	Nepoznat	<i>B. infantis</i>

Tablica 1. Primjeri interakcija između molekularnih obrazaca probiotičkih sojeva i receptora za prepoznavanje uzoraka domaćina-*nastavak*

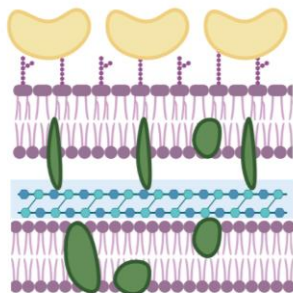
SlpA površinski sloj proteina, DC-receptor dendritički specifični receptor za hvatanje interćelijske adhezijske molekule-3, koji nije integrin, TLR-ovi toll-slični receptori, NOD domena za vezanje i oligomerizaciju nukleotida, PG peptidoglikan, lipoteihonska kiselina; p75 i p40, hidrolaze povezane sa staničnom stijjenkom

2.4. S-layer proteini

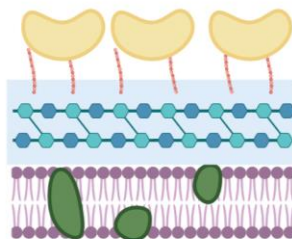
2.4.1. Struktura S-layer proteina

Bakterijski S-layer površinski slojevi su supramolekularne strukture stanične ovojnice koje su prisutne u arhejama, kao i u Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama (slika 2) (Sleytr i sur., 2011). Kemijske analize izoliranih S-slojeva pokazale su da se uglavnom sastoje od jedne vrste proteina ili više vrsta glikoproteina i da njihova prividna relativna molekulska masa iznosi od 40,000 do 200,000. Ti proteini nazvani su S-layer proteinima (SLP). S-layer proteini samoorganizacijom formiraju regularni rešetkasti monosloj i vežu se za vanjsku membranu nekovalentnim interakcijama (Liu i sur., 2020). Rešetkasti sloj površine koji se nalazi s vanjske strane stanice, smatra se prvom bakterijskom komponentom koja izravno stupa u interakciju s epitelom domaćina. S-layer proteini *Lactobacillus* bakterija čine oko 15 % ukupnih proteina stanične stijjenke, a razlikuju se od proteina drugih bakterija po svojoj manjoj molekulskoj masi (25 – 71 kDa) i višim vrijednostima izoelektričnih točaka (9,4 – 10,4) (Panwar i sur., 2017).

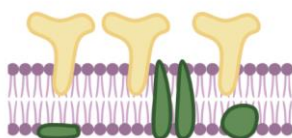
a) Gram-negativne bakterije



b) Gram-pozitivne bakterije i arheje



c) Gram-negativne arheje



S-layer proteini



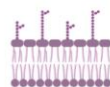
Membranski proteini



Stanična membrana



Peptidoglikan



Vanjska membrana



Polimer sekundarne stanične stijenke

Slika 2. Prikaz S-layer proteina kod arheja i bakterija (prema Sleytr i sur., 2011)

Slika izrađena pomoću BioRender.com.

2.4.2. Zaštitni učinak S-layer proteina kod *Lactobacillus* bakterija

U prethodnim studijama uviđeno je da je bakterija *L. helveticus* R0052 inhibirala adheziju *E. coli* O157 na Caco-2 stanice (Liu i sur., 2020), a njezin ekstrakt površinskih proteina koagregirao sa *Salmonella* Typhimurium FP1 (Johnson-Henry i sur., 2007). Funkcija S-layer proteina u adheziji bakterija i zaštiti crijevne barijere može se pripisati njihovoj sposobnosti kompeticije s patogenima poput enterohemoragične *E. coli* (EHEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC) i enteropatogene *E. coli* (EPEC) za adhezijska mjesta na površini staničnih crijevnih

stanica. Dodatno, njihova učinkovitost može se pripisati i karakteristikama kao što su hidrofobnost površine (Beganović i sur., 2011), raspodjela električnog naboja te njihova sposobnost koagregacije s patogenim bakterijama (Liu i sur., 2020). Ljudska epitelna stanična linija Caco-2 široko se koristi kao model crijevne epitelne barijere, a izvorno je izvedena iz karcinoma debelog crijeva (Verhoeckx i sur., 2015).

Nedavna istraživanja su pokazala da pročišćeni S-layer proteini *L. plantarum* imaju zaštitni učinak na Caco-2 stanice inficirane s enteropatogenom *E. coli*. To postižu povećanjem trans-epitelnog otpora i smanjenjem propusnosti Caco-2 stanica (Li i sur., 2018). Liu i sur. (2020) su identificirali mikrointegralne membranske proteine (engl. *Micro integral membrane proteins, MIMPs*) kao najmanju domenu iz SLP *L. plantarum*. U prethodnim istraživanjima je otkriveno da MIMP-ovi *L. plantarum* CGMCC 1258 mogu obnoviti oštećene čvrste međustanične veza (engl. *tight junctions*) tako da se poveća ekspresija proteina, kao što su JAM-1, okludin i kladin-1 proteini. Ti proteini omogućuju prijenos iona i malih molekula topljivih tvari do crijevne barijere, a sprječavaju prolaz velikih, toksičnih molekula i mikroorganizama (Liu i sur., 2020).

Nadalje uočeno je da S-layer proteini iz *L. acidophilus* imaju zaštitno djelovanje prema crijevnom epitelu i obnavljanjem trans-epitelnog otpora inhibiraju prodiranje *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Također je uočeno da S-layer proteini mogu smanjivati razinu apoptoze stanica i time povećavati fosforilaciju ekstracelularno regulirane kinaze (Liu i sur., 2020; Li i sur., 2018).

Kod nekih vrsta, kao što su *L. buchneri* i *L. kefir* mogu se pronaći specifični glikozilirani S-layer proteini. Kod probiotičkih *Lactobacillus* pronađeni su adhezivni S-layer proteini koji mogu inhibirati prijanjanje i infekciju patogenih bakterija. Ti izolirani S-layer proteini laktobacila pokazali su sposobnost vezivanja za stanične proteine domaćina i ekstracelularni matriks (Teame i sur., 2020).

2.5. Antimikrobno djelovanje

Bakteriocini su ribosomalno sintetizirani, izvanstanično otpušteni bioaktivni peptidi ili kompleksi peptida, koji posjeduju baktericidno (ubijaju bakterije) i bakteriostatsko djelovanje (inhibiraju rast bakterija). To su proteini koje luče mnogi sojevi Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, a pokazuju inhibicijsko djelovanje protiv sojeva iste vrste ili vrsta taksonomski blisko povezanih sa sojevima producentima (Dinesh Raj Modi, 2015).

Bakteriocini BMK-a obično ubijaju druge osjetljive Gram-pozitivne bakterije destabilizirajući funkciju membrane, a pronađeni su među homo i heterofermentativnim vrstama BMK-a. Homofermentativne vrste kao produkt reakcije razgradnje ugljikohidrata daju samo mliječnu kiselinu, a heterofermentativne osim mliječne kiseline kao glavni produkt daju i nusprodukte ugljikov dioksid, etanol i acetat. Postoje četiri općenite klase antimikrobnih peptida ili proteina (bakteriocina) iz BMK-a: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc*.

Antimikrobna svojstva bakterija koriste se u borbi protiv kvarenja hrane, patogenih bakterija u prehrani te kao dodatak hrani za životinje radi smanjenja pojave bakterijskih patogena otpornih na antibiotike. Također se koriste kao probiotici kod ljudi za kontrolu bolesti probavnog sustava uzrokovanih crijevnim patogenima (Dinesh Raj Modi, 2015).

Ovi antibakterijski učinci mogući su zbog različitih antimikrobnih spojeva koje BMK proizvode, kao što su organske kiseline, vodikov peroksid, ugljikov dioksid i masne kiseline.

2.5.1. Organske kiseline BMK

Fermentacija BMK karakterizirana je nakupljanjem organskih kiselina i samim time smanjenjem pH vrijednosti. Antimikrobni učinak organskih kiselina proizlazi iz sniženja pH vrijednosti i prisutnosti nedisociranih oblika molekula. Niska vanjska pH vrijednost uzrokuje zakiseljavanje stanične citoplazme, dok nedisocirana kiselina zbog svoje lipofilne građe može pasivno difundirati kroz membranu (Dinesh Raj Modi, 2015). Nedisocirana kiselina uzrokuje raspad elektrokemijskog protonskog gradijenta ili mijenja propusnost stanične membrane što dovodi do poremećaja sustava za transport supstrata (Šušković i sur., 2010).

Mliječna kiselina je glavni metabolit fermentacije BMK-a i nalazi se u ravnoteži sa svojim nedisociranim i disociranim oblicima. Opseg disocijacije ovisi o pH vrijednosti; pri niskom pH velika količina mliječne kiseline je u nedisociranom obliku, što je toksično za mnoge bakterije, gljivice i kvasce. Međutim, različiti mikroorganizmi znatno se razlikuju u svojoj osjetljivosti na mliječnu kiselinu. Pri pH 5,0, mliječna kiselina inhibira bakterije koje formiraju spore, ali nije učinkovita protiv kvasaca i plijesni. Također, stereoizomeri mliječne kiseline razlikuju se po svojoj antimikrobnoj aktivnosti (Dinesh Raj Modi, 2015).

2.5.2. Vodikov peroksid (H₂O₂) BMK

Vodikov peroksid proizvode BMK u prisutnosti kisika kao rezultat djelovanja flavoproteinskih oksidaza ili nikotinamid adenin dinukleotida peroksidaza. Antimikrobni učinak H₂O₂ može proizlaziti iz oksidacije sulfhidrilnih grupa, što uzrokuje denaturaciju niza enzima, ali i iz peroksidacije membranskih lipida čime se povećava propusnost membrane. Vodikov peroksid

također može djelovati kao prekursor za proizvodnju baktericidnih kiselih slobodnih radikala poput superoksida, ugljikovog dioksida i hidroksilnih radikala, koji mogu oštetiti DNA. Proizvodnja H₂O₂ od strane sojeva *Lactobacillus* i *Lactococcus* inhibirala je *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. i razne psihotropne mikroorganizme u hrani (Dinesh Raj Modi, 2015).

2.5.3. Ugljikov dioksid (CO₂)

Ugljikov dioksid uglavnom proizvode heterofermentativne BMK. CO₂ je bitan u stvaranju anaerobne okoline koja inhibira enzimске dekarboksilacije, a nakupljanje CO₂ u fosfolipidnom dvosloju može uzrokovati disfunkciju u propusnosti. CO₂ može učinkovito inhibirati rast mnogih mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane, posebno Gram-pozitivnih psihotropnih bakterija. Stupanj inhibicije CO₂ značajno varira ovisno o vrsti organizmima (Hotchkiss i sur., 1999).

2.5.4. Masne kiseline

U odgovarajućim uvjetima neke bakterije roda *Lactobacillus* i *Lactococcus* zahvaljujući svojoj lipolitičkoj aktivnosti mogu proizvesti značajne količine masnih kiselina u fermentiranom mlijeku i suhim fermentiranim kobasicama. Nezasićene masne kiseline aktivne su protiv Gram-pozitivnih bakterija, a antimikrobna aktivnost masnih kiselina ovisi o dužini lanca, koncentraciji i pH medija (Ammor i sur., 2006). Antimikrobno djelovanje masnih kiselina je zbog nedisocirane molekule, a ne aniona s obzirom da pH ima značajne učinke na njihovu aktivnost (Dinesh Raj Modi, 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

U eksperimentima su korištena 4 soja bakterije mliječne kiseline koji su izolirani iz majčinog mlijeka. Korišteni sojevi pripadaju vrsti *Levilactobacillus brevis* i prikazani su u tablici 2. Mikroorganizmi su uzgajani anaerobno preko noći pri 37 °C u MRS bujonu. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-bioteknološkog fakulteta.

Tablica 2. Bakterijski sojevi *Levilactobacillus brevis* korišteni u ovom radu

Sojevi	Optimalna podloga za rast	Uvjeti rasta
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB1	MRS bujon	37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB2	MRS bujon	37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB13	MRS bujon	37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i> MB20	MRS bujon	37 °C, anaerobno

3.1.2. Hranjive podloge

MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) hranjiva podloga („Biolife“, Italija) - sastav naveden od proizvođača

- pepton 10,0 g/L
- mesni ekstrakt 10,0 g/L
- kvašćev ekstrakt 5,0 g/L
- glukoza 20,0 g/L
- Tween 80 1,0 g/L
- MgSO₄ × 7 H₂O 0,1 g/L
- MnSO₄ × 7 H₂O 0,05 g/L
- natrijev-acetat 5,0 g/L
- agar (za krutu podlogu) 20 g/L

Za uzgoj bakterija korištena je MRS agar (kruta hranjiva podloga) i MRS bujon (tekuća hranjiva podloga bez agara). Podloga MRS pripravljena je otapanjem navedenih sastojaka u demineraliziranoj vodi. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provela u autoklavu pri 121°C tijekom 15 minuta.

3.1.3. Kemikalije

- akrilamid, „Sigma-Aldrich“, SAD
- amonij-persulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska
- Coomassie Brilliant Blue bojilo, „Sigma-Aldrich“, SAD
- destilirana voda, „PBF“, Hrvatska
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), „Sigma-Aldrich“, SAD
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- fosfatni pufer (engl. *Phosphate-buffered saline, PBS*), „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- gvanidin hidroklorid, „Applichem GmbH“, Njemačka
- izopropanol, „Kemika“, Hrvatska
- NaCl (natrijev klorid), „Kemika“, Hrvatska
- octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- SDS (engl. *Sodium dodecyl sulfate*), „Sigma-Aldrich“, SAD
- standard za elektroforezu, ProSieve QuadColor, „Lonza“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilen), „Sigma“, SAD

3.1.4. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory Equipment“, Italija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- čitač mikrotitracijskih pločica, Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- epruvete 16x160 mm, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- Erlenmeyerove tikvice, „Technische Glaswerke Ilmenau“, Njemačka
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija

- igla za nanošenje proteinskih uzoraka „Hamilton“, SAD
- liofilizator „CHRIST, ALPHA 1-2 LD plus“
- kadice za elektroforezu, „Eppendorf“, SAD
- kivete za centrifugiranje od 15 mL i 50 mL, „Falcon“, Engleska
- mikrotitarska pločica s 96 jažica, „Greiner Bio-One“, Austrija
- napajanje za elektroforetske kadice, „Bio-Rad“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta, „Isolab“, Njemačka
- plastične epruvete od 1,5 i 2 mL, „Eppendorf“, SAD
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Inkolab“, Hrvatska
- vorteks mješač V1 plus, „Biosan“, Latvija
- zamrzivač (-80 °C), „Eppendorf“, SAD

3.2. Metode

3.2.1. Analiza površinskih proteina SDS-PAGE-om (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

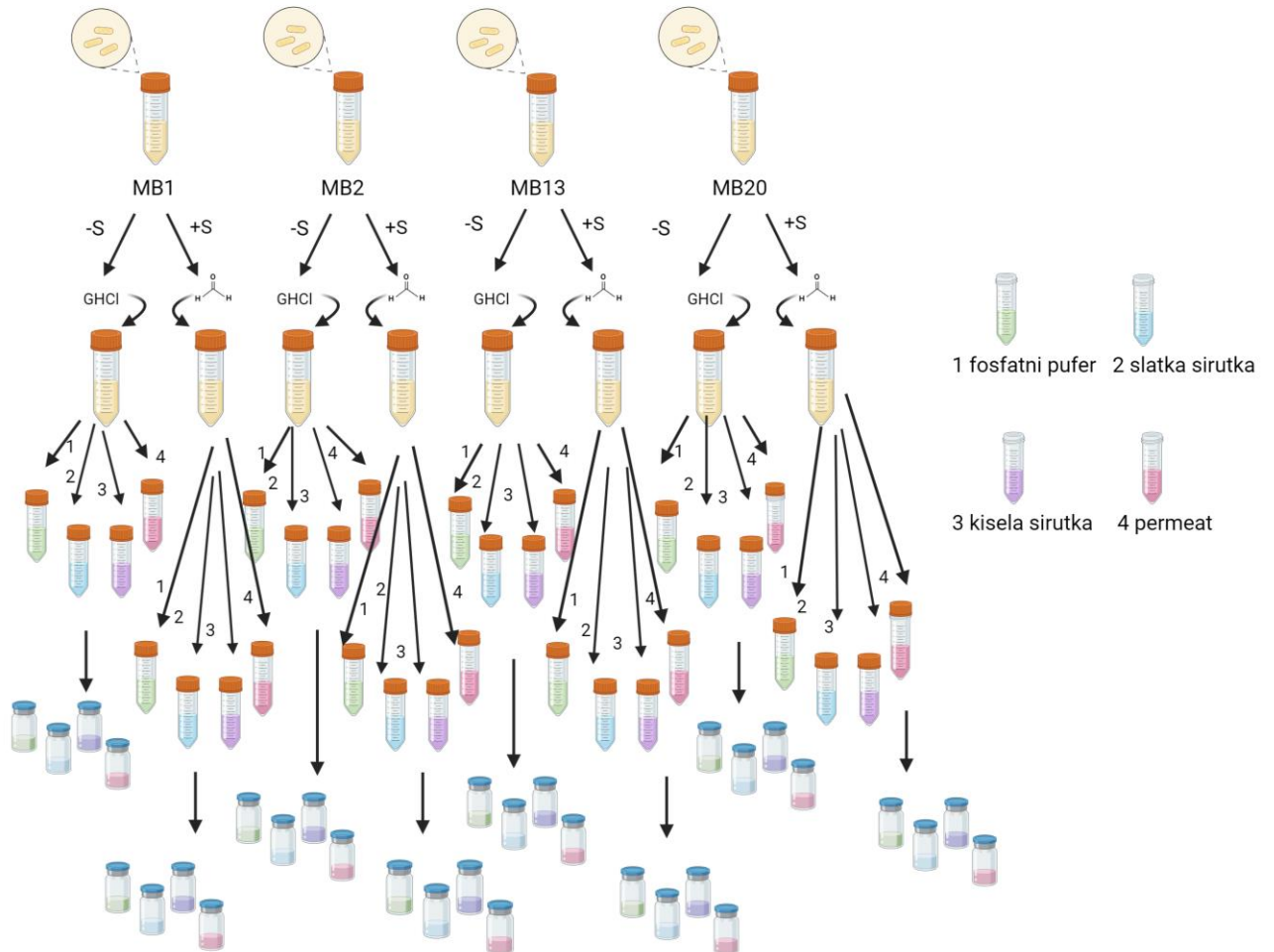
U ovom radu provedena je SDS-PAGE radi detekcije S-proteina. SDS-PAGE je elektroforetska metoda u kojoj se proteini razdvajaju na osnovu svoje molekulske mase. Kao standard korišteno je 5 μ L „ProSieve QuadColor Protein Marker“ koji ima raspon molekulske mase od 4,6 – 315 kDa. SDS-PAGE je provodena pri naponu od 100 – 150 V kroz 45 minuta u kadici za elektroforezu (slika 3). Nakon završetka elektroforeze donji gel je obojan otopinom koja se sastoji od 0,02 % Coomassie Brilliant Blue praha, 25 % izopropanola, 10 % octene kiseline. Zatim je gelu uklonjena boja s 10 % octenom kiselinom.



Slika 3. Prikaz aparature za provođenje SDS-PAGE, vlastita fotografija

3.2.2. Priprava suhih aktivnih formulacija bakterijskih stanica liofilizacijom

Prekonoćne kulture 4 soja bakterija mliječne kiseline *Levilactobacillus brevis* su centrifugirane pri 4200g, 10 minuta, 4 °C. Zatim su paralele svakog soja podijeljene u dvije falconice, ukupno 8 falconica. U jednu falconicu pojedinog soja BMK dodano je 5 mL 3M GHCl-a za uklanjanje S-proteina, a u drugu falconicu sojeva BMK dodano je 5 ml sterilne destilirane vode. Stanice su inkubirane pri 37°C tijekom 1 sata. Stanice su ponovno centrifugirane i talozi su isprani u sterilnoj destiliranoj vodi. Nakon drugog ispiranja stanica određen je broj stanica i svaki uzorak je podijeljen u 4 falconice. Stanice su opet centrifugirane te je talog jedne paralele svakog uzorka suspendiran u 1 mL PBS pufera (pH vrijednosti 7,4), druge paralele svakog uzorka u 1 mL slatke sirutke, treće paralele svakog uzorka u 1 ml kisele sirutke, četvrte paralele u 1 ml permeata, nakon čega su svi uzorci prebačeni u zasebne sterilne staklene penicilinke (slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz pokusa ekstrakcije S-layer proteina s površine bakterijskih stanica te naknadnih faza liofilizacije intaktnih te bakterijskih stanica *L. brevis* kojima je uklonjen S-layer, te faze kultivacije u fosfatnom puferu (kontrola), slatkoj ili kiseljoj sirutci, te permeatu sirutke

Slika izrađena pomoću BioRender.com

Uzorci koji su resuspendirani u PBS-u, permeatu, kiseljoj i slatkoj sirutci su zamrznuti na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 2 sata. Tako priređene suspenzije sušene su u vakuumu pri -60 do $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ u liofilizatoru (slika 5) tijekom 24 sata. Preživljavanje stanica nakon liofilizacije određeno je indirektnom metodom.



Slika 5. Laboratorijski liofilizator („CHRIST, ALPHA 1-2 LD plus“), vlastita fotografija

Određivanje broja stanica indirektnom metodom prije i nakon liofilizacije se postiže najepljivanjem odgovarajućih decimalnih razrjeđenja (100 µl kulture u 900 µl fiziološke otopine) na MRS hranjivu podlogu i prebrojavanjem izraslih kolonija nakon 48 h inkubacije pri 37 °C. Broj živih stanica po mililitru uzorka izračunat je prema formuli:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{a}{b} \cdot c$$

a = srednja vrijednost broja poraslih kolonija na odgovarajućem razrjeđenju

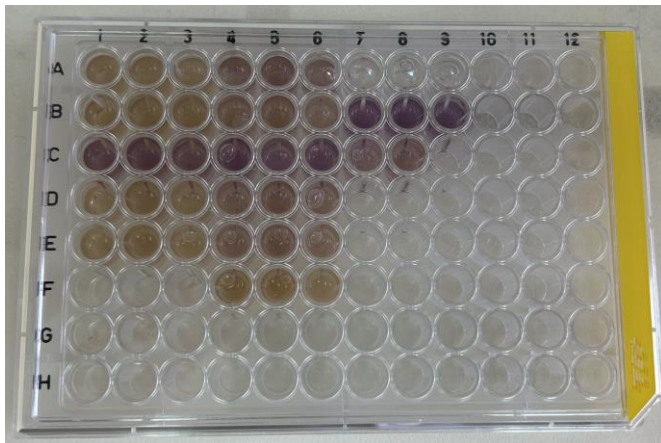
b = volumen upotrijebljenog uzorka (mL)

c = recipročna vrijednost decimalnog razrijeđena

3.2.3. Određivanje antioksidacijskog potencijala

U ovoj metodi mjeri se apsorbancija otopine spoja određene antioksidativne aktivnosti nakon reakcije s DPPH radikalom. Koriste se prekonoćne kulture sojeva sa i bez S-proteina. Talog stanica je ispran dva puta i suspendiran u 1 mL PBS pufera. Stanice su pomiješane sa svježe pripremljenim DPPH-om (0,2 mM u etilnom alkoholu) u omjeru 1:1 nakon čega je provedena inkubacija u mraku tijekom 30 minuta. Kao slijepa proba korišteni su etanol i PBS pufer pH vrijednosti 7,4, a kao kontrola korištena je otopina DPPH u etilnom alkoholu i PBS pufer pH vrijednosti 7,4. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani pri 4200g kroz 10 minuta. Nakon toga izmjerena je apsorbancija supernatanta uzoraka pri 517 nm. Sposobnost uklanjanja DPPH radikala izračunata je prema jednadžbi:

$$\% \text{ uklanjanja DPPH radikala} = \left(1 - \frac{\text{OD uzorak}}{\text{OD kontrola}} \right) \times 100$$

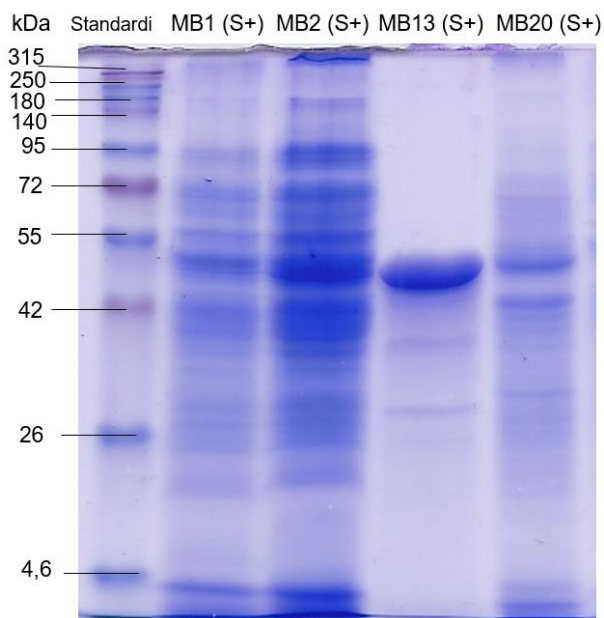


Slika 6. Mikrotitarska pločica s uzorcima suspenzija bakterijskih stanica sojeva *L. brevis*, vlastita fotografija

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. SDS-PAGE analiza S-layer proteina

Iz rezultata SDS-PAGE vidljivo je da intaktni sojevi bakterija *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 pokazuju prisutnost vrpce između 42 – 55 kDa, što odgovara molekularnoj masi S-layer proteina (slika 7).



Slika 7. Prikaz gela nakon SDS-PAGE

Grosu-Tudor i sur. (2016) proveli su elektroforezu kako bi potvrdili identitet S-layer proteina kod *Lactobacillus acidophilus* IBB 801, pri čemu je analizirana proteinska vrpca molekularne mase od 45 kDa. Identificirani protein pokazao je visoki postotak homologije s onim od pretpostavljenog S-layer proteina iz soja *L. acidophilus* ATCC 700396/NCK56/N2/NCFM. Potvrdili su i da 36 od 41 soja *L. brevis* posjeduje S-layer proteine s molekularnim masama u rasponu od 38 do 55 kDa.

4.2. Liofilizacija stanica *L. brevis* sojeva

U tablicama 3 – 6 prikazani su rezultati određeni usporedbom broja bakterijskih stanica sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13 i MB20 prije i nakon provođenja postupka liofilizacije biomase stanica, prethodno suspendiranih u različitim otopinama za koje se smatraju da imaju lioprotektivni učinak. Kao kontrolni uzorak, za usporedbu i analizu rezultata, analiziran je i uzorak suspendiran u fosfatnom puferu. Otopine za suspendiranje bakterijske biomase *L. brevis* ciljano su odabrane jer se radi o nusproizvodima mliječne industrije: kisela i slatka sirutka; te permeat, kako bi se procijenila mogućnost iskorištenja ovih otpadnih proizvoda, ponovnom reciklacijom, u smislu poboljšanja bioprocasa, s ciljem optimiranja aspekata ekonomičnosti i ekološkog učinka.

Tablica 3. Broj bakterijskih kolonija određen nakon provođenja liofilizacije uzoraka vlažne biomase uz dodatak **fosfatnog pufera**, sojeva *L. brevis* prije i nakon što je su s površine stanične stijenke uklonjeni S-layer proteini

Soj (S+)	$\overline{\log}$ (CFU/mL)	$\Delta\log(\text{CFU/mL})$	Soj (S-)	$\overline{\log}$ (CFU/mL)	$\Delta\log(\text{CFU/mL})$
MB1	8,11 ± 0,15	2,25	MB1	4,74 ± 0,33	1,89
MB2	7,53 ± 0,17	3,34	MB2	4,55 ± 0,01	2,11
MB13	8,10 ± 0,16	1,66	MB13	4,04	2,57
MB20	7,87 ± 0,14	2,65	MB20	4,81 ± 0,15	1,86

Tablica 4. Broj bakterijskih kolonija određen nakon provođenja liofilizacije uzoraka vlažne biomase uz dodatak **slatke sirutke**, sojeva *L. brevis* prije i nakon što je su s površine stanične stijenke uklonjeni S-layer proteini

Soj (S+)	$\overline{\log}$ (CFU/mL)	$\Delta\log(\text{CFU/mL})$	Soj (S-)	$\overline{\log}$ (CFU/mL)	$\Delta\log(\text{CFU/mL})$
MB1	9,87 ± 0,15	0,49	MB1	5,82 ± 0,08	1,89
MB2	9,59 ± 0,09	1,28	MB2	5,43 ± 0,26	1,23
MB13	9,14 ± 0,23	0,62	MB13	5,43 ± 0,05	1,18
MB20	9,47 ± 0,27	1,05	MB20	5,52 ± 0,19	1,15

Tablica 5. Broj bakterijskih kolonija određen nakon provođenja liofilizacije uzoraka vlažne biomase uz dodatak **kisele sirutke**, sojeva *L. brevis* prije i nakon što je su s površine stanične stijenke uklonjeni S-layer proteini

Soj (S+)	$\overline{\log}$ (CFU/mL)	$\Delta\log(\text{CFU/mL})$	Soj (S-)	$\overline{\log}$ (CFU/mL)	$\Delta\log(\text{CFU/mL})$
MB1	9,41 ± 0,02	0,95	MB1	5,41 ± 0,01	1,23
MB2	9,74	1,28	MB2	4,56 ± 0,03	5,41
MB13	9,58 ± 0,04	0,19	MB13	5,57 ± 0,30	1,04
MB20	9,58 ± 0,11	0,94	MB20	5,25 ± 0,10	1,42

Tablica 6. Broj bakterijskih kolonija određen nakon provođenja liofilizacije uzoraka vlažne biomase uz dodatak **permeata**, sojeva *L. brevis* prije i nakon što je su s površine stanične stijenke uklonjeni S-layer proteini

Soj (S+)	$\bar{\log}$ (CFU/mL)	$\Delta\log$ (CFU/mL)	Soj (S-)	$\bar{\log}$ (CFU/mL)	$\Delta\log$ (CFU/mL)
MB1	9,84 ± 0,12	0,52	MB1	5,74 ± 0,11	1,23
MB2	9,66 ± 0,08	1,21	MB2	5,38 ± 0,28	5,41
MB13	9,68 ± 0,03	0,09	MB13	5,39 ± 0,44	1,22
MB20	9,51 ± 0,11	1,00	MB20	5,28 ± 0,28	1,39

Iz rezultata proizlazi da kada se postupak liofilizacije provodi s intaktnim bakterijama *L. brevis* sa zadržanim S-layer proteinima je značajno manja razlika u broju stanica prije i nakon liofilizacije u usporedbi s rezultatima s brojem bakterijskih stanica istog soja, ali kojem su prethodno uklonjeni S-protein. Ovakva razlika ukazuje na potencijalni zaštitni učinak S proteina koji su sadržani u parakristalnom sloju (engl. *S-layer*) koji prekriva čitavu površinu bakterijskih stanica *L. brevis*. Uspješno proveden postupak liofilizacije značajan je jer omogućuje visok stupanj preživljavanja korisnih mikroorganizama i dulje vrijeme skladištenja. Uspješnost ovog procesa ovisi o vrsti zaštitnog medija korištenog tijekom liofilizacije. Istraživanje Bolla i sur. (2011) pokazalo je značajne razlike u preživljavanju BMK nakon liofilizacije u prisutnosti različitih protektora.

Tijekom analize potencijalnih lioprotektivnih medija kod intaktnih sojeva *L. brevis*, uočeno je da je korištenje permeata kao medija pokazalo najbolje rezultate. Posebno se ističe soj *L. brevis* MB13, koji je najuspješnije podnio proces liofilizacije, pokazujući veću otpornost u odnosu s drugim ispitivanim sojevima. Ovi rezultati sugeriraju da odabir odgovarajućeg medija, poput permeata, može igrati ključnu ulogu u očuvanju vitalnosti bakterijskih sojeva tijekom liofilizacije. Uspoređujući broj poraslih kolonija prije i nakon liofilizacije intaktnih bakterija *L. brevis*, utvrđeno je da su rezultati slični kada su kao podloge korištene slatka i kisela sirutka (tablice 4 i 5). Kod soja *L. brevis* MB13, kada su mu uklonjeni S-proteini, najmanji gubici broja stanica zabilježeni su pri korištenju kisele sirutke i permeata kao podloga. S druge strane, kada je umjesto potencijalnog lioprotektivnog medija korišten fosfatni pufer, soj *L. brevis* MB1, također bez S-layer proteina, pokazao se kao najotporniji. Važno je napomenuti da je kod bakterija *L. brevis* koje imaju S-layer proteine, upotreba fosfatnog pufera opet istaknula soj *L. brevis* MB13 kao najotporniji. Ovi rezultati naglašavaju značaj pravilnog odabira medija za očuvanje održivosti bakterijskih stanica, posebno kod sojeva bez prirodnog zaštitnog parakristalnog sloja.

Soriano-Perez i sur. (2012) zaključili su da utjecaj medija na bakterije može varirati ovisno o rodu ili čak soju bakterija.

4.3. Ispitivanje antioksidativnog potencijala *L. brevis*

Pojedini sojevi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrsta pokazuju antioksidacijsku aktivnost specifičnu za soj i smanjuju oštećenja izazvana oksidacijom. Oksidativni stres može utjecati na aktivnost bakterijskih stanica koje mogu biti uzrokovane hidroksilacijom DNA, denaturacijom proteina i peroksidacije lipida (Cizeikiene i Jagelaviciute, 2021.) Stoga je u ovom radu ispitan antioksidacijskog potencijal *L. brevis* sojeva temeljem rezultata prema kojima proizlazi da sojevi kada eksprimiraju S-layer proteine imaju tendenciju većeg postotka uklanjanja DPPH radikala u usporedbi sa sojevima kojima su uklonjeni S-layer proteini. Konkretno, intaktni soj *L. brevis* MB13 ima značajno veći antioksidativni potencijal od istog soja kojem je ekstrahiran S-protein sa površine stanične stijenke. S obzirom na ostale sojeve bakterija sa zadržanim S proteinima najveći antioksidativni učinak ima soj *L. brevis* MB20. Prema rezultatima za sojeve bakterije *L. brevis* kojima je ekstrahiran S-layer protein najveće postotke uklanjanja DPPH radikala imaju sojevi MB2 i MB20 (tablica 7).

Tablica 7. Antioksidacijski potencijal kod sojeva *L. brevis* prije i nakon uklanjanja S-proteina

Soj (S+)	% uklanjanja DPPH radikala	Soj (S-)	% uklanjanja DPPH radikala
MB1	53,17 ± 4,00	MB1	40,97 ± 7,78
MB2	59,58 ± 1,86	MB2	52,12 ± 7,91
MB13	51,00 ± 3,78	MB13	17,56 ± 10,65
MB20	64,84 ± 7,96	MB20	51,32 ± 8,28

Cizeikiene i Jagelaviciute (2021) su okarakterizirali antioksidativnu aktivnost *L. reuteri* DSM 20015 i *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM 4905 i pokazali da intaktne stanice (38,6 ± 3,3 i 38,0 ± 1,9 %, pojedinačno) te intracelularni ekstrakti bez bakterijskih stanica (15,0 ± 3,4 i 1,5 ± 0,07 %) iskazuju potencijal uklanjanja DPPH radikala.

Yang i sur., 2020 su analizirali antioksidativnu aktivnost pojedinih bakterija i zaključili da vrijednosti postotka uklanjanja DPPH radikala iznose redom od najviše prema najnižoj: *L. brevis* KU15151 (31,14 %), *L. rhamnosus* GG (27,89 %) te *P. pentosaceus* SC28 (17,83 %). Kim i sur. (2022) su spoznali da *Levilactobacillus brevis* MG5306 ima snažan potencijal primjene kao antioksidativna funkcionalna hrana.

5. ZAKLJUČCI

1. Temeljem rezultata provedenih eksperimenata pretpostavlja se zaštitna funkcija S-layer proteina *L. brevis* tijekom postupka liofilizacije.
2. Optimalni lioprotektivni učinak temeljem usporedbe broja bakterijskih stanica postignut je primjenom permeata kao medija za suspendiranje biomase *L. brevis*.
3. Usporedbom broja bakterijskih stanica analiziranih sojeva, ustanovljeno je da *L. brevis* MB13 nakon liofilizacije preživljava u najvišem broju preživjelih stanica.
4. Sojevi *L. brevis* koji ekspimiraju S-layer proteine imaju veću antioksidativnu aktivnost u usporedbi sa istim sojevima nakon uklanjanja S-proteina s površine stanične stjenke.
5. *L. brevis* MB20 pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost, bez obzira jesu li S-proteini uklonjeni s površine bakterijske stanice ili ne.

6. POPIS LITERATURE

Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1 - Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* **17**, 454–461.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.006>

Beganović J, Frece J, Kos B, Leboš Pavunc A, Habjanič K, Šušković J (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* **100**, 43–53. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9563-4>

Bolla PA, De Los Angeles Serradell M, De Urraza PJ, De Antoni GL (2011) Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *J Dairy Res* **78**, 15–22. <https://doi.org/10.1017/S0022029910000610>

Cizeikiene D, Jagelaviciute J (2021) Investigation of Antibacterial Activity and Probiotic Properties of Strains Belonging to *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Genera for Their Potential Application in Functional Food and Feed Products. *Probiotics Antimicrob Proteins* **13**, 1387–1403. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09777-5>

Dinesh Raj Modi MS (2015) Role of Lactic Acid Bacteria as Probiotics in Health and Disease. *Prensa Med* **101**. <https://doi.org/10.4172/lpma.1000147>

Grosu-Tudor SS, Brown L, Hebert EM, Brezeanu A, Brinzan A, Fadda S, i sur. (2016) S-layer production by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 under environmental stress conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 4573–4583. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7355-5>

Hotchkiss JH, Chen JH, Lawless HT (1999) Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J Dairy Sci* **82**, 690–695. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75285-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75285-9)

Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, Tompkins TA, Sherman PM (2007) Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol* **9**, 356–367. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00791.x>

Kim S, Lee JY, Jeong Y, Kang CH (2022) Antioxidant Activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria. *Fermentation* **8**. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010029>

- Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Miguel Rodríguez J, Boza J, Xaus J (2007) Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* **98**, 96–100. <https://doi.org/10.1017/S0007114507832910>
- Lebeer S, Bron PA, Marco ML, Van Pijkeren JP, O’Connell Motherway M, Hill C, i sur. (2018) Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Curr Opin Biotechnol* **49**, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.10.007>
- Li PN, Herrmann J, Tolar BB, Poitevin F, Ramdasi R, Bargar JR, i sur. (2018) Nutrient transport suggests an evolutionary basis for charged archaeal surface layer proteins. *ISME J* **12**, 2389–2402. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0191-0>
- Liu Q, Yu Z, Tian F, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, i sur. (2020) Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microb Cell Fact* **19**, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1289-4>
- Masood MI, Qadir MI, Shirazi JH, Khan IU (2011) Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Crit Rev Microbiol* **37**, 91–98. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.536522>
- Panwar R, Kumar N, Kashyap V, Singh S, Singh H (2017) Insights into involvement of S-Layer proteins of probiotic Lactobacilli in relation to gut health. *Jour Env Res* **5**, 1–19
- Qiao H, Chen L, Yang J, Zhi W, Chen R, Lu T, i sur. (2022) Effect of Lactic Acid Bacteria on Bacterial Community Structure and Characteristics of Sugarcane Juice. *Foods* **11**. <https://doi.org/10.3390/foods11193134>
- Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D, Horejs CM, Tscheliessnig R, i sur. (2011) Nanobiotechnology with S-Layer Proteins as Building Blocks. *Prog Mol Biol Transl Sci* **103**, 277–352. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415906-8.00003-0>
- Soriano-Perez S, Flores-Velez L, Alonso-Davila P, Cervantes-Cruz G, Arriaga S (2012) Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Ann Microbiol* **62**, 313–317. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0264-z>
- Šušković J, Kos B, Beganović J, Pavunc AL, Habjanič K, Matoć S (2010) Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol* **48**, 296–307
- Teame T, Wang A, Xie M, Zhang Z, Yang Y, Ding Q, i sur. (2020) Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. *Front Nutr* **7**. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344>

Tempelmans Plat-Sinnige MJ, Verkaik NJ, van Wamel WJB, de Groot N, Acton DS, van Belkum A (2009) Induction of *Staphylococcus aureus*-specific IgA and agglutination potency in milk of cows by mucosal immunization. *Vaccine* **27**, 4001–4009. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2009.04.034>

Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, i sur. (2015) The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models

Vivier E, Malissen B (2005) Innate and adaptive immunity: Specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol* **6**, 17–21. <https://doi.org/10.1038/ni1153>

Wells JM, Rossia O, Meijerink M, Van Baarlen P (2011) Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4607–4614. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000092107>

Yang SJ, Kim KT, Kim TY, Paik HD (2020) Probiotic properties and antioxidant activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in fermented black gamju. *Foods* **9**. <https://doi.org/10.3390/foods9091154>

Izjava o izvornosti

Ja Petra Martinović izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Martinović

Vlastoručni potpis