

Strukturna karakterizacija egzopolisaharida proizvedenih pomoću *Lactobacillus fermentum* D12

Vidulin, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:039334>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Tina Vidulin

888/MB

**STRUKTURNA
KARAKTERIZACIJA
EGZOPOLISAHARIDA
PROIZVEDENIH POMOĆU
Lactobacillus fermentum D12**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Blaženke Kos u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009) te u Laboratoriju za bakterijske polisaharide Zavoda za prirodne znanosti Sveučilišta u Trstu uz pomoć prof. Roberta Rizza, dr. Paole Cescutti i dr. Barbare Bellich.

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr.sc. Blaženki Kos, red.prof., dr.sc. Jagodi Šušković, red.prof. i ostalim djelatnicima Laboratorija na zanimljivim predavanjima, uvijek srdačnom odnosu prema studentima te prilici da dio svog diplomskog rada izradim u Italiji te time dodatno proširim svoja znanja i vještine.

Veliko hvala prof. Robertu Rizzu, dr. Paoli Cescutti, dr. Barbari Bellich te dr. Marcu Distefanu na nesebičnom dijeljenju svog bogatog znanja i iskustva, na njihovoj pristupačnosti i toplom gostoprimstvu.

Hvala mag.ing. Katarini Zorić na velikoj pomoći, podršci i savjetima tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Posebno hvala mojoj obitelji, Tomislavu i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i ljubavi tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika,
enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA EGZOPOLISAHARIDA PROIZVEDENIH POMOĆU *Lactobacillus fermentum* D12

Tina Vidulin, 888/MB

Sažetak: Egzopolisaharide (EPOL-e), biopolimere široko rasprostranjene u prirodi, bakterije izlučuju u ekstracelularni matriks. Klasificiraju se u dvije glavne skupine: homoegzopolisaharidi (homo-EPOL-i), sastavljeni od jedne vrste monosaharida i heteroegzopolisaharidi (hetero-EPOL-i), sastavljeni od različitih vrsta monosaharida. Cilj ovog rada bio je sinteza EPOL-a pomoću bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus fermentum* D12, ispitivanje utjecaja sastava podloge na sintezu EPOL-a te njihova strukturna analiza. Smjesa izoliranih egzopolisaharida uspješno je razdvojena u tri frakcije kromatografijom visoke djelotvornosti isključenjem na osnovi veličine čestica, a instrumentalne analize sastava i analize glikozidnih veza provedene su na samoj smjesi kao i na svim dobivenim frakcijama. Rezultati analiza pokazali su kako uzorak Lactobac 1 uglavnom sadrži α -glukan koji se sastoji od 1,4-vezane α -D-glukoze, gdje je 20% šećera acetilirano na C-3 položaju. Analiza sastava uzoraka Lactobac 2 i Lactobac 3 pokazala je da se polisaharidi prisutni u uzorcima sastoje od manoze, glukoze i galaktoze u različitim omjerima, dok je analiza glikozidnih veza ukazala na prisutnost nekoliko točaka grananja u strukturi polisaharida.

Ključne riječi: *Lactobacillus fermentum*, egzopolisaharidi

Rad sadrži: 57 stranica, 20 slika, 6 tablica, 70 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu: prof. dr. sc. *Blaženka Kos*

Neposredni voditelj na Zavodu za prirodne znanosti Sveučilišta u Trstu: Dr. *Paola Cescutti*

Pomoć pri izradi: Prof. *Roberto Rizzo*, Dr. *Barbara Bellich*, mag. ing. *Katarina Zorić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Andreja Leboš Pavunc*
2. Prof.dr.sc. *Blaženka Kos*
3. Prof.dr.sc. *Anita Slavica*
4. Prof.dr.sc. *Višnja Gaurina Srček* (zamjena)

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic
And Starter Culture Technologies

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY *Lactobacillus fermentum* D12

Tina Vidulin, 888/MB

Exopolysaccharides (EPOLs), biopolymers widespread in nature, are extracted by bacteria in the extracellular matrix. They are classified into two main groups: homoexopolysaccharides (homo-EPOL), consisted of one type of monosaccharides, and heteroexopolysaccharides (hetero-EPOL) consisted of different types of monosaccharides. The main goal of this thesis was to synthesize EPOLs with lactic acid bacteria *Lactobacillus fermentum* D12, to investigate the effect of media composition on EPOLs synthesis and structural characterization of produced EPOLs. Mixture of isolated EPOLs was successfully separated in three fractions by high performance size exclusion chromatography and composition analysis together with linkage analysis was performed both on mixture and on obtained fractions. Results of the analysis showed that sample Lactobac 1 mainly contains an α -glucan consisted of 4-linked α -D-glucose, where 20 % of sugars bear an acetyl substituent on the C-3 position. Furthermore, composition analysis of samples Lactobac 2 and Lactobac 3 showed that present polysaccharides are consisted of mannose, glucose, galactose in different ratios, while glycoside linkage analysis indicates the presence of few branching points in EPOLs.

Keywords: *Lactobacillus fermentum*, exopolysaccharides

Thesis contains: 57 pages, 20 figures, 6 tables, 70 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor at Faculty of Food Technology and Biotechnology: PhD. *Blaženka Kos*, prof.

Principal investigator at Department of Life Sciences at University of Trieste: *Paola Cescutti*, dr.

Technical support and assistance: *Roberto Rizzo*, prof.; *Barbara Bellich* dr., *Katarina Zorić*, mag.ing.

Reviewers:

1. PhD. *Andreja, Leboš Pavunc* Assistant professor
2. PhD. *Blaženka, Kos* Full professor
3. PhD. *Anita, Slavica* Full professor
4. PhD. *Višnja, Gaurina Srček* Full professor (substitute)

Thesis defended:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. EGZOPOLISAHARDI I NJIHOVA ULOGA U BAKTERIJA	2
2.2. PODJELA BAKTERIJSKIH EGZOPLOSAHARIDA	3
2.2.1. Homo-EPOL	3
2.2.2. Hetero-EPOL	4
2.3. SINTEZA BAKTERIJSKIH EGZOPOLISAHARIDA	5
2.3.1. Biosinteza homoegzopolisaharida	6
2.3.2. Biosinteza heteroegzopolisaharida	6
2.4. PRINOSI I OPTIMALNI UVJETI UZGOJA BMK PRODUCENATA EGZOPOLISAHARIDA	8
2.5. PRIMJENA EGZOPOLISAHARIDA U PREHRAMBENOJ INUSTRIJU	9
2.5.1. Primjena u prehrambenom inženjerstvu	9
2.5.1.1. Proizvodnja sira	10
2.5.2. Utjecaj egzopolisaharida na zdravlje	11
2.5.3. Buduće primjene egzopolisaharida	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. MATERIJALI	13
3.1.1. Radni mikroorganizam	13
3.1.2. Hranjiva podloga	13
3.1.3. Kemikalije	13
3.1.4. Aparatura i pribor	14
3.1.4.1. Kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica	15
3.1.4.2. Plinska kromatografija (eng. gass chromatography, GC)	15
3.1.4.3. Plinska kromatografija združena sa spektrometrijom masa (eng. Gass chromatography coupled with mass spectrometry, GC-MS)	15
3.2. METODE RADA	15
3.2.1. Sinteza i izolacija egzopolisaharida	15
3.2.2. NMR (eng. Nuclear magnetic resonance) analize	16
3.2.3. Ispitivanje prisutnosti acetilnih skupina tretmanom s NaOD	16
3.2.4. Uklanjanje proteina i lipida iz uzorka egzopolisaharida izoliranih iz supernatanta	16
3.2.5. Određivanje sastava egzopolisaharida njihovom derivatizacijom u alditol acetate i provođenjem plinske kromatografije (eng. Gas Liquid Chromatography, GLC)	17
3.2.6. Analiza tipa glikozidne veze između šećera u polisaharidu plinskom kromatografijom (eng. Gas Liquid Chromatography, GC) i plinskom kromatografijom združenom sa spektrometrijom masa (eng. Gas Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry, GC-MS)	18
3.2.7. Kromatografija visoke djelotvornosti isključenjem na osnovi veličine čestica (eng. High performance size exclusion chromatography, HPSEC)	19
3.2.8. Određivanje sastava egzopolisaharida (metanoliza) provođenjem plinske kromatografije (eng. Gas Liquid Chromatography, GLC)	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. PRINOS EGZOPOLISAHARIDA (EPOL-a) PROIZVEDENIH POMOĆU <i>Lactobacillus fermentum</i> D12	21
4.2. ¹ H NMR ANALIZA EGZOPOLISAHARIDA (EPOL-a) PROIZVEDENIH S <i>Lactobacillus fermentum</i> D12 I IZOLIRANIH IZ MRS PODLOGA OBOGAĆENIH S RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA	22
4.3. ¹ H NMR SPEKTROSKOPIJA EGZOPOLISAHARIDA (EPOL-a) IZOLIRANIH IZ MRS HRANJIVE PODLOGE OBOGAĆENE S 2% GLUKOZE NAKON TRETMANA S NaOD	23
4.4. REZULTAT PROČIŠĆAVANJA SJEDINJENIH UZORAKA	24
4.5. ANALIZA SASTAVA <i>Lactobac purif</i> TCA UZORKA KORIŠTENJEM PLINSKE	

KROMATOGRAFIJE (engl. GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY, GLC).....	25
4.6. ANALIZA TIPA GLIKOZIDNIH VEZA IZMEĐU ŠEĆERA U POLISAHARIDU UZORKA Lactobac purif TCA KORIŠTENJEM PLINSKE KORMATOGRAFIJE ZDRUŽENE SA SPEKTROMETRIJOM MASA (GLC-MS).....	27
4.7. KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI ISKLJUČENJEM NA OSNOVI VELIČINE ČESTICA (ENG. HIGH PERFORMANCE SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY, HPSEC).....	29
4.8. 1H NMR SPEKTROSKOPIJA UZORAKA DOBIVENIH POMOĆU HPSEC.....	30
4.9. ANALIZA SASTAVA EGZOPOLISAHARIDA U UZORCIMA Lactobac 2 I Lactobac 3 REAKCIJOM METANOLIZE I PLINSKOM KORMATOGRAFIJOM.....	32
4.10. ANALIZA TIPA GLIKOZIDNIH VEZA IZMEĐU ŠEĆERA U POLISAHARIDU U UZORCIMA Lactobac 1, Lactobac 2, Lactobac 3 PREVEDENE U DJELOMIČNO METILIRANE ALDITOL ACETATE KORIŠTENJEM PLINSKE KROMATOGRAFIJE ZDRUŽENE S SPEKTROMETRIJOM MASA (GLC-MS).....	36
4.10.1. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 1.....	36
4.10.2. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 2.....	37
4.10.3. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 3.....	38
4.10.4. Relativni molarni omjeri šećera u uzorcima Lactobac 1, Lactobac 2, Lactobac 3.....	39
4.11. 2D NMR UZORKA Lactobac 1.....	41
4.11.1. 1H NMR.....	41
4.11.2. COSY 2D.....	42
4.11.3. HSQC 2D.....	43
4.11.4. NOESY 2D.....	44
4.11.5. KORIŠTENJE CASPER BAZE PODATAKA ZA SIMULACIJU NMR SPEKTRA.....	45
5. ZAKLJUČCI.....	48
6. LITERATURA.....	49

1. UVOD

Egzopolisaharidi (EPOL-i), biopolimeri široko rasprostranjeni u prirodi, sastoje se od ponavljajućih, razgranatih jedinica šećera i/ili njihovih derivata. Najzastupljenije strukturne elemente egzopolisaharida predstavljaju glukoza, galaktoza i ramnoza koje se unutar polimera nalaze u različitim omjerima. Bakterije svoje egzopolisaharide izlučuju u okoliš, točnije u ekstracelularni matriks. Klasificiraju se u dvije glavne skupine: homoegzopolisaharidi (homo-EPOL-i), sastavljeni od jedne vrste monosaharida (α -D-glukani, β -D-glukani, fruktani i poligalaktani) i heteroegzopolisaharidi (hetero-EPOL-i), sastavljeni od različitih vrsta monosaharida; uglavnom D-glukoze, D-galaktoze, L-ramnoze i njihovih derivata.

Sinteza homo-EPOL-a odvija se korištenjem tek nekoliko enzima, dok se sinteza hetero-EPOL-a odvija unutar stanice i uključuje transport šećera, sintezu aktiviranih šećernih jedinica, sintezu ponavljajućih jedinica i polimerizaciju ponavljajućih jedinica. Količina sintetiziranih EPOL-a ovisi o sastavu medija (izvoru ugljika i dušika) i uvjetima uzgoja kao što su temperatura, pH i vrijeme inkubacije.

Bakterijski egzopolisaharidi imaju široku upotrebu u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji gdje su poseban značaj pokazali u proizvodnji sireva i ostalih mliječnih proizvoda. Uz to, bakterijski EPOL-i imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje gdje, između ostalog, olakšavaju kolonizaciju probavnog trakta probiotičkim kulturama, ublažavaju simptome intolerancije na laktozu, stimuliraju imunitet te smanjuju koncentraciju kolesterola, a posjeduju i antimutageno djelovanje.

Cilj ovog rada bio je sinteza EPOL-a pomoću bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus fermentum* D12, ispitivanje utjecaja sastava podloge na sintezu EPOL-a te njihova strukturna analiza. Smjesa izoliranih egzopolisaharida uspješno je razdvojena u tri frakcije kromatografijom visoke djelotvornosti isključenjem na osnovi veličine čestica (eng. High performance size exclusion chromatography, HPSEC). Uz to, provedene su instrumentalne analize sastava te analize glikozidnih veza unutar EPOL-a koje su uključivale plinsku kromatografiju (engl. Gas Liquid Chromatography, GLC), plinsku kromatografiju združenu sa spektrometrijom masa (engl. Gas Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry, GC-MS) te NMR eksperimente.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. EGZOPOLISAHARDI I NJIHOVA ULOGA U BAKTERIJA

Egzopolisaharidi (EPOL-i) su dugolančani polimeri koji se sastoje od ponavljajućih, razgranatih jedinica šećera i/ili njihovih derivata. Najzastupljenije strukturne elemente egzopolisaharida predstavljaju glukoza, galaktoza i ramnoza koje se unutar polimera nalaze u različitim omjerima (De Vuyst i Degeest, 1999a). Egzopolisaharidi su biopolimeri široko rasprostranjeni u prirodi, a njihove uloge su raznolike; mogu služiti kao spremište energije (škrob), strukturni materijal stanične stijenke (celuloza) ili potpomažu međustaničnu komunikaciju (glikozaminoglikani).

Uzevši u obzir smještaj u stanici, biopolimeri mogu biti intracelularni ili ekstracelularni. Intracelularnih biopolimera je vrlo malo i imaju vrlo ograničenu svrhu, no ekstracelularni polimeri pokazuju široku raznolikost i mogu se grupirati u četiri osnovna razreda; polisahardi, anorganski polianhidridi (poput polifosfata), poliesteri i poliamidi (Rehm, 2010; Cerning, 1995). Bakterije egzopolisaharide izlučuju u okoliš tijekom rasta, pri čemu oni ne ostaju trajno vezani za površinu mikrobne stanice, što ih razlikuje od strukturno sličnih kapsularnih polisaharida (CPS, engl. capsular polysaccharides) (Laws i sur., 2001). EPOL-i su smješteni u ekstracelularnom matriksu i nisu povezani kovalentnim vezama sa stanicom. Klasificiraju se u dvije glavne skupine: homoegzopolisaharidi (homo-EPOL-i), sastavljeni od jedne vrste monosaharida (α -D-glukani, β -D-glukani, fruktani i poligalaktani) i heteroegzopolisaharidi (hetero-EPOL-i), sastavljeni od različitih vrsta monosaharida; uglavnom D-glukoze, D-galaktoze, L-ramnoze i njihovih derivata (Mayo i sur., 2010). Mogu biti supstituirani s različitim ne-šećernim komponentama te na taj način postići linearnu ili razgranatu strukturu, što utječe na njihovu topljivost (Sutherland, 2007).

EPOL-i bakterijama pružaju mogućnost lakše adhezije u svrhu interakcije s drugim bakterijskim površinama ili supstratima, služe kao strukturni stabilizatori u tvorbi biofilma te kao signalne molekule (Suresh Kumar i sur., 2007; Sutherland, 2007). Nadalje, EPOL-i mogu formirati biofilm koji ima ulogu zaštite stanica od mehaničkih oštećenja, antimikrobnih sredstava i dehidracije te olakšava komunikaciju između stanica, omogućuje prijenos genetičkog materijala, a istovremeno ih štiti od bakteriofaga (Coghlan, 1996; Cerning i sur., 1994.; Trevors i sur., 1987). EPOL-i mogu služiti kao izvor ugljika što potvrđuje podatak da određeni sojevi BMK producenti EPOL-a sintetiziraju enzime kojima razgrađuju vlastite EPOL-e. Također, tijekom produljene inkubacije (dulje od 48 sati za bakterije mliječne

kiseline), količina proizvedenih egzopolisaharida se smanjuje, što znači da EPOL-i služe kao skladište ugljika. Ipak, tek rijetke bakterijske vrste sintetiziraju sve enzime potrebne za razgradnju vlastitih EPOL-a, a neke od njih produkte degradacije ne mogu metabolizirati, stoga postoji mogućnost da ih koriste druge vrste u složenom ekosustavu (Hallemeersch i sur., 2002).

2.2. PODJELA BAKTERIJSKIH EGZOPLOSARIDA

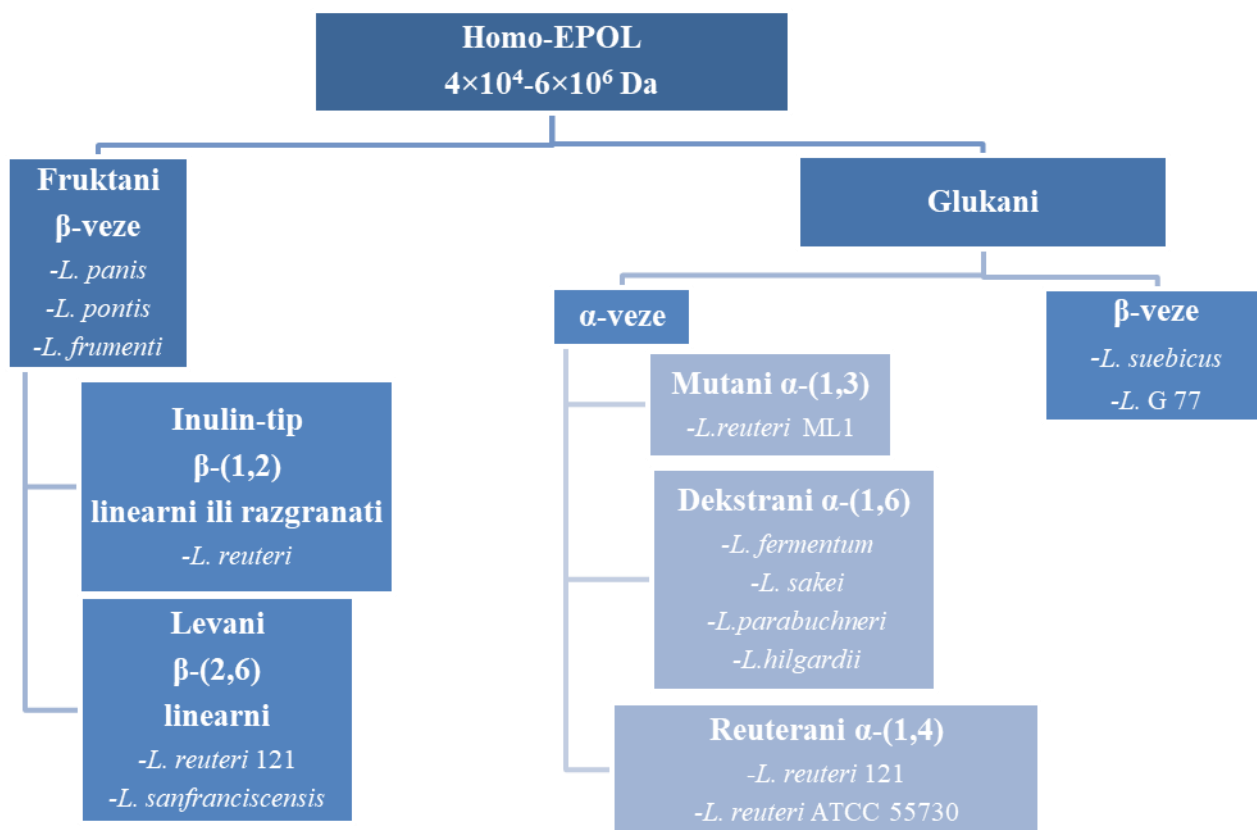
Velika raznolikost bakterijskih egzopolisaharida omogućuje njihovu kategorizaciju obzirom na kemijsku strukturu, funkcionalnost, molekulsku masu i vrstu veza između šećera, ali i prema mjestu sinteze i enzimima uključenim u sintezu. Prekursor ponavljajuće jedinice kod hetero-EPOL-a sintetizira se u unutrašnjosti stanice nakon čega ga izoprenoidni membranski nosač prenosi kroz membranu na daljnju polimerizaciju koja se odvija izvan stanice. Za razliku od toga, sinteza homopolisaharida zahtjeva specifičan supstrat- saharozu. Nadalje, količina proizvedenih egzopolisaharida razlikuje se ovisno o bakterijskoj vrsti, ali i fizikalno-kemijskim faktorima, koji igraju važnu ulogu u konačnom prinosu, a to su pH, temperatura, vrijeme inkubacije, laboratorijski uvjeti i sastav medija (Cerning i sur., 1992).

2.2.1. Homo-EPOL

Razlike između homoegzopolisaharida nastaju uglavnom zbog svojstva njihove primarne strukture, odnosno obrasca ponavljanja veza u glavnom lancu, molekulske mase i strukture grananja (slika 1) (Badel i sur., 2011). Razlikuju se dvije važne skupine homo-EPOL koje proizvode BMK:

- i. α -glukani, uglavnom sastavljeni od α -1,6- i α -1,3-veza (predstavnicima su dekstran i mutan),
- ii. fruktani, uglavnom sastavljeni od β -2,6-vezanih fruktoznih molekula (levan)

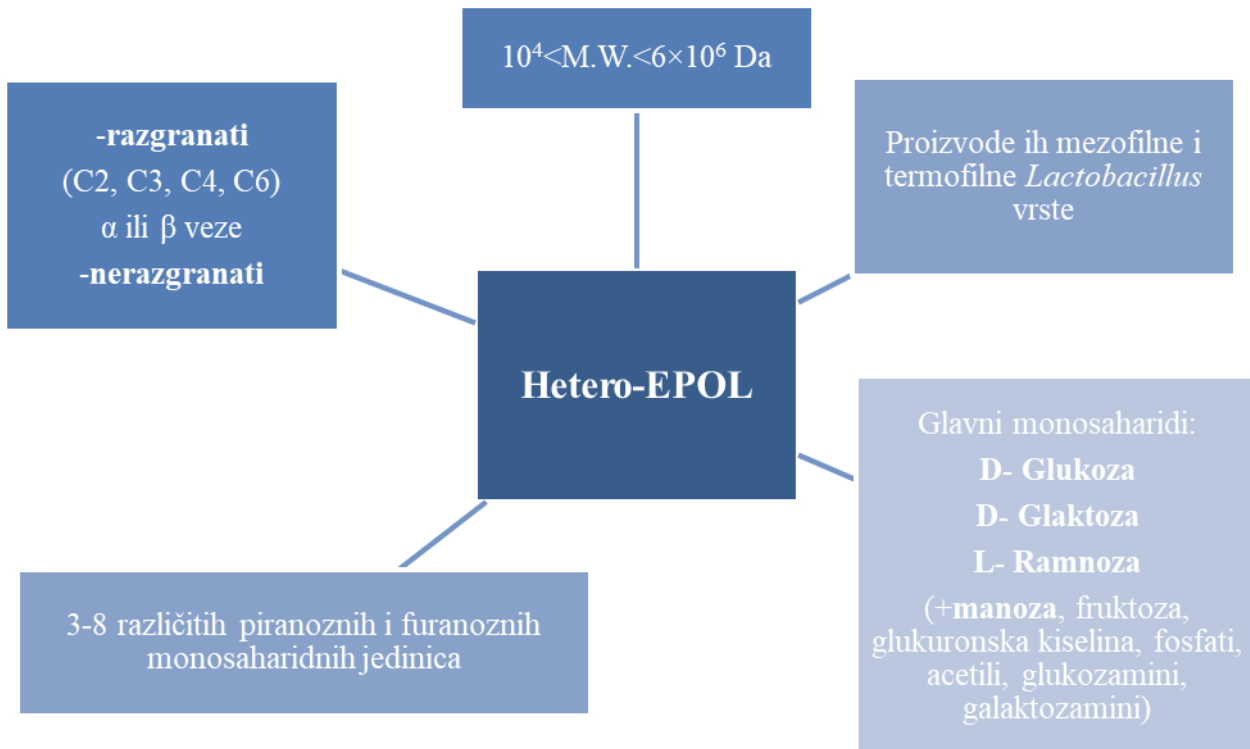
Učestala značajka svih dekstrana jesu prevladavajuće α -1,6-veze s točkama grananja na pozicijama 2, 3 i 4. Za razliku od dekstrana, mutan sadrži visok postotak α -1,3-glikozidnih veza. Nadalje, razlike u topivosti rezultat su omjera između različitih vrsta veza; glukani topivi u vodi bogati su α -1,6- vezama dok su oni netopivi bogati α -1,3-glikozidnim vezama (Cerning, 1990).



Slika 1. Klasifikacija homoezopolisaharida izoliranih iz *Lactobacillus sp.* (Badel i sur., 2011)

2.2.2. Hetero-EPOL

Hetero-EPOL su polimerne ponavljajuće jedinice, uglavnom sastavljene od D-glukoze, D-galaktoze i L-ramnoze čiji je kemijski sastav vrlo različit i nije specifičan za pojedinu vrstu (slika 2) (Badel i sur., 2011; De Vos i sur., 2009). Za razliku od homo-EPOL koji su sastavljeni od jednog tipa monosaharida, hetero-EPOL se sastoje od ponavljajućih jedinica sastavljenih od 3 do 8 različitih ugljikohidratnih komponenti sintetiziranih iz aktiviranih šećera (Ganzle i sur., 2005).



Slika 2. Karakteristike heteroegzopolisaharida izoliranih iz *Lactobacillus sp.* (Badel i sur., 2011)

2.3. SINTEZA BAKTERIJSKIH EGZOPOLISAHARIDA

Povijest bakterijskih egzopolisaharida započinje sredinom 19. stoljeća s otkrićem egzopolisaharida u vinu, koji će kasnije biti poznat kao dekstran, a prokariot zaslužan za njegovu proizvodnju je identificiran kao *Leuconostoc mesenteroides* (Rehm, 2010; Linker i Jones, 1966). Tijekom godina i drugi su egzopolisaharidi izolirani i identificirani, među kojima su i celuloza, alginati i ksantan. Napredak znanosti doveo je do upotrebe bakterijskih enzima i radioizotopa za obilježavanja prekursora biosintetskih puteva čime su razjašnjeni brojni detalji u sintezi biopolimera (Pindar i Bucke, 1975). Važan primjer je polisaharid kojeg proizvodi Gram-negativna, štapićasta bakterija *Klasiella* K15, a čija je struktura razriješena korištenjem 1D i 2D ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije alditola dobivenih depolimerizacijom polisaharida pomoću virusne endoglukanaze. Posljedično, strukturne i funkcionalne uloge prokaritotskih egzopolisaharida postepeno su bile jasnije (Schleifer i Kandler, 1972).

Sinteze homo-EPOL-a i hetero-EPOL-a razlikuju se po mjestu sinteze i složenosti. Homo-EPOL-i se sintetiziraju izvan stanice korištenjem tek nekoliko enzima, dok se sinteza

hetero-EPOL-a odvija unutar stanice i uključuje 4 velika koraka: transport šećera, sinteza aktiviranih šećernih jedinica, sintezu ponavljajućih jedinica i polimerizaciju ponavljajućih jedinica (de Vuyst i sur., 2001).

2.3.1. Biosinteza homoegzopolisaharida

Homo-EPOL-i se sintetiziraju izvan stanice sa specifičnom glikoziltransferazom (GTF) ili fruktoziltransferzom (FTF) pri čemu se saharoza koristi kao specifični supstrat. Reakcija sinteze homo-EPOL-a pomoću GTF i FTF ne zahtjeva energiju jer ne uključuje aktivni transport molekula ili korištenje aktiviranih šećernih jedinica. Ipak, energija oslobođena hidrolizom saharoze koristi se za sintezu enzima koji će katalizirati reakciju sinteze homo-EPOL-a. Stoga, velike količine saharoze mogu biti prevedene u homo-EPOL-e (Korakli i sur., 2003). Iako GTF međusobno pokazuju visoku razinu sličnosti, laktobacili proizvode širok spektar glukana, uključujući polimere sa α -1,6 vezama (dekstran), α -1,3 vezama (mutan) ili α -1,6 i α -1,4 vezama (alternan) (Kralj i sur., 2004). Koncentracija saharoze već od 20 g L^{-1} dovoljna je za indukciju sinteze GTF-a (Neubauer i sur., 2003).

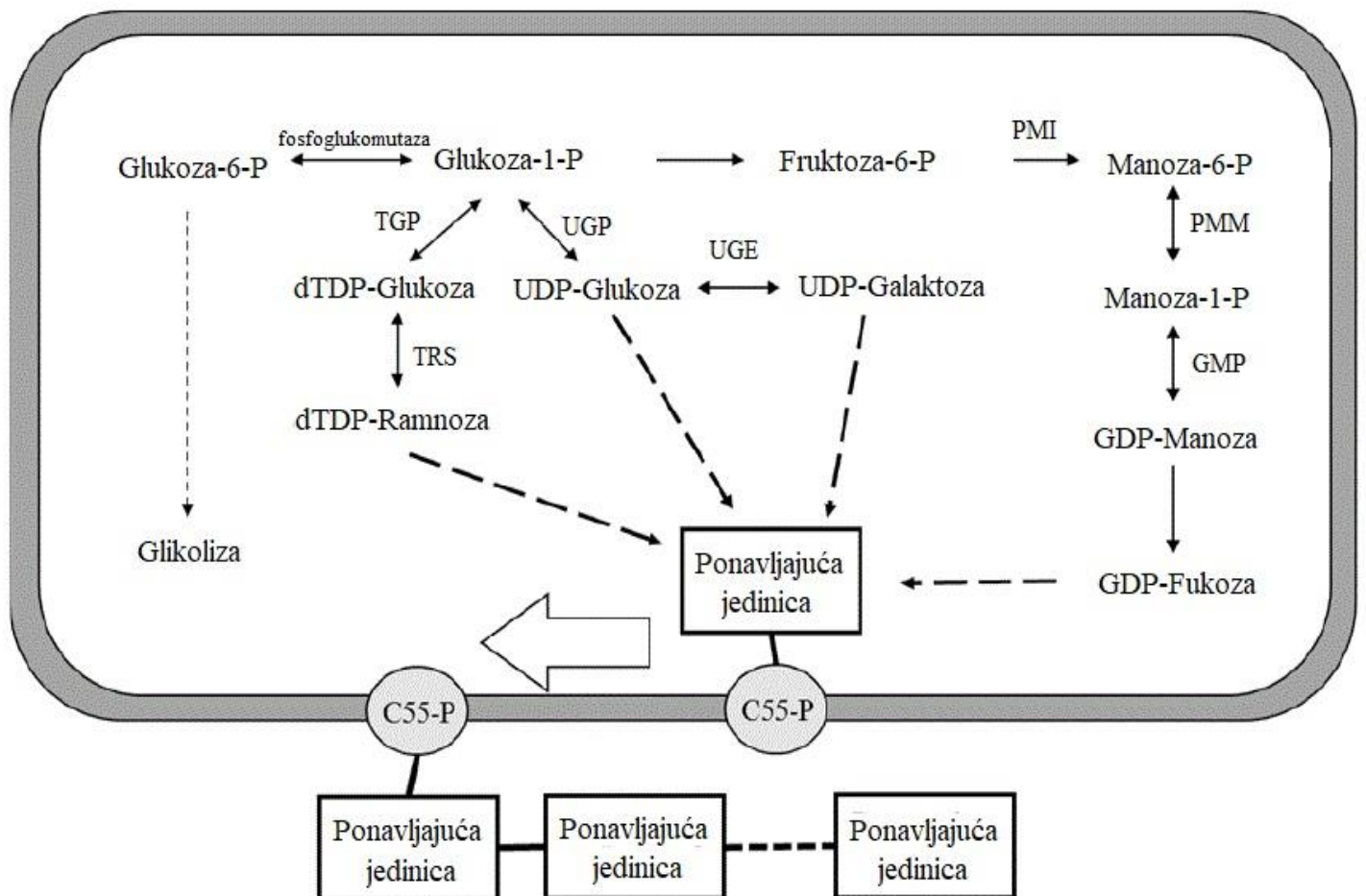
2.3.2. Biosinteza heteroegzopolisaharida

Hetero-EPOL-e sintetiziraju unutarstanični enzimi kroz niz interakcija koje dovode do polimerizacije ponavljajućih ugljikohidratnih jedinica nastalih uzastopnim adicijama aktiviranih monosaharinih jedinica na citoplazmatskoj membrani. Bakterije mliječne kiseline mogu koristiti različite monosaharide i disaharide kao izvor energije i supstrate putem dobro proučenih sustava za transport šećera uz prethodnu hidrolizu polisaharida do monosaharida (npr. škrob se hidrolizira pomoću α -amilaza) (de Vuyst i sur., 2001).

Šećeri transportirani u stanicu prevode se u aktivirane šećerne jedinice i postaju supstrati za reakciju polimerizacije što uključuje UDP (uridin difosfat), TDP (tiamin difosfat) i GDP (gvanozin difosfat), a katalizira ih glukoza pirofosforilaza. Glikozidne veze između aktiviranih monosaharinih jedinica formiraju se na citoplazmatskoj strani membrane, nakon čega se sintetizirana ponavljajuća ugljikohidratna jedinica prenosi na membranski nosač C55-poliprenil fosfat pomoću glikoziltransferaze. Ponavljajuća ugljikohidratna jedinica prenosi se kroz bakterijsku membranu što predstavlja ključan korak za njenu adiciju na rastuću hetero-EPOL molekulu. Prekid genske sekvence za glikoziltransferazu dovodi do stvaranja mutanata koji nemaju sposobnost proizvodnje egzopolisaharida (Dabour i LaPointe, 2005). Stoga, vrsta

i broj dostupnih glikoziltransferaza određuje broj ponavljajućih jedinica u hetero-EPOL-e (slika 3) (Harutoshi, 2013).

Ključni intermedijer koji povezuje anabolički put proizvodnje EPOL-a i katabolički metabolizam razgradnje glukoze je glukoza-6-fosfat. On se prevodi u fruktoza-6-fosfat i ulazi u reakcije glikolize, stvaranja biomase i ATP-a ili u glukoza-1-P prema stvaranju aktiviranih šećernih jedinica- prekursora EPOL-a.



Slika 3. Biosinteza hetero-EPOL-a: **UGP**: UDP-glukoza pirofosforilaza; **TGP**: dTDP-glukoza pirofosforilaza; **TRS**: enzimi uključeni u sintezu dTDP-ramnoze; **UGE**: UDP-galaktoza-4-epimeraza; **PMI**: fosfomanoizomeraza; **PMM**: fosfomanomutaza; **GMP**: manozna pirofosforilaza (Harutoshi, 2013)

2.4. PRINOSI I OPTIMALNI UVJETI UZGOJA BMK PRODUCENATA EGZOPOLISAHARIDA

Opisano je otprilike 30 vrsta laktobacila koji imaju sposobnost proizvodnje egzopolisaharida, a među njima najpoznatiji su: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, itd. (Sutherland, 2002). Prinosi se značajno razlikuju, pa je tako prinos za *Streptococcus thermophilus* 50-350 mg L⁻¹, 80-600 mg L⁻¹ za *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*, 60-150 mg L⁻¹ za *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 50-60 mg L⁻¹ za *Lactobacillus casei* i otprilike 140 mg L⁻¹ za *Lactobacillus plantarum* (Tsuda i Miyamoto, 2010; Tallon i sur., 2003; Cerning, 1995). Najveći zabilježeni prinosi hetero-EPOL-a iznose 2775 mg L⁻¹ za *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M i 2500 mg L⁻¹ za *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B (Maeda i sur., 2004; Macedo i sur., 2002).

Ukupan prinos EPOL-a proizvedenog bakterijama mliječne kiseline ovisi o sastavu medija (izvoru ugljika i dušika) i uvjetima uzgoja kao što su temperatura, pH i vrijeme inkubacije. Dokazano je da je optimalan omjer ugljika i dušika bitan za postizanje visokog prinosa EPOL-a. Proizvodnja EPOL-a bakterijom *Streptococcus thermophilus* LY03 je podešena ukupnim količinama ugljika i dušika i njihovim omjerom (C/N omjer). Izvor ugljika koji se prevodi u mliječnu kiselinu, koristi se za dobivanje energije kao i za sintezu stanične stijenke i EPOL-a, dok je dušik potreban za sintezu esencijalnih staničnih komponenti. Stoga, viši C/N omjer i dovoljne količine ugljika i dušika povećavaju prinos EPOL-a (de Vuyst i sur., 1998). Kompleksni mediji su također istraženi, ali je dokazano da nisu prikladni za uzgoj zbog međudjelovanja s ekstrakcijom i/ili analizom egzopolisaharida. Kompleksni ugljikohidrati kvašćevog ekstrakta teško se uklanjaju dijalizom i/ili ultrafiltracijom (Cerning i sur., 1992). Suplementacija medija može povećati produktivnost. Primjerice, dodatak šećera u suvišku ima stimulirajući efekt, dok tiamin smanjuje proizvodnju EPOL-a, što je dokazano kod vrste *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* (Petry i sur., 2000).

Prilikom uzgoja *Lactobacillus rhamnosus*, Gamar i sur. (1997) uočili su povećanu proizvodnju sluzi pri nižim temperaturama (uzgoj na 25 °C umjesto 30 °C) i povećanje ukupnog prinosa proizvedenih EPOL-a. Temperatura za maksimalnu proizvodnju EPOL-a mora se prilagoditi tako da gustoća stanica u eksponencijalnoj fazi rasta bude optimalna, te da prinos EPOL-a bude što viši. BMK se obično uzgajaju između 30 i 37 °C u bogatom mediju kao što je MRS, obranom mlijeku i mliječnim derivatima (Sutherland, 2002).

Nadalje, regulacija pH vrijednosti također može povećati prinos EPOL-a. Zakiseljavanje podloge uslijed proizvodnje mliječne kiseline aktivira glikohidrolaze (oko pH 5) što dovodi do smanjenja ukupne koncentracije proizvedenog EPOL-a. Najbolji prinos zabilježen je kod bakterije *L. rhamnosus* koji iznosi oko 2,7 g L⁻¹ egzopolisaharida, uglavnom sastavljenih od ramnoze i u manjoj količini od glukoze i galaktoze (Macedo i sur. 2002; van Calsteren i sur., 2002).

2.5. PRIMJENA EGZOPOLISAHARIDA U PREHRAMBENOJ INUDSTRIJI

Bakterijski egzopolisaharidi, iako manjeg prinosa, mogu se istaknuti boljom kvalitetom i višom razinom čistoće u odnosu na egzopolisaharide izolirane iz biljaka i algi. Jedan od najboljih primjera polimera proizvedenih iz bakterija je celuloza koja se koristi kao stabilizator emulzija u kozmetičkoj industriji, kao umjetna koža za medicinsku primjenu ili kao akustična membrana (Bielecki i sur., 2002). Bakterije mliječne kiseline dobro su poznati producenti egzopolisaharida, a najpoznatiji primjer je *Leuconostoc mesenteroides*, koji proizvodi dekstran za komercijalnu primjenu. Zbog svoje strukturne različitosti, dekstrani se razlikuju po svojoj topljivosti. Koriste se u slastičarstvu zbog inhibicije kristalizacije šećera, a istovremeno djeluju kao sredstvo za geliranje. Osim toga, dekstran se koristi i kao dodatak krvnoj plazmi te kao osnovna komponenta stacionarnih faza u kromatografiji (Patell i Prajapati, 2013). Slabi prinosi egzopolisaharida većine vrsta BMK sprječavaju njihovu komercijalizaciju, ali njihova strukturna različitost i GRAS (eng. Generally Regarded as Safe) status, mogu pružiti nove mogućnosti.

2.5.1. Primjena u prehrambenom inženjerstvu

Osim već spomenutog dekstrana, ksantan kojeg proizvodi biljni patogen *Xanthomonas campestris* drugi je mikrobiološki EPOL čija je upotreba dozvoljena u prehrambenom inženjerstvu od 1969. godine. Ksantan je opisan kao jedan od proizvoda koji služe kao standard u proizvodnji zbog svoje važnosti kako u prehrambenoj industriji tako i u industrijama koje nisu povezane s proizvodnjom hrane. Tako je ksantan uključen u proizvodnju mliječnih proizvoda, pića, konditorskih proizvoda, preljeva, pekarskih proizvoda, sirupa, hrane za kućne ljubimce, ali i ulja, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda, papira, boje i tekstila. Proizvodnja ksantana je relativno jeftina zbog visokog stupnja konverzije supstrata (glukoze) u polimer (60-70%) (Sutherland, 1998). Prema Becker i sur. (1998) ovaj biopolimer je vrlo viskozozan u malim

koncentracijama u otopinama, pokazuje svojstva pseudoplastičnosti te je stabilan pri visokom rasponu pH, temperature i ionske jakosti.

Mikrobiološki polisaharidi posjeduju reološka svojstva koja odgovaraju zahtjevima industrije i mogu se proizvoditi u velikim količinama uz visoku čistoću. Od 1940. godine, dekstran i levan se široko primjenjuju u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Fruktozni-oligosaharidi (FOS) imaju svojstva vrlo zanimljiva prehrambenoj industriji jer ih karakterizira manji intenzitet slatkog okusa nego što je kod saharoze, a u osnovi su bez kalorija te su nekancerogeni (Yun, 1996). Primjena inulina i FOS-a u prehrambenoj industriji uglavnom se zasniva na njihovim prebiotičkim svojstvima. Značajno je istaknuti da polimere na bazi fruktoze može fermentirati crijevna mikroflora što dovodi do poboljšanja njezinog sastava i povećanja apsorpcije minerala (Xu i sur., 2006; Yamamoto i sur., 1999). Levan koji se dobiva proizvodnjom pomoću *L. sanfrancisceis* LTH 2590 također pokazuje prebiotička svojstva što je u nekoliko navrata demonstrirano *in vitro* (Korakli i sur., 2002; Bello i sur., 2001). Uz sve navedeno, fruktani imaju važnu ulogu u toleranciji staničnog stresa u biljaka stabilizacijom staničnih membrana (Oliver i sur., 2001). Svojstvo FOS-a i EPOL-a da zaštite bakterije od različitih okolišnih stresova otvara mogućnost njihove primjenu u poboljšanju preživljenja i aktivnosti BMK tijekom pripreme i skladištenja fermentiranih mliječnih proizvoda.

EPOL poboljšavaju reologiju, teksturu, stabilnost i okus fermentiranih mliječnih proizvoda. Problemi poput slabe viskoznosti, razdvajanja slojeva, odvajanja sirutke koji se često javljaju prilikom proizvodnje jogurta mogu se ukloniti primjenom EPOL-a (De Vuyst i Deegest, 1999b). Zdravstvena osviještenost potrošača dovela je do povećane potražnje za niskokaloričnim i posnim proizvodima odnosno za proizvodima bez masnoća. Međutim, kako mliječne masti doprinose okusu i teksturi mliječnih proizvoda, njihovo uklanjanje dovodi do strukturnih i funkcionalnih nedostataka u niskomasnim, fermentiranim mliječnim proizvodima. Stoga, bakterije mliječne kiseline koje su producenti EPOL-a nude prirodni, prihvatljiv i poželjan pristup korištenju aditiva jer zadovoljavaju zahtjeve potrošača za niskom razinom aditiva u prehrambenim proizvodima, poboljšavaju senzorska svojstva i teksturu proizvoda (Jolly i sur., 2002; De Vuyst i sur., 2001; Wachter-Rodarte i sur., 1993).

2.5.1.1. Proizvodnja sira

Analiza teksture pokazuje da su čvrstoća, konzistencija, adhezivnost, žilavost i elastičnost značajno smanjeni u sirevima dobivenim fermentacijom mlijeka s bakterijama *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* koji su producenti

EPOL-a. Sir proizveden primjenom kultura producenata EPOL-a postaje gladak, kremast, vlažan i mekan dok onaj proizveden bez sojeva producenata postaje suh i granuliran. Sojevi bakterija mliječne kiseline koji proizvode EPOL-e koriste se u proizvodnji sireva i doprinose poboljšanju senzorskih svojstava brojnih niskomasnih sireva (Ahmed i sur., 2005). Iako sami za sebe nemaju okus, EPOL-i bakterija mliječne kiseline (BMK) poboljšavaju percepciju okusa i teksture mliječnog proizvoda (Duboc i Mollet, 2001).

Heteroegzopolisaharidi izolirani iz sojeva laktobacila kao što su *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helveticus* i *L. casei* uzrokuju zadržavanje vode zbog čega poboljšavaju ukupnu teksturu sira, sprječavaju promjene u strukturi, ali i smanjuju ukupne kalorije u konačnom proizvodu (Zisu i Shah, 2007). Laktobacili doprinose acidifikaciji zbog oslobađanja mliječne kiseline potrebne na početku sazrijevanja sireva. Njihova proteolitička aktivnost, uz sintezu sekundarnih metabolita, korisna je za rast drugih bakterijskih sojeva što je ključno u proizvodnji sireva (Coeuret i sur., 2003).

2.5.2. Utjecaj egzopolisaharida na zdravlje

EPOL-i ostaju dulje u gastrointestinalnom traktu te na taj način olakšavaju kolonizaciju probavnog trakta probiotičkim kulturama poput onih iz rodova *Bifidobacteria* i *Lactobacillus*. Naime, većina trenutno dostupnih prebiotika ima malu molekulsku masu, uz iznimku inulina. Kako se dugi ugljikohidratni lanci metaboliziraju sporije od kratkih, tako egzopolisaharidi posjeduju prebiotički efekt u distalnom dijelu debelog crijeva, za razliku od oligosaharida koji se brže probavljaju u njegovom proksimalnom dijelu (Rastall, 2003). Stack i sur. (2010) analizirali su sposobnost bakterije *L. paracasei* NFBC 338, proizvođača β -glukana, da preživi tehnološke i gastrointestinalne stresove. Analiza reakcije na temperaturni stres otkrila je da je proizvodnja polisaharida povezana sa značajno povećanim preživljenjem tijekom temperaturnog stresa (60 puta), kemijskog stresa (20 puta) i simuliranih gastrointestinalnih uvjeta (15 puta). Test reakcije na stres uzrokovan žučnim kiselinama pokazao je skromnije, ali ipak značajno bolje preživljenje (5,5 puta) u odnosu na kontrolni soj. Rezultati sugeriraju da bakterijama koje imaju ulogu probiotika proizvodnja β -glukana pruža bolju zaštitu tijekom uzgoja, procesiranja i probave. Slično tome, u jednom od *in vitro* eksperimenata, Lebeer i sur. (2010) zaključili su da *L. rhamnosus* GG (LGG) proizvodi EPOL-e koji imaju ulogu zaštitnog sloja od faktora urođene imunosti u crijevima. Mutirani soj (koji nije proizvodio EPOL-e) bio je osjetljiviji na faktore imunosti domaćina kao što su LL-37 antimikrobni peptid te faktori komplementa.

Dobrobit za ljudsko zdravlje je višestruka jer EPOL-i ublažavaju simptome intolerancije na laktozu i stimuliraju imunitet aktivacijom makrofaga i limfocita svojim fosfatnim grupama (Kitazawa i sur., 2000). Uz njihovu ulogu kao dodataka prehrani i prebiotika, smatra se da snižavaju krvni kolesterol. U prilog tome ide istraživanje koje su proveli Tok i Aslim (2010) gdje tvrde kako su 3 soja *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, izolirana iz domaćih jogurta, proizvela visoke količine EPOL-a i uklonila više kolesterola iz medija u usporedbi sa sojevima koji su proizvodili male količine EPOL-a. Zanimljivo je i antimutageno svojstvo egzopolisaharida gdje su EPOL-i proizvedeni sa sojem bakterije vrste *L. plantarum* vezali i inaktivirali mutagene poput heterocikličkih amina (Tsuda i sur., 2008). Oda i sur. (1983) istraživali su antitumorsko djelovanje EPOL-a dobivenog iz *L. helveticus* ssp. *jogurti* na ascites Sarcoma-180 injektiranjem EPOL-a intraperitonealno u dozi od 20 mg kg⁻¹ tijekom 9 dana, što je uzrokovalo produljenje života miševa za 144%.

2.5.3. Buduće primjene egzopolisaharida

Iako se primjena egzopolisaharida proteže kroz različita područja poput industrije (tekstilna, mliječna, kozmetička itd.), zdravlja (medicina i farmaceutika), okoliša (remedijacija i flokulacija); njihova primjena u procesima flokulacije bit će značajna prekretnica u promoviranju zdravlja i ekologije- posebice u zbrinjavanju otpada. Tijekom flokulacije suspendiranih čestica u vodama koriste se anorganske soli aluminija, derivati poliakrilamida i polietilenimini. Ovi flokulanti pokazali su štetan utjecaj na ljudsko zdravlje poput neurotoksičnosti i karcinogeneze. Stoga, bakterijski EPOL mogu služiti kao sigurna alternativa što potvrđuju istraživanja na bakterijskim egzopolisaharidima iz vrsta poput *Bacillus* spp. i *Artrobacter* spp. Ova istraživanja upućuju na to da bakterijski EPOL-i mogu efikasno provoditi flokulaciju i biti primijenjeni u većem mjerilu u industriji, s posebnim naglaskom na zbrinjavanje otpadnih voda, što otvara nove mogućnosti za egzopolisaharide bakterija mliječne kiseline (Mabinya i sur., 2012; Cosa i sur., 2011).

Potruga za sojevima bakterija, koje će biti producenti EPOL-a s visokim prinosima, neprekidno traje. Optimiranje uvjeta fermentacije, usavršavanje biotehnoloških alata poput genetičkog i metaboličkog inženjerstva, te pronalazak jeftinih medija za uzgoj visokoproizvodnih sojeva, izazovi su koji će dovesti do poboljšanja komercijalne proizvodnje i širenja primjene bakterijskih egzopolisaharida (Pratel i Prajapati, 2013).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom diplomskom radu u *in vitro* eksperimentima korištena je bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus fermentum* D12, producent analiziranih egzopolisaharida. Navedeni soj pohranjen je u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Soj se čuva pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola.

3.1.2. Hranjiva podloga

MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) kruta hranjiva podloga sastava: pepton 15,0 g/L; mesni ekstrakt 3,0 g/L; kvašćev ekstrakt 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; MgSO₄·7 H₂O 0,05 g/L; MnSO₄·7 H₂O 0,05 g/L; natrijev-acetat 5,0 g/L; agar 20,0 g/L, u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge je 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min. Podloga je suplementirana sa 2 % jednog izvora ugljika (glukoza, galaktoza, laktoza, fruktoza ili saharoza, ukupno 5 različitih vrsta podloga)

3.1.3. Kemikalije

- 99,8%-tni etanol, Fluka, UK
- acetanhidrid, Sigma-Aldrich, SAD
- amonijev hidroksid, Sigma-Aldrich, SAD
- anhidridni metanol, Sigma-Aldrich, SAD
- voda
- deuterij oksid, Sigma-Aldrich, SAD
- dimetil sulfoksid, Sigma-Aldrich, SAD
- heksan, Sigma-Aldrich, SAD
- HMDS:TMCS-Piridin u omjeru 3:1:9, Supelco, SAD
- inozitol, Sigma-Aldrich, SAD
- kalijev metilsulfonilmetida, Sigma-Aldrich, SAD
- kloroform, Sigma-Aldrich, SAD
- M komercijalnog standarda HCl:MeOH, Supelco, SAD
- metanol, Sigma-Aldrich, SAD
- metil jodid, Sigma-Aldrich, SAD

- MiliQ voda
- natrijev borodeuterid, Sigma-Aldrich, SAD
- natrijev deuteroksid, Sigma-Aldrich, SAD
- natrijev hidroksid, Sigma-Aldrich, SAD
- natrijev klorid, Sigma-Aldrich, SAD
- natrijev sulfat , Sigma-Aldrich, SAD
- octena kiselina, Sigma-Aldrich, SAD
- piridin ,Sigma-Aldrich, SAD
- staklena vuna, Sigma-Aldrich, SAD
- trikloroctena kiselina, Sigma-Aldrich, SAD

3.1.4. Aparatura i pribor

- analitička vaga, Scaltec, Njemačka
- automatska pipeta, Gilson, Velika Britanija
- centrifuga, „4227R Refrigerated Centrifuge“, ALC, UK
- centrifuga, „Centrifuge 5418“, Eppendorf, SAD
- epruvete, Eppendorf, SAD
- liofilizator, Modulyo Freeze Dryers, SAD
- magnetska miješalica, PB International, Italija
- membrane za dijalizu, Servapor, Njemačka
- NMR instrument, „Varian 400 MHz“, Agilent Technologies, SAD
- NMR instrument, „Varian 500 MHz“, Agilent Technologies, SAD
- NMR tube, Sigma Aldrich, Italija
- pH-metar, „Basic 20“, Crison Instruments, Španjolska
- rotaciona tresilica, „Cecchinato A. s.a.s.“, Apparecchi scientifici, Italija
- termostat, Memmert moled 20, Njemačka
- termostatu pod vakuumom, MPM Instruments, Italija
- vakuum uparivač, Büchi, Švicarska
- vialo, Thomas Scientific, SAD
- vibro-mješač, PB international, Italija
- zamrzivač (-20 °C), Atlantic Appliance, SAD
- zamrzivač (-80 °C), „Heto Ultra Freeze“, A. De Mori Strumenti, Italija

3.1.4.1. Kromatografija isključenjem na osnovi veličine čestica

- detektor, Smartline RI Detector 2300/2400, Knauer, Njemačka
- kolektor, LKB Bromma, Austrija
- SEC kolona, Sephacryl S-300 column, GE Healthcare, UK

3.1.4.2. Plinska kromatografija (eng. gass chromatography, GC)

GC analize u ovom diplomskom radu provedene su na Perkin-Elmer Autosystem XL (SAD) plinskom kromatogramu opremljenim s plameno ionizacijskim detektorom i kapilarnom HP-1 kolonom (30 m), uz He kao plin nosač.

3.1.4.3. Plinska kromatografija združena sa spektrometrijom masa (eng. Gass chromatography coupled with mass spectrometry, GC-MS)

GC-MS analize u ovom diplomskom radu proveden su na Agilent Technologies 7890A plinskom kromatogramu združenom s Agilent Technologies 5975C VL MSD sustavom za masenu spektrometriju, uz HP-1 kolonu (30 m).

3.2. METODE RADA

3.2.1. Sinteza i izolacija egzopolisaharida

Soj *L. fermentum* D12 uzgojen je propagacijom u 500 ml MRS bujona suplementiranog s 2% izvora ugljika (glukoza, galaktoza, laktoza, fruktoza, saharoza) pri 37°C. Izolacija egzopolisaharida otpuštenih u medij te onih vezanih za površinu stanice prilagođena je prema Tallon i sur. (2003) i Toba i sur. (1991). S obzirom na malu masu uzoraka egzopolisaharida vezanih na površinu stanica, koja je u rasponu od 0,9 - 2,2 mg i prisutnost proteina u visokoj koncentraciji koja je dokazana mjerenjem apsorbancije UV-VIS spektrofotometrijom, uzorci egzopolisaharida izoliranih s površine stanica su izostavljeni u daljnjim analizama. Egzopolisaharidi otpušteni u medij su liofilizirani te im je izvagana masa u svrhu određivanja prinosa.

3.2.2. NMR (eng. Nuclear magnetic resonance) analize

U svrhu ispitivanja sastava egzopolisaharida izoliranih iz supernatanta nakon uzgoja soja *L. fermentum* D12 u medijima suplementiranim s različitim izvorima ugljika (2% w/v glukoza, galaktoza, laktoza, fruktoza, saharoza), provedene su NMR (eng. Nuclear magnetic resonance) analize.

Uzorci su pripremljeni resuspendiranjem EPOL-a u 400 μ L D₂O nakon čega su liofilizirani radi uklanjanja molekula vode. Dan prije NMR analize, liofilizirani uzorci resuspendirani su u 600 μ L D₂O te stavljani na tresilicu tijekom noći. Uzorci su zatim prebačeni u tube za NMR analizu, a analiza je provedena na „Varian 400“ i „Varian 500“ NMR uređajima (400 MHz/ 500 MHz, 50°C, 0-7 ppm, 64 scans).

3.2.3. Ispitivanje prisutnosti acetilnih skupina tretmanom s NaOD

U svrhu provjere prisutnosti acetilnih skupina, uzorak egzopolisaharida izoliran iz supenatanta, nakon uzgoja u hranjivoj podlozi suplementiranoj s glukozom (2% w/v) tretiran je s 0,1 M NaOD u konačnoj koncentraciji od 0,2 mol L⁻¹ tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon provođenja reakcije uzorak je podvrgnut ¹H-NMR analizi, opisano pod točkom 3.2.2..

3.2.4. Uklanjanje proteina i lipida iz uzorka egzopolisaharida izoliranih iz supernatanta

Liofilizirani egzopolisaharidi izolirani iz supernatanta nakon uzgoja soja *L. fermentum* D12 u medijima suplementiranim s različitim izvorima ugljika (2% w/v glukoza, galaktoza, laktoza, fruktoza, saharoza) sjedinjeni su u jedinstveni uzorak. Uzorak je ohlađen u ledu nakon čega je dodana trikloroctena kiselina u konačnoj koncentraciji 20% (w/v). Uzorak je centrifugiran 30 minuta pri 18 000 rpm (4°C) nakon čega je uslijedila dijaliza u membranama promjera 2,9 cm (MWCO od 12 000 do 14 000). Nakon završene dijalize uzorak je koncentriran uparavanjem na vakuum uparivaču (40°C) i tretiran s 4 volumena hladnog 99,8%-tnog etanola. Smjesa etanola i uzorka stavljena je na -20°C kako bi se dodatno potaknulo taloženje lipida. Nakon prekonoćne inkubacije uzorak je centrifugiran 30 min pri 18 000 o min⁻¹ (4°C), supernatant je odliven, a talog je resuspendiran u MiliQ vodi. Slijedila je dijaliza uzorka u membrani polumjera 1,05 cm, promjera 2,1 cm (MWCO od 12 000 do 14 000). Nakon provedene dijalize, pH uzorka podešen je na 6,70 i uzorak je liofiliziran.

3.2.5. Određivanje sastava egzopolisaharida njihovom derivatizacijom u alditol acetate i provođenjem plinske kromatografije (eng. Gas Liquid Chromatography, GLC)

Sastav egzopolisaharida određen je plinskom kromatografijom nakon provođenja kemijskih reakcija hidrolize, redukcije i per-acetilacije.

Reakcija hidrolize provedena je dodatkom 2 M trifluoroctene kiseline pri 125°C u 1 mg uzorka te je trajala 1 h nakon čega je uzorak osušen uz lagano zagrijavanje pod strujom dušika. Redukcija je započeta dodatkom destilirane vode, 100 µL 1 M amonijevog hidroksida (NH₄OH), 50 µL inozitola (1 mg mL⁻¹) koji služi kao unutarnji standard te dodatkom natrijevog borodeuterida (NaBD₄). Reakcija je zaustavljena nakon 18 h dodatkom 50%-tne otopine octene kiseline i vode, do prestanka stvaranja mjehurića. Uzorci su isprani tri puta u 10%-tnoj otopini octene kiseline u metanolu i tri puta u metanolu, a između ispiranja je provedeno uparavanje pod vakuumom. Uzorak osušen pod dušikom dodatno je osušen u termostatu pod vakuumom pri 50°C nakon čega je provedena reakcija per-acetilacije dodatkom 300 µL piridina i 1 ml acetanhidrida. Reakcija se odvijala 30 minuta pri 100°C. Uzorci su ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje na magnetnoj miješalici. Reakcije redukcije i per-acetilacije do dobivanja alditol acetata (AA) napravljene su prema Albersheim i sur. (1967).

Uzorci su osušeni pod dušikom i ekstrahirani dodatkom kloroforma i vode, uz ispiranje s vodom šest puta. Organska faza (kloroform) je uklonjena uz dodatak natrijevog sulfata i uz filtraciju preko staklene vune, nakon čega je uzorak osušen pod dušikom. Dobiveni uzorak je resuspendiran u kloroformu i injektiran u kolonu za plinsku kromatografiju duljine 30 metara, promjera 0,32 mm i debljine ispune 0,25 µm. Plinska kromatografija provedena je na uređaju „Perkin-Elmer Autosystem XL“ s plameno-ionizacijskim detektorom, helijem kao plinom nosačem i temperaturnim programom od 150°C (3 min) do 270°C (3 °C min⁻¹, 2 min) i od 270 do 150°C (25°C min⁻¹, 2 min). Dobivenim pikovima u GLC kromatogramu je, usporedbom s retencijskim vremenima standarda, pridružena odgovarajuća vrsta šećera.

3.2.6. Analiza tipa glikozidne veze između šećera u polisaharidu plinskom kromatografijom (eng. Gas Liquid Chromatography, GC) i plinskom kromatografijom združenom sa spektrometrijom masa (eng. Gas Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry, GC-MS)

Analizi pomoću GC-a i GC-MS-a prethode reakcije per-metilacije, hidrolize, redukcije, per-acetilacije i ekstrakcije sa CHCl_3 , odnosno prevođenje šećera u djelomično metilirane alditol acetate.

Liofilizirani uzorak egzopolisaharida (oko 1 mg) osušen je u termostatu pod vakuumom pri 50°C . Uzorak je otopljen dodatkom $300\ \mu\text{L}$ dimetil sulfoksida uz miješanje u vodenoj kupelji tijekom 30 min. Reakcija per-metilacije je modificirana prema Harris i sur. (1984) metodu dodatkom $300\ \mu\text{L}$ otopine kalijevog metilsulfinilmetida (eng. potassium methylsulfinylmethanide; dimethyl potassium) koji je pripremljen prema Phillips i Fraser (1981). Reakcija se provodila 30 minuta uz vorteksiranje, nakon čega je uzorak ohlađen na ledu. Kalijev metilsulfinilmetanid je jaka baza kojom se uklanjaju svi vodikovi ioni vezani na kisik. U smrznuti uzorak dodano je $300\ \mu\text{L}$ hladnog metil jodida, nakon čega je uzorak ostavljen na sobnoj temperaturi, odmrznut i vorteksiran tijekom 30 minuta. U ovom koraku metilne grupe se vežu na sve slobodne kisikove atome, kojima je prethodno uklonjen vodikov ion. Reakcija je zaustavljena dodatkom smjese kloroforma i metanola u omjeru 2:1 (v/v) te destiliranom vodom. Smjesa je centrifugirana 10 minuta pri $1000\ \text{min}^{-1}$, nakon čega je uklonjena vodena faza, a postupak ispiranja dodatkom destilirane vode ponovljen je 6 puta. Organska faza u kojoj se nalazi metilirani uzorak je osušena pod dušikom nakon čega su provedene reakcije hidrolize, redukcije i per-acetilacije kako je opisano pod točkom 3.2.4., a derivati su nazvani djelomično metilirani alditol acetati (engl. partially methyleted alditol acetates, PMAA). Dobiveni derivati resuspendirani su u kloroformu i injektirani u kolonu za plinsku kromatografiju dugačku 30 metara, promjera $0,25\ \text{mm}$ i debljine ispune $0,25\ \mu\text{m}$. Plinska kromatografija provedena je na uređaju „Perkin-Elmer“ (SAD) s plameno-ionizacijskim detektorom i helijem kao plinom nosačem. Temperaturni program iznosio je: 125°C (1 min) do 240°C ($4^\circ\text{C}/\text{min}$, 2 min) i od 240 do 125°C ($25^\circ\text{C}/\text{min}$, 2 min). Uz to, uzorak je injektiran u „Agilent Technologies 7890A“ plinski kromatogram združenom s „Agilent Technologies 5975C VL MSD“ sustavom za masenu spektrometriju, uz HP-1 kolonu i s jednakim temperaturnim programom.

Fragmenti odgovarajućih masa, dobiveni procesom ionizacije, uspoređeni su s literaturom (Carpita i Shea, 1989; mrežna baza podataka „The CCRC Spectral Database for PMAA's), nakon čega je svakom peaku dodijeljen odgovarajući tip veze.

3.2.7. Kromatografija visoke djelotvornosti isključenjem na osnovi veličine čestica (eng. High performance size exclusion chromatography, HPSEC)

Smjesa egzopolisaharida nakon pročišćavanja s TCA i EtOH te s podešenom pH vrijednosti razdvojena je kromatografijom isključenjem na osnovi veličine čestica (eng. size-exclusion chromatography, SEC) pomoću Sephacryl S-300 kolone koja ima mogućnost razdvajanja molekula u rasponu od 2×10^3 - 4×10^5 Da, pri čemu je korišten detektor refraktivnog indeksa. Kao mobilna faza korištena je 0,15 M otopina NaCl-a, a frakcije su se počele skupljati pomoću kolektora nakon 10 min svakih 30 sekundi uz protok od 1 ml min^{-1} .

Nakon razdvajanja smjese pročišćenog uzorka egzopolisaharida, frakcije koje su sadržavale molekule iste molekulske mase združene su u jedinstven uzorak. Time su dobivena tri zasebna uzorka koji su koncentrirani pomoću vakuum uparivača i dijalizirana u destiliranoj vodi s ciljem uklanjanja natrijeva klorida.

3.2.8. Određivanje sastava egzopolisaharida (metanoliza) provođenjem plinske kromatografije (eng. Gas Liquid Chromatography, GLC)

Sastav egzopolisaharida u drugom i trećem uzorku, dobiven kromatografijom isključenjem na osnovi veličine čestica, određen je plinskom kromatografijom, nakon provođenja kemijske reakcije metanolize prema Dudman i sur. (1983).

Uzorci (oko 1 mg) su zajedno s inozitolom ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$), koji služi kao unutarnji standard, liofilizirani i dodatno osušeni u termostatu pod vakuumom pri 50°C . Reakcija metanolize provedena je pri 85°C tijekom 16 sati dodatkom 3 M komercijalnog standarda HCL:MeOH. Nakon provedene reakcije uzorci su osušeni pod dušikom uz zagrijavanje, a klorovodična kiselina (HCl) je uklonjena ispiranjem uzoraka 5 puta dodatkom anhidridnog metanola, uz sušenje pod dušikom između svakog ispiranja. Uzorci su ponovno osušeni u termostatu pod vakuumom pri 50°C , nakon čeg je provedena TMS (Trimetilsilil) derivatizacija tijekom 25 minuta pri 80°C dodatkom komercijalnog HMDS:TMCS-Piridina u omjeru 3:1:9. Uzorci osušeni pod dušikom su ekstrahirani dodatkom heksana i ponovno osušeni pod dušikom. Dobiveni metil glikozidi su resuspendirani u heksanu i injektirani u kolonu za plinsku kromatografiju. Plinska kromatografija provedena je na uređaju „Perkin-Elmer Autosystem

XL“ s plameno-ionizacijskim detektorom, helijem kao plinom nosačem i temperaturnim programom od 150°C (3 min) do 270°C (3°C/min, 2 min) i od 270 do 150°C (25°C/min, 2 min). Dobiveni spektri svakog uzorka uspoređeni su sa standardima, te je usporedbom s retencijskim vremenima standarda izračunat relativni molarni omjer među šećerima.

Relativni molarni omjer između komponenata smjese izračunava se usporedbom masa pojedinog šećera u uzorku koja se pak izračunava prema formuli [1]:

$$W_i = \frac{A_i \times W_{ino}}{A_{ino} \times S_i} \quad [1]$$

gdje je:

W_i - masa šećera u uzorku

W_{ino} -masa inozitola, unutarnjeg standarda

A_i - površina pika određene vrste šećera prisutnog u uzorku

A_{ino} - površina pika inozitola, unutarnjeg standarda

S_i - engl. response factor za standard šećera koji je jednak šećeru prisutnom u uzorku

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. PRINOS EGZOPOLISAHARIDA (EPOL-a) PROIZVEDENIH POMOĆU

Lactobacillus fermentum D12

Nakon uzgoja soja *Lactobacillus fermentum* D12 u MRS podlozi obogaćenoj s 2% glukoze, fruktoze, galaktoze, saharoze ili laktoze, sintetizirani EPOL-i su pročišćeni te su izolirani uzorci imenovani na sljedeći način:

EPOL-i izolirani iz MRS podloge obogaćene s 2% glukoze- Lactobac GluS

EPOL-i izolirani iz MRS podloge obogaćene s 2% fruktoze- Lactobac FruS

EPOL-i izolirani iz MRS podloge obogaćene s 2% galaktoze- Lactobac GalS

EPOL-i izolirani iz MRS podloge obogaćene s 2% saharoze- Lactobac SahS

EPOL-i izolirani iz MRS podloge obogaćene s 2% laktoze- Lactobac LakS

Liofilizirani uzorci izvagani su kako bi se odredio prinos EPOL-a (tablica 1). Prinos je izražen kao mg sintetiziranog EPOL-a u ukupnom volumenu (L) MRS podloge (koji je iznosio 400 mL, a koji je korišten za uzgoj *Lactobacillus fermentum* D12)

Tablica 1. Prinos (Y_{EPOL} ; mg L⁻¹) EPOL-a proizvedenih s *Lactobacillus fermentum* D12 u MRS podlozi obogaćenoj s 2% izvora ugljika

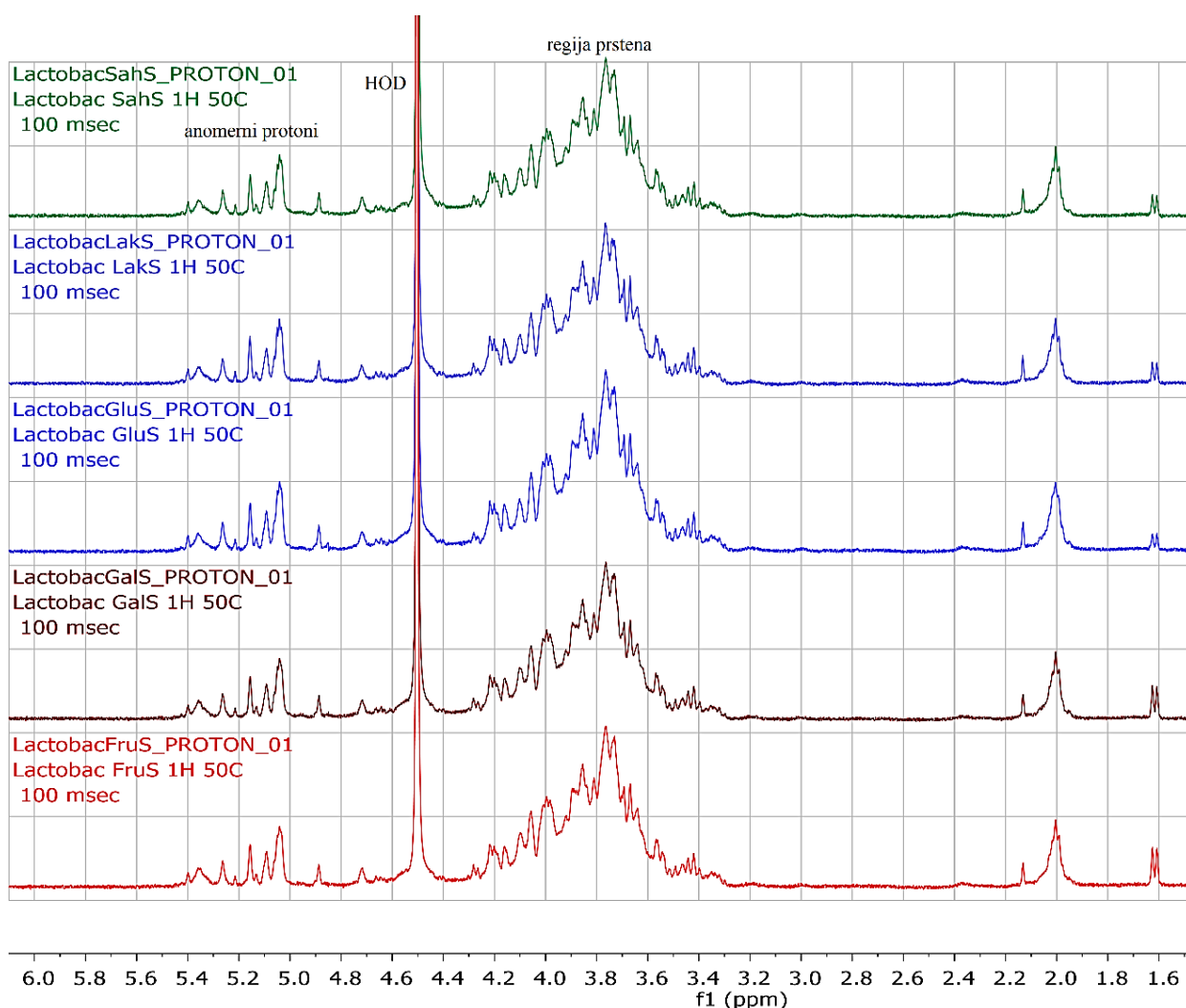
Ime uzorka	Y_{EPOL} (mg L ⁻¹)
Lactobac GluS	200,25
Lactobac FruS	193,00
Lactobac GalS	165,75
Lactobac SahS	167,50
Lactobac LakS	181,75

Usporedbom dobivenih prinosa s istraživanjem koje su proveli Bukola i sur. (2008) može se zaključiti da je *Lactobacillus fermentum* D12 aktivni proizvođač EPOL-a, budući da su svi prinosi viši od 40 mg L⁻¹. Nadalje, suplementacija a glukozom dovela je do najviših prinosa EPOL-a, dok je prinos najmanji u podlozi obogaćenoj s galaktozom. Cerning i sur. (1994) u svom su istraživanju zaključili da povećanje koncentracije glukoze, u podlozi u kojoj

se uzgaja soj producent, dovodi do povećane proizvodnje EPOL-a, što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom diplomskom radu.

4.2. ^1H NMR ANALIZA EGZOPOLISAHARIDA (EPOL-a) PROIZVEDENIH S *Lactobacillus fermentum* D12 I IZOLIRANIH IZ MRS PODLOGA OBOGAĆENIH S RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA

Da bi se odredile moguće razlike u strukturi između EPOL-a izoliranih iz medija koji sadrže jedan šećer u suvišku (saharozu, laktozu, glukozu, galaktozu ili fruktozu) uzorci su analizirani korištenjem ^1H -NMR spektroskopije (slika 4).

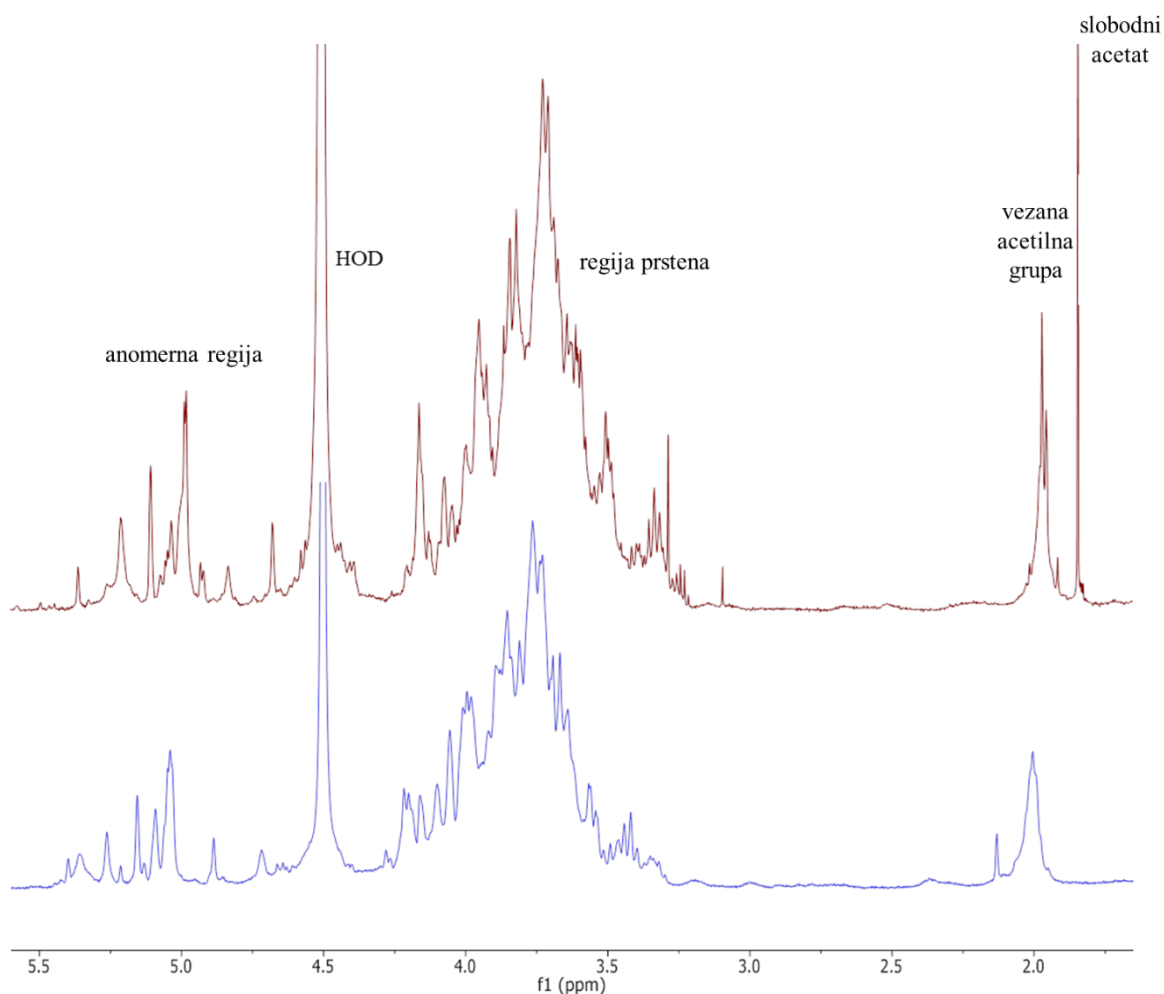


Slika 4. ^1H -NMR spektri EPOL-a proizvedenih s *Lactobacillus fermentum* D12 u medijima obogaćenim s 2% izvora ugljika (saharoze, laktoze, glukoze, galaktoze ili fruktoze)

^1H -NMR spektar pokazuje da su EPOL-i izolirani iz različitih medija za uzgoj strukturno identični, što znači da sastav hranjive podloge ne utječe na strukturu EPOL-a koje proizvodi *Lactobacillus fermentum* D12. Signal na približno 2 ppm može ukazivati na prisutnost acetilne grupe, dok pikovi između 2 i 1 ppm mogu biti pripisani proteinima i/ili lipidima.

4.3. ^1H NMR SPEKTROSKOPIJA EGZOPOLISAHARIDA (EPOL-a) IZOLIRANIH IZ MRS HRANJIVE PODLOGE OBOGAĆENE S 2% GLUKOZE NAKON TRETMANA S NaOD

Budući da je uzorak Lactobac GluS na prethodnom ^1H NMR spektru (slika 4) pokazao najvišu čistoću, deacetiliran je direktno u epruveti za NMR pomoću 0,2 M NaOD-a. Svrha ovog eksperimenta bila je istražiti jesu li proizvedeni egzopolisaharidi acetilirani.



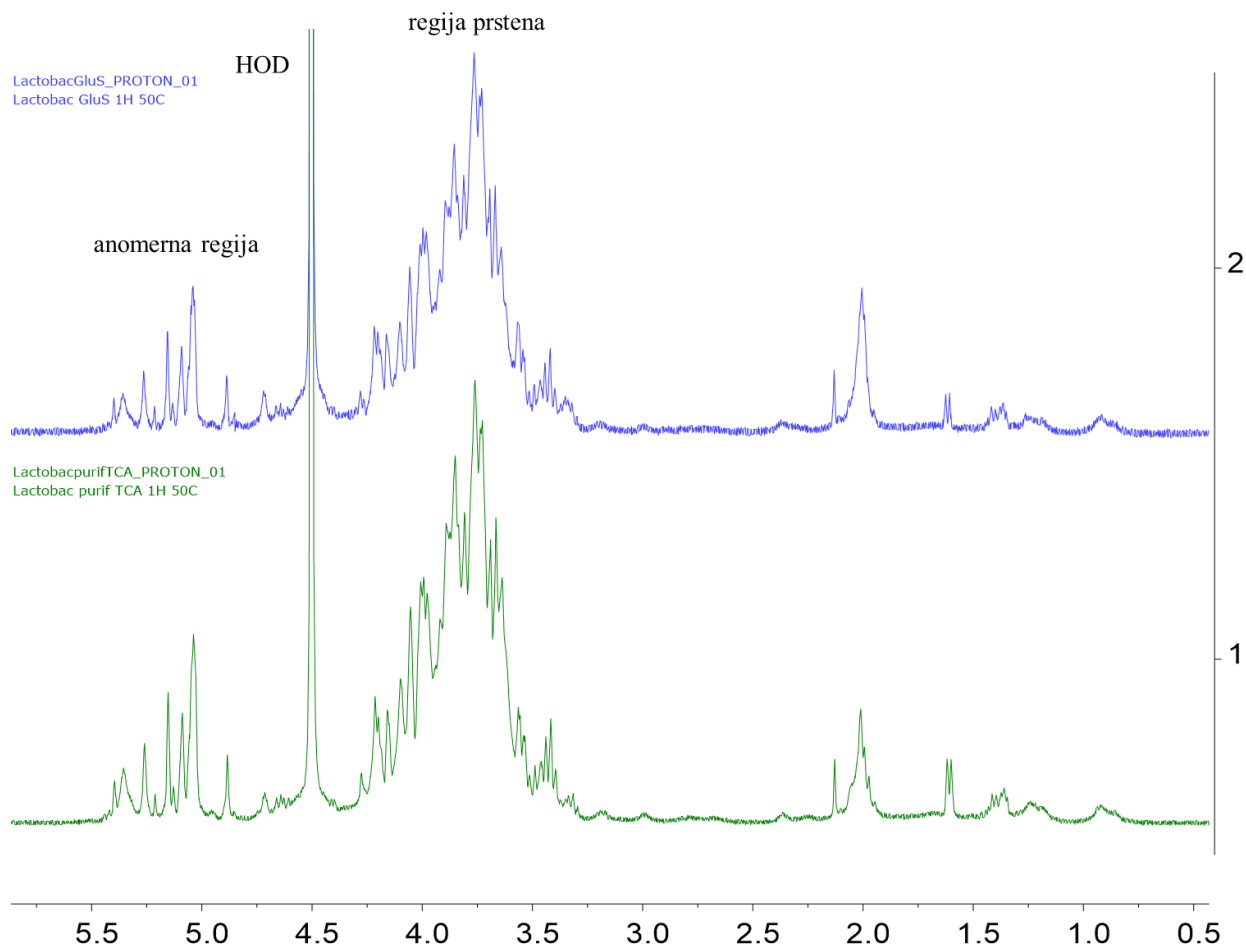
Slika 5. ^1H NMR spektar uzorka Lactobac GluS prije (plavo) i nakon (crveno) tretmana sa NaOD

Usporedbom ^1H NMR spektara prije i nakon tretmana s NaOD (slika 5) vidljive su promjene u anomernoj regiji spektra te oštar pik pri 1,8 ppm prisutan nakon tretmana bazom. Taj se pik može pripisati slobodnom acetatu što navodi na zaključak da je tretman bazom hidrolizirao dio vezanih acetilnih grupa. Nadalje, u uzorku tretiranom sa NaOD prisutnost pika pri 2,0 ppm ukazuje na to da je dio acetilnih skupina još uvijek vezan na polisaharid. Dobiveni rezultati sugeriraju kako je u ovom polisaharidu acetilna grupa otpornija na baznu hidrolizu od istih vrsta supstituenata u drugih bakterijskih polisaharida.

4.4. REZULTAT PROČIŠĆAVANJA SJEDINJENIH UZORAKA

Prethodno provedene analize pokazale su da se egzopolisaharidi, proizvedeni pomoću *Lactobacillus fermentum* D12 u mediju suplementiranom s 2% izvora ugljika, strukturno ne razlikuju (slika 4). Takvi rezultati analiza doveli su do spajanja pet liofiliziranih uzoraka (navedenih u tablici 1) u jedinstveni uzorak koji je zatim pročišćen s trikloroocetnom kiselinom (TCA, u svrhu uklanjanja preostalih proteina) i etanolom (u svrhu uklanjanja preostalih lipida). Nakon provođenja svakog od dva navedena stupnja pročišćavanja, uzorak je dijaliziran kako bi se uklonili TCA i etanol. Nakon pročišćavanja, uslijedila je liofilizacija uzorka koji je naposljetku imenovan Lactobac purif TCA.

Kako bi se provjerila uspješnost pročišćavanja provedena je ^1H NMR analiza i dobiveni je spektar uspoređen s ^1H NMR spektrom Lactobac GluS uzorka prije tretmana s NaOD (slika 6).

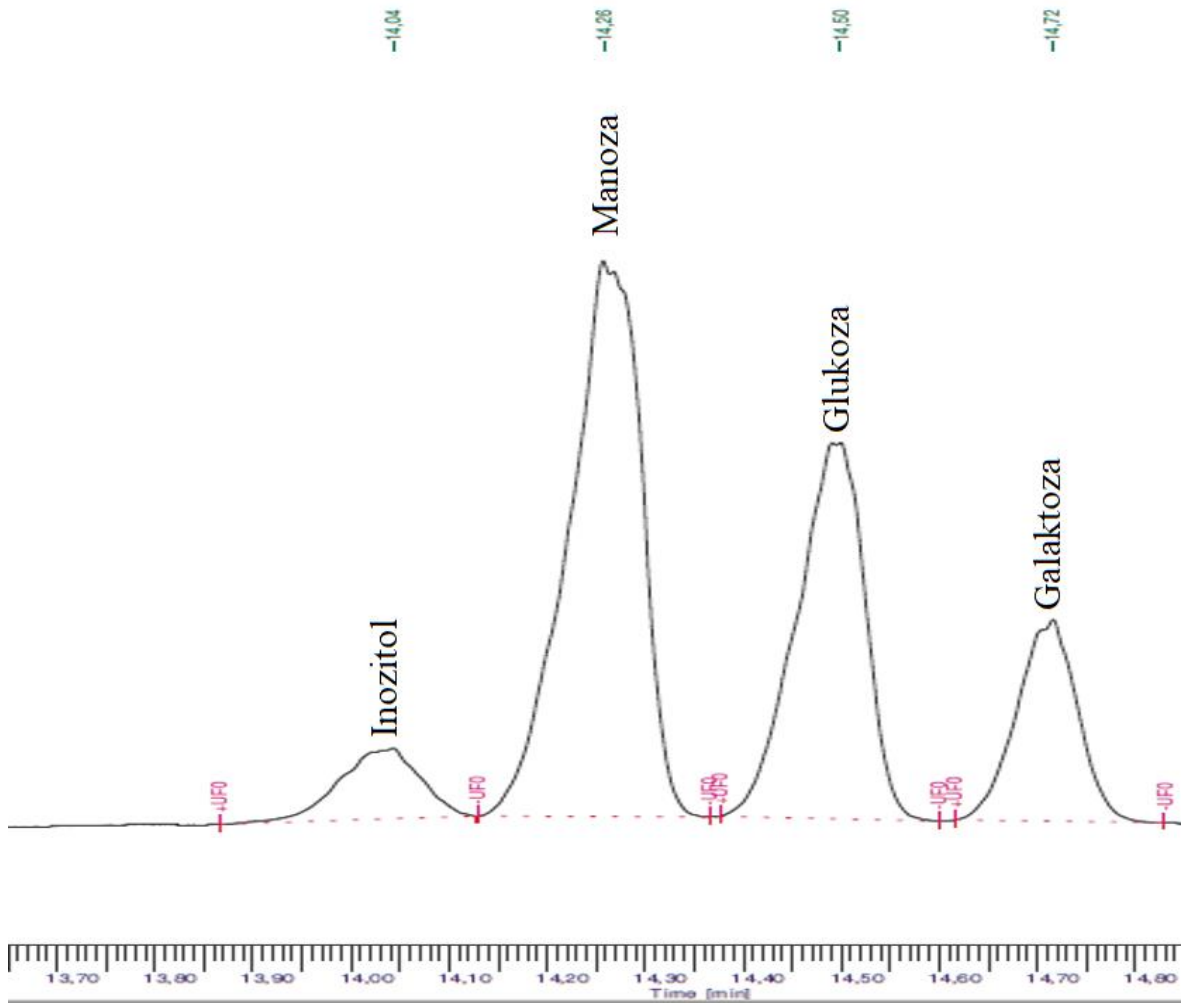


Slika 6. ^1H NMR spektar uzorka Lactobac purif TCA (zeleno) uspoređen s ^1H NMR spektrom uzorka Lactobac GluS (plavo)

Dva ^1H NMR spektra pokazuju visok stupanj sličnosti pri čemu između pikova u spektrima nije uočena nijedna značajna razlika.

4.5. ANALIZA SASTAVA Lactobac purif TCA UZORKA KORIŠTENJEM PLINSKE KROMATOGRAFIJE (engl. GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY, GLC)

Sastav egzopolisaharida određen je nakon provedbe reakcija hidrolize, redukcije i peracetilacije na uzorku Lactobac purif TCA metodom prema Albersheim i sur. (1967). Dobiveni alditol acetati (AA) razdvojeni su plinskom kromatografijom. Retencijska vremena pikova (slika 7, tablica 2) na GLC kromatogramu uspoređena su s retencijskim vremenima standardnih šećera. Na ovaj je način svakom piku na GLC kromatogramu pridružen odgovarajući tip šećera.



Slika 7. GLC kromatogram uzorka Lactobac purif TCA

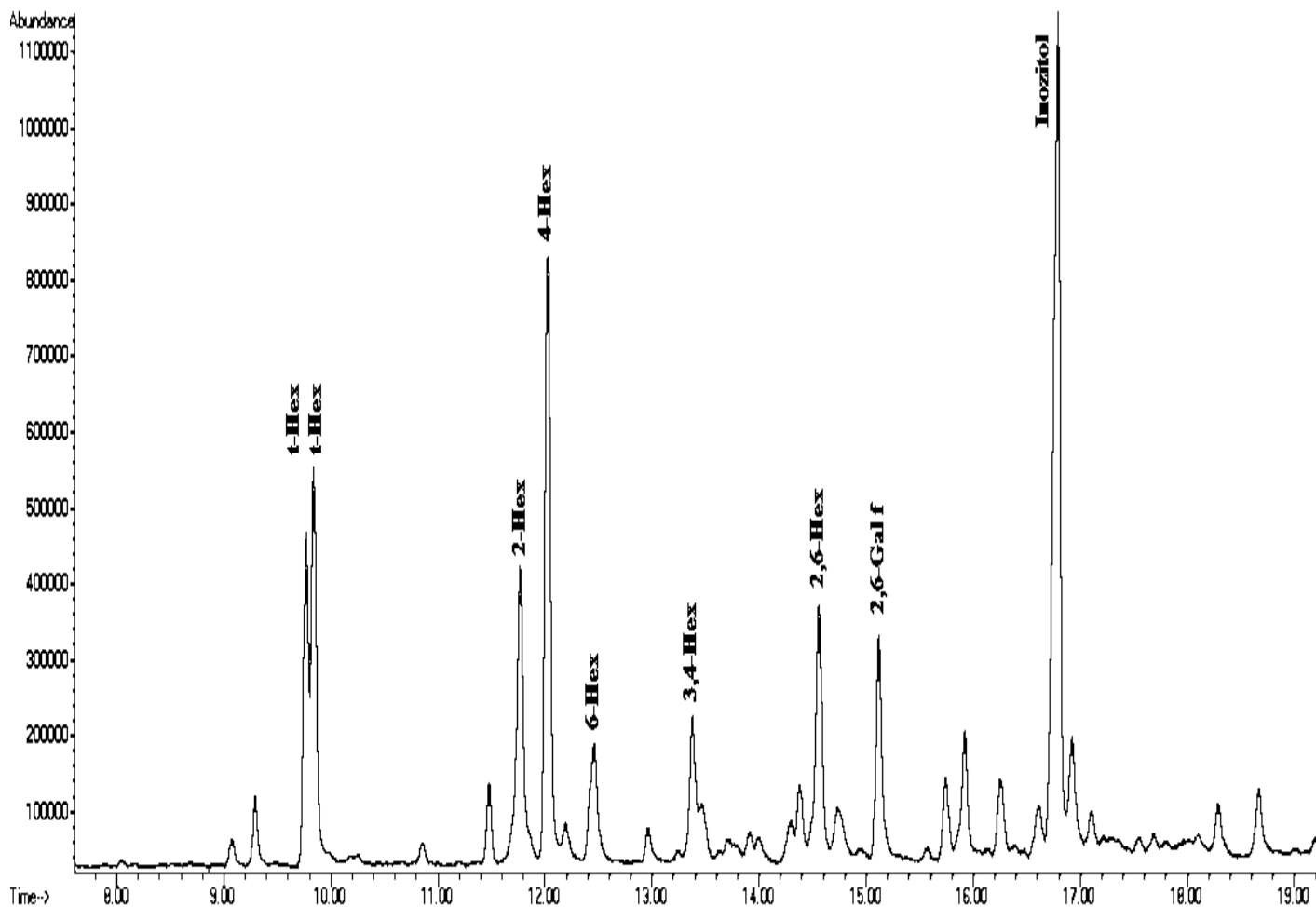
Tablica 2. Izvješće za GLC kromatogram uzorka Lactobac purif TCA

Pik #	Naziv spoja	Retencijsko vrijeme (min)	Površina pika ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
1	Inozitol	14,043	58025,72
2	Manozza	14,257	413290,47
3	Glukoza	14,499	261835,51
4	Galaktoza	14,716	124641,121

U uzorku Lactobac purif TCA prisutna su tri različita tipa šećera: manoza (Man), glukoza (Glu) i galaktoza (Gal). Relativni omjer između šećera Man, Glu i Gal izračunat je izjednačavanjem najmanje površine (Gal) s 1 i dijeljenjem druge dvije površine s tom vrijednošću. Dobiven relativni omjer je Man = 3,3; Glu = 2,1 i Gal = 1.

4.6. ANALIZA TIPA GLIKOZIDNIH VEZA IZMEĐU ŠEĆERA U POLISAHARIDU UZORKA Lactobac purif TCA KORIŠTENJEM PLINSKE KORMATOGRFIJE ZDRUŽENE SA SPEKTROMETRIJOM MASA (GLC-MS)

Uzorak Lactobac purif TCA podvrgnut je analizi glikozidnih veza što uključuje per-metilaciju, hirolizu, redukciju, per-acetilaciju uzorka te ekstrakciju s H₂O/CHCl₃ (Haris i sur., 1984). Dobiveni derivati zovu se djelomično metilirani alditol acetati (engl. partialy methylated alditol acetates; PMAA) koji su zatim analizirani pomoću GLC i GLC-MS (eng. Mass spectrometry, MS). GLC daje podatak o retencijskom vremenu svakog derivata, koji se onda koristio za identifikaciju tipa šećera (Man, Gal ili Glu), dok su rezultati GLC-MS analize prikazani TLC kromatogramom (engl. Total Ion Current Chromatograms). Maseni spektar svakog pojedinog derivata ovisi o poziciji metilnih i acetilnih skupina u šećeru, i njihovom identifikacijom mogu se odrediti ugljici uključeni u glikozidne veze kao i veličina šećernog prstena (Carpita i Shea, 1989; mrežna baza podataka „The CCRC Spectral Database for PMAA's”).

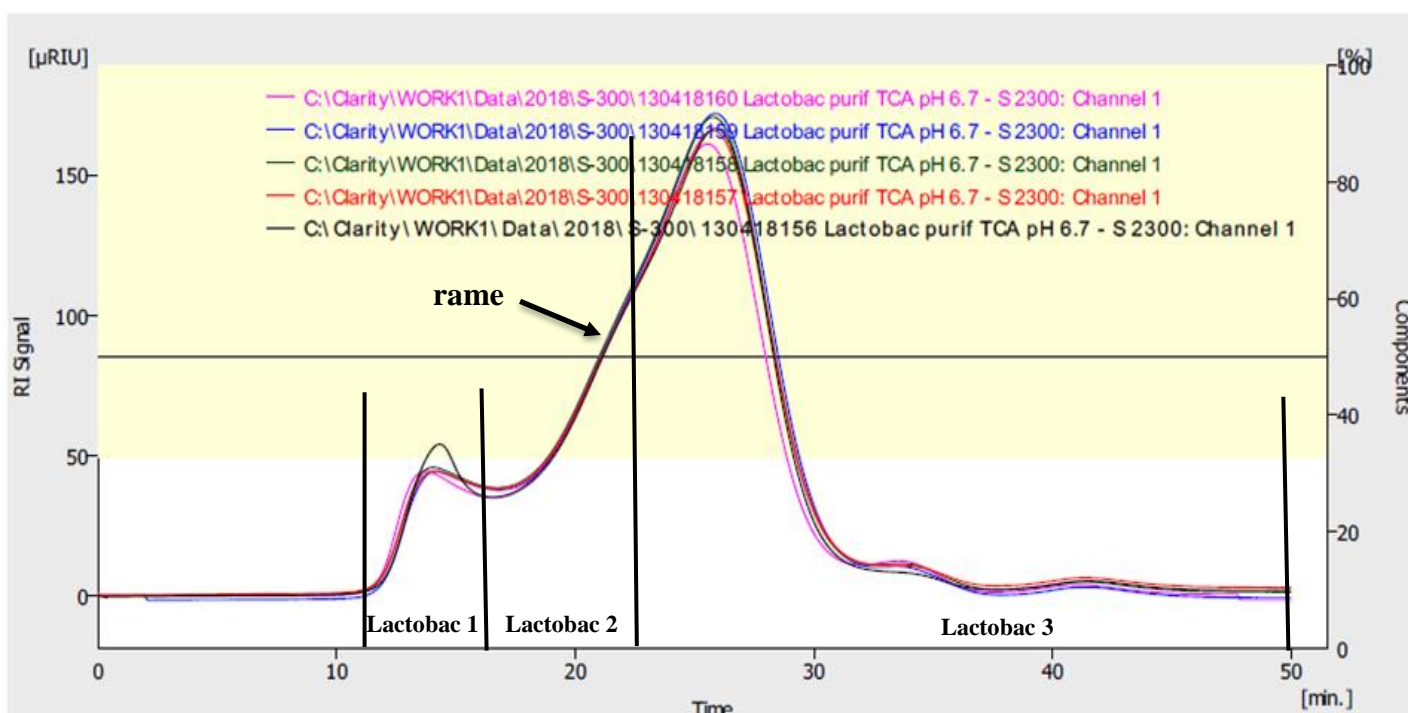


Slika 8. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac purif TCA

Analiza PMAA smjese dovela je do identifikacije 8 glavnim pikova (slika 8) : dvije terminalne ne-reducirajuće heksoze (t-Hex), 2-vezane heksoze (2-Hex), 4-vezane heksoze (4-Hex), 6-vezane heksoze (6-Hex), 3,4-vezane heksoze (3,4-Hex), i 2,6-vezane heksoze (2,6-Hex), sve u konfiguraciji piranoznog prostena, i 2,6-vezana Gal u konfiguraciji furanoznog prstena (2,6-Galf). Uz navedene glavne pikove prisutni su i pikovi manjeg intenziteta, ukazujući time da EPOL nije potpuno pročišćen.

4.7. KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI ISKLJUČENJEM NA OSNOVI VELIČINE ČESTICA (ENG. HIGH PERFORMANCE SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY, HPSEC)

Cijeli uzorak egzopolisaharida (uzorak Lactobac purif TCA) razdvojen je kromatografijom isključenjem na osnovi veličine čestica na Sephacryl S-300 koloni koja ima raspon razdvajanja od 2×10^3 - 4×10^5 Da uz RI detektor. Na ovaj je način moguće razdvojiti komponente smjese različite veličine i time odrediti broj proizvedenih egzopolisaharida.

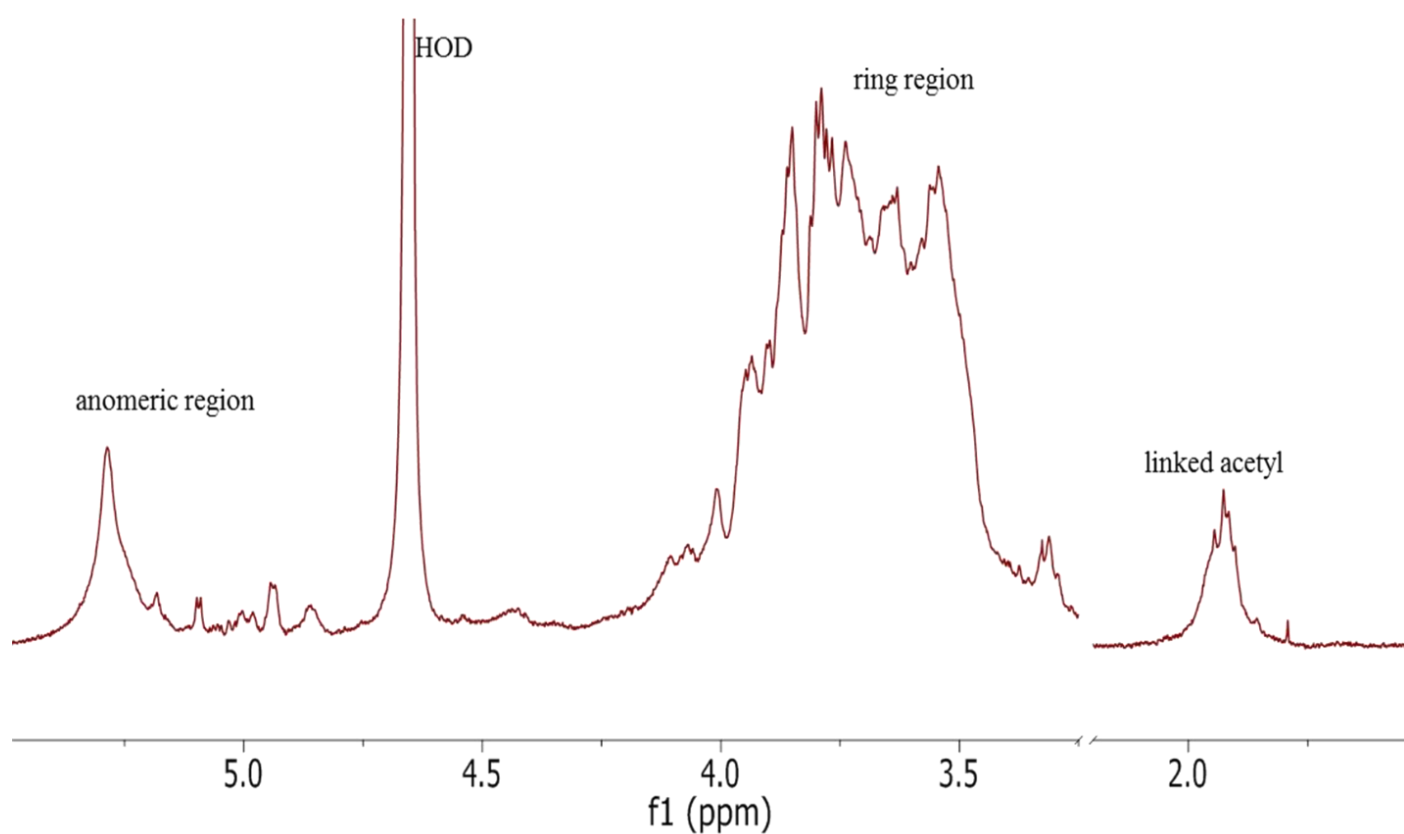


Slika 9. HPSEC kromatogram

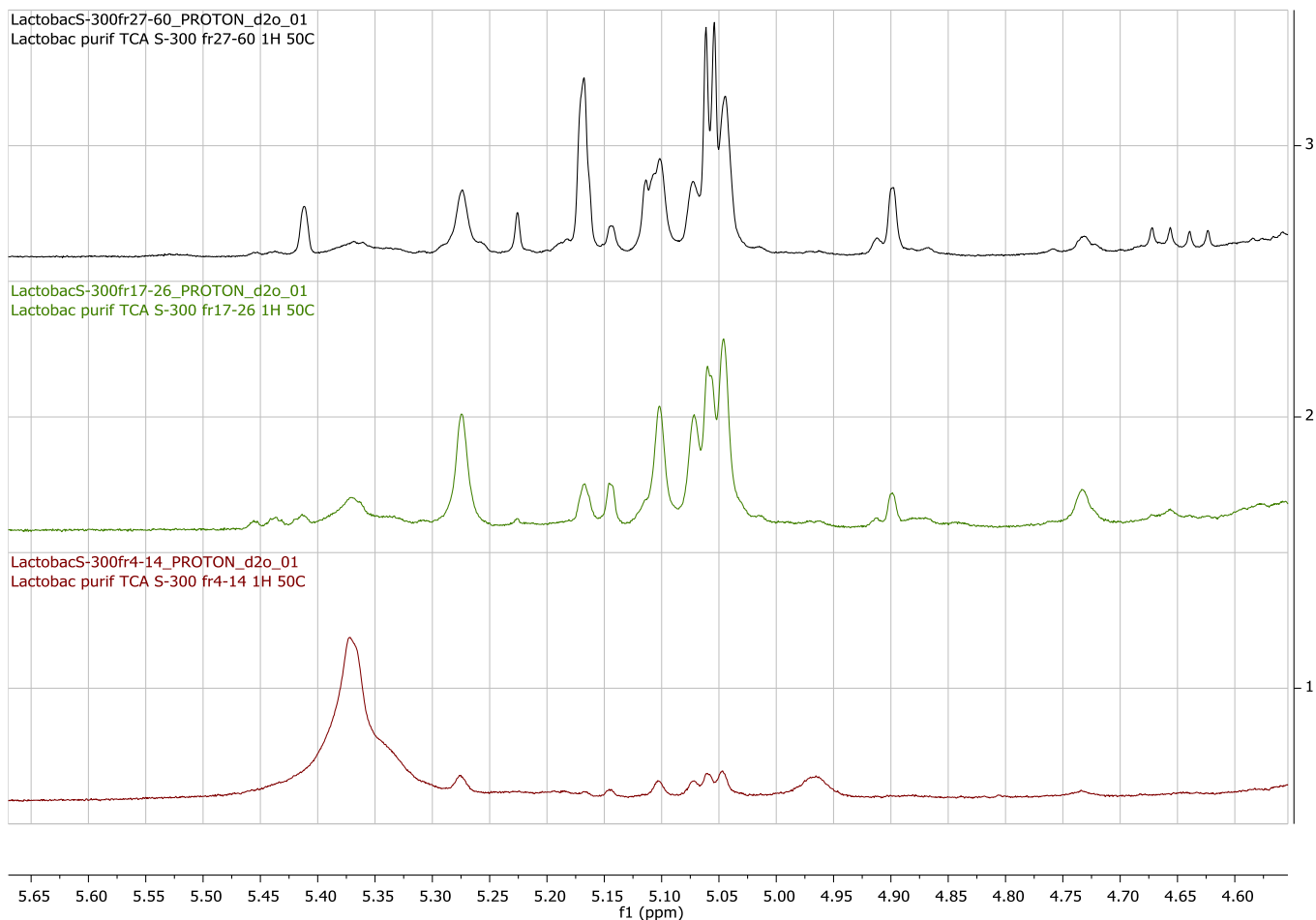
Nakon razdvajanja, dobiveni SEC kromatogram sastavljen je od dva glavna pika i ramena koji ukazuje na prisutnost najmanje tri različita egzopolisaharida (slika 9). Frakcije su sakupljene kako je prikazano na slici 6 te su tri dobivena uzorka imenovana Lactobac 1, Lactobac 2, Lactobac 3. Lactobac 1 sadrži EPOL-e najviše molekulske mase (više od 4×10^5 Da), a Lactobac 3 sadrži EPOL-e najmanje molekulske mase. Lactobac 2 ima srednju molekulsku masu. Nakon provedene kromatografije uzorci su koncentrirani, dijalizirani i liofilizirani.

4.8. ^1H NMR SPEKTROSKOPIJA UZORAKA DOBIVENIH POMOĆU HPSEC

Nakon razdvajanja i pročišćavanja egzopolisaharida uslijedila je analiza razlika u njihovom sastavu korištenjem ^1H NMR spektroskopije.



Slika 10. ^1H NMR spektar uzorka Lactobac 1



Slika 11. Usporedba ^1H NMR anomerne regije uzoraka Lactobac 1, Lactobac 2, Lactobac 3

Na ^1H NMR spektru uzorka Lactobac 1 (slika 10) ističe se samo jedna glavna rezonancija u anomernoj regiji spektra na otprilike 5,36 ppm-a, što sugerira prisutnost homopolisaharoda. Manji pikovi u rasponu od 4,5 do 5,5 ppm-a mogu se pripisati molekulama koje pripadaju drugim dvjema frakcijama ili drugim spojevima prisutnim u malim količinama. Signal na približno 2 ppm-a može indicirati prisutnost acetilnih supstituenata.

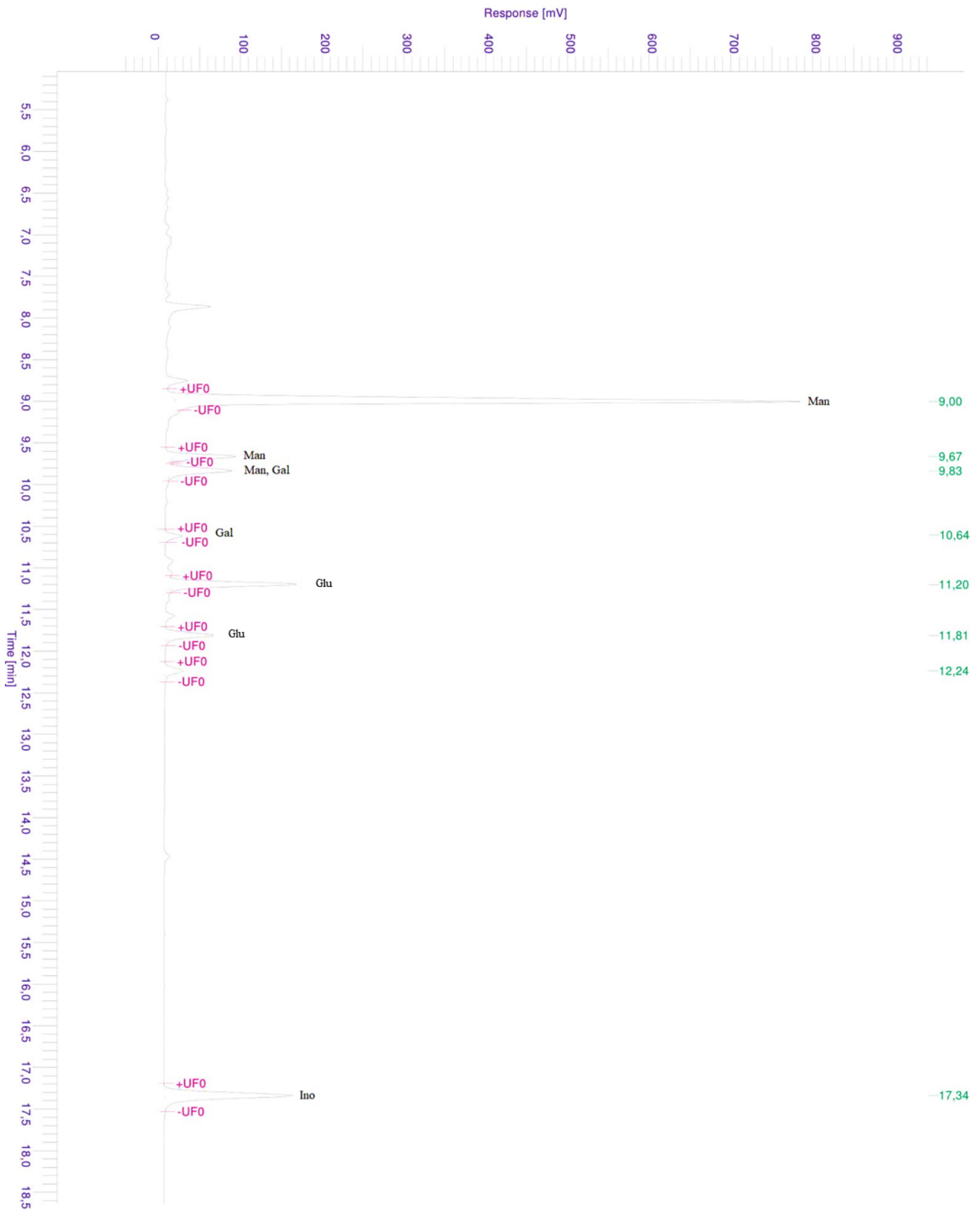
Usporedbom ^1H NMR anomerne regije uzoraka Lactobac 2 i Lactobac 3 (slika 11) mogu se uočiti sličnosti između dva uzorka, no u daljnjim će se analizama razmatrati kao dva različita egzopolisaharida zbog razlika u intenzitetu i površini pikova anomerne regije istog kemijskog pomaka. Nadalje, određeni pikovi prisutni su u jednom uzorku dok ih na ^1H NMR spektru drugog uzorka nema.

Usporedbom ^1H NMR anomerne regije sva tri uzorka (slika 11) moguće je lakše zaključiti da nečistoće od 4,5 do 5,5 ppm u uzorku Lactobac 1 mogu doista biti pripisane

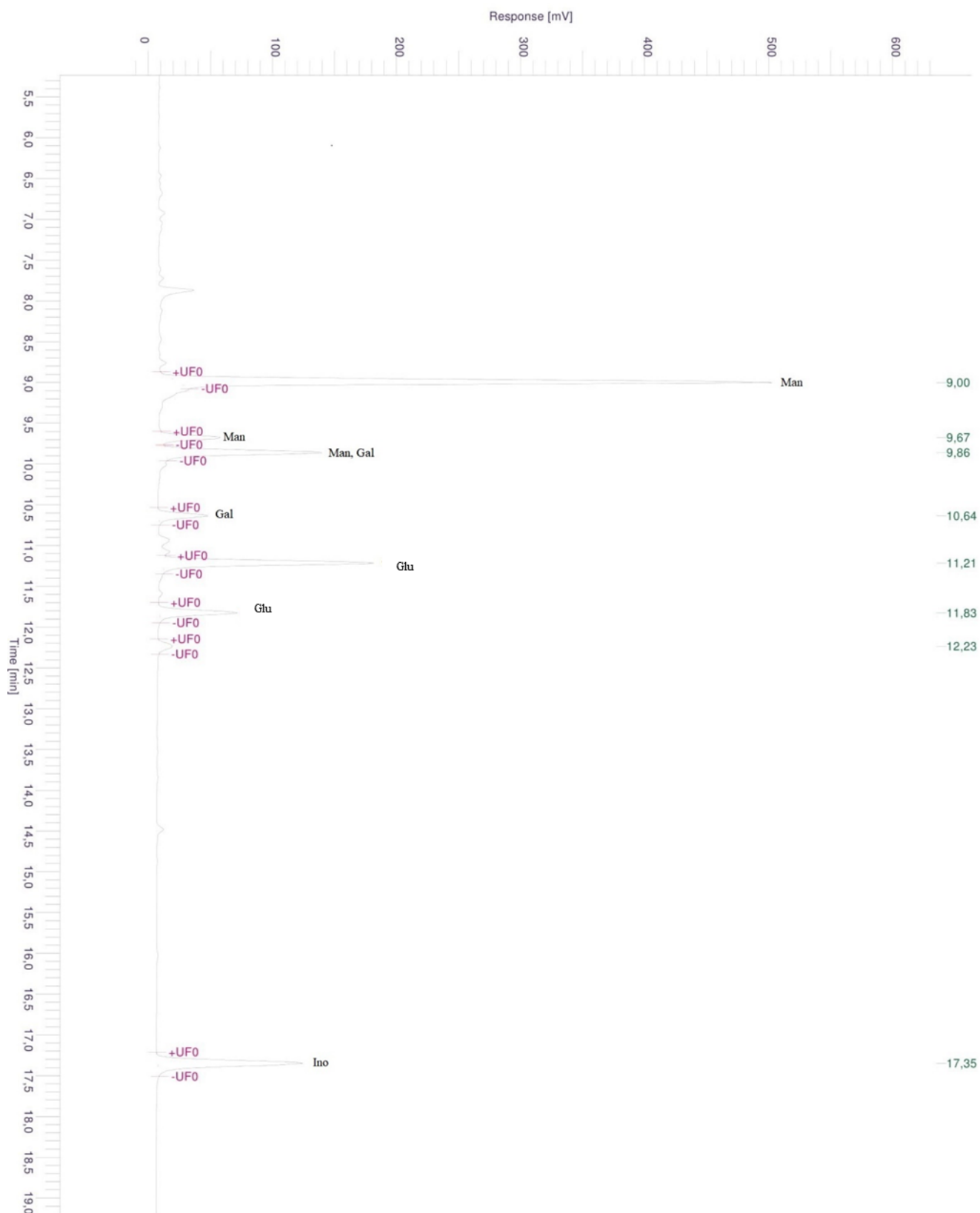
ostacima iz druga dva uzorka zbog njihovog jednakog kemijskog pomaka, ali jačeg intenziteta na ^1H NMR spektru uzoraka Lactobac 2 i/ili Lactobac 3. Nadalje, vidljivo je i da je pik na 5,36 ppm u uzorku Lactobac 1 sastavljen od pika i ramena što može ukazivati na prisutnost dvaju ili više neznatno različitih šećera.

4.9. ANALIZA SASTAVA EGZOPOLISAHARIDA U UZORCIMA Lactobac 2 I Lactobac 3 REAKCIJOM METANOLIZE I PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM

Uzorci Lactobac 2 i Lactobac 3 podvrgnuti su analizi sastava koja uključuje metanolizu, ispiranje s anhidridnim MeOH, TMS derivatizaciju i ekstrakciju s heksanom. Dobiveni metil glikozidi (MG) analizirani su plinskom kromatografijom (GLC) nakon čega su retencijska vremena pikova na GLC-u uspoređena sa retencijskim vremenima standarda (slika 12 i 13, tablice 3 i 4).



Slika 12. GLC kromatogram uzorka Lactobac 2



Slika 13. GLC kromatogram uzorka Lactobac 3

Tablica 3. Izvješće za GLC kromatoram uzorka Lactobac 2

Šećer	MM (g mol ⁻¹)	Si	RV	RRV	Površina	Wi (μg)	mikromoli	RMO
Man	180,16	0,51	9,00	0,52	3196040	386,3	2,14	6,4
Gal	180,16	0,08	10,62	0,61	78619	60,58	0,34	1,0
Glu	180,16	0,55	11,20	0,65	606556	96,66	0,54	1,6
Glu			11,81	0,68	255820			
Ino	180,16	/	17,34	1,00	811108	50,00	/	/

MM- Molarna Masa; RV- Retencijsko Vrijeme; RRV- Relativno Retencijsko Vrijeme; Wi- Mikrogrami šećera u uzorku; RMR- Relativni Molarni Omjer

Tablica 4. Izvješće za GLC kromatogram uzorka Lactobac 3

Šećer	MM (g mol ⁻¹)	Si	RV	RRV	Površina	Wi (μg)	mikromoli	RMO
Man	180,16	0,51	9,00	0,52	1846042	301,03	1,67	1,8
Gal	180,16	0,08	10,64	0,61	163122	167,57	0,94	1,0
Glu	180,16	0,55	11,22	0,65	707445	148,33	0,82	0,9
Glu			11,83	0,68	273527			
Ino	180,16	/	17,35	1,00	601227	50,00	/	/

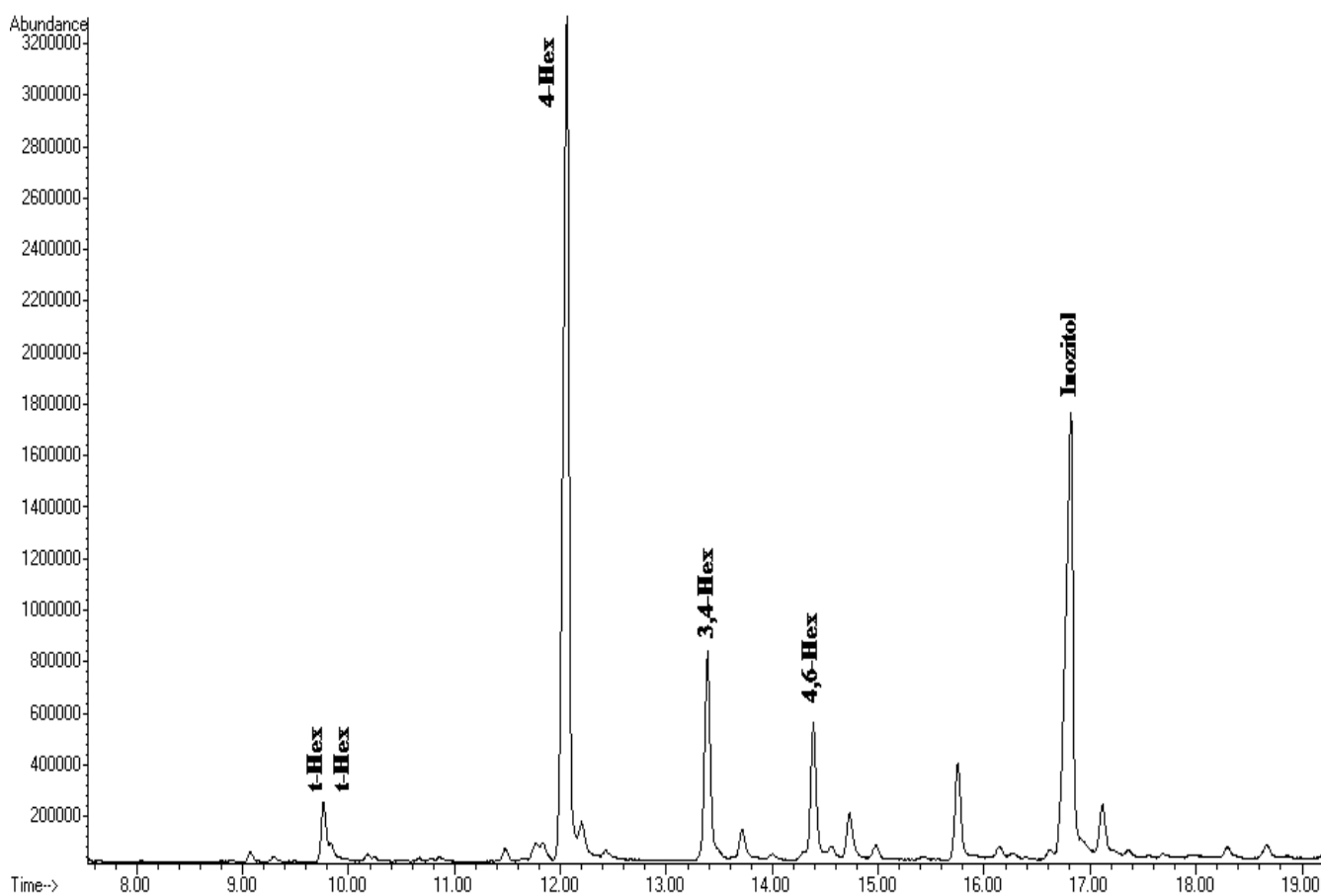
MM- Molarna Masa; RV- Retencijsko Vrijeme; RRV- Relativno Retencijsko Vrijeme; Wi- Mikrogrami šećera u uzorku; RMR- Relativni Molarni Omjer

Budući da reakcija metanolize ne zahtjeva prethodnu redukciju aldehidnih grupa, uobičajeno dolazi do stvaranja više od jednog izomera svakog monosaharida (Wada i sur, 2013), no teško je kvantificirati sve izomere jer su na GLC kromatogramu prisutni pikovi koji su premalog intenziteta za kvantifikaciju. U svakom uzorku uspoređenom sa standardima identificirana su dva karakteristična pika za galaktozu (Gal) i glukozu (Glu) zajedno sa tri karakteristična pika za manozu (Man). Prilikom izračuna relativnog molarnog omjera pomoću Formule [1] (Poglavlje 3.2.8.) korišteni su samo glavni pikovi, jačeg intenziteta. Egzopolisaharid u uzorku Lactobac 2 sastavljen je od manoze, galaktoze i glukoze u omjeru 6,4: 1,0: 1,6; dok je egzopolisaharid u uzorku Lactobac 3 sastavljen od manoze, galaktoze i glukoze u omjeru 1,8: 1,0: 9,0.

4.10. ANALIZA TIPA GLIKOZIDNIH VEZA IZMEĐU ŠEĆERA U POLISAHARIDU U UZORCIMA Lactobac 1, Lactobac 2, Lactobac 3 PREVEDENE U DJELOMIČNO METILIRANE ALDITOL ACETATE KORIŠTENJEM PLINSKE KROMATOGRAFIJE ZDRUŽENE S SPEKTROMETRIJOM MASA (GLC-MS)

Svaki je uzorak podvrgnut kemijskim reakcijama u svrhu analize glikozidnih veza kako je već opisano u poglavlju 1.6. Derivati su analizirani korištenjem GC-a i GC-MS-a u svrhu izračunavanja relativnog molarnog omjer šećera u uzorcima.

4.10.1. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 1

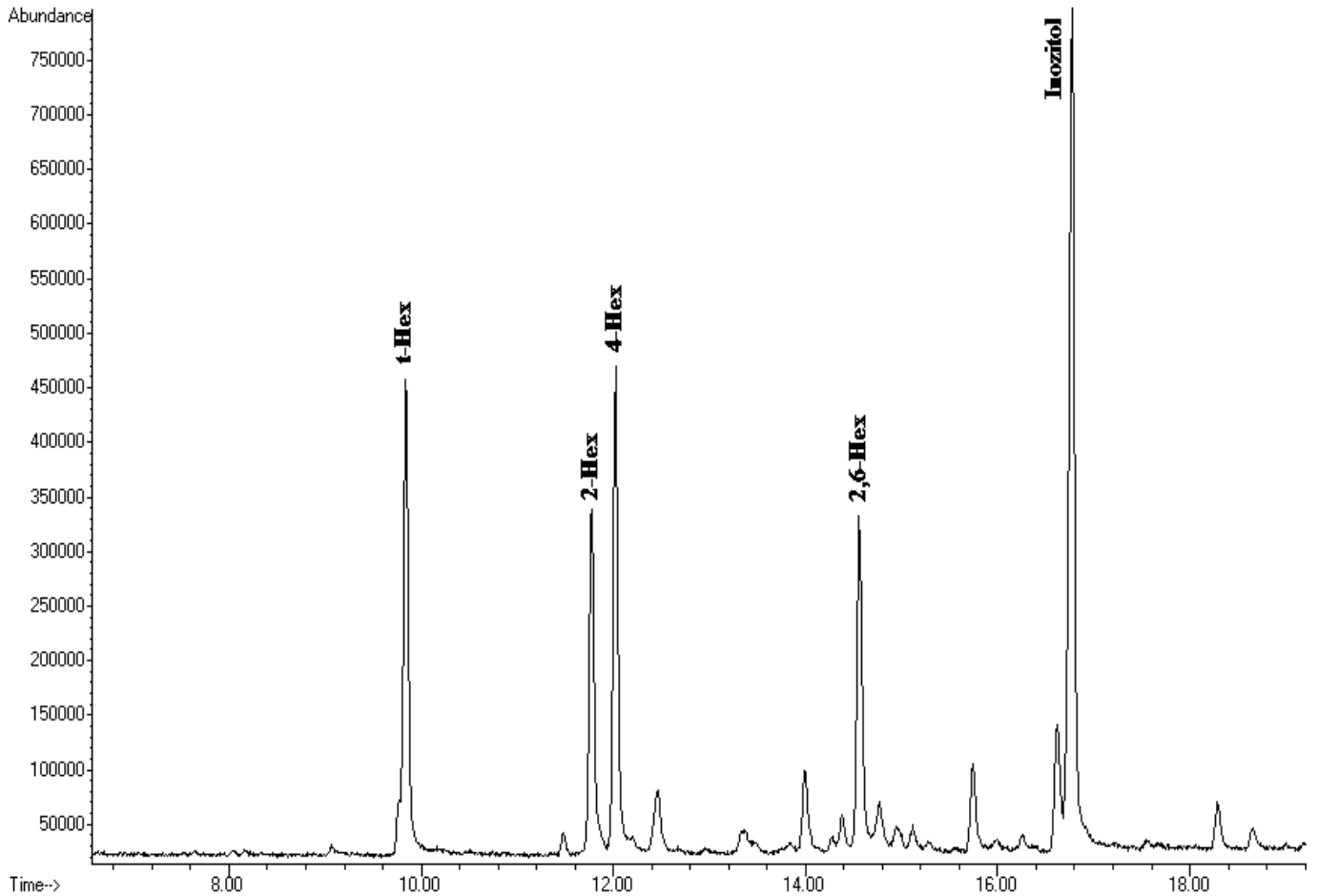


Slika 14. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 1

Korištenjem podataka dobivenim GLC-MS analizom (slika 14) uzorka može se zaključiti kako je egzopolisaharid u uzorku Lactobac 1 uglavnom sastavljen od 4-vezane heksoze (4-Hex), uz prisutnost malih količina ne-reducirajuće terminalne heksoze (t-Hex), 3,4-

vezane heksoze (3,4-Hex) i 4,6-vezane heksoze (4,6-Hex). Pikovi koji sugeriraju razgranatost šećera mogu biti posljedica nepotpune metilacije polisaharida, budući da je površina t-Hex mnogo manja u odnosu na površine 4,6-Hex i 3,4-Hex .

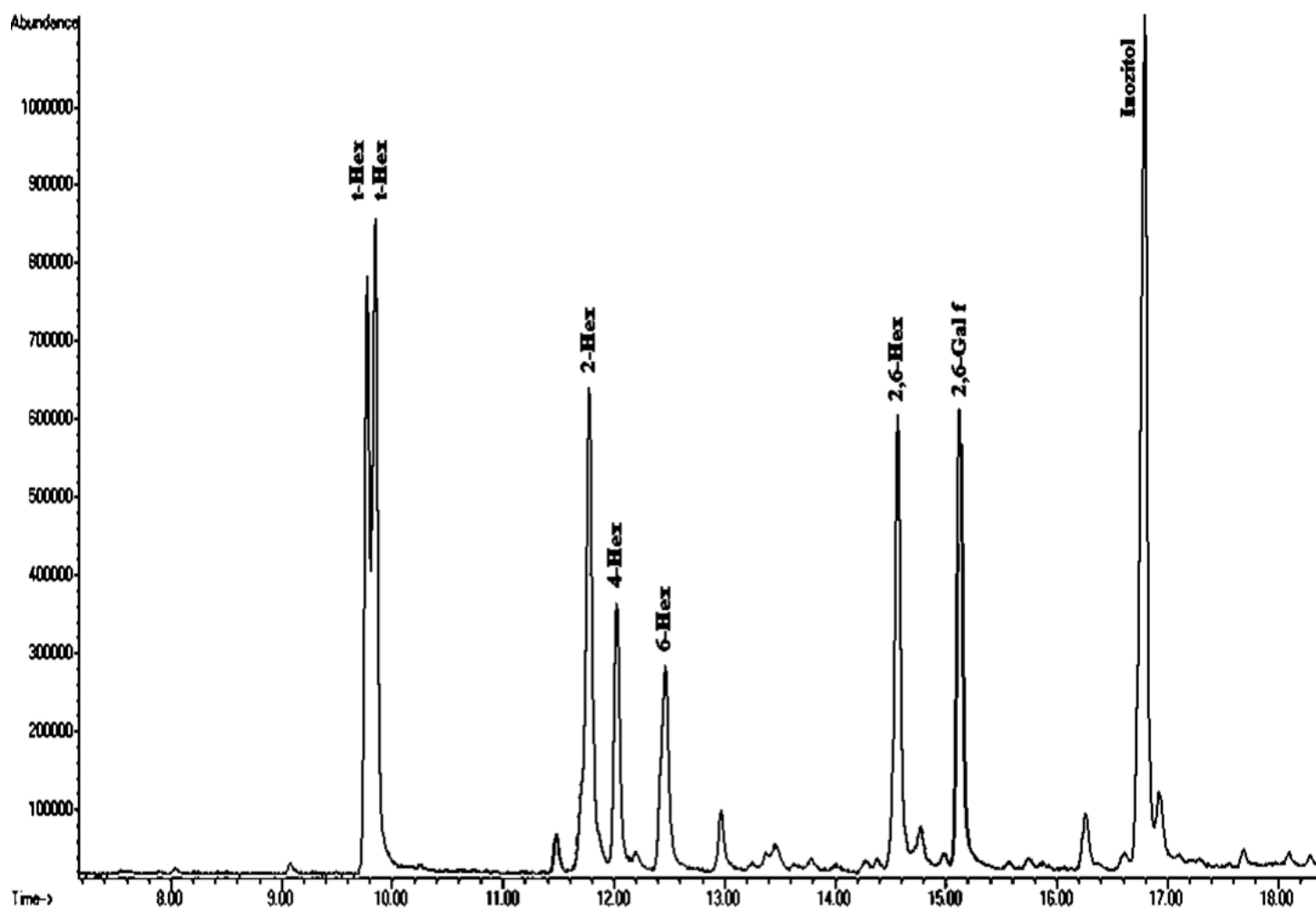
4.10.2. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 2



Slika 15. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 2

Egzopolisaharid prisutan u uzorku Lactobac 2 uglavnom je sastavljen od nereducirajuće terminalne heksoze (t-Hex), 2-vezane heksoze (2-Hex), 4-vezane heksoze (4-Hex) te jedne točke grananja koja uključuje 2,6-vezanu heksozu (2,6-Hex) (slika 15).

4.10.3. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 3



Slika 16. GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 3

GLC-MS kromatogram uzorka Lactobac 3 (slika 16) ukazuje na prisutnost egzopolisaharida koji je uglavnom sastavljen od dvije različite ne-reducirajuće terminalne heksoze (t-Hex), 2-vezane heksoze (2-Hex), 4-vezane heksoze (4-Hex), 6-vezane heksoze (6-Hex), jedne točke grananja koja uključuje 2,6-vezanu heksoze (2,6 Hex) te drugu točku grananja sa 2,6-vezanom galaktozom u furanoznoj konfiguraciji (2,6-Galf).

4.10.4. Relativni molarni omjeri šećera u uzorcima Lactobac 1, Lactobac 2, Lactobac 3

Relativni molarni omjer među šećerima izračunat je korištenjem podataka dobivenih plinskom kromatografijom svakog pojedinog uzorka djelomično metiliranih alditol acetata. Rezultati su prikazani u tablicama 5-7.

Tablica 5. Izvješće GC-a i relativni molarni omjer za uzorak Lactobac 1

šećer	RV	RRV	Površina pika	ERC faktor	Korekcija površine	RMO
t-Hex₁	11,31	0,60	42533	0,7	60761	0,07
t-Hex₂	11,39	0,61	9411	0,7	13444	0,02
4-Hex	13,74	0,73	638933	0,74	863423	1,00
3,4-Hex	15,13	0,81	152778	0,79	193390	0,22
4,6-Hex	16,17	0,86	97070	0,8	121338	0,14
Ino	18,71	1,00	228325	/	/	/

RV- Retencijsko Vrijeme; RRT- Relativno Retencijsko Vrijeme; ERC faktor-Effective Carbon Response faktor; RMR- Relativni Molarni Omjer

Tablica 6. Izvješće GC-a i relativni molarni omjer za uzorak Lactobac 2

šećer	RV	RRV	Površina pika	ERC faktor	Korekcija površine	RMO
t-Hex₁	11,32	0,61	15178	0,7	21682	0,12
t-Hex₂	11,40	0,61	131614	0,7	188020	1,00
2-Hex	13,44	0,72	88235	0,74	119237	0,63
4-Hex	13,70	0,73	116915	0,74	157994	0,84
2,6-Hex	16,36	0,88	82404	0,8	103004	0,55
Ino	18,67	1,00	214863	/	/	/

RV- Retencijsko Vrijeme; RRT- Relativno Retencijsko Vrijeme; ERC faktor-Effective Carbon Response faktor; RMR- Relativni Molarni Omjer

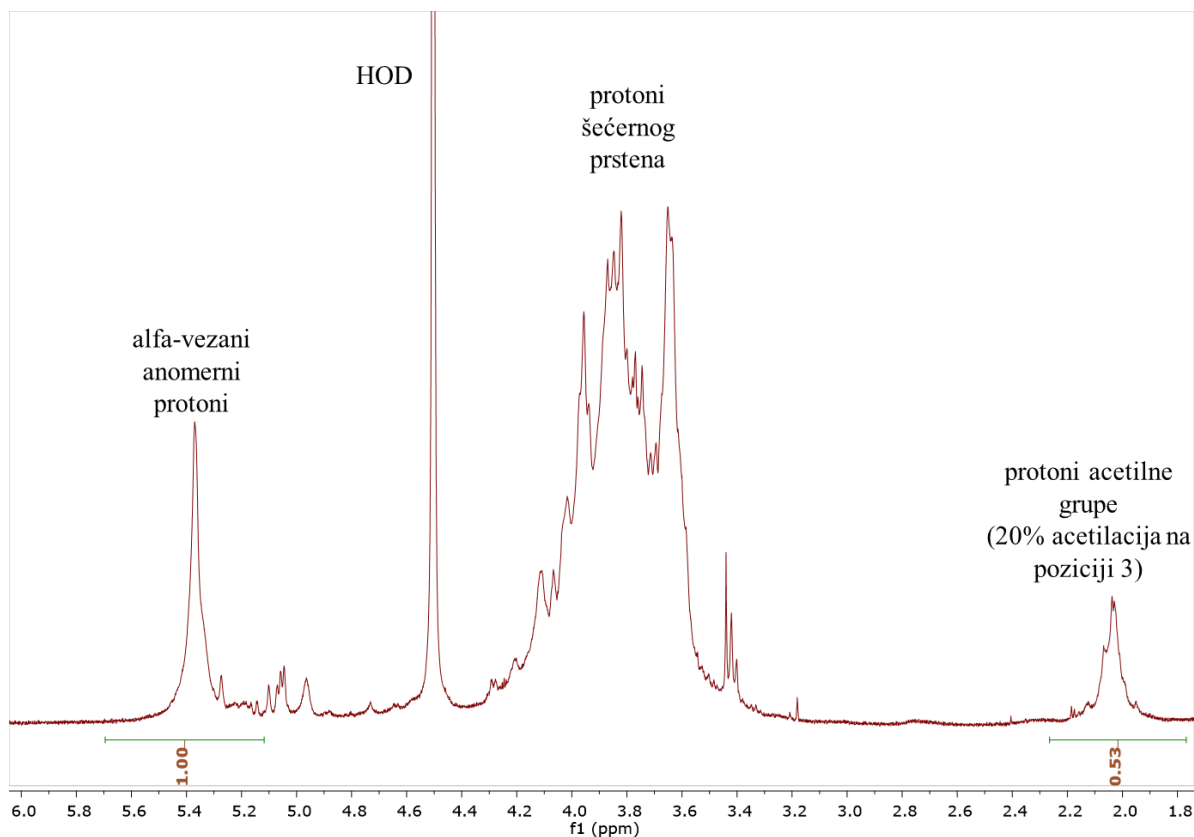
Tablica 7. Izvješće GC-a i relativni molarni omjer za uzorak Lactobac 3

šećer	RV	RRV	Površina pika	ERC faktor	Korekcija površine	RMO
t-Hex₁	11,33	0,61	219984	0,7	314263	1,00
t-Hex₂	11,41	0,61	199591	0,7	285130	0,91
2-Hex	13,44	0,72	185240	0,74	250324	0,80
4-Hex	13,70	0,73	101757	0,74	137510	0,44
6-Hex	14,17	0,76	115294	0,75	153725	0,49
2,6-Hex	16,37	0,87	199038	0,8	248798	0,79
2,6-Galf	16,95	0,91	183564	0,8	229455	0,73
Ino	18,67	1,00	397147	/	/	/

RV- Retencijsko Vrijeme; RRT- Relativno Retencijsko Vrijeme; ERC faktor-Effective Carbon Response faktor; RMR- Relativni Molarni Omjer

4.11. 2D NMR UZORKA Lactobac 1

4.11.1. ^1H NMR



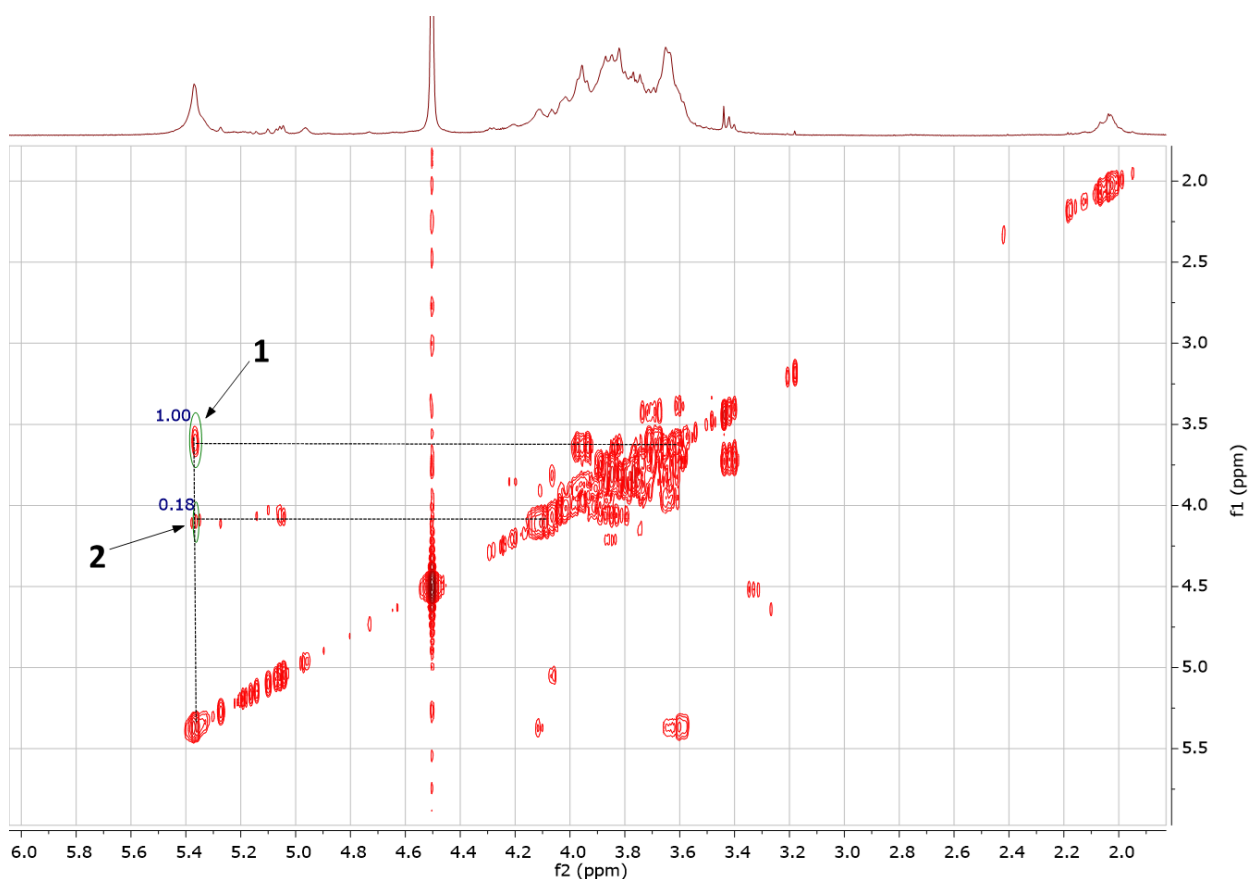
Slika 17. ^1H NMR spektar uzorka Lactobac 1

Analizom ^1H NMR spektra uzorka Lactobac 1 (slika 17) zaključeno je da glavni pik na 5,36 ppm pripada α -vezanim anomernim protonima, a da pikovi manjeg intenziteta od 4,9 do 5,3 ppm pripadaju kontaminacijama koje potječu iz druga dva uzorka. Ta je pretpostavka potvrđena usporedbom ^1H NMR spektra uzorka Lactobac 1 a ^1H NMR spektrima uzoraka Lactobac 2 i Lactobac 3 gdje pikovi malog intenziteta na 4,9 do 5,3 ppm uzorka Lactobac 1 imaju jednak kemijski pomak kao i signali jačeg intenziteta u uzorcima Lactobac 2 i/ili Lactobac 3 (slika 11).

Rezonancija na otprilike 2,0 ppm ukazuje na prisutnost acetilnog supstituenta, budući da je ta grupa bila prisutna i prije HPSEC razdvajanja (slika 5). Ako je ovaj signal acetilna grupa, omjer između površina pikova na 5,36 ppm i 2,0 ppm (koja je podijeljena s 3) je približno 1: 0,2, što znači da 20% anomernih protona pripada protonima acetilne grupe i da je 20% šećera u uzorku Lactobac 1 acetilirano.

4.11.2. COSY 2D

COSY spektar daje informaciju o povezanosti susjednih protona. Stoga, krenuvši od H1 ppm pozicije moguće je odrediti H2 ppm poziciju te jednako tako nastaviti za ostale protone u prstenu. Ipak, zbog intenzivnog preklapanja regije protona šećernog prstena u dobivenom spektru ovog uzorka, analiza je limitirana na detekciju isključivo H1-H2 pozicija.



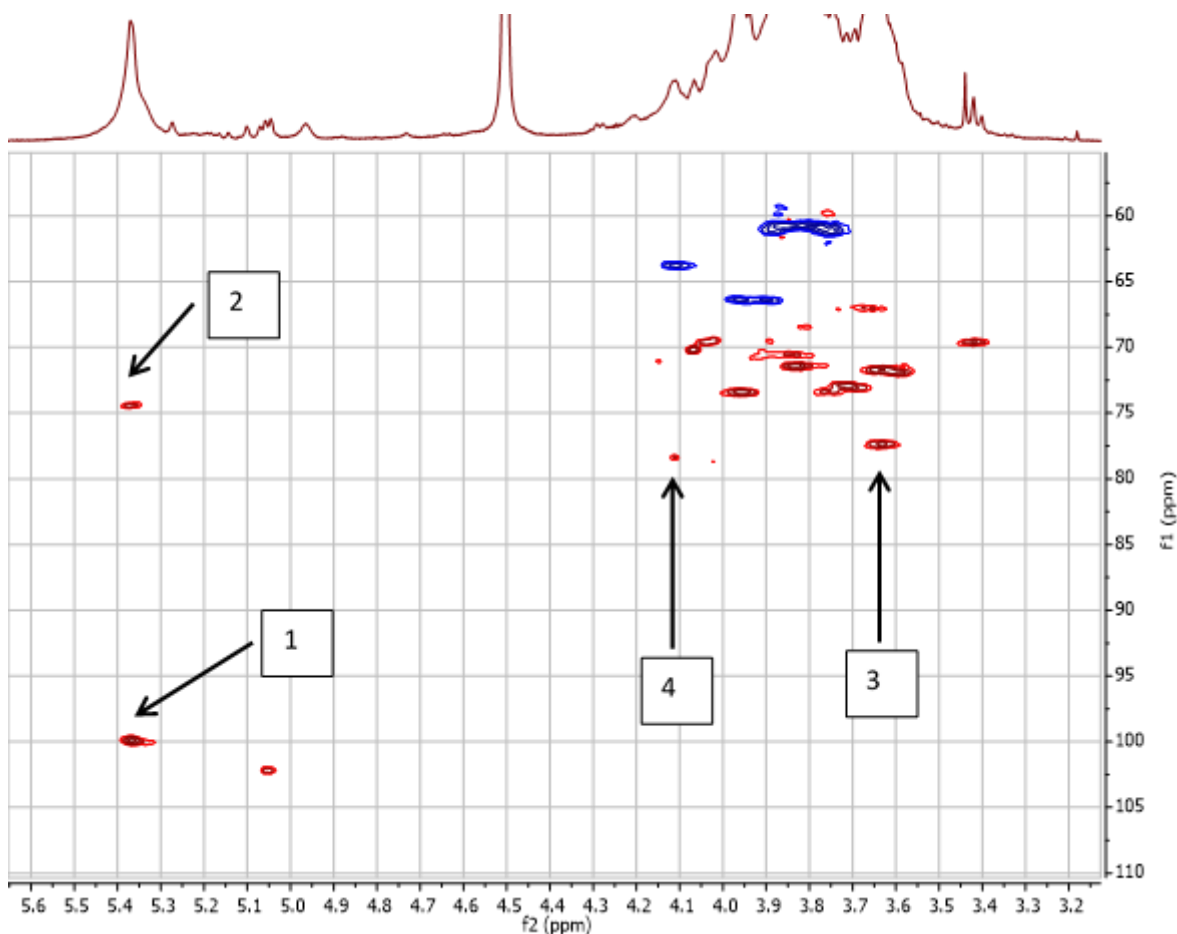
Slika 18. COSY 2D spektar uzorka Lactobac 1

U COSY 2D spektru (slika 18) prisutna su dva pika na 5,36 ppm; jedan od njih (1) nastao je kao posljedica interakcije anomernog protona s protonom u poziciji 2 (3,60 ppm), kako je ranije objašnjeno. Drugi, manje intenzivan pik (2), vrlo je interesantan jer postoji mogućnost da predstavlja ne-anomerni proton čiji je signal pomaknut iz regije protona u prstena u regiju anomernih protona zbog prisutnosti acetilnog supstituenta na njegovom atomu ugljika. Ta se pretpostavka mora dodatno potvrditi analizom HSQC spektra.

Integracijom površina dvaju pikova na 5,36 ppm izračunat je njihov omjer koji iznosi 1: 0,2, što je u korelaciji sa omjerom dobivenim integracijom signala acetilne grupe u 1D protonskom spektru (slika 17).

4.11.3. HSQC 2D

HSQC spektar koristi se za analizu interakcija između protona i ugljika s kojima su kovalentno vezani. Dobiveni rezultati važni su jer C-H interakcije otkrivaju koji su protoni uključeni u glikozidne veze te razrješuju problem superimpozicije tipične za 1D protonski spektar.



Slika 19. HSQC 2D spektar uzorka Lactobac 1

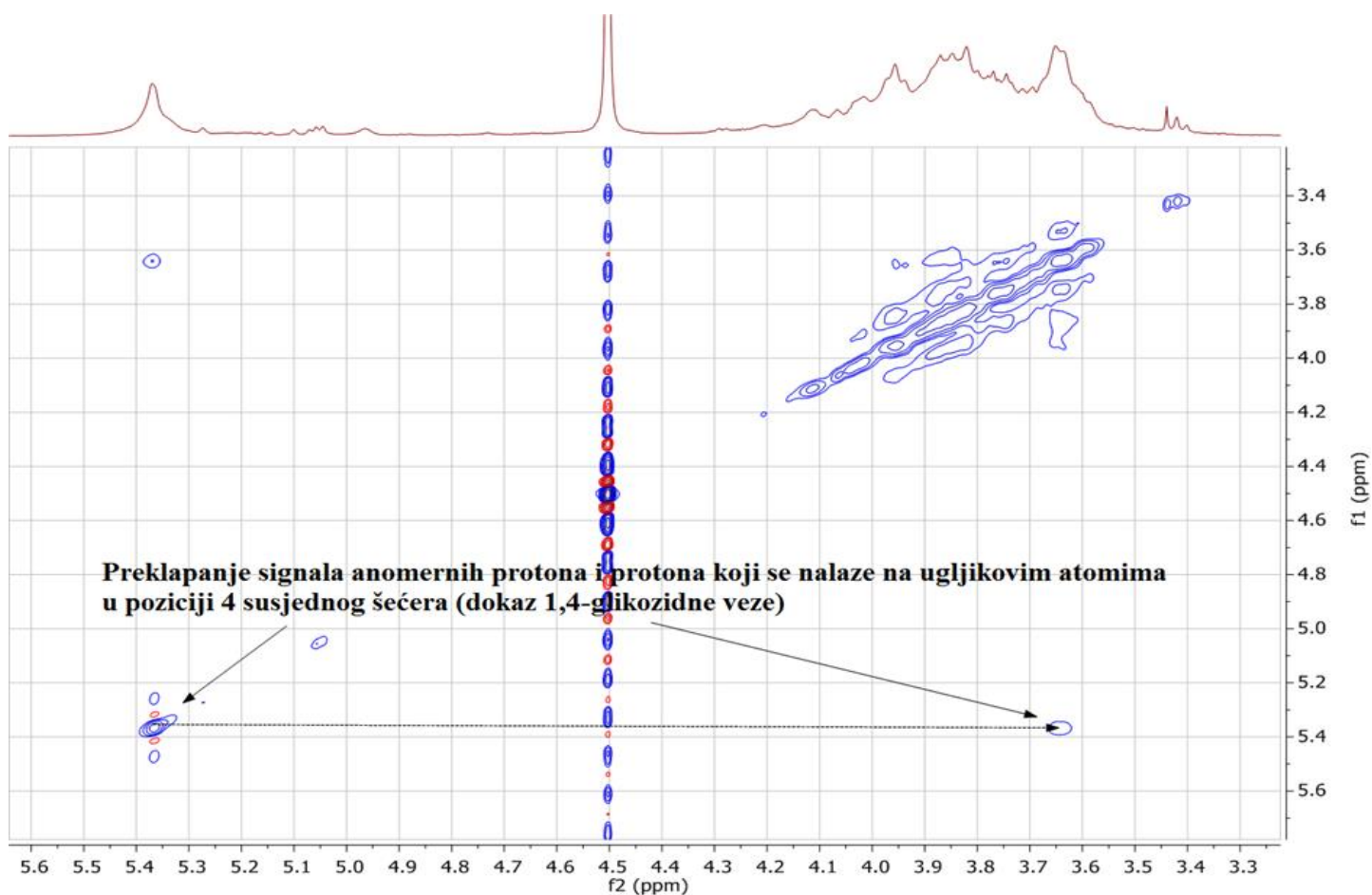
HSQC pikovi značajni za analizu označen su brojevima od 1 do 4 kako je prikazano na slici 19. Pik 1 predstavlja anomerni proton polisaharida te pokazuje tipično visoku ppm poziciju na vertikalnoj ugljikovoj ljestvici (100 ppm). Očekivano, rezonancija na 5,36 ppm na horizontalnoj ljestvici posljedica je superimpozicije dvaju pikova što je jasno vidljivo na vertikalnoj skali. Naime, pik 2 nije signal anomernog protona budući da je njegov položaj na vertikalnoj skali prilično nizak (74 ppm). Kako je ranije spomenuto u analizi COSY 2D spektra, pik 2 predstavlja signal ne-anomernog protona koji je zbog acetilacije pomaknut na 5,36 ppm,

a što je dodatno potvrđeno analizom dobivenog HSQC 2D spektra. Pik 3 (77-3,65 ppm) posljedica je interakcije C-H para uključenog u glikozidnu vezu budući da je njihov položaj u vertikalnoj skali uobičajeno između 76 i 80 ppm i, uzevši u obzir rezultate analize veza, može biti pripisan H4-C4 paru. Ukoliko se pik 4 (78-4,1 ppm) razmatri na isti način može se zaključiti da i on mora biti signal C-H para uključenog u glikozidnu vezu. Uzevši u obzir ranije određeni postotak acetilacije i intenzitete pikova 3 i 4 na HSQC 2D kromatogramu, moguće je zaključiti da pik 3 pripada ne-acetiliranom monosaharidu, a pik 4 acetiliranom monosaharidu. Protoni na poziciji 6 pojavljuju se u HSQC spektru kao plave linije na položaju 3,83 i 3,92 ppm te su povezane s ugljikima na 61 ppm (najniža ppm pozicija na vertikalnoj skali).

Dobiveni HSQC spektar sadrži mnoge druge korelacijske pikove kojima je vrlo teško odrediti značenje, ali važno je uzeti u obzir da je dobiveni spektar nastao superimpozicijom dvaju spektara: jednog kojeg su proizveli ne-acetilirani monosaharidi i drugi nastao zbog acetiliranih monosaharida. Nadalje, iako u manjim količinama, određeni pikovi posljedica su kontaminacija koje potječu iz uzoraka Lactobac 2 i Lactobac 3.

4.11.4. NOESY 2D

NOESY spektar sljedeća je mogućnost NMR analiza, a koristan je za utvrđivanje slijeda monosaharida u polimernom lancu. Dapače, NOESY pikovi nastaju zbog parova protona koji nisu direktno povezani kemijskim vezama nego su u interakciji u prostoru uz uvjet da se nalaze na vrlo maloj udaljenosti jedan od drugoga. Na ovaj način, protoni koji pripadaju susjednim monosaharidima mogu biti detektirani i na taj način dati više informacija o redoslijedu monosaharida u polimeru.



Slika 20. NOESY spektar uzorka Lactobac 1

NOESY spektar (slika 20) pokazuje da je anomerni proton na 5,36 ppm u interakciji s protonom na 3,64 ppm susjednog šećera koji, kako je prikazano u HSQC spektru (slika 19), je proton H4 uključen u glikozidnu vezu.

4.11.5. KORIŠTENJE CASPER BAZE PODATAKA ZA SIMULACIJU NMR SPEKTRA

Uzevši u obzir da su NMR spektri vrlo složeni i da ih je vrlo teško protumačiti u cijelosti, korisno je koristiti se mrežnom bazom podataka CASPER (Lundborg i Wildmalm, 2011). Simulacija NMR spektra temelji se na svim postojećim i dostupnim literaturnim podacima o NMR spektrima oligo i poli-saharida. Stoga, simulacija je vrlo točna za uobičajene šećere, ali manje precizna za šećere koji sadrže rijetke šećerne ili ne-ugljikohidratne supstituente.

Kako je prethodnim analizama koje su uključivale 2D NMR i analizu veza utvrđeno da je uzorak Lactobac 1 uglavnom sastavljen od jednog polisaharida te da su ponavljajuće monosahardine jedinice povezane α -(1,4)-vezama, korištenje CASPERA smatra se pouzdanim.

U CASPER program unesene su navedene informacije o polisaharidu prisutnom u uzorku te je simulacija NMR spektra testirana za nekoliko heksoza za koje je prema rezultatima analize sastava utvrđeno da se nalaze u uzorku Lactobac purif TCA (glukoza, manoza i galaktoza). Uz to, svaka je NMR simulacija provedena i za šećera acetilirane na različitim pozicijama u prstenu.

Eksperimentalnim rezultatima najbolje je odgovarala NMR simulacija glukoze acetilirane na C3 položaju, a dobiveni podaci simuliranoog NMR-a prikazani su u tablici 5 (ne acetilirana glukoza) i tablici 6 (acetilirana glukoza).

Tablica 5. Izračunati ^{13}C and ^1H kemijski pomaci za (1 \rightarrow 4) α -D-Glu

\rightarrow 4) α -D-Glu(1 \rightarrow	1	2	3	4	5	6a	6b
^{13}C	100,45	72,51	74,14	78,20	72,20	61,51	61,51
^1H	5,36	3,64	3,95	3,64	3,84	3,81	3,89

Tablica 6. Izračunati ^{13}C and ^1H kemijski pomaci za (1 \rightarrow 4) α -D-Glu3Ac

\rightarrow 4) α -D-Glu3Ac(1 \rightarrow	1	2	3	4	5	6a	6b
^{13}C	100,26	72,68	76,44	76,12	71,88	61,04	61,04
^1H	5,41	3,83	5,41	3,83	3,92	3,81	3,89

Poklapanje izračunatih kemijskih pomaka pomoću CASPER simulacije i eksperimentalnih podataka je zadovoljavajuće. Stoga, može se zaključiti da uzorak Lactobac 1 uglavnom sadrži α -glukan koji se sastoji od 1,4-vezane α -D-glukoze, gdje je 20% šećera acetilirano na C-3 položaju.

Uzorci Lactobac 2 i Lactobac 3 moraju biti podvrgnuti dodatnim koracima pročišćavanja te NMR eksperimentima kako bi se mogla odrediti primarna struktura polisaharida prisutnih u uzorku.

5. ZAKLJUČCI

1. Usporedbom dobivenih prinosa s istraživanjem koje su proveli Bukola i sur. (2008) može se zaključiti da je *Lactobacillus fermentum* D12 aktivni proizvođač EPOL-a, budući da su svi prinosi viši od 40 mg L⁻¹.
2. Bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus fermentum* D12 proizvodi tri tipa egzopolisaharida
3. Egzopolisaharid u uzorku Lactobac 2 sastavljen je od manoze, galaktoze i glukoze u omjeru 6,4: 1,0: 1,6; dok je egzopolisaharid u uzorku Lactobac 3 sastavljen od manoze, galaktoze i glukoze u omjeru 1,8: 1,0: 9,0.
4. Egzopolisaharid u uzorku Lactobac 1 uglavnom je sastavljen od 4-vezane heksoze, uz prisutnost malih količina ne-reducirajuće terminalne heksoze, 3,4-vezane heksoze i 4,6-vezane heksoze.
5. Egzopolisaharid prisutan u uzorku Lactobac 2 uglavnom je sastavljen od ne-reducirajuće terminalne heksoze, 2-vezane heksoze, 4-vezane heksoze te jedne točke grananja koja uključuje 2,6-vezanu heksozu.
6. egzopolisaharid prisutan u uzorku Lactobac 3 uglavnom je sastavljen od dvije različite ne-reducirajuće terminalne heksoze, 2-vezane heksoze, 4-vezane heksoze, 6-vezane heksoze, jedne točke grananja koja uključuje 2,6-vezanu heksoze te druge točke grananja sa 2,6-vezanom galaktozom u furanoznoj konfiguraciji.
7. Uzorak Lactobac 1 uglavnom sadrži α -glukan koji se sastoji od 1,4-vezane α -D-glukoze, gdje je 20% šećera acetilirano na C-3 položaju.

6. LITERATURA

Ahmed, N. H., El Soda, M., Hassan, A. N., Frank, J. (2005) Improving the textural properties of an acid-coagulated (Karish) cheese using exopolysaccharide producing cultures. (Lebensmittel- Wissenschaft und- Technologie). *Food. Sci. Technol.* **38**, 843–847.

Albersheim, P., Nevins, D.J., English, P.D., Karr, A. (1967) A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas–liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* **5**, 340–345.

Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P. (2011) New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides *Biotechnol. Adv.* **29**, 54-66.

Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., Ielpi, L. (1998) Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 145-152.

Bello, F. D., Walter, J., Hertel, C., Hammes, W. P. (2001) *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 232-237.

Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2002) Bacterial cellulose. U: Biopolymers, 2. izdanje. (Steinbüchel, A., ured.) Wiley VCH, Weinheim, str. 37–90.

Bukola, C., Adebayo-tayo, B. C., Onilude, A. A. (2008) Screening of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Some Nigerian Fermented Foods for EPS Production. *World Appl. Sci. J.* **4**, 741-747.

Carpita, N. C., Shea, E. M. (1989) Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MC) of partially methylated alditol acetates. U: Analysis of Carbohydrates by GLC and MS,(Biermann, C. J., McGinnis, G. D. ured.), CRC Press, Inc., Florida, str. 157-216.

Cerning, J. (1995) Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, **75**, 463-472.

Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **87**, 113-130.

Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirovic, L. (1994) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Apl. Environ Microbiol.* **60**, 3914-3919.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. (1992) Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy. Sci.* **75**, 692–699.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J. P. (2003) Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing on cheeses and others dairy products. *Lait* **83**, 269–306.

Coghlan, A. (1996) Slime city. *New. Sci.* **2045**, 32–36.

Cosa, S., Mabinya, L. V., Olaniran, O. A., Okoh, O. O., Bernard, K. (2011) Bioflocculant Production by *Virgibacillus* sp. Rob Isolated from the Bottom Sediment of Algoa Bay in the Eastern Cape, South Africa. *Molecules* **16**, 2431-2442.

Dabour, N., LaPointe, G. (2005) Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7414-7425.

De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R, Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., Whitman, W. B. (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.3, 2. izd. Springer, New York.

de Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S., Degeest, B. (1998) Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 1059-1068.

de Vuyst, L., Degeest, B. (1999a) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 153–177.

de Vuyst, L., Degeest, B. (1999b) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Technological bottlenecks and practical solutions. *Macromol. Symp.* **140**, 31–41.

de Vuyst, L., de Vin, F., Vaningelgem, F., Degees, B. (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**, 687-707.

Duboc, P., Mollet, B. (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* **11**, 759–768.

Dudman, W. E., Franze'n, L-E, Darvill, J. E., McNeil, M., Darvill, A.G., Albersheim, P. (1983) The structure of the acidic polysaccharide secreted by *Rhizobium phaseoli* strain 127 K36. *Carbohydr. Res.* **117**, 141 – 56.

Gamar, L., Blondeau, K., Simonet, J. M. (1997) Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 281-287.

Ganzle, M., Michael, G., Schwab, C. (2005) Exopolysaccharide production by intestinal lactobacilli. U: Probiotics & Prebiotics: Scientific Aspects, (Tannock, G. W, ured.), Academic Press, Norfolk: Caister, str. 83-96.

Hallemeersch, I., De Baet, S., Vandamme, E. J. (2002) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria. U: Biopolymers, (Steinbüchel, A., ured.) Wiley VCH, Weinheim, str. 407–429.

Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B., Stone, B. A. (1984) An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **127**, 59-73.

Harutoshi, T. (2013) Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications. U: Lactic Acid Bacteria (Marcelino Kongo, J., ured.), IntechOpen, London, str. 515-538.

- Jolly, L., Vincent, S. J. F., Duboc, P., Neeser, J. R. (2002) Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 367-374.
- Kitazawa, H., Ishii, Y., Uemura, J., Kawai, Y., Saito, T., Kaneko, T., Itoh, T. (2000) Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*. *Food Microbiol.* **17**, 109–118.
- Korakli, M., Gänzle, M., R. F. (2002) Metabolism by *bifidobacteria* and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *LactoBacillus sanfranciscensis*. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 958-965.
- Korakli, M., Pavlovic, M., Ganzle, M. G., Vogel, R. F. (2003) Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2073-2079.
- Kralj, S., van Geel-Schutten, G. H, van der Maarel, M. H. E. C, Dijkhuizen, L. (2004) Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. *Microbiol.* **150**, 2099-2112.
- Laws, A., Gu, Y., Marshall, V. (2001) Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* **19**, 597–625.
- Lebeer, S., Claes, I. J. J., Verhoeven, T. L. A., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C. J. (2010) Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG form a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microb. Biotechnol.* **8**, 1-7.
- Linker, A., Jones, R. S. (1966) A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from pseudomonads. *J. Biol. Chem.* **241**, 3845–3851.
- Lundborg, M., Widmalm, G. (2011) Structure Analysis of Glycans by NMR Chemical Shift Prediction. *Anal. Chem.* **83**, 1514-1517.

Mabinya, V. L., Cosa, S., Nwodo, U. U., Okoh, A. I. (2012) Studies on bioflocculant production by *Arthrobacter* sp Raats a freshwater bacteria isolated from Tyume River South Africa. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 1054-1065.

Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J., Champagne, C. P. (2002) Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595 M in whey permeate. *Int. Dairy. J.* **12**, 419–26.

Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., Kitamura, S. (2004) Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5533-5538.

Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Fernandez, M., Kowalczyk, M., Alvarez-Martin, P., Bardowski, J. (2010) Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. U: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria (Mozzi, F., Raya, R. R, Vignolo, G. M, ured.) Blackwell Publishing, Iowa, str. 3-33.

Neubauer, H., Bauche, A., Mollet, B. (2003) Molecular characterization and expression analysis of the dextransucrase DsrD of *Leuconostoc mesenteroides* Lcc4 in homologous and heterologous *Lactococcus lactis* cultures. *Microbiology* **149**, 973-982.

Oda, M., Hasegawa, H., Komatsu, S., Kambe, M., Tsuchiya, F. (1983) Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* spp. *Agric Biol Chem* **47**, 1623-1625.

Oliver, A. E., Leprince, O., Wolkers, W. F., Hinch, D. K., Heyer, A. G. (2001) Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiology* **43**, 151-167.

Patell, A., Prajapati, J. B. (2013) Food and Health Applications of Exopolysaccharides produced by Lactic acid Bacteria. *Adv. Dairy. Res.* **1**, 1-7.

Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M. J., Cerning, J., Desmazeaud, M. (2000) Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3427–31.

Phillips, L. R., Fraser, B. A. (1981) Methylation of carbohydrates with dimethyl potassium in dimethyl sulfoxide. *Carbohydr. Res.* **90**, 149–152.

Pindar, D. F., Bucke, C. (1975) The biosynthesis of alginic acid by *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* **152**, 617–622.

Rastall, R. (2003) Enhancing the functionality of prebiotics and probiotics. U: Functional Dairy Products, (Mattila- Sandholm, T., Saarela, M., ured.), CRC Press LLC, Florida, str. 301-315.

Rehm, B. H. A. (2010) Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 578–592.

Schleifer, K. H., Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407–477.

Stack, H. M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2010) Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 500-507.

Suresh Kumar, A., Mody, K., Jha, B. (2007) Bacterial exopolysaccharides- a perception. *J. Basic. Microbiol.* **47**, 103–17.

Sutherland, I. W. (1998) Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* **16**, 41-46.

Sutherland, I. W. (2002) A sticky business. Microbial exopolysaccharides: current products and future trends. *Microbiol. Today* **29**, 70–1.

Sutherland, I. W. (2007) Bacterial exopolysaccharides. U: Comprehensive Glycoscience, 2. izdanje (Kamerling, J.P., ured.) Elsevier, Oxford, str. 521–57.

Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M. C. (2003) Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res. Microbiol.* **154**, 705- 712.

- Toba, T., Kotani, T., Adachi, S. (1991) Capsular polysaccharide of slime-forming *Lactococcus lactis* subs. *Cremoris* LAPT 3001 isolated from Swedish fermented milk “langfil”. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 167-172.
- Tok, E., Aslim, B. (2010) Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiol. Immunol.* **54**, 257 – 264.
- Trevors, J. T., Barkay, T., Bourquin, W. (1987) Gene transfer among bacteria in soils and aquatic environments: a review. *Can. J. Microbiol* **33**, 191–8.
- Tsuda, H., Hara, K., Miyamoto, T. (2008) Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *J. Dairy. Sci.* **91**, 2960-2966.
- Tsuda, H., Miyamoto, T. (2010) Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Sci. Technol. Res.* **16**, 87-92.
- Van Calsteren, M. R., Pau-Roblot, C., Bégin, A., Roy, D. (2002) Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595 M and R. *Biochem. J.* **1**, 7-17.
- Wacher-Rodarte, C., Galvan, M. V., Farres, A., Gallardo, F., Marshall, V. M. E. (1993) Yogurt production from reconstituted skim milk powders using different polymer and non-polymer forming starter cultures. *J. Dairy. Res.* **60**, 247-254.
- Wada, S., Iseki, K., Hama, T. (2013) Carbohydrate analysis by methanolysis method and application to compositional analysis of transparent exopolymer particles. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **4**, 11-17.
- Xu, Q., Yajima, T., Li, W., Saito, K., Ohshima, Y. (2006) Levan (beta- 2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. *Clin. Exp. Allergy.* **36**, 94-101.

Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S., Yamaguchi, H. (1999) *In vitro* digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J. Nutr. Biochem.* **10**, 13-18.

York, W. S. (Year Unknown) The CCRC Spectral Database for PMAA's, <<https://www.ccrcc.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html#na>>. Accessed 24 April 2018.

Yun, J.W. (1996) Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enz. Microb. Technol.* **19**, 107-117.

Zisu, B., Shah, N. P. (2007) Texture characteristics and pizza bake properties of low-fat mozzarella cheese as influenced by pre-acidification with citric acid and use of encapsulated and ropy exopolysaccharide producing cultures. *Int. Dairy. J.* **17**, 985–97.

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Tina Vidulin

A handwritten signature in purple ink that reads "Tina Vidulin". The signature is written in a cursive style with a large initial 'T'.