

Taksonomska identifikacija i karakterizacija specifičnih svojstava odabranih bakterijskih sojeva producenata egzopolisaharida izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka

Makovec, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:038251>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Ena Makovec

1010/MB

TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA
SPECIFIČNIH SVOJSTAVA ODABRANIH BAKTERIJSKIH
SOJEVA PRODUCENATA EGZOPOLISAHARIDA
IZOLIRANIH IZ MIKROBIOTE MAJČINOŠ MLIJEKA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kojeg je pročelnica prof. dr.sc. Jagoda Šušković, pod mentorstvom izv. prof. dr.sc. Jasne Novak te uz pomoć asistentice Katarine Butorac mag. ing., doc. dr.sc. Andreje Leboš Pavunc i prof. dr.sc. Blaženke Kos, a u okviru Sveučilišne potpore znanstvenim istraživanjima „Probiotička aktivnost sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz majčinog mlijeka“ 000070002439 (voditeljica: Prof. dr. sc. Jagoda Šušković).

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Jasni Novak na stručnom vodstvu tijekom izrade i pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se mag. ing. Katarini Butorac i doc. dr.sc. Andreji Leboš Pavunc na korisnim savjetima i nesebičnoj pomoći prilikom pripreme i izrade ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji i Dariju na ljubavi i podršci 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

TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA I KARAKTERIZACIJA SPECIFIČNIH SVOJSTAVA ODABRANIH BAKTERIJSKIH SOJEVA PRODUCENATA EGZOPOLISAHARIDA IZOLIRANIH IZ MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

Ena Makovec, 1010/MB

Sažetak: Egzopolisaharidi (EPOL) bakterija mliječne kiseline (BMK) imaju značajnu primjenu u prehrambenoj industriji, no u novije vrijeme istražuje se i njihova uloga kao funkcionalnih biomolekula. Stoga je cilj ovog rada bio detektirati sojeve, potencijalne producente EPOL, kod bakterijskih izolata mikrobiote majčinog mlijeka, koja sadrži visoki udio mikrobne populacije BMK i bifidobakterija. Mogućnost biosinteze EPOL kod 60 izolata BMK mikrobiote majčinog mlijeka ispitana je *in vitro*, detekcijom tipičnog „ropy“ fenotipa. Tri odabrana soja MC1, MC9 i AF7, potencijalna producenta EPOL, koja su pokazala prepoznatljiv, „ropy“ fenotip za biosintezu EPOL, taksonomski su identificirani sekvencioniranjem 16S rRNA gena, te je ustanovljeno da se radi o *Lactobacillus fermentum* MC1 i *Enterococcus faecium* MC9, dok soj AF7 nije identificiran. S ciljem daljnje karakterizacije odabranih sojeva BMK, ispitana je osjetljivost sojeva na antibiotike, te njihov spektar antimikrobnog djelovanja, što su specifična svojstva značajna za definiranje funkcionalnosti odnosno iskazivanje poželjnih učinaka na zdravlje domaćina. Metodom difuzije u agar s filter diskovima i E-testom ustanovljeno je da *Lb. fermentum* MC1 i *Ec. faecium* MC9 pokazuju fenotipski rezistenciju na antibiotik vankomicin, što je tipična karakteristika bakterija iz roda *Lactobacillus*. Kako je izolat AF7 pokazao višestruku rezistenciju na antibiotike gentamicin, eritromicin, neomicin i streptomycin, isključen je iz daljnjih istraživanja. Na temelju vrijednosti efektivnih inhibicijskih omjera (EIR) ustanovljeno je da se odabrani sojevi odlikuju različitim spektrom antimikrobnog djelovanja, koji ne iskazuje značajno inhibicijsko djelovanje prema srodnim bakterijama iz roda *Lactobacillus* i *Enterococcus*, a čiji su predstavnici također dio mikrobne populacije majčinog mlijeka. Daljnja istraživanja će se provesti s ciljem karakterizacije funkcionalnosti odabranih bakterija.

Ključne riječi: egzopolisaharidi, funkcionalnost, mikrobiota majčinog mlijeka, 16S rRNA sekvencioniranje

Rad sadrži: 44 stranice, 9 slika, 11 tablica, 64 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc, Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Blaženka Kos
2. Izv.prof.dr.sc. Jasna Novak
3. Prof.dr.sc. Jadranka Frece
4. Prof.dr.sc. Ksenija Markov

Datum obrane: 16. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotics, Enzymes, Probiotics and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

TAXONOMIC IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE SPECIFIC PROPERTIES OF POTENTIAL EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCERS ISOLATED FROM THE MICROBIOTA OF MOTHERS' BREAST MILK

Ena Makovec, 1010/MB

Abstract: The exopolysaccharides (EPOL) from lactic acid bacteria (LAB) have significant use in the food industry, but recently, their role as functional biomolecules has been proposed. Therefore, the aim of this work was to detect strains, potent EPOL producers, among breast milk microbiota that is characterized by the high abundance of LAB and bifidobacteria. 60 LAB representatives of breast milk microbiota had been evaluated *in vitro* for potential biosynthesis of EPOL, by the detection of a typical “ropy” phenotype. The three selected strains, MC1, MC9 and AF7, which demonstrated a recognizable “ropy” phenotype for the biosynthesis of EPS, were identified as *Lactobacillus fermentum* MC1 and *Enterococcus faecium* MC9 by 16S rRNA gene sequencing, while AF7 isolate was not identified. In order to further characterize the selected strains of LAB, their antibiotic susceptibility and the spectrum of antimicrobial activity were examined. These specific properties are important for defining strain functionalities i.e. health-promoting effects. According to the results *Lb. fermentum* MC1 and *Ec. faecium* MC9 were found to be phenotypically resistant to vancomycin, which is typical for *Lactobacillus* genus. Since the AF7 isolate showed multiple resistance to gentamicin, erythromycin, neomycin and streptomycin, it was excluded from further research. The value of effective inhibition ratio (EIR) revealed that selected strains are distinct in their spectrum of antimicrobial activity, which appears not to show significant inhibitory effect on related bacteria from the *Lactobacillus* and *Enterococcus* genus, and whose representatives are also part of the microbial population of breast milk. Further research will be carried out to characterize the functionality of the selected bacteria.

Keywords: exopolysaccharides, functionalities, breast milk microbiota, 16S rRNA sequencing

Thesis contains: 44 pages, 9 figures, 11 tables, 64 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: PhD Jasna Novak, Associate professor

Technical support and assistance: PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant professor,
Katarina Butorac, mag. ing. biotechn

Reviewers:

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

Thesis defended: July 16th 2019

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. MIKROBIOTA MAJČINOG MLIJEKA | 2 |
| 2.1.1. Predložena funkcija mikrobiote majčinog mlijeka..... | 3 |
| 2.2. EGZOPOLISAHARIDI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE | 4 |
| 2.2.1. Kemijska struktura egzopolisaharida | 5 |
| 2.3. INDUSTRIJSKA PRIMJENA EGZOPOLISAHARIDA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE | 7 |
| 2.4. MOGUĆI FUNKCIONALNI UČINCI EGZOPOLISAHARIDA | 9 |
| 2.4.1. Uloga egzopolisaharida u imunodgovoru | 9 |
| 2.4.2. Uloga egzopolisaharida u bakterijskoj adheziji..... | 10 |
| 2.4.3. Egzopolisaharidi kao izvor hranjivih tvari | 11 |
| 2.4.4. Anatagonističko djelovanje egzopolisaharida | 12 |
| 2.4.5. Prebiotički učinak | 13 |
| 2.4.6. Adsorpcija kolesterola pomoću egzopolisaharida..... | 14 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 15 |
| 3.1. MATERIJALI | 15 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizmi | 15 |
| 3.1.2. Kemikalije | 15 |
| 3.1.3. Aparatura i pribor | 16 |
| 3.2. METODE RADA | 16 |
| 3.2.1. <i>In vitro</i> odabir sojeva producenata egzopolisaharida | 16 |
| 3.2.2. Taksonomska identifikacija sojeva producenata EPOL-a sekvencioniranjem 16S rRNA..... | 17 |
| 3.2.3. Određivanje osjetljivosti odabranih sojeva na različite antibiotike metodom difuzije u agar s filter-diskovima | 19 |
| 3.2.4. Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika pomoću E-testa..... | 20 |
| 3.2.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara..... | 20 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 22 |
| 4.1. <i>In vitro</i> DETEKCIJA BIOSINTEZE EGZOPOLISAHARIDA KOD BAKTERIJSKIH SOJEVA MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA | 22 |
| 4.2. TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA ODABRANIH IZOLATA MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA | 25 |
| 4.3. KARAKTERIZACIJA SPECIFIČNIH SVOJSTAVA ODABRANIH IZOLATA MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA | 32 |
| 5. ZAKLJUČCI | 36 |
| 6. LITERATURA | 37 |

1. UVOD

Majčino mlijeko je biološka tekućina složenog kemijskog sastava, koja predstavlja optimalnu prehranu dojenčadi i smanjuje rizik od zaraznih bolesti. Majčino mlijeko se smatralo sterilnim, međutim istraživanja su pokazala da je kompleksnog sastava te da sadrži mikrobnu populaciju koja sadrži niz mutualističkih i potencijalnih probiotičkih bakterija koje koloniziraju gastrointestinalni trakt (GIT) novorođenčadi u kojem se uspostavlja prva mikrobiota djeteta. Tako je, kao dio mikrobne populacije majčinog mlijeka, ustanovljena prisutnost bakterija iz rodova *Streptococcus* i *Staphylococcus* koje su među prvim bakterijskim sojevima koji koloniziraju crijeva (Collado i sur., 2009). Bakterije iz roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* su također važan dio mikrobne populacije majčinog mlijeka, što ukazuje na važnu ulogu majčinog mlijeka kao izvora mogućih probiotičkih bakterija (Fernandez i sur., 2013). Mikrobiota majčinog mlijeka ima ulogu u razvoju imunološkog sustava putem interakcija mikrobnih liganada, metabolizma i apsorpcije hranjivih tvari te poboljšanja funkcije intestinalne barijere. Stoga je cilj ovog rada karakterizacija BMK koje su dio mikrobne populacije majčinog mlijeka, a kako je odnedavno prepoznata i uloga EPOL-a BMK iz majčinog mlijeka kao funkcionalnih biomolekula, dodatno je cilj bio odabrati sojeve proizvođače EPOL. EPOL su ugljikohidratni polimeri prisutni na površini bakterijske stanice. Ove makromolekularne strukture služe kao zaštitni sloj s vanjske strane površine bakterijske stanice, koji istovremeno omogućava interakcije bakterijske stanice sa specifičnim mikrookolišom. Spoznaje o genetičkim i biosintetskim putevima EPOL-a u BMK i bifidobakterijama, kao i razvoj molekularno-genetičkih metoda, doprinjele su karakterizaciji uloge EPOL-a u sluznici crijeva domaćina. Utvrđeno je da EPOL ima važnu ulogu u kolonizaciji pojedinih bakterija, proizvođača EPOL, u intestinalnom traktu. Neki autori smatraju da bi pojedini korisni učinci probiotika, koji sintetiziraju EPOL, mogli biti povezani s formiranjem sloja biofilma koji može doprinjeti zaštiti domaćina od nepoželjnih mikroorganizama, odnosno infekcija uzrokovanih patogenima ili njihovim toksinima. Ipak, *in vivo* formiranje biofilma kod probiotičkih bakterija još uvijek nije dokazano. Konačno, EPOL koje sintetiziraju probiotički sojevi ima ulogu prilikom interakcije s intestinalnom mikrobiotom. Smatra se da pojedini EPOL mogu biti izvor ugljikohidrata za komensalne bakterije u crijevima, što može utjecati na poticanje sinteze bakterijskih metabolita koji mogu iskazati pozitivne koristi za domaćina (Castro-Bravo i sur., 2018). Potencijalni proizvođači EPOL, koji su dio mikrobne populacije majčinog mlijeka, taksonomski su identificirani 16S rRNA sekvencioniranjem te su ispitana i okarakterizirana specifična svojstva kao osjetljivost na antibiotike i antimikrobno djelovanje, koja mogu doprinjeti daljnjoj funkcionalnoj karakterizaciji odabranih bakterija te doprinjeti definiranju njihove funkcionalne uloge u specifičnom ekosustavu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROBIOTA MAJČINOG MLIJEKA

Sastav intestinalne mikrobiote dojenčadi razlikuje se od sastava intestinalne mikrobiote odraslih osoba, a odlikuje se vrlo velikom taksonomskom raznolikosti prisutnih mikrobnih sudionika. Razvoj intestinalne mikrobiote u dojenčadi započinje kolonizacijom fakultativnim anaerobima poput *Escherichia coli* i drugih enterobakterija. Kada ti mikroorganizmi iscrpe početne zalihe kisika, što se obično odvija unutar nekoliko dana, u kolonu se stvaraju anaerobni uvjeti, koji doprinose kolonizaciji striktno anaerobnih bakterija koje pripadaju rodovima *Bifidobacterium*, *Clostridium* i *Bacteroides*, a ponekad i *Ruminococcus*. Intestinalna mikrobiota od novorođenčeta do dobi djeteta od 3 godine se mijenja te se povećava mikrobna raznolikost te se smatra da tada sastav intestinalne mikrobiote odgovara sastavu odrasle osobe (Matamoros i sur., 2013). Pri rođenju mikrobiota majke je presudan egzogeni čimbenik koji utječe na razvoj mikrobioma djeteta, zbog kontakata majke i djeteta tijekom poroda i nakon rođenja tijekom dojenja. Utjecaj majke na sastav mikrobioma djeteta je očit tijekom djetetove prve godine života. U dobi djeteta od 1 mjeseca, intestinalna mikrobiota djeteta je funkcionalno i filogenetski vrlo slična majčinoj, što je ustanovljeno analizom sastava mikrobioma "shotgun" sekvenciranjem. Međutim, nakon 11 mjeseci se uočavaju filogenetske razlike, ali povezanost funkcije gena i specifičnog sastava mikrobiote je i dalje vrlo slična između majke i djeteta (Vaishampayan i sur., 2010). Snažna povezanost odnosno uloga majke u oblikovanju sastava mikrobima djeteta utvrđena je qPCR analizom fekalne mikrobiote novorođenčeta tijekom prvih 6 mjeseci života, te je ustanovljena prisutnost bakterija *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* i *Staphylococcus aureus* (Gronlund i sur., 2011). Osim načina poroda, vaginalno ili carskim rezom, za koji se pokazalo da ima bitan utjecaj na prvu kolonizaciju crijeva mikrobioma, i to prvenstveno bifidobakterijama, prilikom oblikovanja intestinalnog mikrobioma dojenčadi važan učinak ima i način hranjenja. Majčino mlijeko osigurava optimalnu prehranu dojenčadi te ima zaštitnu ulogu jer smanjuje rizik pojave raznih infekcija. U mikrobnjnoj populaciji majčinog mlijeka dokazana je prisutnost bakterija iz rodova *Streptococcus* i *Staphylococcus* koje odgovaraju ranim kolonizatorima crijeva (Collado i sur., 2009). Bakterije iz roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, koje mogu biti potencijalni probiotički sojevi, su važan dio mikrobne populacije majčinog mlijeka, te se time ukazuje na važnost majčinog mlijeka kao izvora probiotičkih bakterija (Fernandez i sur., 2013). Mikrobiom novorođenčadi koja doje majčino mlijeko, u usporedbi s novorođenčadi koja se hrani pripravcima dječje hrane, pokazuje značajno veći udio rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, te niži udio *Bacteroides*, *Clostridium coccoides*, *Staphylococcus* i *Enterobacteriaceae* (Harmsen i sur., 2012). Genotipizacijom bakterijskih izolata *Lactobacillus*, *Staphylococcus* i *Bifidobacterium* iz majčinog mlijeka i fekalnih uzoraka dojenčadi

ustanovljena je prisutnost identičnih sojeva, što ukazuje na važnu ulogu majčinog mlijeka kao izvora mikrobne populacije u prvim danima kolonizacije crijeva dojenčadi.

2.1.1. Predložena funkcija mikrobiote majčinog mlijeka

Funkcija mikrobiote u majčinom mlijeku obuhvaća poticanje razvoja učinkovitog imunološkog sustava interakcijom s mikrobnim ligandima, metabolizam i apsorpciju hranjivih tvari te poboljšanu funkciju intestinalne barijere. Novorođenčad nema potpuno razvijen imunološki sustav, što se očituje povećanom populacijom protuupalnih regulacijskih T-stanica u krvi pupkovine. Unutar populacije CD4 pozitivnih T-stanica, postoje T-pomoćničke 2 (Th2) i T-pomoćničke 1 (Th1) stanice. Th1 stanice proizvode interleukin IL2, interferon i faktor nekroze tumora TNF, koji potiču citotoksičnu funkciju T-stanica. Th2 stanice izlučuju IL4, IL5, IL6, IL10 i IL21, koji podržavaju humoralnu imunost. Dojenčad ima veći omjer Th2:Th1 u usporedbi s odraslima, što ukazuje na pojačani odgovor B-stanica i mogući razvoj alergijske osjetljivosti (LaTuga i sur., 2014). Dojenje utječe na sazrijevanje imunološkog sustava dojenčadi, te u usporedbi s novorođenčadi hranjenom pripravcima dječje hrane, imunostav dojenčadi pokazuje povećanu aktivnost Th1 stanica, veći proliferativni odgovor T-stanica na toksoid tetanusa te umjereni broj CD4 što je ustanovljeno protočnom citometrijom. Zbog još nerazvijenog neonatalnog humoralnog odgovora, obrambeni sustav novorođenčadi prilikom infekcije utemeljen je na aktivnosti antitijela prenesenih od majke i citotoksičnog Th1. Poboljšana citotoksična funkcija dojenčadi može se inducirati bakterijskim ligandima prisutnim u majčinom mlijeku. Dakle, mikrobiota majčinog mlijeka može potaknuti sazrijevanje citotoksičnih Th1 stanica i utjecati na zaštitu od infekcije (LaTuga i sur., 2014). Mikrobiota majčinog mlijeka također može biti uključena u poboljšanje zaštite crijevnog barijere. Ispitivanja na životinjama pokazala su da je crijeva kolonizacija kritična za povećanje regulacije epitelnih spojeva, stimulaciju obrane antimikrobnih peptida i ekspresiju ključnih enzima za detoksikaciju kao što je alkalna fosfataza, da bi se ublažila prekomjerna stimulacija bakterijskim lipopolisaharidnim ligandima (Hancock i Scott, 2000).

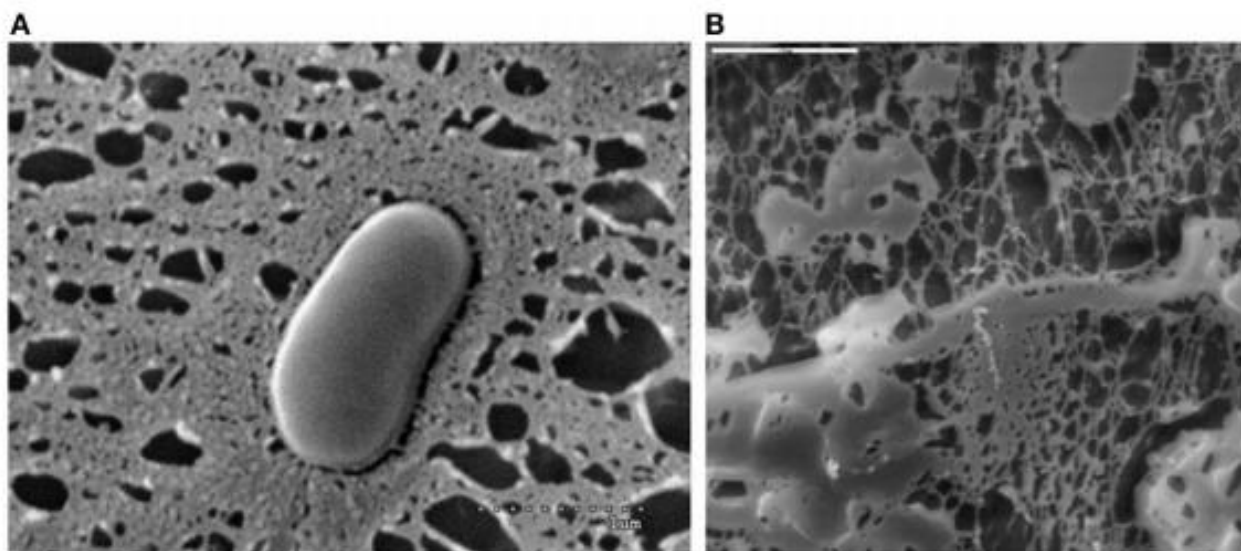
Na modelu eksperimentalnih životinja ustanovljeno je da "heat shock" protein 70 (Hsp70) u majčinom mlijeku utječe na smanjenje prijenosa bakterija iz crijevnog lumena. Moguće je da mikrobiota u majčinom mlijeku može povećati razinu Hsp70 u crijevnom lumenu i doprinijeti funkciji epitelne barijere kod novorođenčadi (Arvans i sur., 2005). Majčino mlijeko je važan izvor oligosaharida, koji imaju jak prebiotički učinak na razvoj mikrobiote novorođenčeta. Oligosaharidi u majčinom mlijeku imaju dinamičan odnos s mikrobiotom u majčinom mlijeku i crijevnom traktu. Strukturno, to su složeni glikani koji se nalaze u majčinom mlijeku. Tradicionalno se smatralo da oligosaharidi služe kao supstrat za rast crijevnih bakterija u distalnom crijevnom traktu. Najnoviji

podaci ukazuju na složeniji odnos u kojem mikrobiota ne konzumira oligosaharide iz majčinog mlijeka, ali oni i dalje mijenjaju rast mikrobiote. Osim toga, oligosaharidi imaju neovisnu imunološku funkciju kod novorođenčadi te mogu djelovati sinergistički s majčinim mlijekom i crijevnom mikrobiotom kako bi ojačali funkciju barijere (LaTuga i sur., 2014).

BMK zbog svojih općeprepoznatih korisnih učinaka imaju značajan potencijal i vjerojatno uloge i u metabolizmu dojenčadi. Primjerice pojedina istraživanja upućuju na važnost glikobioma specifičnih sojeva laktobacila i bifidobakterija, uključujući i vrste izolirane iz majčinog mlijeka, u oblikovanju specifične uravnotežene intestinalne mikrobiote kod dojenčadi (Asakuma i sur., 2011). Ovi mikroorganizmi također mogu doprinijeti probavi dojenčadi razgradnjom šećera i proteina; ta je mogućnost posebno važna s obzirom na to da je prolaz hrane kroz GIT dojenčadi kraći nego u odraslih osoba te, također, da je pH vrijednost dojenčadi u želucu viša od pH vrijednosti kod odrasle osobe. S ovog aspekta je značajno da sojevi laktobacila majčinog mlijeka su metabolički aktivni u crijevu dojenčadi i utječu na povećavnje proizvodnje funkcionalnih metabolita kao što je butirat, koji je glavni izvor energije za kolonocite i značajna molekula u modulaciji funkcije crijeva. Kao rezultat, oni poboljšavaju crijevne navike s povećanjem fekalne vlage, učestalosti i volumena stolice (Maldonado i sur., 2010).

2.2. EGZOPOLISAHARIDI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

EPOL su ugljikohidratni polimeri koji se nalaze na površini bakterijske stanice. U bakterijskim stanicama imaju funkciju zaštitnog površinskog sloja i omogućuju interakciju bakterije s mikrokolišom. BMK predstavljaju zasebnu skupinu Gram-pozitivnih bakterija koje su često prisutne u različitim fermentiranim proizvodima i često se primjenjuju kao starter kulture u industrijskoj proizvodnji hrane. Osim toga, nekoliko vrsta iz ove skupine, uglavnom one koje pripadaju rodu *Lactobacillus*, zajedno s nekim iz roda *Bifidobacterium* su dio mikrobne populacije različite funkcionalne hrane (Linares i sur., 2017). Pojedini bakterijski sojevi ovih rodova sintetiziraju EPOL koji se mogu transportirati ekstracelularno u vanstanični medij. Prednost je što se bakterijski sojevi, potencijalni producenti EPOL, mogu lako detektirati nakon izravnog makroskopskog promatranja bakterijskih kolonija na površini optimalnog hranjivog medija. Razlikuju se dva tipična fenotipa prepoznatljiva kod bakterijskih sojeva koji sintetiziraju EPOL. Moguće je uočiti tkz. "ropy" fenotip za koji je karakteristično formiranje dugih niti nakon doticanja bakterijskih kolonija mikrobiološkom ušicom ili "mukoidni" fenotip koji se očituje pojavom pravilnih, sjajnih i glatkih bakterijskih kolonija nakon njihova uzgoja na optimalnom krutom hranjivom mediju. Oba fenotipa mogu se vizualizirati uporabom različitih mikroskopskih tehnika (Slika 1).



Slika 1. EPOL na površini bakterije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* S89L, vizualiziran pomoću krio-skenirajućeg elektronskog mikroskopa (A) i ekstracelularni EPOL izlučen iz bakterije u mikrookoliš (B) (Castro-Bravo i sur., 2018)

Uloge ovih EPOL-a u njihovom mikrookolišu mogu biti raznovrsne, no još uvijek nisu potpuno razjašnjene. Smatra se da EPOL vjerojatno ima ulogu u "quorum-sensing" kontroli, zatim u zaštiti integriteta mikrobne stanice prilikom nepovoljnih uvjeta ekosustava, primjerice u uvjetima isušivanja, osmotskog stresa, ekstremnih pH vrijednosti te izlaganju antimikrobnim čimbenicima poput bakteriofaza, fagocitozi, visokim koncentracijama metalnih iona, nisa, lizozima, dezinficijensa, etanolu i antibioticima. EPOL također ima ključnu ulogu u stvaranju biofilma i adheziji na različite površine koje omogućuju kolonizaciju različitih ekosustava (Zannini i sur., 2016).

2.2.1. Kemijska struktura egzopolisaharida

Prema kemijskom sastavu i mehanizmima biosinteze, EPOL su klasificirani u dvije različite skupine: homopolisaharidi (HoPS) i heteropolisaharidi (HePS). HoPS se uglavnom sintetiziraju ekstracelularno koristeći saharozu, koja je izvor strukturne podjedinice odnosno monosaharidne komponente, djelovanjem ekstracelularnih enzima: glikozil hidrolaze (GH) koje koriste saharozu kao donor glikozila (fruktoze ili glukoze) (Leemhuis i sur., 2013), glukansukraze (GS; GH obitelj 70) koje kataliziraju sintezu α -glukana te fruktansukraze (FS; GH obitelj 68) koje kataliziraju sintezu β -fruktana (Cantarel i sur., 2009). Međutim, β -glukani se sintetiziraju pomoću

glukoziltransferaza iz aktivirane UDP-glukoze koja djeluje kao donor umjesto saharoze. Ovisno o vrsti povezivanja i položaju ugljika uključenog u vezu, HoPS se mogu klasificirati kao α -D glukani (dekstran, mutan, reuteran i alternan) i β -D glukani, dok oni koji sadrže fruktozu su fruktani (levan i inulin tipovi). Glukani i fruktani se najčešće nalaze među HoPS, a oboje se primjenjuju kao sastojak u prehrambenoj industriji (Anwar i sur., 2010). Postoji i četvrta skupina HoPS-a tzv. poligalaktani koji su pentameri sastavljeni od ponavljajućih jedinica galaktoze (Gruter i sur., 1992). HePS proizvode različite mezofilne bakterije poput *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Lb. sake* i *Lb. rhamnosus* i termofilne bakterije *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* i *Streptococcus thermophilus* (Tablica 1.) (Zannini i sur., 2016). Molekule HePS-a se sastoje od okosnice ponavljajućih podjedinica koje su razgranate (na položajima C2, C3, C4 ili C6) ili nerazgranate, i sastoje se od tri do osam molekula monosaharida (najčešće D-glukoze, D-galaktoze i L-ramnoze), derivata monosaharida (N-acetilglukozamina (GlcNAc), N-acetilgalaktozamina (GalNAc) ili glukuronske kiseline (GlcA) ili supstituiranih monosaharida (kao što su fosfat, acetil i glicerol) (De Vuyst i Degeest, 1999). Termofilne BMK koje proizvode HePS privlače sve veći interes, budući da igraju ključnu ulogu u reologiji, teksturi i okusu fermentiranih mliječnih napitaka (Ryan i sur., 2015; Fox i sur., 2015).

Tablica 1. Prikaz mezofilnih i termofilnih vrsta BMK koje proizvode HePS (Zannini i sur., 2016).

| Mezofilne BMK | Termofilne BMK |
|--|---|
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> |
| <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Lactobacillus helveticus</i> |
| <i>Lactobacillus sake</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | |

Sinteza HePS-a razlikuje se od sinteze HoPS-a, budući da se ponavljajuće jedinice sintetiziraju intracelularno, a u proces su uključeni izoprenoidni glikozilni lipidi (Cerning, 1990). Ponavljajuće jedinice se translociraju preko membrane i nakon toga polimeriziraju ekstracelularno. Isto tako, biosinteza i sekrecija HePS-a koje proizvode BMK se javljaju u različitim fazama rasta, a količina i tip se reguliraju uvjetima fermentacije (De Vuyst i Degeest, 1999).

2.3. INDUSTRIJSKA PRIMJENA EGZOPOLISAHARIDA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

EPOL-i utječu na specifičnu teksturu i viskoznost u fermentiranim mliječnim proizvodima. EPOL-i pojedinih bakterijskih sojeva primjenjuju se i kao alternativa polisaharidima biljnog porijekla, primjerice guar guma ili pektin, ili pak polisaharidima izoliranim iz algi poput karagenana ili alginata za poboljšanje fizikalnih svojstava (Freitas i sur., 2011). Novija istraživanja doprinose karakterizaciji jedinstvenih svojstava bakterijskih EPOL-a koji imaju potencijal u biotehnološkoj primjeni (npr. bakterijska celuloza ili levan) (Kumar i sur., 2007).

U industriji mliječnih proizvoda sve je veći interes potrošača za raznovrsnim jogurtnim proizvodima koji se odlikuju glatkom i kremastom strukturom dobivenom blagom homogenizacijom koaguluma mlijeka nakon fermentacije. Međutim, homogenizacija snažno utječe na reologiju koaguluma i olakšava nepoželjnu separaciju seruma, sinerezu, jer se mreža koja se formira gelom razbije. Različite su mogućnosti za poboljšanje teksture fermentiranih mliječnih proizvoda i smanjenje sinereze (Rohm i Kovac, 1994). Jedno od učinkovitih tehnoloških rješenja je poboljšanje kvalitete proizvoda povećanjem krutina mlijeka kao što su masti, proteini (Rohm i Schmid, 1993), ili šećeri (saharoza, fruktoza), ili dodavanjem stabilizatora kao što je pektin, škrob, alginat, želatina. No, ovi pristupi nisu u skladu s trendom potrošača koji zahtijevaju proizvode s niskim (ili smanjenim) masnoćama, niskim sadržajem šećera, niskim troškovima i što manje dodanih aditiva u hranu. Izazovi koji se mogu primijeniti kao nova tehnološka rješenja su inkubacija starter kultura pri suboptimalnim temperaturama rasta, koje potiču proizvodnju EPOL-a, i/ili korištenje prirodnih EPOL-a proizvedenih pomoću BMK koje se koriste kao starter kultura u fermentaciji. Učinkovitost primjene EPOL-a u prehrambenoj industriji ovisi o sposobnosti vezanja vode, interakcijama s proteinima i povećanjem viskoznosti faze mliječnog seruma. EPOL može djelovati kao sredstvo za teksturu te kao stabilizator, a time je moguće izbjegavanje upotrebe aditiva u hrani (Duboc i Mollet, 2001).

Iako je mehanizam međudjelovanja EPOL-a i sastojaka mlijeka u fermentiranim proizvodima još uvijek nepoznat, viskoznost i molekularna svojstva EPOL-a uvelike određuju fizička svojstva krajnjeg proizvoda. EPOL-i koje proizvode BMK su prema okusu neutralni; međutim, budući da fermentirani mliječni proizvodi postaju sve viskozniji, vrijeme njihovog zadržavanja u ustima i vrijeme kontakta s nepcem i okusnim receptorima se povećava. Poželjni učinci EPOL-a se mogu detektirati u ekstremno niskim koncentracijama. Cilj je dobiti privlačan vizualni izgled proizvoda, spriječiti sinerezu, zadržati kremastu i čvrstu teksturu i ugodan osjećaj okusa (Duboc i Mollet, 2001). U proizvodnji djelomično obranog sira Mozzarella, primjena

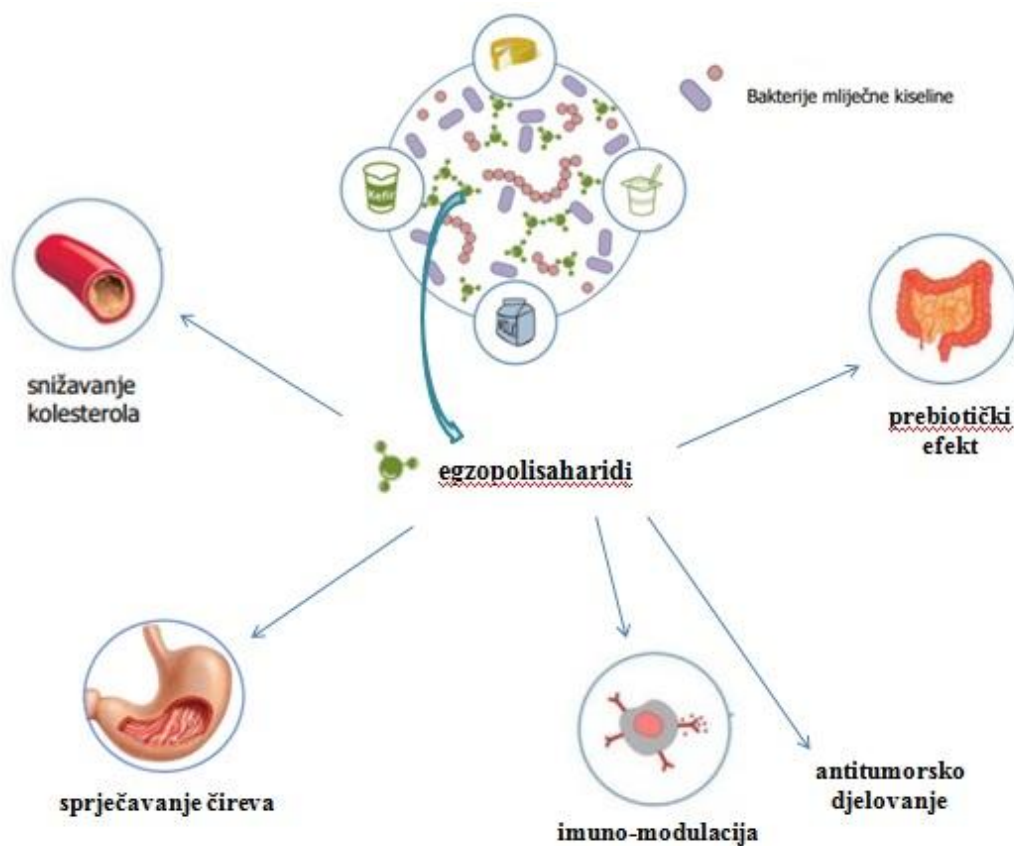
enkapsuliranog EPOL-a *S. thermophilus* je doprinjela povećanoj razini vlage, prinosa i svojstvima topljenja Mozzarella sira bez štetnog učinka sirutke u smislu viskoznosti sirutke ili vremena ultrafiltracije (Broadbent i sur., 2001).

U zadnjih nekoliko desetljeća prevedeno je nekoliko istraživanja o utjecaju mikrobnih EPOL-a proizvedenih *in situ* tijekom fermentacije kruha. Arendt i sur. (2007) predložili su da bi EPOL-i koje proizvede BMK iz kiselog tijesta mogli biti učinkovita i jeftinija zamjena za skuplje hidrokoloide biljnog podrijetla. Proizvodnja dekstrana pomoću *Weissella confusa* značajno utječe na viskoznost kiselog tijesta te doprinosi blago kiselom pšeničnom kruhu većeg volumena i mekoćom (Katina i sur. 2009.). Oligosaharidi koje su proizvele *W. cibaria* i *Lb. reuteri* korišteni su za procjenu utjecaja izlučivanja EPOL-a *in situ* u reologiji tijesta i kvaliteti kruha bez glutena, što je rezultiralo poboljšanjima u proizvodnji kruha (Galle i sur., 2012). To je obećavajuća primjena bakterijskih EPOL, jer su jedan od glavnih problema pekarskih proizvoda bez glutena manje zadovoljavajuća reološka svojstva u usporedbi s konvencionalnim proizvodima. Prema Schwab i sur. (2008) primjena starter kultura koje proizvode EPOL u fermentaciji kiselih tijesta može povećati količinu prebiotika u kruhovima bez glutena.

Definiranje molekularnih temelja odnosa kemijske strukture i funkcije EPOL-a doprinjet će raznolikosti primjene EPOL i EPOL / BMK simbiotskih kultura s ciljem dodane vrijednosti i inovacija u prehrambenoj industriji. Industrijska proizvodnja više od jednog tipa EPOL-a pojedinačnim sojevima može imati potencijal za razvoj budućih primjena u hrani, jer mogu utjecati na sinergijske učinke na teksturu (dekstran, ropy CPS) i poboljšanje prehrane (levan, inulin, OS). BMK koja proizvodi više vrsta EPOL-a može doprinjeti primjeni prirodnih aditiva s obzirom na zakonodavstvo o hrani. Biotehnološka primjena EPOL-a BMK u industriji hrane i pića ovisit će o biotehnološkim dostignućima, od visokih prinosa do proizvodnje sojeva sa svim poželjnim svojstvima vezanim uz njihovu uporabu u području hrane. Stoga je potrebno precizno definirati mehanizme odgovorne za kontrolu i regulaciju biosinteze EPOL-a, i na razini gena i proteina, kako bi se smanjili industrijski troškovi primjenom metaboličkog inženjeringa za dobivanje visokih prinosa uz postizanje komercijalizacije, te definirati funkcionalnost pojedinih sojeva producenata i polimera te oligosaharida sadržanih u njihovoj strukturi, kako bi se omogućila njihova ciljana uporaba u hrani i piću (Zannini i sur., 2016).

2.4. MOGUĆI FUNKCIONALNI UČINCI EGZOPOLISAHARIDA

Osim tehnoloških svojstava, EPOL BMK mogu također doprinijeti i zdravlju čovjeka (Slika 2.). To podrazumijeva njihov potencijalni bifidogeni učinak, imunomodulirajuće i antitumorsko djelovanje, te učinak u sprječavanju želučanih čireva i smanjenju razine kolesterola (De Vuyst i Degeest, 1999).



Slika 2. Prikaz mogućih funkcionalnih učinaka EPOL BMK na zdravlje čovjeka (Prilagođeno prema Zannini i sur., 2016; Linares i sur., 2017)

2.4.1. Uloga egzopolisaharida u imunodgovoru

Sve veći broj znanstvenih istraživanja opisuje imunostimulatorne ili imunomodulacijske učinke EPOL-a sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* *in vitro* ili *in vivo* (Laiño i sur., 2016). Primjerice prema *in vivo* istraživanjima Fanning i sur. (2012), miševi koji su oralno hranjeni izogenim sojevima *Bifidobacterium breve* - producentima EPOL, odnosno sojevima koji ne sintetiziraju EPOL, tijekom tri dana, ustanovljena je razlika u populaciji imunih stanica sluznice

kod dvaju skupina. Dodatno, fekalni IgA i serumski IgG bili su povišeni u skupini miševa koji su hranjeni sojevima koji nemaju mogućnost sinteze EPOL, što je u skladu s drugim istraživanjima o ulozi EPOL-a u kolonizaciji i/ili zaštitnom učinku EPOL-a na fagocitozu; poticanju imunodgovora i prezentaciji antigena. Poznato je da polisaharidne kapsule patogenih bakterija imaju steričku ulogu u zaštiti od antigena i opsonizirajućih antitijela koja pojačavaju fagocitozu, ili od antimikrobnih peptida, te da sudjeluju u modulaciji imunološkog odgovora. Stoga se postavlja hipoteza o sličnim učincima EPOL-a prisutnih na površini bakterijskih stanica laktobacila i bifidobakterija, što je dokazano za EPOL kojeg sintetizira *Lb. rhamnosus* GG (Lebeer i sur., 2010). Također se pokazalo da EPOL kojeg sintetiziraju i druge komensalne bakterije, osim laktobacila i bifidobakterija, ima imunomodulatorne učinke u crijevima *in vivo*.

2.4.2. Uloga egzopolisaharida u bakterijskoj adheziji

Smatra se da adhezija na crijevni epitel, uglavnom u regiji kolona, pomaže probiotičkim bakterijama da trenutno koloniziraju GIT, što im omogućuje preživljavanje tijekom dužeg vremenskog perioda u crijevima, a pretpostavlja se da može utjecati i na otežanu kolonizaciju intestinalnih patogena. Stoga je adhezija na epitelne stanice crijeva ili na sloj sluzi koji pokriva taj epitel jedno od svojstava koje se često ispituje prilikom definiranja potencijalnih probiotičkih sojeva (FAO-WHO, 2006). Površinski EPOL pojedinih sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* mogu doprinijeti zadržavanju bakterije tijekom gastrointestinalnog tranzita, djelujući kao zaštitni omotač prilikom nepovoljnih uvjeta GIT, kao što je nizak pH u želucu i žučne soli, te prisutnih enzima gušterače u duodenumu. Jednom kada bakterije koje proizvode EPOL stignu do debelog crijeva, te makromolekule su uključene u interakciju s crijevnom sluznicom. Mehanizam kojim je EPOL uključen u bakterijsku adheziju do sada nije potpuno razjašnjen. Različite metode se koriste za *in vitro* kvantificiranje adhezije bakterija koje proizvode EPOL na crijevni epitel, primjerice (1) metaboličko obilježavanje bakterije pomoću ³H nukleotida (Ruas-Madiedo i sur., 2006), (2) obilježavanje bakterija s fluorescentnim sondama (Živković i sur., 2015), (3) ekspresija fluorescentnih proteina na bakterijskoj površini (Castro-Bravo i sur., 2017), i (4) određivanjem broja adheziranih bakterija u staničnim kulturama. Smatra se da EPOL na površini stanica laktobacila i bifidobakterija sa specifičnim fizičko-kemijskim svojstvima, npr. dugolančanim polimerima, imaju ključnu ulogu u interakciji tih bakterija s domaćinom.

2.4.3. Egzopolisaharidi kao izvor hranjivih tvari

EPOL-i, koje sintetiziraju BMK i bifidobakterije, mogli bi imati potencijalnu ulogu kao prebiotici, koji su prema definiciji selektivni supstrati, koje mogu iskoristiti mikroorganizmi mikrobiote domaćina pri čemu potiču zdravstvene učinke (Salazar i sur., 2016; Gibson i sur., 2017). Za prebiotike koji se primjenjuju oralno, nužno je da se ne mogu probaviti, niti apsorbirati u gornjem dijelu GIT, već moraju kao nepromjenjene molekule dospjeti do debelog crijeva, gdje ih mogu koristiti specifični, korisni mikroorganizmi, sudionici mikrobiote crijeva (Roberfroid i sur., 2010).

Pretpostavlja se da HoPS bakterija može dospjeti do debelog crijeva gotovo neprobavljen zbog svog specifičnog kemijskog sastava, koji je sličan sastavu inulina ili FOS (fruktooligosaharidnim) prebioticima. Također visoka molekulska masa ovih makromolekula vjerojatno je razlog otežane enzimske hidrolize, ali se pretpostavlja i da domaćin nema enzimske sustave koji bi bili specifični za razgradnju ovih polimera. Osim toga, prema pojedinim istraživanjima, primarna struktura HoPS-a omogućuje da ih fermentira fekalna mikrobiota. Primjerice, izolirana molekula HoPS-a kojeg sintetizira *Lactobacillus sanfranciscensis* pokazala je bifidogeni učinak koji utječe na modificiranje sastava intestinalne mikrobiote (Dal Bello i sur., 2001). Istraženi su i metabolički putevi razgradnje HoPS-a kojeg sintetizira *Lb. sanfranciscensis* u bifidobakterijama tijekom fermentacije tijesta kako bi se procijenio prebiotički potencijal fermentirane hrane. Pri tome je frakcija polisaharida topljiva u vodi ekstrahirana iz fermentiranog kiselog tijesta i korištena za uzgoj različitih bifidobakterija. Rezultati su pokazali da svi ispitani sojevi bifidobakterija mogu metabolizirati β -fruktan sintetiziran laktobacilima. Prema tome HoPS se može koristiti kao supstrat za poticanje rasta pojedinih sudionika intestinalne mikrobiote zbog njihove jednostavne primarne strukture; no potrebno je provesti *in vivo* istraživanja kako bi se ova hipoteza potvrdila (Castro-Bravo i sur., 2018).

Struktura HePS-a je složenija što vjerojatno doprinosi zadržavanju nepromjenjene strukture tijekom prolaska kroz GIT, no to nije dokazano *in vivo*. Rezultati istraživanja na skupini Wistar štakora, koji su hranjeni sojevima *B. animalis* subsp. *lactis* ili *B. longum*, pokazali su povećanje udjela intestinalnih bifidobakterija u cekumu i fecesu životinja (Salazar i sur., 2011), što bi moglo ukazivati na to da bi i njihovi polimeri mogli, nepromjenjene strukture, doći do debelog crijeva. Prema Lebeer i sur. (2010) *Lb. rhmanosus* GG, koja proizvodi EPOL, u usporedbi sa sojem mutantom, koji ne proizvodi EPOL, iskazuje bolje svojstvo kolonizacije, vjerojatno zbog zaštitne uloge HePS-a, no dodatno, niske koncentracije molekularnih čimbenika obrambenog sustava domaćina, poput antimikrobnog peptida LL- 37, potiču biosintezu EPOL-a što upućuje i na ulogu

domaćina u ovim interakcijama. *In vitro* istraživanja također su pokazala da osjetljivost HePS-a na razgradnju u crijevima domaćina ovisi o kemijskom sastavu polimera. Općenito, jednostavne strukture polimera koje sadrže ponavljajuće strukturne podjedinice mogu se lako hidrolizirati pomoću enzima. Isto tako, HePS izolirani iz različitih vrsta bifidobakterija humanog podrijetla iskazuju mogućnost modulacije sastava mikrobiote *in vitro* (Salazar i sur., 2008).

Pretpostavlja se, prema tome da se HoPS i HePS *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* sojeva ne razgrađuju/ ne probavljaju u GIT domaćina, ali ih mogu razgraditi pojedini sudionici intestinalne mikrobiote, što ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima, ali i dostupnim glikolitičkim enzimima intestinalnih mikroorganizama. Osim toga, monosaharidi koji se oslobađaju nakon razgradnje EPOL-a također mogu imati utjecaj na sastav mikrobiote jer mogu biti izvor hranjivih tvari drugim bakterijama mikrobiote. Stoga se HoPS i HePS mogu smatrati prebiotičkim supstratima koji su izvor ugljika za mikrobiotu, gdje su prisutni uvjeti iscrpljenih hranjivih tvari, koji ograničavaju rast, što utječe na održavanje ravnoteže intestinalne mikrobiote te tako indirektno doprinosi zdravlju domaćina (Salazar i sur., 2016).

2.4.4.. Anatagonističko djelovanje egzopolisaharida

Antagonistički učinak laktobacila i bifidobakterija koje proizvode EPOL, a posebno izoliranih i purificiranih molekula EPOL-a na patogene bakterije ispitan je primjenom različitih *in vitro* i *in vivo* modela. Sposobnost koagregacije s patogenima je tipično fenotipsko svojstvo koje se ispituje prilikom *in vitro* karakterizacije probiotičkih bakterija, jer može doprinjeti smanjenoj izloženosti crijevnog epitela štetnim mikroorganizmima. Pojedini sojevi *Lb. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, koji sintetiziraju EPOL-e u visokim prinosima, pokazuju značajnu koagregaciju s bakterijom *Escherichia coli* (Aslim i sur., 2007). Ovim zaključcima idu u prilog eksperimenti provedeni s izogenim mutantima u kojima se uspoređuje aktivnost sojeva koji sintetiziraju EPOL, sojeva koji ne sintetiziraju EPOL te sojeva koji proizvode različite tipove EPOL, kako bi se definirala uloga EPOL u bakterijskoj stanici. Tako je ispitano antimikrobno djelovanje *Lb. rhamnosus* GG, mutanta koji ima smanjenu mogućnost biosinteze EPOL-a i pročišćenog EPOL-a prema *Candida albicans* te je utvrđeno da EPOL-sloj može utjecati na smanjenje formacije hifa, ali i na kompeticiju sa *Candidom* što utječe na smanjenje adhezije ovog mikroba na vaginalne epitelne stanice (Allonsius i sur., 2017). Također, dokazan je i zaštitni učinak *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 koji proizvodi EPOL u usporedbi s izogenim sojem NB1, koji ne proizvodi EPOL, u inhibiciji sedam različitih oportunističkih patogena na staničnoj liniji HT29-MTX, jer EPOL roditeljskog soja BGCG11 vjerojatno doprinosi jačanju barijere sluznice spriječavanjem kontakta

patogena *E. coli* ili *Listeria monocytogenes* s epitelnim stanicama. Istraživanja na *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, mutantnom koji ne sintetizira EPOL te mutantom koji proizvodi EPOL s drugačijim sastavom u usporedbi s divljim tipom soja, pokazala su da EPOL koji proizvodi divlji tip ima ulogu u spriječavanju invazije *E. coli* na Caco-2 stanice (Živković i sur., 2016), što upućuje i na važnost specifičnog sastava EPOL-a, a ne samo proizvodnju EPOL-a, prilikom inhibicije patogena.

Različiti eksperimentalni modeli životinja su korišteni u *in vivo* eksperimentima za istraživanje antagonističkog djelovanja sojeva koji proizvode EPOL prema patogenima. Primjerice, *Lactobacillus johnsonii* FI9785, izoliran iz peradi, koji proizvodi dva različita EPOL-a, iskazuje inhibicijski učinak na kolonizaciju i perzistenciju *Clostridium perfringens*a kod peradi i smanjenju kolonizaciju *E. coli* tankog crijeva (La Ragione i sur., 2004). Također, *B. longum* subsp. *infantis* 35624, koji sintetizira EPOL koji u strukturi sadrži galaktozu, glukozu, galakturonsku kiselinu i 6-deoksi-L-talozu, smanjuje nepoželjan učinak salmonele na aktivnost enzima mikrovila i utječe na gubitak težine kod miševa (Symonds i sur., 2012). Iako ove studije pokazuju povezanost primjene sojeva producenta EPOL-a i smanjenja nepoželjnog učinka pojedinih patogena, precizni mehanizmi djelovanja EPOL-a još uvijek su nepoznati ili kontradiktorni. Rezultati istraživanja na *B. breve* UCC2003 i izogenom mutantnom soju pokazuju ulogu EPOL-a u antagonizmu patogena (Fanning i sur., 2012). Ovi autori su pokazali da površinski vezan EPOL soja UCC2003 pomaže u dugotrajnom zadržavanju bakterija u crijevima miševa i omogućuje domaćinu zaštitu protiv patogena *C. rodentium*, što ukazuje na funkcionalnu ulogu EPOL-a važnu za probiotičko djelovanje poželjnih sojeva.

2.4.5. Prebiotički učinak

Prebiotici su obično ne probavljivi oligosaharidi koji selektivno stimuliraju rast i aktivnost ograničenog broja bakterijskih vrsta u debelom crijevu, kao što su bifidobakterije i laktobacili. Različiti oligosaharidi imaju svojstva prebiotika jer utječu na povećan broj *Bifidobacterium*-a u debelom crijevu domaćina. Galakto-oligosaharidi (GOS) i frukto-oligosaharidi (FOS) smatraju se važnim prebionicima. Mogućnost djelovanja EPOL-a kao prebiotičkih supstrata uspješno su dokazali Korakli i sur. (2002) za EPOL fruktanskog tipa kojeg proizvodi jedan soj *Lb. sanfranciscensis*. Postoje dokazi i o bifidogenom učinku EPOL-a levanskog tipa kojeg proizvodi drugi soj iste vrste. Drugi eksperimentalni pristup koji su proveli Salazar i sur. (2008) pokazao je da EPOL sintetiziran intestinalnom *Bifidobacterium* djeluje kao supstrat za fermentaciju mikroorganizmima u GIT, mijenjajući interakcije među intestinalnim populacijama.

2.4.6. Adsorpcija kolesterola pomoću egzopolisaharida

Prema Dilna i sur. (2015) utvrđeno je da EPOL *Lb. plantarum* RJF4 može utjecati na smanjenje koncentracije kolesterola adsorpcijom. Određena koncentracija kolesterola u supernatantu dodatkom EPOL-a je smanjena u usporedbi s kontrolom. Izražena u postocima, sposobnost snižavanja kolesterola iznosila je 42,24%. Polisaharidi kiselih svojstava su učinkovitiji za smanjenje kolesterola od neutralnih polisaharida, a također je objavljeno i da dekstran kao EPOL nije uspio ukloniti kolesterol (Soh i sur., 2003). Točan mehanizam učinka snižavanja kolesterola nije poznat. Pojedini EPOL specifične kemijske strukture, koje proizvode bakterije *Streptococcus thermophilus* i *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mogu vezati slobodne žučne kiseline i tako povećati njihovo izlučivanje nakon probave. To bi moglo rezultirati sintezom novih žučnih kiselina iz kolesterola u jetri i tako smanjiti razinu kolesterola u cirkulaciji (Akalin i sur., 1997). Tako bi *Lb. plantarum* RJF4, koji proizvodi EPOL, u sklopu funkcionalnih pripravaka hrane mogao pomoći u smanjenju povišene razine kolesterola u krvi. U istraživanju koje su proveli Tok i Aslim (2010), od ukupno 5 sojeva *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, izoliranih iz domaćeg jogurta, tri soja koja su proizvodila velike količine EPOL-a pokazala su svojstvo uklanjanja više kolesterola iz medija u usporedbi sa sojevima koji imaju niže prinose EPOL-a. Imobilizirane bakterijske stanice pri tome su bile mnogo učinkovitije u adsorpciji kolesterola u usporedbi sa slobodnim stanicama.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu korišteni je 60 izolata BMK koji su dio mikrobne populacije mačjinog mlijeka, a za karkterizaciju daljnjih svojstava odabrana su 3 soja pod oznakama MC1, MC9 i AF7, čiji su uvjeti rasta navedeni u tablici 2. Kao kontrola korišten je soj *Lb. fermentum* D12 koji, potječe iz druge ekološke niše, ali koji proizvodi EPOL. Također su navedeni sojevi BMK koji su korišteni prilikom ispitivanja antimikrobnog djelovanja MC1, MC9 i AF7.

Tablica 2. Uvjeti rasta radnih i test mikroorganizama korištenih u ovom diplomskom radu

| Bakterijski soj | Uvjeti rasta |
|-------------------------------------|----------------------------|
| <i>Lb. fermentum</i> D12 | MRS, 37 °C, mikroaerofilno |
| Izolat MC1 | MRS, 37 °C, mikroaerofilno |
| Izolat MC9 | MRS, 37 °C, mikroaerofilno |
| Izolat AF7 | MRS, 37 °C, mikroaerofilno |
| <i>Lactobacillus brevis</i> ZG1 | MRS, 37 °C, mikroaerofilno |
| <i>Lactococcus. lactis</i> ZG7-10 | MRS, 37 °C, mikroaerofilno |
| <i>Enterococcus faecium</i> L3 | MRS, 37 °C, mikroaerofilno |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> ZG1C | MRS, 37 °C, mikroaerofilno |

3.1.2. Kemikalije

U ovom eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- Glukoza
- Promega Genomic Wizard kit (Madison, WI, SAD)
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- Pufer bez MgCl₂ (Roche, Applied Biosystems)
- MgCl₂ (Roche, Applied Biosystems)
- dNTP (TaKaRa)
- Taq polimeraza (TaKaRa)
- MiliQ voda
- Agaroza
- Etidijev bromid

- λ DNA Hind III (Fermentas, Kanada)
- 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD)
- Diamond boja (Promega, SAD)
- E –test (M. I. C. E. Evaluators™, Oxoid Ltd, Baksingstoke, Velika Britanija)
- UNI16SF i UNI16SR, početnice

3.1.3. Aparatura i pribor

U ovom eksperimentalnom radu korištena je sljedeća aparatura i pribor:

- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- filter-diskovi s određenim koncentracijama antibiotika
- pinceta
- Petrijeve zdjelice
- marker za pisanje po staklu
- BioSpec-nano UV/VIS spektrofotometar (Shimadzu, Kyoto, Japan)
- PCR uređaj, „Applied Biosystems“, SAD
- elektroforetske kadice
- centrifuga
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Transiluminator MiniBis Pro (DNR BioImaging Systems, Jeruzalem, Izrael)
- sterilni tipsevi
- vibromješač
- ependorfice
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete

3.2. METODE RADA

3.2.1. *In vitro* odabir sojeva producenata egzopolisaharida

Mogućnost biosinteze EPOL-a ispitana je kod 60 sojeva BMK izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka fenotipski, pomoću detekcije specifičnog "ropy" fenotipa kod prekonočno poraslih kolonija na MRS hranjivom agaru. Soj *Lb. fermentum*

D12 koji sintetizira EPOL u eksperimentima je korišten kao pozitivna kontrola. Svaki od sojeva BMK precijepljen je iz -80 °C u 5 ml svježeg MRS bujona i stavljen na anaerobnu inkubaciju pri 37°C. 10 µL prekonoćnih kultura bakterijskih sojeva naciepljene su na MRS krutu hranjivu podlogu sa dodatkom 2 % glukoze. Ploče su stavljene na anaerobnu inkubaciju pri 30°C tijekom 2 dana. Detekcija "ropy" fenotipa se očituje pojavom filamentoznih niti, te su takvi sojevi smatrani kao potencijalni producenti EPOL.

3.2.2. Taksonomska identifikacija sojeva producenata EPOL-a sekvencioniranjem 16S rRNA

3.2.2.1. Izolacija DNA iz autohtonih izolata mikrobiote majčinog mlijeka

Nakon prekonoćnog uzgoja odabranih autohtonih sojeva BMK (MC1, MC9 i AF7), mikrobiote majčinog mlijeka, u MRS tekućoj podlogi pri 37°C, provedena je izolacija genomske DNA. Izolacija DNA iz odabranih izolata BMK provedena je primjenom Promega Genomic Wizard kita (Madison, WI, SAD) prema uputama proizvođača. Koncentracija i čistoća ekstrahirane DNA u uzorcima je izmjerena spektrofotometrijski pomoću BioSpec-nano UV/VIS spektrofotometra (Shimadzu, Kyoto, Japan). Čistoća DNA, s obzirom na mogućnost prisutnosti onečišćenja s RNA ili fenolom, provjeravala se u 1 µL uzorka spektrofotometrijom i to očitavanjem vrijednosti omjera pri 260nm/230nm, za koji se smatra da je u rasponu 2,0-2,2 kada uzorak DNA ne sadrži primjese fenola, odnosno očitavanjem vrijednosti omjera pri 260 nm/280 nm za uzorak DNA koji ne sadrži zaostatke RNA te on, u tom slučaju, iznosi 1,8- 2,0.

3.2.2.2. PCR reakcija primjenom UNI16SF i UNI16SR početnica

Za izvođenje PCR metode, prema Tablici 3. preračunati su volumeni pojedinih sastojaka reakcijske smjese ukupnog volumena 25 µL. Za amplifikaciju varijabilne regije 16S rRNA gena korištene su početnice UNI16SF i UNI16SR sljedećih nukleotidnih sekvenci:

UNI16SF 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GC-3'

UNI16SR 5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3'

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR metode primjenom početnica UNI16SF i UNI16SR

| Sastojci reakcijske smjese | Početna koncentracija | Konačna koncentracija |
|---|-----------------------|-----------------------|
| Pufer bez MgCl ₂ (Roche, Applied Biosystems) | 10 x | 1x |
| MgCl ₂ (Roche, Applied Biosystems) | 25 mM | 2,5 mM |
| Početnica UNI16SF | 100 μM | 1 μM |
| Početnica UNI16SR | 100 μM | 1 μM |
| dNTP (TaKaRa) | 2.5 mM | 0,2 mM |
| Taq polimeraza (TaKaRa) | 5,00 U/μl | 0,025 U/μl |
| DNA-kalup | 100 ng/μL | 1 ng/μL |
| Mili Q voda | - | - |

Kao negativna kontrola, odnosno kako bi se potvrdilo da DNA fragment nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica, korišten je uzorak koji je umjesto uzorka DNA, sadržavao miliQ vodu, a PCR reakcija se odvijala prema istim uvjetima kao za ostale uzorke, koji su navedeni u Tablici 4.

Amplifikacija DNA provedena je pomoću PCR pri sljedećim uvjetima: početna denaturacija tijekom 5 min pri 94 °C, denaturacija 30 ciklusa od 30s pri 94 °C, prianjanje početnica na DNA kalup 30s pri 50 °C, produljivanje DNA lanca 30s pri 72 °C te završno produljivanje DNA lanca 7 min pri 72 °C. Prisutnost produkata PCR reakcije detektirana je elektroforezom u 1.5 % (w/v) agaroznom gelu nakon bojanja gela etidijevim bromidom.

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije za amplifikaciju primjenom početnica UNI16SF i UNI16SR

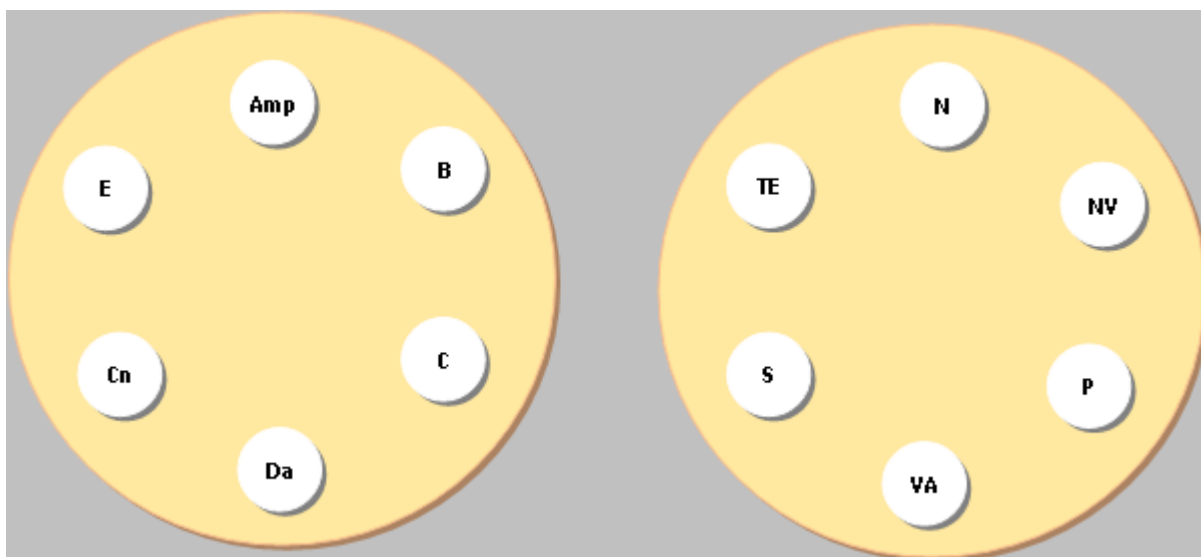
| Uvjeti PCR reakcije | Temperatura | Trajanje |
|---------------------------------|-------------|------------|
| Početna denaturacija | 94 °C | 5 min |
| 30 ciklusa: Denaturacija | 94 °C | 30 sekundi |
| Sparivanje početnica | 50 °C | 30 sekundi |
| Produljivanje lanca DNA | 72 °C | 30 sekundi |
| Završno produljivanje lanca DNA | 72 °C | 7 minuta |

3.2.2.3.. Pročišćavanje PCR produkata

Dobiveni PCR produkti pročišćeni su pomoću QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača kako bi se uklonio višak nesparenih početnica i slobodnih nukleotida, nakon čega je određena koncentracija dsDNA spektrofotometrijski pomoću Biospec-nano (Shimadzu, Kyoto, Japan). Dobiveni pročišćeni PCR produkti su razdvojeni u 1,5 %-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 150 V tijekom 1 sata. Standard se sastojao od λ DNA *Hind* III (Fermentas, Kanada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD), a gel je obojan u Diamond boji (Promega, SAD) i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru MiniBis Pro (DNR BioImaging Systems, Jeruzalem, Izrael) pri valnoj duljini od 254 nm pomoću programa Gel Capture (DNR, Jeruzalem, Izrael) (Leboš Pavunc i sur., 2012). Sekvencioniranje 16S rRNA regije provedeno je u ovlaštenoj instituciji Macrogen (Amsterdam, Nizozemska). Rezultati sekvencioniranja svakog od tri odabrana bakterijska soja izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka su uspoređeni sa sekvencama dostupnim u NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information) bazi podataka primjenom BLAST (engl. Basic Local Alignment Search Tool) algoritma koji je dostupan na poveznici <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, odnosno omogućuje poravnavanje tražene sekvence sa svim sekvencama prisutnim u bazi podataka, te kao rezultat prikazuje popis najuspješnijih podudaranja.

3.2.3. Određivanje osjetljivosti odabranih sojeva na različite antibiotike metodom difuzije u agar s filter-diskovima

Metodom difuzije u agar s filter-diskovima koji sadrže određenu koncentraciju antibiotika ispitana je osjetljivost *Lb. fermentum* D12 i odabranih izolata (MC1, MC9 i AF7), koji su dio mikrobiote majčinog mlijeka, na antibiotike, mjerenjem promjera zona inhibicije rasta nakon prekonoćne inkubacije. Nakon prekonoćnog uzgoja pri 37°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi, 4 odabrana bakterijska soja inokulirana su u 12 ml MRS (de Man Rogosa Sharpe; Difco, Detroit, MI, USA) krute hranjive podloge. Nakon što se inokulirana hranjiva podloga skrutnula, sterilnom pincetom su postavljeni filter-diskovi koji sadrže već definirane koncentracije pojedinih antibiotika redosljedom prikazanim na slici 3. Inokulirane bakterijske kulture u Petrijevim pločama su zatim inkubirane anaerobno pri 37°C preko noći, nakon čega su izmjereni promjeri zona inhibicije rasta (r), uključujući i promjer diska, izraženi u mm.



Slika 3. Redosljed filter-diskova s određenom koncentracijom pojedinog antibiotika postavljen na MRS hranjivu podlogu inokuliranu s *Lb. fermentum* D12 ili jednim od odabranih izolata (MC1, MC9 i AF7), koji su dio mikrobiote majčinog mlijeka. Oznake antibiotika: (Amp – ampicilin; N – neomicin; B – bacitracin; NV – novobiocin; C – kloramfenikol; P - penicilin G; DA – klindamicin; VA – vankomicin; Cn – gentamicin; S – streptomycin; E – eritromicin; TE – tetraciklin).

3.2.4. Određivanje minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika pomoću E-testa

Prekonoćne bakterijske kulture *Lb. fermentum* D12, odnosno odabranih izolata, koji su dio mikrobiote majčinog mlijeka MC1, MC9 i AF7 su inokulirane u 12 ml MRS krute hranjive podloge. Inokulirana hranjiva podloga prelivena je u Petrijeve zdjelice označene nazivom pojedinog bakterijskog soja. Nakon skrućivanja inokulirane MRS hranjive podloge, E-test (M. I. C. E. Evaluators™, Oxoid Ltd, Basingstoke, Velika Britanija), za kvantitativno očitavanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) antibiotika je položen po sredini inokulirane MRS hranjive podloge. Tako priređene bakterijske kulture u Petrijevim zdjelicama se inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta prekonoćno, te se sljedeći dan očitavaju vrijednosti minimalnih inhibicijskih koncentracija pojedinih antibiotika (MIC vrijednost).

3.2.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara

Antibakterijske aktivnosti odabranih sojeva producenata EPOL ispitana je metodom difuzije s dvostrukim slojem agara koja se još naziva “Agar-spot-test metoda”. Ukratko, prekonoćne kulture *Lb. fermentum* D12, odnosno odabranih izolata (MC1, MC9 i AF7), koji su dio mikrobiote

majčinog mlijeka, nakon uzgoja pri optimalnim uvjetima rasta, nacijepljene su mikropipetom, u obliku kapi po 5 µl, na prethodno priređenu MRS agar hranjivu podlogu i inkubirane pri 37 °C tijekom 24 sata. Petrijeve zdjelice s poraslim bakterijskim kolonijama, su zatim prelivene s 12 ml MRS „soft-agara“ (koji je jednakog sastava kao MRS tekuća hranjiva podloga, ali uz dodatak 0,8% agara), koji sadrži 100 µl suspenzije pojedinog test mikroorganizma *Lb. brevis* ZG1, *Lb. plantarum* ZG1C ili *Ec. faecium* L3 odnosno 12 ml M 17 „soft-agara“ koji sadrži 100 µl suspenzije test mikroorganizma *Lc. lactis* ZG7-10. Tako priređene Petrijeve zdjelice s dvostrukim slojem agara inkubirane su 24 sata pri 37°C. Pojava zona inhibicije rasta testiranih mikroorganizama oko bakterijskih kolonija *Lb. fermentum* D12, odnosno odabranih izolata, koji su dio mikrobiote majčinog mlijeka MC1, MC9, AF7, ukazuje na njihovo antibakterijsko djelovanje. Stoga, su očitani promjeri zona inhibicije rasta i poraslih bakterijskih kultura, izračeni kao mm, te je na temelju dobivenih vrijednosti izračunat efektivni inhibicijski omjer (EIR).

Izračunavanje efektivnog inhibicijskog odnosa prema slijedećoj jednadžbi /1/:

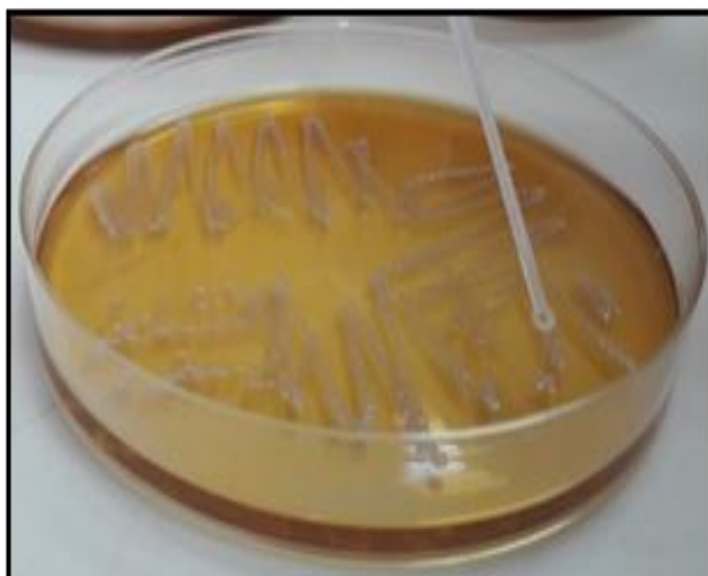
$$/1/ \quad \text{EIR} = \frac{(ID-CD)}{CD}$$

Ovisno od izračunatoj vrijednosti EIR, inhibicijsko djelovanje je okarakterizirano kao slabo kada je $\text{EIR} < 0,5$, kao srednje ako je vrijednost $\text{EIR} = 0,5-1,5$, odnosno kao snažno ako je vrijednost $\text{EIR} > 1,5$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. *In vitro* DETEKCIJA BIOSINTEZE EGZOPOLISAHARIDA KOD BAKTERIJSKIH SOJEVA MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

Majčino mlijeko, osim što predstavlja temeljnu prehranu nakon rođenja, je i biotekućina kompleksnog sastava koja je sadrži različite bioaktivne komponente za rast, ali i razvoj imunološkog sustava te intestinalnog sustava djeteta, što podrazumijeva oblikovanje sastava intestinalnog mikrobioma. Jedna od važnijih komponenta u majčinom mlijeku su oligosaharidi (engl. Human milk oligosaccharides) koji su važni prilikom definiranja sastava mikrobiote majčinog mlijeka i intestinalnog trakta djeteta (LaTuga i sur., 2014). Smatralo se da oligosaharidi služe kao supstrat za rast crijevnih bakterija u distalnom crijevnom traktu. Prema novijim istraživanjima ustanovljeno je da mikrobiota majčinog mlijeka ne može iskoristiti dostupne oligosaharide, odnosno da ove raznolike molekule dopijavaju u debelo crijevu neprobavljene i mogu se izlučiti u mekoniju dojenčeta, no ipak značajno utječu na oblikovanje sastava mikrobiote. Kako znanstvena populacija u novije vrijeme upućuje na važne uloge intestinalne mikrobiote, ali i drugih dijelova tijela na zdravlje čovjeka, a s obzirom na činjenicu da je majčino mlijeko prva i najoptimalnija prehrana novorođenog djeteta, cilj je karakterizacija mikrobioma majčinog mlijeka, te definiranje molekularnih čimbenika za koje se pretpostavlja da su temelj funkcionalnosti, odnosno poželjnih učinika pojedinih sojeva sudionika takve kompleksne mikrobne zajednice. Kao jedan od molekularnih čimbenika značajnih za funkcionalnost korisnih bakterijskih sojeva u novije vrijeme prepoznati su EPOL-i. EPOL-i su makromolekularne strukture koje sintetiziraju pojedini bakterijski sojevi, osobito BMK i bifidobakterije. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati prisutnost EPOL-a kod bakterijskih izolata mikrobiote majčinog mlijeka, s obzirom na spoznaju da EPOL-i, koje sintetiziraju BMK i bifidobakterije, mogu imati potencijalnu ulogu kao prebiotici (Salazar i sur., 2016). Nadalje, sojevi producenti EPOL-a koji su autohtoni sojevi majčinog mlijeka još nisu okarakterizirani kao producenti EPOL. No pojedina istraživanja, s obzirom na specifičnost ekosustava iz kojeg potječu, upućuju na moguće, do sada neokarakterizirane, funkcionalne uloge EPOL bakterijskih sojeva koji su sudionici mikrobiote majčinog mlijeka (Riaz Rajoka i sur., 2018). Stoga je u ovom radu ispitana mogućnost biosinteze EPOL kod 60 izolata BMK izoliranih iz majčinog mlijeka. Sojevi koji doticanjem bakterijskih kolonija sterilnom mikrobiološkom ušicom formiraju filamentozne rastezljive niti smatraju se potencijalnim producentima EPOL-a. Kao kontrola je korišten soj producent EPOL-a, *Lb. fermentum* D12. Inicijalni odabir proveden je pomoću *in vitro* detekcije bakterijskih sojeva mikrobiote majčinog mlijeka, potencijalnih producenata EPOL-a, odnosno provjeravanjem prisutnosti specifičnog fenotipa kod prekonočno poraslih bakterijskih kolonija, potencijalnih producenta EPOL-a (Slika 4.).



Slika 4. Detekcija sinteze EPOL-a nakon prekonocnog rasta soja *Lb. fermentum* D12 na MRS agaru

Sojevi MC1, MC2, MC3, MC4, MC6, MC9, MC11 i AF7 pokazali su se kao potencijalni producenti EPOL jer su se doticanjem njihovih kolonija sterilnom mikrobiološkom ušicom formirale filamentozne rastezljive niti. Kod sojeva KR18, MC12, MC19, AF2, AF3, AF4, AF8, AF12 i AF15 sposobnost rastezanja kolonija, odnosno formiranja filamentoznih niti, bila je manje intenzivna. Od poraslih sojeva, sojevi KR16, KR19 i MC13 nisu pokazali sposobnost formiranja filamentoznih niti, odnosno nije uočen specifičan "ropy" fenotip (Tablica 5.). Kako je između 60 ispitanih izolata mikrobiote majčinog mlijeka, *in vitro* selekcijom ustanovljena mogućnost biosinteze EPOL kod većeg broja bakterijskih sojeva, može se pretpostaviti da ove makromolekularne strukture na površini bakterijske stanice imaju ulogu funkcionalnih biomolekula prilikom interakcija, koje se ostvaruju unutar mikrobne populacije majčinog mlijeka, a koje kasnije mogu biti značajne i prilikom stvaranja prve intestinalne mikrobiote dojenog djeteta.

Tablica 5. *In vitro* detekcija biosinteze EPOL kod autohtonih sojeva mikrobiote majčinog mlijeka kao potencijalnih producenata EPOL fenotipski pomoću detekcije specifičnog „ropy“ fenotipa

| Oznaka bakterijskog izolata mikrobiote majčinog mlijeka | Prisutnost „ropy“ fenotipa koji ukazuje na mogućnost biosinteze EPOL | <i>nastavak tablice</i> | |
|---|--|-------------------------|---------------|
| <i>Lb. fermentum</i> D12 | + | MC11 | + |
| KR1 | nije porastao | MC12 | +/- |
| KR2 | nije porastao | MC13 | - |
| KR3 | nije porastao | MC14 | nije porastao |
| KR4 | nije porastao | MC15 | nije porastao |
| KR5 | nije porastao | MC16 | nije porastao |
| KR6 | nije porastao | MC17 | nije porastao |
| KR7 | nije porastao | MC18 | nije porastao |
| KR8 | nije porastao | MC19 | +/- |
| KR9 | nije porastao | MC20 | nije porastao |
| KR10 | nije porastao | AF1 | nije porastao |
| KR11 | nije porastao | AF2 | +/- |
| KR12 | nije porastao | AF3 | +/- |
| KR13 | nije porastao | AF4 | +/- |
| KR14 | nije porastao | AF5 | nije porastao |
| KR15 | nije porastao | AF6 | nije porastao |
| KR16 | - | AF7 | + |
| KR17 | nije porastao | AF8 | +/- |
| KR18 | +/- | AF9 | nije porastao |
| KR19 | - | AF10 | nije porastao |
| KR20 | nije porastao | AF11 | nije porastao |
| MC1 | + | AF12 | +/- |
| MC2 | + | AF13 | nije porastao |
| MC3 | + | AF14 | nije porastao |
| MC4 | + | AF15 | +/- |
| MC5 | nije porastao | AF16 | nije porastao |
| MC6 | + | AF17 | nije porastao |
| MC7 | nije porastao | AF18 | nije porastao |
| MC8 | nije porastao | AF19 | nije porastao |
| MC9 | + | AF20 | nije porastao |
| MC10 | nije porastao | | |

* Sojevi koji doticanjem kolonija sterilnom mikrobiološkom ušicom formiraju filamentozne rastezljive niti smatraju se potencijalnim producentima EPOL-a i označeni su sa “+” u tablici, dok su oni koji ne formiraju filamentozne niti označeni sa “-“. Oznakom “+/-“ su obilježeni oni sojevi kod kojih je sposobnost rastezanja kolonija bila manje intenzivna. Kao kontrola je korišten soj producent EPOL-a, *Lb. fermentum* D12

4.2. TAKSONOMSKA IDENTIFIKACIJA ODABRANIH IZOLATA MIKROBIOTE MAJČINOŠ MLIJEKA

Kako je između 60 bakterijskih sojeva, koji su dio mikrobne populacije majčinog mlijeka, mogućnost biosinteze EPOL pokazalo više izolata, za daljnu karakterizaciju odabrana su 3 bakterijska soja: MC1, MC9 i AF7; kod kojih je uočen tipičan "ropy" fenotip. Ovi bakterijski sojevi su odabrani kako bi se nakon njihove taksonomske identifikacije provela i karakterizacija specifičnih svojstava koja mogu upućivati na funkcionalnost odnosno iskazivanje poželjnih učinaka na zdravlje domaćina. U prethodnim istraživanjima Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Sveučilišta u Zagrebu ustanovljeno je da 60 novoizoliranih sojeva pripadaju rodovima BMK. Za identifikaciju je primijenjeno sekvencioniranje 16S rRNA pri čemu su korištene početnice UNI16SF i UNI16SR. Geni koji kodiraju za rRNA su među visokokonzerviranim (najmanje varijabilnim) genima u genomu. Međutim, dok su neke regije unutar 16S rRNA molekule jednake kod različitih bakterijskih vrsta, druge se regije razlikuju. Sekvence varijabilnih regija unutar 16S rRNA gena mikroorganizama se mogu međusobno usporediti, čime je moguće odrediti njihovu filogenetičku sličnost, odnosno različitost. Upravo zato, analiza gena koji kodiraju za 16S rRNA (16S rDNA) se najčešće primjenjuje u taksonomiji, odnosno filogenetičkim analizama. Provedena je izolacija genomske DNA iz odabranih autohtonih sojeva BMK mikrobiote majčinog mlijeka MC1, MC9 i AF7, nakon čega se proveo PCR za umnažanje 16S rRNA gena. Rezultati dobiveni izolacijom genomske DNA, izmjereni spektrofotometrijski, prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Koncentracija uzoraka DNA sojeva BMK korištenih za PCR reakciju primjenom početnica UNI16SF i UNI16SR

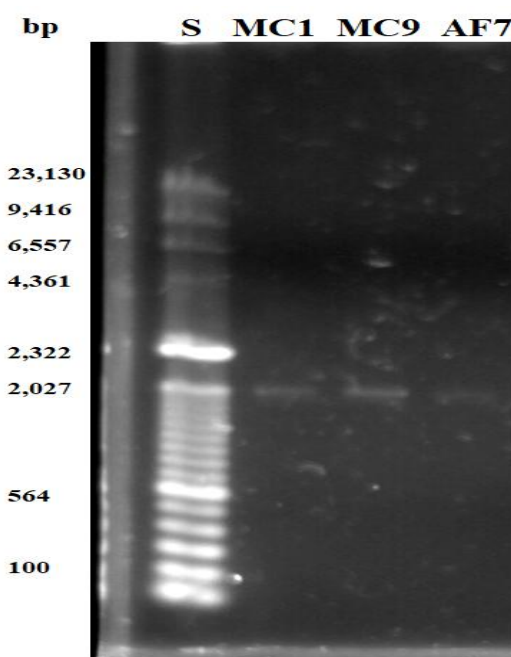
| Uzorak | Koncentracija DNA (ng/ μ L) |
|--------------------------|---------------------------------|
| MC1 | 266.76 |
| MC9 | 446.25 |
| AF7 | 1.69 |
| <i>Lb. fermentum</i> D12 | 460.96 |

Kako bi se uklonio višak nesparenih početnica i slobodnih nukleotida, provedeno je pročišćavanje PCR produkata, nakon čega je određena koncentracija dsDNA spektrofotometrijski (Tablica 7.).

Tablica 7. Koncentracija dsDNA u uzorcima PCR produkata određena nakon pročišćavanja

| Uzorak | Koncentracija dsDNA (ng/ μ l) |
|--------|-----------------------------------|
| MC1 | 3,57 |
| MC9 | 4,43 |
| AF7 | 5,32 |

Dobiveni pročišćeni PCR produkti su razdvojeni u 1,5 %-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 150 V tijekom 1 sata. Standard se sastojao od λ DNA *Hind* III i 100 bp DNA Ladder, a gel je obojan u Diamond boji i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru MiniBis Pro pri valnoj duljini od 254 nm pomoću programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012), što je prikazano na Slici 5. Rezultati gel elektroforeze su potvrdili da je PCR reakcija uspješno provedena jer su vidljive vrpce koje odgovaraju PCR produktima dobivenim umnažanjem DNA kalupa sva tri izolata iz mikrobiote majčinog mlijeka.



Slika 5. Elektroforeza produkata dobivenih PCR metodom s početnicama UNI16SF i UNI16SR nakon pročišćavanja. S – standard, MC1, MC9, AF7 – sojevi BMK izolirani iz majčinog mlijeka.

Nakon što su PCR produkti pročišćeni provedeno je sekvencioniranje 16S rRNA regije. Naime, taksonomska identifikacija je neophodna prilikom istraživanja biotehnološkog potencijala novoizoliranih bakterijskih sojeva, bilo da se odabrani soj koristi za definiranje mogućih probiotičkih učinaka, ili za karakterizaciju uloge u specifičnom ekosustavu poput mikrobioma majčinog mlijeka ili za karakterizaciju odnosno definiranje funkcionalne uloge njegovih specifičnih biomolekula, u ovom slučaju EPOL. S obzirom na funkcionalnost i iskazivanje poželjnih učinaka na zdravlje domaćina, jedan od najvažnijih zahtjeva probiotičkog koncepta je upravo precizna taksonomska identifikacija i funkcionalna karakterizacija soja. Rezultati sekvencioniranja 16S rRNA gena svakog od tri odabrana bakterijska soja izoliranih iz mikrobiote majčinog mlijeka, primjenjeni su za pretraživanje baza podataka koja sadrži javno dostupne podatke o sekvencama drugih bakterijskih sojeva. Korištena je baza podataka NCBI (engl. National Center for Biotechnology Information) i primijenjen je BLAST algoritam (engl. Basic Local Alignment Search Tool) koji omogućuje poravnavanje tražene sekvence sa svim sekvencama prisutnim u bazi podataka te kao rezultat prikazuje popis najuspješnijih podudaranja. Redosljed aminokiselina u 16S rRNA na temelju kojih su autohtoni izolati MC1 i MC9 identificirani prikazan je za svaki pojedini soj na slikama (Slika 6. i Slika 7.).

UNI16F

```
AAAAAGTATGGGTTTCCCGGCATATTACATGCAAGTCGAACGCTGTTGATCCCAATTGATTGAT
GGTGCTTGCACCTGATTGATTTTGGTCGCCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTA
ACCTGCCCAGAAGCGGGGACAACATTAGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTT
CGCATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGCTATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTA
GCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCG
GCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
AATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCT
CTGTTGTTAAAGAAGAACACGTATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAA
GTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGA
GAAGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGTGGAACCTCATGTGTAGCG
GTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTACCTGGTCTGCAACTGA
CGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
CGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCAA
CCCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTACTAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACAACGTCCGAT
CCTCATGCCCTATGACCGTGGCTACACCGTGCTACAAGGGACGGACACCAATTCGCGAACCGC
GAGGCAAGCAATTCTTTAAACCGTTTTTCATTTGGAATGGAGGTGCAATCCCCGCCAAATCGAAA
CCCAAATCCGGAAACCCTGCCCGGGAAAAATTCGCGGCCCTTAAACCCCCCGCCCCCCAAA
ATTTAACCCCAAGCGGGGGGA
```

UNI16R

AAAATGTTATGACTCTTTTCTCGACTGCACATTAGTCATTTGTCCCACCTTAGGCGGCTGGCTCC
TAAAAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA
AGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGC
AGGCGAGTTGCAGCTGCAGTCCGAACGAGTAAAGAGATTTGCTTGCCCTCGCGAG
TTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCACGTCATAAGGGGCATGATGA
TCTGACGTCGTCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAAT
GCTGGCAACTAGTAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCATTGCGTTCCCGAAGGAAACGCCCTATCTCTAGGGTT
GGCGCAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCAC
CGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCAGGCGGA
GTGCTTAATGCGTTAGCTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTT
TACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTTCGAGTCTCAGCGTCA
GTTGCAGACCAGGTAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTA
CACATGGAGTTCCACTACCCTCTTCTGCACTCAAGTTATCCAGTTTCCGATGCACTTCTCCGGTT
AAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAGAAAACCGCCTGCACTCTCTTTACGCCCAATAAATCC
GGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTGG
TTAAATACCGTCAACGTATGAACAGTTACTCTCATAACGTGTTCTTCTTTAACAACAGAGCTTTAC
GAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGGAAGAA
TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCCGGGTCTCAGTCCCATTGTGGGCGAATCAG
TCTCCAAATCGGGATAGGCATCATCCCTTGGGTAGGCCTTTCCCCCCCCAAAACTAAAGGGC
CCGAAGGGCCCTCAAAAAAGAAAAAATAAACCCTTTTTTAAGGTTTTTTTCGGCAAAAA
CACCTGTTTTGGGGGTATAAAAATTTTGTTCCAAAGGTGCCCCCCCTTTGGGGGGGGGCTCC

Slika 6. Redoslijed nukleotida parcijalne sekvence 16S rRNA gena na temelju kojeg je autohtoni izolat MC1 identificiran kao *Lactobacillus fermentum*

UNI16F

GGGGGCTTTACGGCTTTGCTATACTGCAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACC
GGAAAAATAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCCATCACAAGGGGAT
AACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAG
GCGCTTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGCGAGGTAACGGCT
CACCAATGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACG
GCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGAATAAGTCTGACCGAG
CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG
ATGAGAGTAACGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGATAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG
GCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGG
AGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGG
AGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC
AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCC
CCTTCGGAGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCTAGCAA
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTTGACC
TGGGCTACCACCGTGCTACAAGGGGAAGTCAACGAGTTGCGAATTCCCGAGGCTAAGCTAATC

CTTAAAGCTTTCCAGTTCGAATGCAAGCTGCAATCCCCTGGAGAAACCGAAACCCTAAAATCG
GTAAACCCCCCGGGGAAACTTCCCGGCCCTTA

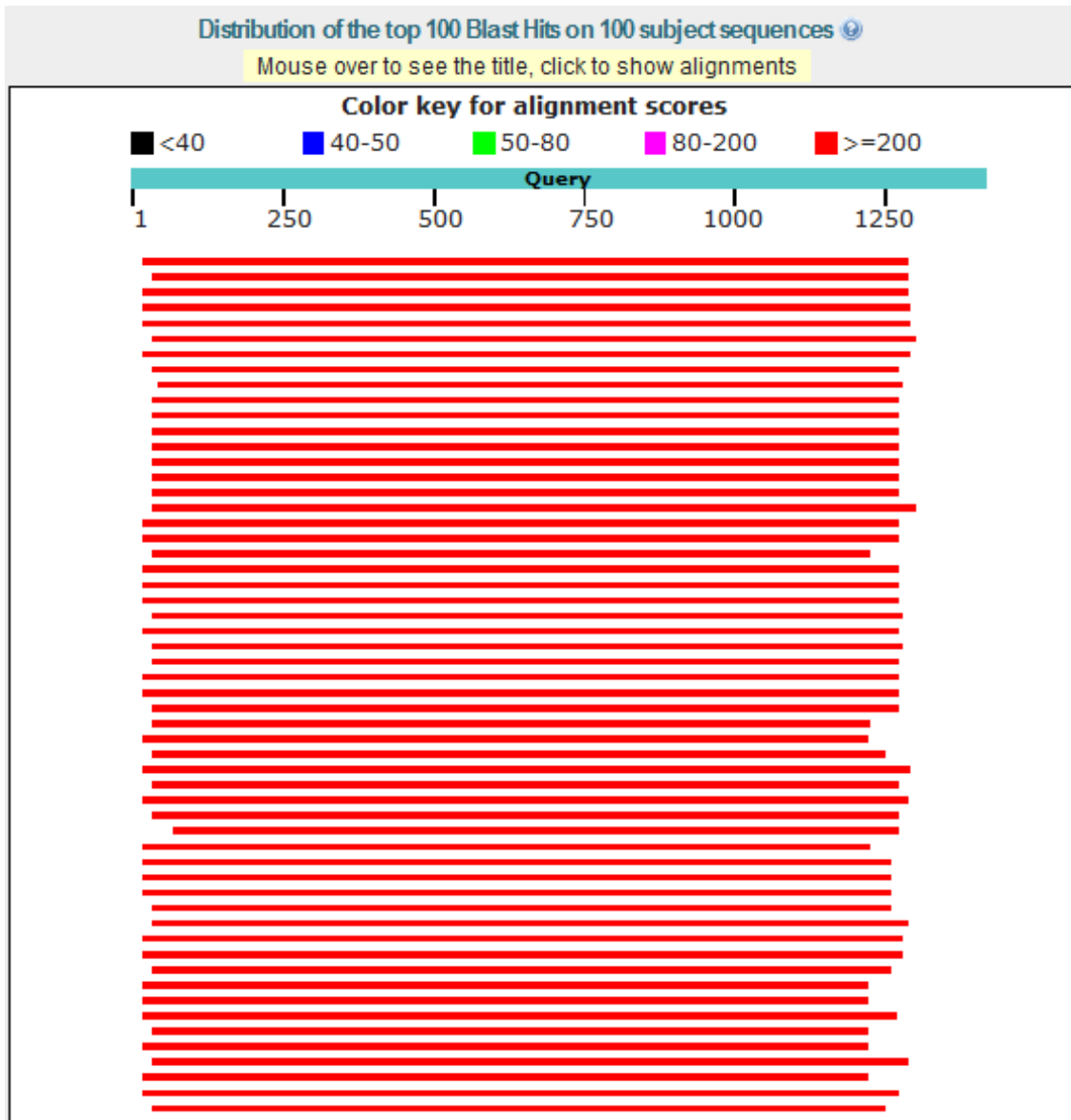
UNI16R

AGAATATATCGTGTGTTTACTACTTCCCCTACTCATCAATCCTACCTTAGGGCGGCTGGCTCAATT
CGGCTACCTCACCGACATCGGGTGTACTAACTCTCTTGGTGTGACGGGTGGTGTGTACAAGGT
CCGGGAACGTATTCACCGCGGGCGTGCTGATCCGCGAGTTTTTCGATTCCGGCTTCATGCAGGTG
AGTTGCACCCTGCAATCCGAACTGAGAGATTTTTTAATAGATTAGCTTACCCTCGCGACTTCGC
AACTCGTTGTACTTTCCATTGTTGCACGTGTTTCGCCCAGGACATAAGGGGAATGATGATTTGA
CGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTTGCTAAAGTGCCCAACTGAATGATG
GCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
ACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGCCCCGAAGGGGAAGCTCTATCTCTATAGTGGTCA
AATGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTIONCCAGGCGGAGTGCTT
AATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGC
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACA
GACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACAT
GGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCC
GGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCCGGAC
AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAG
ATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTCATCCTGTTCTCTCTAACAACAGAAGTTTTACGATC
CGAAACCTTCTCACCTCACGCGGGCGTGCTCGTCAGACTTTCGTCATGCCGAGATTCCTACTGCT
GCCTCCGTAGGAGTTTGGCGGGTTCTCAGTCAAGTTGGGCGAATCACCTCCAGGTCGCTATGC
ATCTGCCTGGTGTGACCGTACCTACCAACATAGCTAATGGACACGC

Slika 7. Redoslijed nukleotida parcijalne sekvence 16S rRNA gena na temelju kojeg je autohtoni izolat MC9 identificiran kao *Enterococcus faecium*.

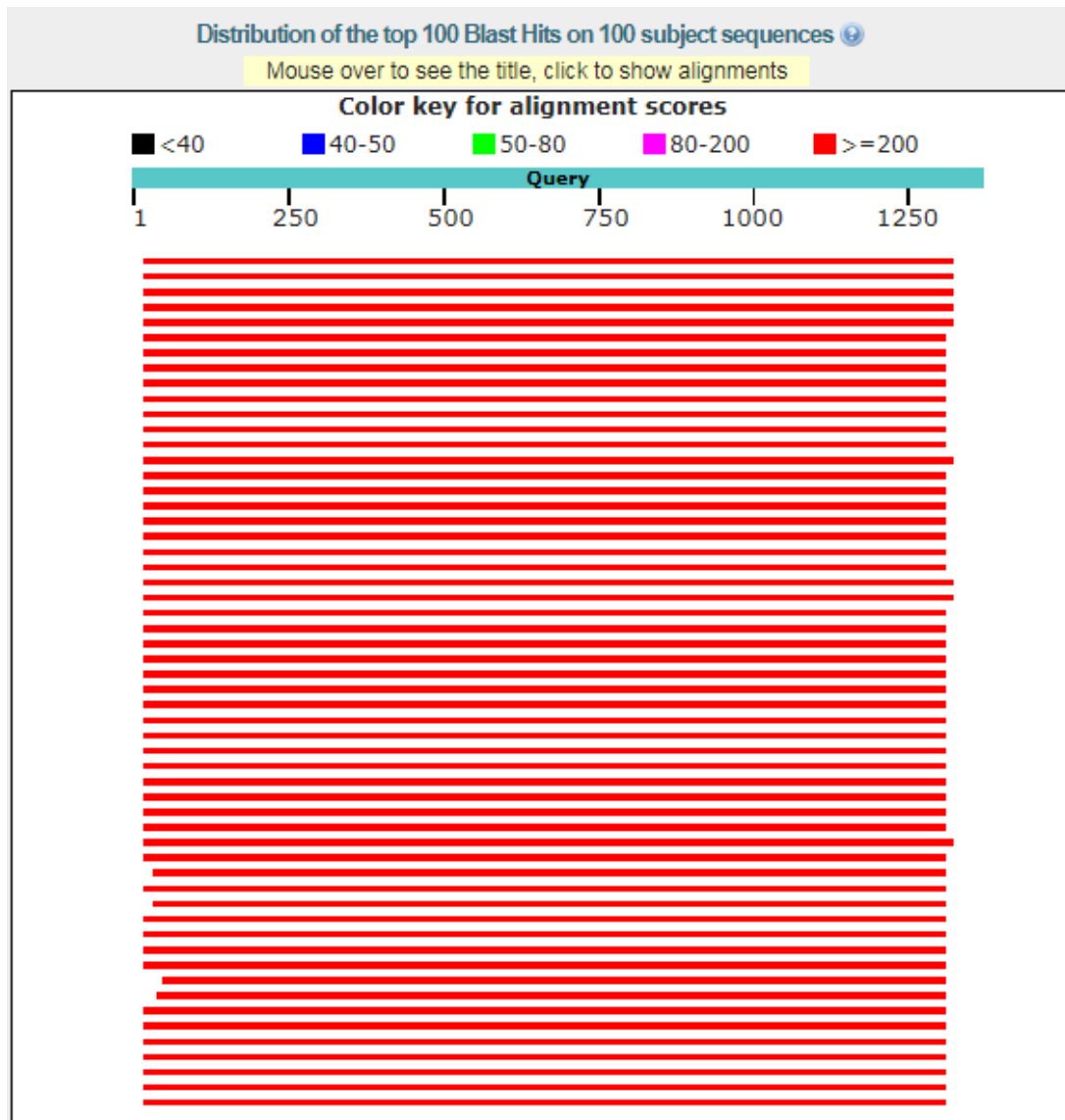
Rezultati poravnanja traženih sekvenci sa sekvencama prisutnim u bazi podataka prikazani su na slikama 8. i 9. Rezultati pretraživanja prikazani su kao crvene horizontalne linije koje predstavljaju homologne sekvence, a ispod tog prikaza nalazi se lista sekvenci poredanih s obzirom na maksimalnu podudarnost, odnosno taksonomska identifikacija bakterijskog soja na osnovu sličnosti 16 S ribosomskih RNA sekvenci.

Autohtoni izolat MC1 BMK identificiran je kao *Lactobacillus fermentum*, dok je autohtoni izolat MC9 BMK identificiran kao *Enterococcus faecium*, a autohtoni izolat AF7 nije identificiran ovim pristupom (Tablica 8.).



| | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--------------------------|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus fermentum strain CIP 102980 16S ribosomal RNA, partial sequence | 2193 | 2193 | 89% | 0.0 | 98.17% | NR_104927.1 |
| <input type="checkbox"/> | Lactobacillus fermentum strain NBRC 15885 16S ribosomal RNA, partial sequence | 2191 | 2191 | 88% | 0.0 | 98.48% | NR_113335.1 |

Slika 8. Izolat MC1 BMK, koji je dio mikrobiote majčinog mlijeka, identificiran kao *Lactobacillus fermentum* primjenom UNI16F i UNI16R početnica tijekom sekvencioniranja 16S rRNA gena.



| | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--------------------------|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> | Enterococcus faecium strain DSM 20477 16S ribosomal RNA, partial sequence | 2242 | 2242 | 94% | 0.0 | 97.78% | NR_114742.1 |
| <input type="checkbox"/> | Enterococcus faecium strain NBRC 100486 16S ribosomal RNA, partial sequence | 2239 | 2239 | 94% | 0.0 | 97.70% | NR_113904.1 |

Slika 9. Izolat MC9 BMK, koji je dio mikrobiote majčinog mlijeka, identificiran kao *Enterococcus faecium* primjenom UNI16F i UNI16R početnica tijekom sekvencioniranja 16S rRNA gena.

Tablica 8. Identifikacija sojeva BMK mikrobiote majčinog mlijeka sekvencioniranjem 16S rRNA

| Izolat BMK | Identifikacija | Postotak identifikacije |
|------------|--------------------------------|-------------------------|
| MC1 | <i>Lactobacillus fermentum</i> | 98.17 % |
| MC9 | <i>Enterococcus faecium</i> | 97.78 % |
| AF7 | n.o. | / |

Ovakvi rezultati su u skladu s istraživanjima koja potvrđuju da su bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus* među najčešće izoliranim sojevima iz mikrobiote majčinog mlijeka za čiju je mikrobnu populaciju karakteristično da sadrži visoki udio BMK i bifidobakterija koje su vjerojatno prvi izvor za komensalne bakterije intestinalnog mikrobioma novorođenčadi (Kozak i sur., 2015).

4.3. KARAKTERIZACIJA SPECIFIČNIH SVOJSTAVA ODABRANIH IZOLATA MIKROBIOTE MAJČINOG MLIJEKA

S obzirom da se EPOL BMK istražuju kao funkcionalne biomolekule, koje mogu imati biološke uloge koje u konačnici mogu rezultirati pozitivnim učincima na zdravlje čovjeka, te kao takve se primijeniti kao bioterapeutici, osim točne taksonomske identifikacije soja BMK, neophodno je ispitati osjetljivost tih mikroorganizama na antibiotike, odnosno isključiti mogućnost prijenosa gena za rezistenciju. Naime, bakterijski sojevi koji se istražuju kao potencijalni probiotici, a koji su izolirani iz majčinog mlijeka, ne smiju imati svojstvo otpornosti na antibiotike, jer ovi sojevi, upravo predstavljaju prvu komensalnu intestinalnu mikrobiotu kod dojenog novorođenčeta, koja ima ključnu ulogu u dugoročnom zdravlju djeteta i kasnije odrasle osobe (Kozak i sur. 2015), odnosno majčino mlijeko ima snažan utjecaj na razvoj intestinalne mikrobiote dojenčadi. Laktobacili, enterokoki i drugi predstavnici BMK, dio su mikrobne populacije GIT, gdje zbog prisutnosti velikog broja mikroorganizama lako dolazi do prijenosa gena odgovornih za antibiotsku rezistenciju. Zbog toga je ispitivanje osjetljivosti potencijalnih probiotičkih sojeva na antibiotike dio općih izbornih kriterija u okviru strogo definiranog probiotičkog koncepta (Šušković i sur., 2001; Đidić i sur., 2008). U ovom radu je ispitana osjetljivost odabranih bakterijskih sojeva na određene antibiotike metodom difuzije u agar s filter diskovima (Tablica 9.), te su izmjerene vrijednosti minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) antibiotika vankomicina i klindamicina potrebne za inhibiciju rasta odabranih bakterijskih sojeva (Tablica 10).

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 9. bakterijski sojevi su uglavnom jako ili srednje osjetljivi na djelovanje većine primjenjenih antibiotika. Soj *Lb. fermentum* MC1 i *Ec. faecium* MC9

pokazali su fenotipski rezistenciju na antibiotik vankomicin, za razliku od soja AF7, koji nije uspješno identificiran sekvencioniranjem 16S rRNA gena, a koji se pokazao osjetljiv na ovaj antibiotik iz skupine inhibitora sinteze stanične stijenke.

Tablica 9. Osjetljivost odabranih BMK mikrobiote majčinog mlijeka i *Lb. fermentum* na različite antibiotike izražena kao promjer zona inhibicije rasta.

| Antibiotici | µg/disk | <i>Lb. fermentum</i> D12 | <i>Lb. fermentum</i> MC1 | <i>Ec. faecium</i> MC9 | Izolat AF7 |
|---|---------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------|
| Promjeri zona inhibicije (mm) | | | | | |
| Inhibitori sinteze stanične stijenke | | | | | |
| Ampicilin | 2 | 32 | 32 | 31 | 20 |
| Bacitracin | 10 | 17 | 17 | 16 | 12 |
| Penicilin G | 1 | 30 | 31 | 28 | 16 |
| Vankomicin | 30 | 0 | 0 | 0 | 17 |
| Inhibitori sinteze proteina | | | | | |
| Kloramfenikol | 30 | 20 | 22 | 22 | 24 |
| Gentamicin | 10 | 9 | 9 | 8 | 0 |
| Klindamicin | 2 | 29 | 28 | 26 | 15 |
| Eritromicin | 15 | 24 | 22 | 21 | 0 |
| Neomicin | 10 | 9 | 9 | 8 | 0 |
| Streptomycin | 10 | 0 | 8 | 0 | 0 |
| Tetraciklin | 10 | 22 | 21 | 19 | 22 |
| Inhibitori sinteze DNA | | | | | |
| Novobiocin | 5 | 12 | 13 | 12 | 12 |

Rezultati E-testa su potvrdili osjetljivost izolata AF7 na vankomicin, za koji je izmjerena vrijednost MIC=2 µg/mL, a fenotipski je otpornost *Lb. fermentum* MC1 i *Ec. faecium* MC9 na vankomicin također potvrđena E-testom (Tablica 10.). Prema rezultatima metode difuzije u agar s filter diskovima autohtoni izolat AF7 iskazuje višestruku rezistenciju i to na antibiotike gentamicin, eritromicin, neomicin te na streptomycin, stoga je zbog aspekta sigurnosti primjene isključen iz daljnjih eksperimenata. Soj *Ec. faecium* MC9 je također pokazao otpornost na streptomycin, no kako ovi antibiotici mogu biti osjetljivi na kisele uvjete, postoji mogućnost da je uslijed sinteze mliječne kiseline, kao primarnog metabolita, došlo do razgradnje molekule streptomicina, koja stoga nije mogla biti aktivna, i zbog toga je izostala pojava zone inhibicije. Otpornost na antibiotike odabranih sojeva, odnosno profile osjetljivosti na odabrane antibiotike, potrebno je dalje potvrditi primjenom molekularno-genetičkih metoda, kao bi se ustanovilo da li fenotipski uočena otpornost na pojedine antibiotike ima genotipske temelje.

Prema literaturi, mnoge bakterije iz roda *Lactobacillus* imaju urođenu rezistenciju na antibiotik vankomicin, koja nije prenosiva na druge bakterijske sojeve, kao što to može biti slučaj kod nekih vankomicin - rezistentnih vrsta iz roda *Lactobacillus* i *Enterococcus* (Bernardeau i sur., 2008). Naime, smatra se da je struktura peptidoglikana stanične stijenke laktobacila odgovorna za rezistenciju ovih sojeva na glikopeptidne antibiotike (Belen Florez i sur., 2005). Rezistencija na vankomicin kod *Lactobacillus* sojeva smatra se urođenom. Međutim, rezistenciju na vankomicin kod vrsta iz roda *Enterococcus* treba dodatno provjeriti primjenom molekularno-genetičkih metoda, da bi se isključila prisutnost gena za rezistenciju na vankomicin koji su prenosivi.

Tablica 10. Minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) antibiotika vankomicina i klindamicina odabranih BMK mikrobiote majčinog mlijeka i *Lb. fermentum* D12 određene E-testom

| Antibiotici | D12 | MC1 | MC9 | AF7 |
|------------------|-------|-------|-------|-----|
| | MIC | | | |
| Vankomicin (VA) | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Klindamicin (DA) | 0,016 | 0,023 | 0,023 | 1 |

Budući da EPOL probiotičkih sojeva iskazuju svojstva koja im omogućuju interakciju sa intestinalnom mikrobiotom, primjerice inhibicijsko djelovanje prema nepoželjnim mikroorganizmima, metodom s dvostrukim slojem agara ispitano je antibakterijsko djelovanje odabranih izolata MC1, MC9, AF7, koji su dio mikrobiote majčinog mlijeka, na pojedine test mikroorganizme; *Lb. brevis* ZG1, *Lb. plantarum* ZG1C, *Ec. faecium* L3 i *Lc. lactis* ZG7-10. S obzirom da se smatra da su EPOL bakterijski metaboliti koji pokazuju pozitivne učinke za domaćina, željelo se ispitati da li ovi sojevi, kao potencijalni proizvođači EPOL-a, ne djeluju inhibitorno na druge BMK, koje su dio intestinalne mikrobiote crijeva. Prednost ove metode, u odnosu na ostale, kojima se ispituje antibakterijska aktivnost supernatanta, je u tome što mikroorganizam producent tijekom rasta luči antimikrobne supstancije direktno u podlogu na kojoj se testira inhibicija rasta test-mikroorganizma (Brkić, 1995). Zone inhibicije označavaju antibakterijsko djelovanje ispitanog soja prema ispitanim BMK.

Efektivni inhibicijski omjeri, koji uključuju promjere zona porasle kulture čije se antimikrobno djelovanje ispituje i promjere zona inhibicije korištenih test-mikroorganizama, pokazuju da svi sojevi vrlo slabo inhibiraju ili uopće ne inhibiraju test-mikroorganizme, s iznimkom test-mikroorganizma *Ec. faecium* L3 prema kojem su svi sojevi iskazali srednju inhibiciju (Tablica 11.) S obzirom na dobivene rezultate, može se zaključiti da antimikrobno djelovanje ispitanih bakterijskih sojeva, izolata koji su dio mikrobiote majčinog mlijeka,

MC1, MC9 i AF7, potječe prvenstveno od nespecifičnog inhibicijskog utjecaja mliječne kiseline, koja je primarni metabolit BMK. Na temelju određenih efektivnih inhibicijskih omjera (EIR) ustanovljeno je da odabrani sojevi imaju različiti spektar antimikrobnog djelovanja prema srodnim bakterijama iz roda *Lactobacillus* i *Enterococcus*. Zanimljivo je ustanoviti da vrijednosti EIR određene prilikom ispitivanja antibakterijskog djelovanja izolata AF7 prema 3 različita soja iz roda *Lactobacillus*, iznose =0, a jedino u slučaju *Ec. faecium* L3, ova vrijednost iznosi 0,5, što zajedno s prijašnjim rezultatima prilikom ispitivanja osjetljivosti na antibiotike, i nemogućnosti identifikacije s 16S rRNA, doprinosi zaključku da AF7 vjerojatno ne pripada BMK.

Tablica 11. Antibakterijsko djelovanje odabranih BMK mikrobiote majčinog mlijeka prema srodnim BMK izraženo efektivnim inhibicijskim omjerom (EIR) na temelju određenih vrijednosti promjera porasle bakterijske kulture (CD) i promjer zone inhibicije rasta (ID).

| Bakterijski sojevi | efektivni inhibicijski omjer (EIR) | | | |
|--------------------------|--|------------------------------------|---|--|
| | <i>Lb. brevis</i> ZG1 | <i>Lb. plantarum</i> ZG1C | <i>Lc. lactis</i> ZG7-10 | <i>Ec. faecium</i> L3 |
| <i>Lb. fermentum</i> D12 | ID = 1,1 cm CD = 0,9 cm EIR = 0,22 | ID = 0 CD = 0 EIR = 0 | ID = 1,2 cm CD = 1 cm EIR = 0,2 | ID = 1,5 cm CD = 0,9 cm EIR = 0,67 |
| <i>Lb. fermentum</i> MC1 | ID = 1,1 cm CD = 0,9 cm EIR = 0,22 | ID = 0 CD = 0 EIR = 0 | ID = 1,2 cm CD = 1 cm EIR = 0,2 | ID = 1,2 cm CD = 0,7 cm EIR = 0,714 |
| <i>Ec. faecium</i> MC9 | ID = 1,1 cm CD = 0,8 cm EIR = 0,375 | ID = 0 CD = 0 EIR = 0 | ID = 1,1 cm CD = 0,9 cm EIR = 0,22 | ID = 1,5 cm CD = 0,9 cm EIR = 0,67 |
| Izolat AF7 | ID = 0 cm CD = 0,7 cm EIR = 0 | ID = 0 CD = 0 EIR = 0 | ID = 0 CD = 0 EIR = 0 | ID = 1,2 cm CD = 0,8 cm EIR = 0,5 |

Sojevi *Lb. fermentum* MC1 i *Ec. faecium* MC9 iskazuju različiti spektra antimikrobnog djelovanja, a prema vrijednostima EIR ne iskazuju značajno inhibicijsko djelovanje prema srodnim bakterijama iz roda *Lactobacillus* i *Enterococcus*, čiji su predstavnici dio mikrobne populacije majčinog mlijeka. Ovo svojstvo ide u prilog njihovoj funkcionalnoj ulozi, a za daljnju karakterizaciju mikrobnog antagonizma odabranih sojeva, ispitat će se inhibicijski učinak prema nepoželjnim bakterijskim sojevima. Daljnja istraživanja će se provesti s ciljem detaljne karakterizacije funkcionalnosti odabranih bakterija.

5. ZAKLJUČCI

1. Kako je između 60 ispitanih izolata mikrobiote majčinog mlijeka, *in vitro* selekcijom ustanovljena mogućnost biosinteze EPOL kod većeg broja bakterijskih sojeva, može se pretpostaviti da ove makromolekularne strukture na površini bakterijske stanice imaju ulogu funkcionalnih biomolekula prilikom interakcija, koje se ostvaruju unutar mikrobne populacije majčinog mlijeka, a koje mogu imati mogući učinak i prilikom stvaranja prve intestinalne mikrobiote dojenog djeteta.
2. Sojevi *Lactobacillus fermentum* MC1 i *Enterococcus faecium* MC9 identificirani 16S rRNA sekvencioniranjem, pokazali su fenotipski rezistenciju na antibiotik vankomicin, što je tipična značajka bakterija iz roda *Lactobacillus*, dok je genetičke osnove rezistencije potrebno detaljno okarakterizirati molekularno-genetičkim metodama. Neidentificirani autohtoni izolat AF7, iskazao je višestruku rezistenciju na različite antibiotike, stoga je isključen iz daljnjih istraživanja.
3. Na temelju vrijednosti efektivnih inhibicijskih omjera (EIR) ustanovljeno je da se odabrani sojevi odlikuju različitim spektrom antimikrobnog djelovanja, prema kojem odabrani izolati ne iskazuje značajno inhibicijsko djelovanje prema srodnim bakterijama iz roda *Lactobacillus* i *Enterococcus*, čiji su predstavnici dio mikrobne populacije majčinog mlijeka.

6. LITERATURA

Akalin, A. S., Gonc, S., Duzel, S. (1997) Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. *J Dairy Sci.* **80**, 2721-2725.

Allonsius, C. N., van den Broek, M. F. L., De Boeck, I., Kiekens, S., Oerlemans, E. F. M., Kiekens, F., Foubert, K., Vandenheuvei, D., Cos, P., Delputte, P., Lebeer, S. (2017) Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. *Microb. Biotechnol.* **10**, 1753–1763. doi: 10.1111/1751-7915.12799

Anwar, M. A., Kralj, S., Pique, A. V., Leemhuis, H., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L. (2010) Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology.* **156**(4), 1264–1274.

Arendt, E.K., Lam, R., Dal Bello, F. (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food. Microbiol.* **24**, 165–174. doi:10.1016/J.Fm.2006.07.011

Arvans, D. L., Vavricka, S. R., Ren, H., Musch, M. W., Kang, L., Rocha, F. G., Lucioni, A., Turner, J.R., Alverdy, J., Chang, E. B. (2005) Luminal bacterial flora determines physiological expression of intestinal epithelial cytoprotective heat shock proteins 25 and 72. *Am. J. Physiol-Gastr. L.* **288**(4), G696–G704.

Asakuma, S., Hatakeyama, E., Urashima, T., Yoshida, E., Katayama, T., Yamamoto, K., Kumagai, H., Ashida, H., Hirose, J., Kitaoka, M. (2011) Physiology of Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Infant Gut-associated Bifidobacteria. *J. Biol. Chem.* **286** (40), 34583–34592.

Aslim, B., Onal, D., Beyatli, Y. (2007) Factors influencing autoaggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from handmade yogurt. *J. Food. Prot.* **70**, 223–227. doi: 10.4315/0362-028X-70.1.223

Belén Flórez, A., Delgado, S., Mayo, B. (2005) Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canad. J. Microbiol.* **51**, 51-58.

Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 278-285.

- Brkić, B. (1995) Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline, Magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Welker, D.L. (2001) Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *Int. Dairy J.* **11**, 433–439. doi:10.1016/S0958-6946(01)00084-X
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**(Database), D233–D238
- Castro-Bravo, N., Hidalgo-Cantabrana, C., Rodriguez-Carvajal, M. A., RuasMadiedo, P., Margolles, A. (2017) Gene replacement and fluorescent labeling to study the functional role of exopolysaccharides in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Front. Microbiol.* **8**, 1405. doi: 10.3389/fmicb.2017.01405
- Castro-Bravo, N., Wells, J.M., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. (2018) Interactions of Surface Exopolysaccharides From *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Within the Intestinal Environment. *Front. Microbiol.* **9**, 2426.
- Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **87**, 113–130.
- Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A., Rodríguez, J. M. (2009) Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**(5), 523–528. doi:10.1111/j.1472-765x.2009.02567.x
- Dal Bello, F., 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. doi: 10.1078/0723-2020-00033
- De Vuyst, L., Degeest, B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 153–177.

Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., Nampoothiri, K. M. (2015) Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT - Food Science and Technology*. **64**(2), 1179–1186.

Duboc, P., Mollet, B. (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* **11**, 759–768. doi:10.1016/S0958-6946(01)00119-4

Đidić, S., Šušković, J., Kos B. (2008) Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol. Biotechnol.* **46**, 11-21.

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

FAO-WHO, Food and Agriculture Organization-World Health Organization (2006). “Probiotics in foods. health and nutritional properties and guidelines for evaluation,” u FAO Food and Nutritional Paper No. 8592-5-105513-0.

Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Moldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., Rodriguez, J.M. (2013) The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* **69**, 1–10.

Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., Mcsweeney, P.L.H., O'mahony, J.A. (2015) Chemistry and biochemistry of fermented milk products. U: Dairy chemistry and biochemistry, Springer Int Publ. p 547–567.

Freitas, F., Alves, V.D., Reis, M. A .M. (2011) Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* **29**, 388–398. doi:10.1016/J.Tibtech.2011.03.008

Galle, S., Schwab, C., Dal Bello, F., Coffey, A., Gänzle, M.G., Arendt, E.K. (2012) Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 105–112.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G. (2017) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75

Gronlund, M.M., Grześkowiak, Ł., Isolauri, E., Salminen, S. (2011) Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant. *Gut Microbes* **2**, 227–233.

Gruter, M., Leeflang, B. R., Kuiper, J., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. (1992) Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carbohydr. Res.* **231**, 273–291.

Hancock, R.E.W. i Scott, M.G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(16), 8856–8861.

Harmsen, H.J., Wildeboer–Veloo, A. C. M., Raangs, G. C., Wagendorp, A., Klijn, N., Bindels, J.G., Welling, G.W. (2012) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**, 61–67.

Katina, K., Maina, N.H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L., Tenkanen, M., Laitila, A. (2009) In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiol.* **26**, 734–743.

Kitazawa, H., Yamaguchi, T., Itoh, T. (1992) B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming, encapsulated *Lactococcus Lactis* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* **75**, 2946-2951.

Korakli, M., Gänzle, M.G., Vogel, 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

Kozak, K., Charbonneau, D., Sanozky-Dawes, R., Klaenhammer, T. (2015) Characterization of bacterial isolates from the microbiota of mothers' breast milk and their infants. *Gut Microbes*, **6**:6, 341-351.

Kumar, A.S., Mody, K., Jha, B. (2007) Bacterial exopolysaccharides—aperception. *J. Basic Microbiol.* **47**, 103–117.

La Ragione, R. M., Narbad, A., Gasson, M. J., Woodward, M. J. (2004) *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 197–205. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01474.x

Laiño, J., Villena, J., Kanmani, P., Kitazawa, H. (2016) Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria exopolysaccharides: new insights into molecular interactions with host cells. *Microorganisms.* **4**, 27.

LaTuga, S., Stuebe, A., Seed, P.C. (2014) A Review of the Source and Function of Microbiota in Breast Milk. *Semin. Reprod. Med.* **32**, 68–73.

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. *Microbial. Biotechnol.* **4**, 368–374.

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

Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L. (2013) Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *J. Biotechnol.* **163**(2), 250–272.

Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Ross, R. P., Stanton. C. (2017) Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Front. Microbiol.* **8**, 846.

- Maldonado, J., Lara-Villoslada, F., Sierra, S., Sempere, L., Gómez, M., Rodríguez, J. M., Boza, J., Xaus, J., Olivares, M. (2010) Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in 6-month-old children. *Nutrition*. **26**(11-12), 1082–1087.
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., de La Cochetiere, M.-F. (2013) Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.* **21**(4), 167–173. doi:10.1016/j.tim.2012.12.001
- Riaz Rajoka, M. S., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J., Hussain, N. (2018) Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. *LWT*, **89**, 638–647.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* **104**, S1–S63. doi: 10.1017/S0007114510003363
- Rohm, H., Schmid, W. (1993) Influence of dry matter fortification on flow properties of yogurt. *Eval Flow Curves Milchwissenschaft* **48**, 556–560.
- Rohm, H., Kovac, A. (1994) Effects of starter cultures on linear viscoelastic and physical properties of yogurt gels. *J. Texture Stud.* **25**, 311–329.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., Salminen, S. (2006) Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* **69**, 2011–2015. doi: 10.4315/0362-028X-69.8.2011
- Ryan, P.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Caplice, N.M., Stanton, C. (2015) Sugarcoated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Funct.* **6**, 679–693.

Salazar, N., Gueimonde, M., Hernández-Barranco, A. M., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C. G. (2008) Exopolysaccharides produced by intestinal *Bifidobacterium* strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4737–4745. doi: 10.1128/AEM.00325-08

Salazar, N., Binetti, A., Gueimonde, M., Alonso, A., Garrido, P., González del Rey, C., Gonzalez, C., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C.G. (2011) Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA E44 orally administered to Wistar rats. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 342–351.

Salazar, N., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., Ruas-Madiedo, P. (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 1440–1453. doi: 10.1080/10408398.2013.770728

Schwab, C., Mastrangelo, M., Corsetti, A., Gänzle, M. (2008) Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in sorghum sourdoughs. *Cereal Chem.* **85**, 679–684.

Soh, S. H., Kim, S. C., Lee, P. S. (2003) A new *in Vitro* assay of cholesterol adsorption by food and microbial polysaccharides. *J. Med. Food.* **6**(3), 225-230.

Symonds, E. L., O'Mahony, C., Laphorne, S., O'Mahony, D., Sharry, J. M., O'Mahony, L., Shanahan, F. (2012) *Bifidobacterium infantis* 35624 protects against salmonella-induced reductions in digestive enzyme activity in mice by attenuation of the host inflammatory response. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **3**:e15. doi: 10.1038/ctg.2012.9

Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* **39**, 227-235.

Tok, E., Aslim, B. (2010) Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiol. Immunol.* **54**, 257 - 264.

Vaishampayan, P. A., Kuehl, J. V., Froula, J. L., Morgan, J. L., Ochman, H., Francino, M. P. (2010) Comparative Metagenomics and Population Dynamics of the Gut Microbiota in Mother and Infant. *Genome Biol. Evol.* **2**, 53–66. doi:10.1093/gbe/evp057

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., Arendt, E. K. (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biot.* **100** (3), 1121–1135.

Živković, M., Hidalgo-Cantabrana, C., Kojic, M., Gueimonde, M., Golic, N., Ruas-Madiedo, P. (2015) Capability of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-producing isogenic strain NB1, to counteract the effect of enteropathogens upon the epithelial cell line HT29-MTX. *Food Res. Int.* **74**, 199–207. doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.012

Živković, M., Miljković, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M. B., Veljović, K., Tolinački, M., Soković, S., Korać, A., Golić, N. (2016) EPS-SJ exopolysaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* **7**, 286. doi: 10.3389/fmicb.2016.00286

Izjava o izvornosti

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.

Ena Makovec

Ime i prezime studenta