

# Egzopolisaharidi kao funkcionalne biomolekule probiotičkih bakterija

---

**Begić, Darija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:532347>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Darija Begić**

7646/BT

**EGZOPOLISAHARIDI KAO FUNKCIONALNE BIOMOLEKULE  
PROBIOTIČKIH BAKTERIJA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 4

**Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:** „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.)

**Mentor:** Prof. dr. sc. Jasna Novak

**Zagreb, 2020.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pročelnice prof. dr.sc. Jagode Šušković, a pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009), voditeljice prof.dr.sc. Blaženke Kos.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija**

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

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

### **Egzopolisaharidi kao funkcionalne biomolekule probiotičkih bakterija**

**Darija Begić, 0058213137**

**Sažetak:** Bakterije mliječne kiseline (BMK) sintetiziraju spektar polisaharida koji se odlikuju raznolikošću u strukturi, sastavu gradivnih podjedinica i mehanizmom biosinteze. Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava ovi polimeri se industrijski primjenjuju za poboljšanje teksture i senzorskih svojstava fermentiranih proizvoda. No osim doprinosa tehnološkim aspektima, egzopolisaharidi BMK imaju funkciju zaštitnog sloja koji određuje i karakteristike površine bakterijske stanice, a značajni su za preživljavanje probiotičkih sojeva prilikom prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT) domaćina. Pretpostavlja se da ove površinske biomolekule posreduju prilikom interakcija bakterijske stanice s mikrookolišem, a istražuje se potencijalna biološka uloga u imunomodulaciji, antioksidativnom, antimikrobnom, čak antitumorskom djelovanju probiotičkih bakterija. Zbog specifične kemijske strukture ne razgrađuju se u GIT, te u kolonu domaćina mogu biti izvor supstrata za korisne bakterijske vrste iz roda *Bifidobacterium* gdje selektivno potiču njihov rast i tako posreduju u modulaciji sastava intestinalne mikrobiote. U kolonu mogu biti izvor ugljika i za druge predstavnike intestinalne mikrobiote koji ih fermentiraju do kratkolančanih masnih kiselina (engl. short-chain fatty acids; SCFA) poput butirata, propionata i acetata koje su značajne u snabdjevanju energije stanica intestinalnog epitela, modulaciji metaboličkih puteva, inhibiciji intestinalnih patogena i imunomodulaciji.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, funkcionalne biomolekule, egzopolisaharidi, probiotici

**Rad sadrži:** 26 stranica, 4 slike, 0 tablica, 61 literaturni navod, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

**Datum obrane:** 15. rujan 2020.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Bachelor thesis**

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

**Department of biochemical engineering  
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology**

**Exopolysaccharides as functional biomolecules of the probiotic bacteria**

**Darija Begić, 0058213137**

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) synthesize a spectrum of polysaccharides characterized by diversity in structure, the composition of repeating units and mechanism of biosynthesis. Due to their physical-chemical properties, these polymers have an industrial application to improve the texture and sensory properties of fermented products. In addition to contributing to technological aspects, LAB exopolysaccharides have the function of a protective layer that determines the characteristics of the bacterial cell surface and promote the survival of probiotic strains in the gastrointestinal tract (GIT) of the host. These surface biomolecules mediate bacterial cell-microenvironment interactions. Their potential roles in immune response, antioxidant, antimicrobial, and even antitumor activities of probiotic bacteria are investigated. Due to their specific chemical structure, exopolysaccharides are not digested in the upper GIT, and in the colon can be a source of substrates for beneficial *Bifidobacterium* strains and also can be utilized by other specific beneficial members of the gut microbiota with the influence on intestinal microbiota composition. In colon some representatives of the intestinal microbiota ferment them to short-chain fatty acids (SCFA) such as butyrate, propionate and acetate, which are important in supplying energy to intestinal epithelial cells, modulating metabolic pathways, inhibition of intestinal pathogens and immune response.

**Keywords:** exopolysaccharides, functional biomolecules, lactic acid bacteria, probiotic

**Thesis contains:** 26 pages, 4 figures, 0 tables, 61 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

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

**Defence date:** September 15<sup>th</sup> 2020

## **SADRŽAJ**

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Biosinteza egzopolisaharida sojeva bakterija mliječne kiseline .....	2
2.2. Interakcije egzopolisaharida probiotičkih bakterija s intestinalnom mikrobiotom.....	9
2.3. Egzopolisaharidi probiotičkih bakterija u modulaciji imunološkog odgovora .....	13
2.4. Uloga egzopolisaharida u adheziji .....	15
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>18</b>
<b>4. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>20</b>
<b>5. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>21</b>

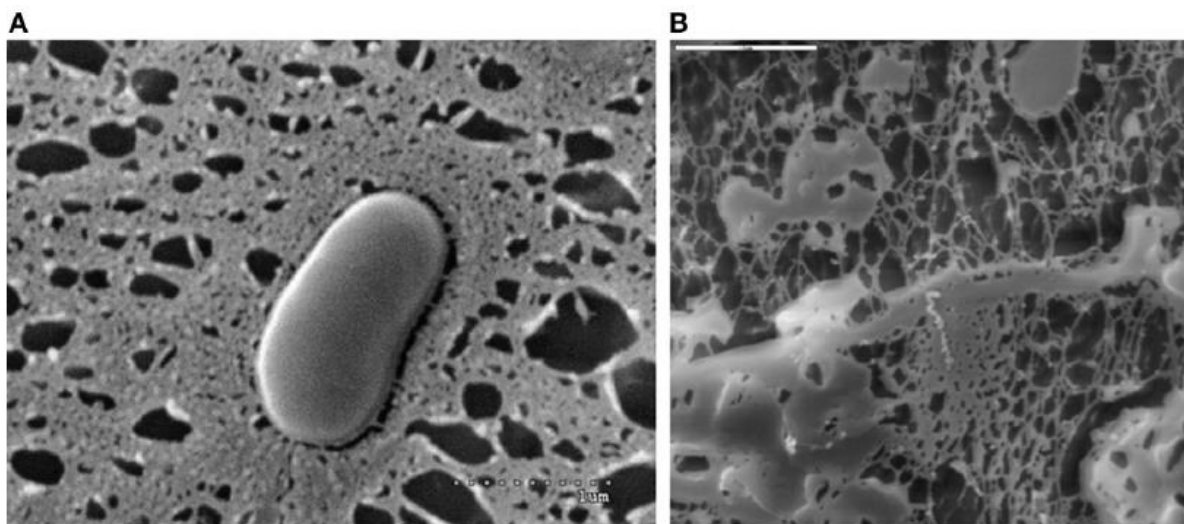
## 1.UVOD

Egzopolisaharidi su polimeri sastavljeni od ugljikohidratnih podjedinica, a nalaze se s vanjske strane površine stanične stijenke bakterija koje ih sintetiziraju. Kod bakterija mliječne kiseline (BMK), koje u intestinalnom traktu iskazuju probiotičku aktivnost, egzopolisaharidi mogu imati funkciju površinskog zašitnog sloja, ali pretpostavlja se da posreduju prilikom interakcija bakterijske stanice s mikrokolišem. Spoznaje o biosintetskom putu egzopolisaharida u stanici BMK i razvoj metoda genetičkog inženjerstva omogućili su karakterizaciju mogućih molekularnih interakcija egzopolisaharida i intestinalne sluznice domaćina što obuhvaća i interakcije s prisutnom intestinalnom mikrobiotom i tjelesnim stanicama domaćina. Pretpostavlja se da pojedini receptori za prepoznavanje ugljikohidrata u intestinalnom epitelu specifično prepoznaju bakterijskim egzopolisaharidima i posreduju u imunomodulaciji. No znanstveno je dokazano da egzopolisaharidi imaju značajnu zašitnu ulogu u otpornosti bakterijske stanice u intestinalnom traktu. Pojedine istraživačke grupe kontinuirano istražuju povezanost probiotičkih učinaka bakterijskih sojeva koji sintetiziraju egzopolisaharide s formiranjem biofilma za koji se pretpostavlja da doprinosi zaštiti od patogena i/ili patogenih toksina, no formiranje biofilma probiotičkih sojeva *in vivo* nije u potpunosti dokazano (Castro-Bravo i sur., 2018). Intestinalne bakterije koje su u komensalnom odnosu s BMK, a koje vjerojatno sintetiziraju bakterijske metabolite s pozitivnim učinkom na intestinalno zdravlje domaćina, prvenstveno kratkolančane masne kiseline, mogu koristiti određene egzopolisaharide kao fermentabilne izvore ugljika. Iako se provodi veliki broj znanstvenih istraživanja o funkcionalnoj ulozi ovih površinskih biomolekula prilikom interakcija probiotičkih bakterija s intestinalnim receptorima i mikrobiotom, demonstriranje funkcionalnosti egzopolisaharida *in vivo* je znanstveni izazov, čija bi karakterizacija omogućila primjenu probiotičkih sojeva producenata egzopolisharida kao živih terapijski pripravaka za promociju zdravlja domaćina (Castro-Bravo i sur., 2018). Cilj ovog rada je dati sažeti prikaz osnovnih karakteristika egzopolisaharida BMK, a prvenstveno probiotičkih sojeva kao bi se ustanovila poveznica biološke uloge egzopolisaharida s funkcionalnošću soja producenta, odnosno poveznica sa specifičnih svojstvima poput adhezije ili imunomodulacijskog djelovanja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Biosinteza egzopolisaharida sojeva bakterija mliječne kiseline

BMK sintetiziraju dva tipa egzopolisaharida, homopolisaharide i heteropolisaharide, koji se razlikuju po kemijskom sastavu i biosintetskim putevima (Zannini i sur., 2016). Homopolisaharidi su sastavljeni od ponavljajućih podjedinica ili glukoze ili fruktoze, a ovisno o tipu glikozidnih veza mogu biti  $\alpha$ -glukani,  $\beta$ -glukani ili  $\beta$ -fruktani (Slika 2.) (Dertli i sur., 2018). Saharoza je donor supstrata za enzime glikozil-hidrolazne skupine, glucansucrases i fructansucrases, koji se nalaze s vanjske strane površine bakterijske stanice te kataliziraju sintezu  $\alpha$ -glukana ili  $\beta$ -fruktana (Castro-Bravo i sur., 2018). Glukozil-transferaze sintetiziraju  $\beta$ -glukane iz aktivirane UDP-glukoze (Castro-Bravo i sur., 2018). Heteropolisaharidi se sastoje od ponavljajućih jedinica monosaharida D-glukoze, D-galaktoze i L-ramnoze, a pojedini egzopolisaharidi u strukturi sadrže i N-acetilirane monosaharide poput N-acetil glukozamina, N-acetil galaktozamina, fukoze, glukuronske kiseline, glicerola i manoze (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2014). Heteropolisaharidi su raznovrsne molekule s obzirom na činjenicu da mogu biti razgranati ili nerazgranati, neutralni ili s nabojem, sa širokim rasponom glikozidnih veza te s ne-ugljikohidratnim komponentama, a dva glukozna ostatka mogu biti povezana na 30 različitih načina (Laine, 1994).

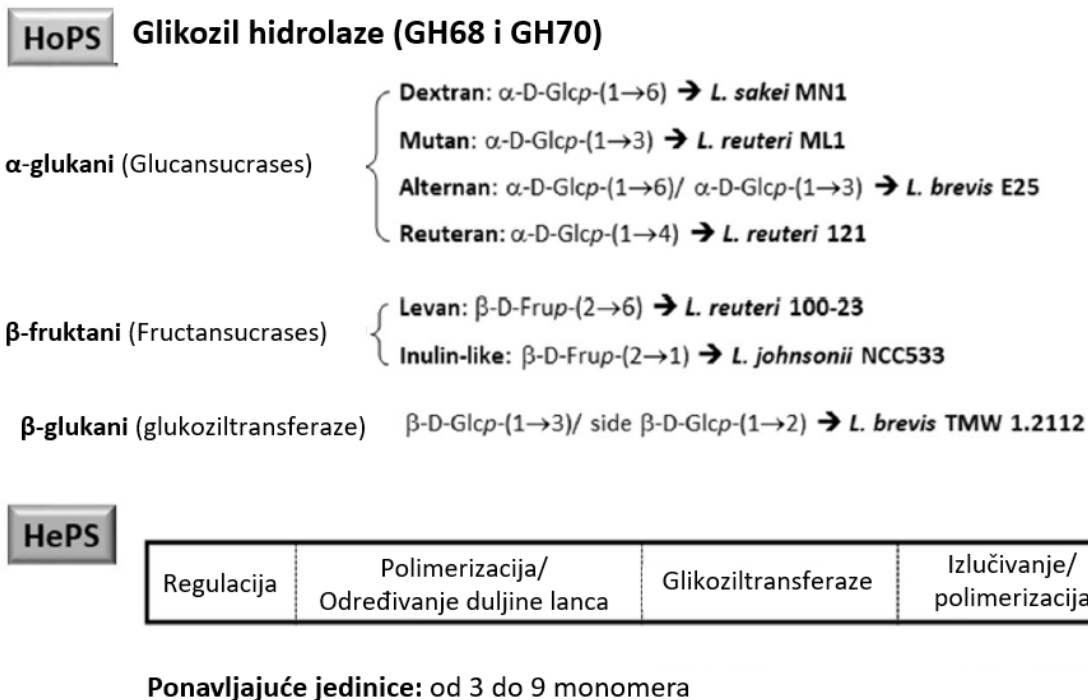


**SLIKA 1.** A) Soj producent egzopolisaharida *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* S89L pod elektronskim mikroskopom, B) Izlučeni egzopolisaharidi (Castro-Bravo i sur., 2018)

Kemijska karakterizacija heteropolimera uključuje primjenu različitih tehnika kako bi se između ostalog odredila i kompozicija monomera, tip glikozidnih veza te položaj i duljina bočnih lanaca. Za definiranje potpune strukture ponavljajućih jedinica primjenjuje se potencijal



nuklearne magnetske rezonance (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2012). Kod sojeva BMK do sada je opisano više od pedeset različitih struktura ponavljajućih jedinica egzopolisaharida primjenom nuklearne magnetske rezonance (Oleksy i Klewicka, 2018). Dokazane su specifične strukture EPOL, koje sadrže od tri do devet monomera, a koje se razlikuju na razini roda ili vrste, odnosno ustanovljena je njihova biosinteza kod pojedinog soja producenta. Biosinteza heteropolisaharida kompleksnija je od homopolisaharida jer uključuje aktivnost nekolicine *eps* gena organiziranih u genske nakupine (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2014). Nakupine *eps* gena kodiraju za glikozil-transferaze koje kataliziraju reakcije biosinteze ponavljajućih strukturnih jedinica, zatim proteine-enzime koji kataliziraju polimerizaciju ponavljajućih jedinica i njihov transport van bakterijske stanice te za gene s još nerazjašnjenim funkcijama, uključujući i pokretne genetičke elemente (Jiang i Yang, 2018). Kod pojedinih BMK pretpostavlja se da su nakupine gena za biosintezu EPOL okarakterizirane kao što je prikazano na slici 2.



**SLIKA 2.** Glavne skupine homopolisaharida (HoPS) i shematski prikaz enzima uključenih u sintezu heteropolisaharida (HePS) (Castro-Bravo i sur., 2018)

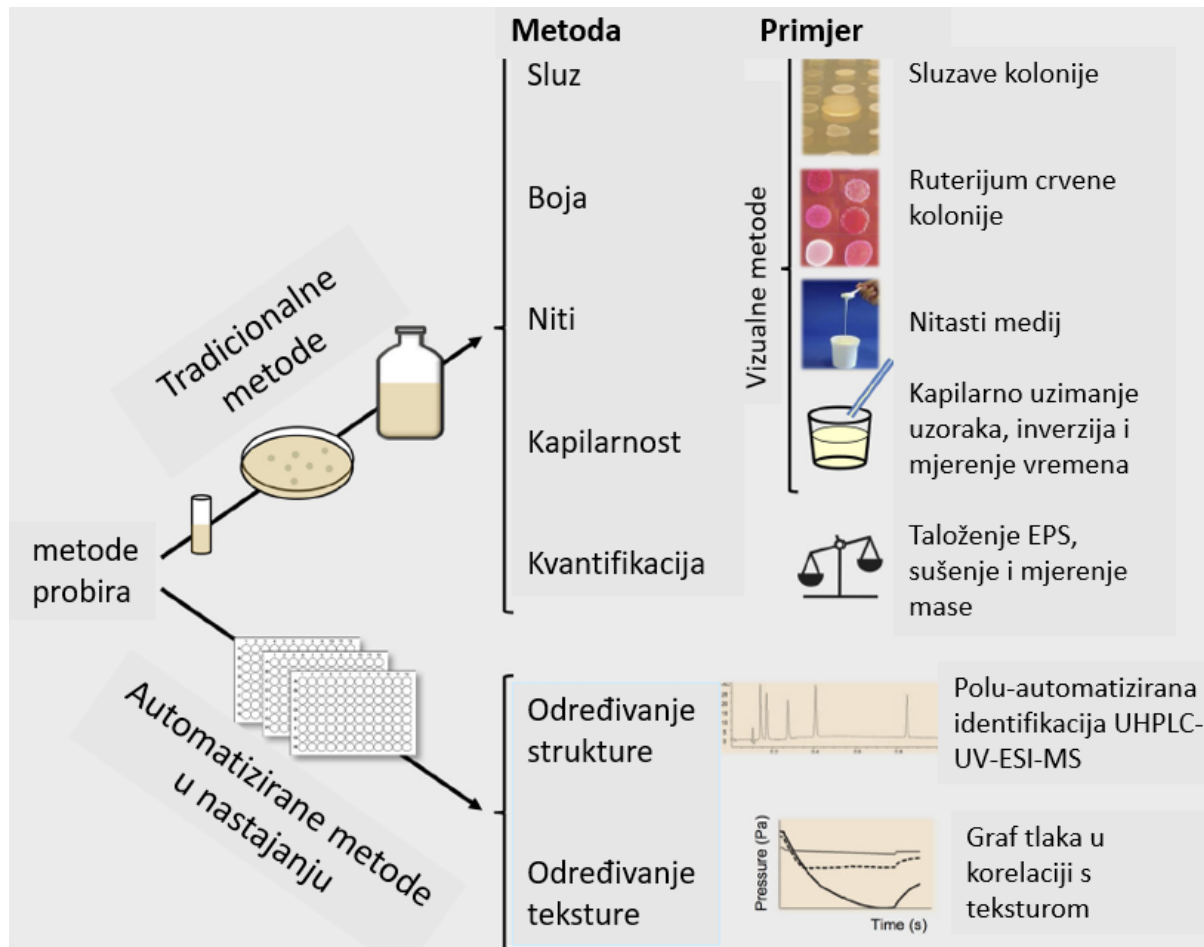
Pretpostavlja se da je *eps* nakupina gena konzervirana kod sojeva iz roda *Lactobacillus*, ali i kod drugih BMK, te u strukturi, u smjeru 5' → 3', se općenito može zaključiti da započinje s genima za regulaciju transkripcije, i određivanje dužine lanca, po sredini sadrži gen za glikozil-transferazu, završava s genima za polimerizaciju i izlučivanje, a s oba kraja je omeđena s genima za transpozazu i insercijskim elementima (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2014). Pri tome

je potrebno istaknuti da su funkcije ovih gena uglavnom definirane pomoću *in silico* analiza nakon usporedbe homolognih sekvenci DNA odgovarajućih gena pretraživanjem baze podataka (Jiang i Yang, 2018). Funkcionalne analize provedene su tek na pojedinim genima, primjerice *eps* genima za glikoziltransferaze (Lamothe i sur., 2002), specifične-glikoziltransferaze (Tahoun i sur., 2017), genima za određivanje duljine lanca (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2015) i regulatorima transkripcije *eps* operona (Dertli i sur., 2016). *Eps* geni najviše se značajno istražuju u gram-negativnim ili i u gram-negativnim i gram-pozitivnim patogenima (Castro-Bravo i sur., 2018). Na temelju pretpostavljenih funkcija *eps* gena predložen je biosintetski put heteropolisaharida bakterija mliječne kiseline (Olensky i Klewicka, 2018). Prema hipotezi prvi korak u sintezi heteropolisaharida je unutarstanično nakupljanje pojedinih ponavljajućih strukturnih podjedinica inicirano specifičnim glikoziltransferazama. Ovaj enzim veže prvi monosaharid na lipidni nosač ( undecaprenil fosfat C55-P) u staničnoj membrani. Raznovrsne su glikoziltransferaze koje kataliziraju stvaranje glikozidnih veza između monosaharida iz aktiviranih nukleotidnih prekursora. Aktivirani prekursori nastaju iz molekula glukoze, galaktoze ili laktoze preko međuprodukata, kao što su glukoza-1-fosfat i fruktoza-6-fosfat, koji potječu iz središnjih metaboličkih puteva bakterijske stanice. Nastali ugljikohidratni lanci vežu se na prvi monosaharid (De Vuyst i sur., 2001). Slijedi transport izvan stanice i daljnja izvanstanična polimerizacija ugljikohidratnih jedinica. Pretpostavlja se da su dva moguća transportna sustava koja omogućuju izvanstanični transport i polimerizaciju novosintetiziranog egzopolisaharida : i) ABC- transportni sustav i ii) Wzx/Wzy ovisni put (Castro-Bravo i sur., 2018). Sintetizirane ponavljajuće podjedinice s lipidnog „nosača“ transportiraju se kroz staničnu membranu pomoću Wzx (flipaza) te se izvan stanice povezuju u rastući lanac egzopolisaharida pomoću Wzy (polimeraza). Konačnu duljinu polimera regulira Wzz (tirozin kinaza). Dokazano je da mutacije u *eps* genima bakterija mliječne kiseline (Castro-Bravo i sur., 2017) koji kodiraju za proteine homologne Wzz utječu na razlike u molekulskim masama novosintetiziranih heteropolisaharida. No još uvijek biosintetski put heteropolisaharida bakterija mliječne kiseline nije u potpunosti detaljno okarakteriziran. Prinos i molekulska masa novosintetiziranih egzopolisaharida bakterija mliječne kiseline definirana je različitim izvanstaničnim i unutarstaničnim čimbenicima. Prinos i molekulska masa egzopolisaharida često su u korelaciji s tehnološkim i funkcionalnim svojstvima kod različitih primjena (Mende i sur., 2016). Prinos polisaharida pomoću Wzy-ovisnog puta kod BMK u rasponu je vrijednosti 20 do 600 mg L<sup>-1</sup> (Leroy i De Vuyst, 2016), a samo kod pojedinih sojeva uočena je sinteza egzopolisaharida sa značajno većim prinosima. Količina sukraza-ovisnih homopolisaharida proizvedenih u bakterija mliječne kiseline obično je veća od 1 g L<sup>-1</sup> (Torino i sur., 2015), a pojedini sojevi, kao što je *Lb. reuteri* Lb121 koji proizvodi i α-glukane i β-

fruktane, proizvode i oko  $10 \text{ g L}^{-1}$  (Van Geel-Schutter i sur., 1999). Sinteza izvanstaničnih homopolisaharida u većim koncentracijama vjerojatno je posljedica nedostatka međuovisnosti s glavnim metaboličkim procesima. S druge strane sinteza polisaharida pomoću Wzy-ovisnog puta isprepletena je s metabolizmom ugljika i energije. Prilikom usporedbe koncentracija polisaharida koje sintetiziraju različiti bakterijski sojevi opisani u literaturi neophodno je sagledati postupke izolacije koji značajno utječu na određenu koncentraciju egzopolisaharida, te mogu utjecati na lažno pozitivan ili negativan rezultat vrijednosti koncentracije (Mende i sur., 2016). Bakterije mliječne kiseline proizvode polisaharide i manjih i većih molekulskih masa. Molekulska masa polisaharida proizvedenih Wzy-ovisnim putem, ovisno o soju bakterije, može varirati od 8 do preko 5000 kDa (Mozzi i sur., 2006). Pojedini soj BMK može sintetizirati više različitih polisaharida odnosno egzopolisaharida različitih molekulskih masa (Mende i sur., 2013). Pretpostavlja se da se polimeri male molekulske mase nalaze unutar stanice, a polimeri velike molekulske mase izlučuju u izvanstanični prostor, te su slobodni u izvanstaničnom mediju (Mende i sur., 2016). No ipak moguće je da pojedini sojevi bakterija mliječne kiseline proizvode samo jedan tip egzopolisaharida. *Lb. reuteri* 121 (Van Geel-Schutter i sur., 1999) istovremeno sintetizira različite tipove homopolisaharida, a *Lb. johnsonii* (Dertli i sur., 2013) i *O. oeni* (Dimopoulou i sur., 2016) istovremeno proizvode različite tipove homopolisaharida i heteropolisaharida. Molekulska masa glukanskih i fruktanskih homopolisaharida iznosi između  $10^5$  i  $10^6$  Da, ali su otkriveni i polimeri molekulske mase i preko  $10^7$  Da (Torino i sur., 2015). Bakterije mliječne kiseline većinom proizvode razgranate egzopolisaharide, i do sada je otkriveno samo sedam ne-razgranatih struktura (Ruas-Madiedo i sur., 2009). Polisaharidi su najčešće neutralni, ali pojedini sojevi proizvode egzopolisaharide s fosfatnim ostatcima što ih čini anionskima. Pretpostavlja se da prisutne komponente neugljikohidratne prirode, acetilirani i piruvirani ostatci, definiraju biološku i funkcionalnu ulogu egzopolisaharida (Zeidan i sur., 2017).

Za selekciju sojeva producenata egzopolisaharida koriste se takozvane metode probira koje se primjenjuju u znanstvenim istraživanjima, ali i industrijskim razvojnim laboratorijima. Ove metode omogućavaju selekciju sojeva producenata egzopolisaharida koji mogu doprinijeti korisnim reološkim svojstvima u konačnoj primjeni, te se kao takvi mogu koristiti kao starter kulture u prehrambenoj i ostalim industrijama. Općenito, metode probira se unaprjeđuju s ciljem učinkovite selekcije bakterijskih izolata sa željenim fenotipom biosinteze egzopolisaharida. To se prvenstveno odnosi na bakterijske izolate s visokim prinosom egzopolisaharida ili alternativno izolate koji općenito poboljšavaju svojstva korištenog medija. Nastojanja su da se razviju metode probira za brzo određivanje prinosa ili procjenu specifičnog svojstva bakterijskog izolata značajnog za industrijsku primjenu kod velikog broja izolata. Cilj

je i unaprijediti metode s aspekta ekonomičnosti. Kod razvoja pojedine metode važno je provoditi postupak u odgovarajućem mediju koji će se i u konačnoj primjeni odgovarajućeg izolata koristiti. Primjerice, ako će se određena starter kultura industrijski primjenjivati u zakiseljenom mlijeku i sama metoda probira se provodi u zakiseljenom mlijeku.



**SLIKA 3.** Shematski prikaz metoda koje se primjenjuju za selekciju sojeva koji sintetiziraju egzopolisaharide (Zeidan i sur., 2017).

Na slici 3 su prikazane različite metode probira potencijalnih sojeva producenata EPOL. Vedamuthu i Neville (1986) su provodili test viskoznosti rekonstituiranog kiselog nemasnog mlijeka u prahu putem evaluacije i formiranja niti tekućeg mliječnog gela. Van den Berg i sur. (1993) istim pristupom su između 600 različitih sojeva BMK ustanovili prisutnost egzopolisharida kod 30 sojeva. Ludbrook i sur. (1997) primijenili su modificiranu hranjivu podlogu, te su izolirali 11 sojeva bakterija mliječne kiseline iz različitih mikrokoliša, kod kojih je određen prinos egzopolisaharida u rasponu vrijednosti od 114 i 530 mg L<sup>-1</sup>. Pomoću navedene metode Sanni i sur. (2002) izolirali su sojeve producente egzopolisaharida *Lc. mesenteroides*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* i *Lb. brevis* iz autohtone fermentirane hrane.

Slijede istraživanja mnogih drugih svjetskih grupa koji primjenom iste metode dokazuju prisutnost specifičnih niti koje mogu upućivati na biosintezu egzopolisaharida kod sojeva BMK, a koji su izolirani iz raznovrsnih fermentiranih proizvoda autohtoni različitim geografskim područjima. Mozzi i sur. (2001) također su opisali metodu probira sojeva producenata na temelju dokazivanja prisutnosti one tipične niti dulje od 6 mm. Biosintezu egzopolisaharida su ispitali kod 201 različitog soja bakterija mliječne kiseline (Mozzi i sur., 2006). Samo šest termofilnih i šest mezofilnih sojeva generirali su viskozno mlijeko. Dobiveni rezultati nisu se podudarali s istraživanjima određivanja suhe mase polimera, ali od šest sojeva producenata egzopolisaharida velike molekulske mase (>1000 kDa) pet ih pokazuje fenotip formiranja niti (Mozzi i sur., 2006). Behare i sur. (2009) istom metodom su potvrdili formiranje niti kod 47 mezofilnih izolata BMK koji su autohtoni indijskom Dahi i kiselom mlijeku. Dodatna metoda probira sojeva producenata egzopolisaharida obuhvaća inokulaciju čistih kultura pojedinih sojeva na krutim hranjivim podlogama, nakon čega se prisutnost tipičnih niti provjerava dodirivanjem poraslih kolonija mikrobiološkom ušicom. Ako je nit dulja od 5 mm, smatra se da soj sintetizira egzopolisaharide (Dierksen, 1997). Hajimohammadi Farimani i sur. (2016) ispitali su 102 izolata bakterija mliječne kiseline izoliranih iz mlijeka koza i ovaca, ali niti jedan nije stvarao niti. Iako je ova metoda probira vrlo jednostavna za izvedbu, standardizacija postupka je otežana. Metoda upućuje na moguću biosintezu egzopolisaharida kod određenog soja no kvalitativna je, a prinos egzopolisaharida se mora odrediti kvantitativno drugim analitičkim pristupima (Vijayendra i sur., 2008). Također je razvijena metoda probira koja uz primjenu mikrohematokrit kapilare za mjerenje protoka koji je u korelaciji s viskoznošću koja je jednostavne izvedbe (Ricciardi i sur., 1997). Ovom metodom ispitivana je viskoznost bakterija mliječne kiseline poraslih u hranjivim medijima s različitim izvorima ugljika. Pojedini izolati sojeva *Lb. bulgaricus*, *Lc. dextranicum* i *Lactococcus sp.* identificirani su kao potencijalni producenti egzopolisaharida. Metodom probira utemeljenom na uočavanju specifičnog fenotipa formiranja filamentoznih niti kod kolonija poraslih na krutom hranjivom mediju, te metodom mikrohematokrit kapilara ispitan je 41 izolat bakterija mliječne kiseline iz fermentiranog kiselog tijesta (Zotta i sur., 2008). Izolati *Lb. plantarum* porasli na glukozu, maltozi ili sukrozi, *Lb. paraplantarum* porasli na maltozi ili saharozu te *Lc. mesenteroides* i *Weissella cibaria* porasli isključivo na saharozu proizvodili su niti. Osim jednostavne izvedbe prednost primjene mikrohematokrit kapilara kao metode je što se ujedno može ustanoviti promjena viskoziteta hranjivog medija kao rezultata biosinteze egzopolisaharida. Najčešće se primjenjuje metoda probira uočavanjem fenotipa sluzavih i mukoidnih kolonija na krutom hranjivom mediju. Sluz oko poraslih kolonija koja je posljedica biosinteze egzopolisaharida omogućuje učinkovitu primjenu ovog pristupa osobito za detekciju sojeva s visokim prinosom

egzopolisaharida. Ovakav fenotip često je tipičan za bakterijske sojeve koji sintetiziraju izvanstanične homopolisaharide (De Vuyst i De Vin, 2007). Tallgren i sur. (1999) pregledali su 600 izolata iz tla uzgojenih na hranjivim agar podlogama sa saharozom, te su pronašli 160 sluzavih kolonija. Nedostatak ove metode je detekcija sojeva s visokim prinosom egzopolisaharida, a sojevi koji proizvode egzopolisaharide Wzy-ovisnim putem rijetko imaju prinos dovoljno velik za tvorbu sluzi oko porasle kolonije. Za detekciju stanica producenata egzopolisaharida koriste se i metode bojanja. Primjenjuju se boje ruterijum crvena, neutralna crvena, calcofluor bijela, congo crvena i Indian ink. Za detekciju sojeva producenata egzopolisaharida kod *L. lactis* koristi se crveno-bijela selekcija. Kolonije porasle na mliječnom agaru boje se s ruterijum crvenom, te se mutanti koji ne proizvode egzopolisaharide boje crveno, dok sojevi koji proizvode egzopolisaharide ostaju nebojeni, tj. bijeli. No ovakva primjena nije moguća kod drugih bakterijskih sojeva za detekciju sinteze egzopolisaharida (Zeidan i sur., 2017) Iako su metode bojanja jako jednostavne za provedbu, interpretacija rezultata može biti otežana zbog slabe rezolucije negativnih i pozitivnih signala. U svrhu detekcije sojeva producenata predložen je i test aglutinacije utemeljen na visoko-specifičnoj reakciji između soja producenta i specifičnih antitijela. Ipak, zbog nedostupnosti specifičnih klonalnih antitijela ovaj test nije korišten za identifikaciju sojeva producenata bakterija mliječne kiseline. Sve navedene metode probira utemeljene su na fenotipskim svojstvima koja su rezultat biosinteze egzopolisaharida. Za kvantitativno određivanje proizvedenih egzopolisaharida potrebno je primijeniti druge pristupe. Van Geel-Schuten i sur. (1998) su kod 182 izolata *Lactobacillus* sojeva gravimetrijski odredili masu egzopolisaharida u tekućem hranjivom mediju. Prinos egzopolisaharida kod pojedinih sojeva iznosio je više od 100 mg L<sup>-1</sup> tijekom uzgoja na saharozi. Bakterijski izolati uzgojeni na laktozi ili rafinozi rjeđe su se pokazali kao producenti egzopolisaharida. Ako bakterije mliječne kiseline rastu u mlijeku ili drugom hranjivom mediju bogatom proteinima za precizno određivanje suhe mase egzopolisaharida potrebno je provesti postupak taloženja proteina (De Vuyst i sur., 1998). Rühmann i sur. (2016) opisali su noviju metodu probira kojom se učinkovito određuje koncentracija i sastav monosaharida egzopolisaharida. Ova metoda provodi se u pet koraka: i) kultivacija soja producenta, ii) uklanjanje bakterijskih stanica centrifugiranjem i filtracijom, iii) uklanjanje šećernih monomera gel filtracijom, iv) hidroliza egzopolisaharida trifluoroctenom kiselinom te v) derivacija 1-fenil-3-metil-5-pirazolonom i detekcija monomera UHPLC-UV-ESI-MS. Cantor i sur. (2016) razvili su visoko selektivnu metodu probira za određivanje teksture uzoraka fermentiranog mlijeka. Bakterijski izolati inokuliraju se u mikrotitarskim pločama s 96 jažica koje sadrže mlijeko kao hranjivi medij. Nakon zakiseljavanja mlijeka, uzorci se automatski pipetiraju pomoću uređaja Hamilton MicroLab Star. Senzori za tlak prikupljaju podatke o

pritisku u svakom kanalu za pipetiranje. Na temelju prikupljenih podataka kreiraju grafove tlakova pomoću kojih razlikujemo sojeve različitih teksturnih fenotipova. Prednost ove metode je selekcija sojeva u željenom mediju. Molekularne metode probira sojeva producenata egzopolisaharida ustanovljene su na analizi gena koji kodiraju za biosintezu egzopolisaharida. Jedna od molekularnih metoda je sekvencioniranje ciljanog gena koje podrazumijeva odabir specifične početnice na temelju potpuno sekvencioniranih genoma bakterija mliječne kiseline nakon čega slijedi umnažanje ciljanog gena primjenom PCR reakcija te kloniranje i sekvenciranje PCR produkata. Ova metoda je korištena za karakterizaciju biosinteze egzopolisaharida sojeva koji proizvode glukane i fruktane (Zeidan i sur., 2017). Uz snižavanje cijene sekvenciranja olakšano je i istraživanje sekvencioniranih *eps* gena i strukture nakupina gena koji kodiraju za biosintezu egzopolisharida te razlikovanje sojeva na genskoj razini. Ipak, identifikaciju *eps* gena treba nadopuniti daljnjim istraživanjima koji će omogućiti određivanje količine i vrste egzopolisaharida ili u konačnici s aspekta industrijske primjene karakterizaciju reoloških svojstava, primjerice, prilikom primjene soja producenta u fermentaciji mlijeka.

## **2.2. Interakcije egzopolisaharida probiotičkih bakterija s intestinalnom mikrobiotom**

Mikrobiotu čine svi mikroorganizmi pojedinog ekosustava. Intestinalni ekosustav čovjeka se odlikuje gustoćom mikrobne populacije i visokim stupnjem bioraznolikosti prisutnih mikrobnih vrsta između svih do sada opisanih mikrobioma. Unutar intestinalne mikrobiote prisutne su stabilne i varijabilne mikrobne skupine. Debelo crijevo je dio probavnog sustava koji sadrži najviše mikroorganizama (oko  $10^{11}$ - $10^{12}$  mikrobnih stanica/g crijevnog sadržaja) u organizmu. Bakterije, arheje, fungi, protozoe i virusi glavne su skupine mikroorganizama u kolonu gdje stupaju u komensalni, mutualistički ili parazitski odnos s domaćinom što utječe na fiziologiju čovjeka. Najbrojnije su zastupljene bakterije iz fila *Firmicutes* i *Bacterioides*, a prisutne su iako s nižim udjelom bakterije iz fila poput *Actinobacteria* i *Proteobacteria*. Prisutna mikrobiota u stalnoj interakciji s mikrookolišem gastrointestinalnog trakta osigurava značajan metabolički potencijal kodiran u metagenomu, zbog čega se intestinalna mikrobiota slikovito opisuje kao zaseban organ ljudskog tijela (Castro-Bravo i sur., 2018). Prva istraživanja o povezanosti učestalosti pojave različitih bolesti i profila odnosno sastava mikrobiote počela su se provoditi prije više od desetljeća, a do danas je ustanovljeno da je više od 100 bolesti i poremećaja povezano s promjenama mikrobnih populacija u mikrobioti (Castro-Bravo i sur., 2018). Nove spoznaje o mikrobioti utemeljene su na primjeni metoda nove generacije sekvenciranja koje omogućuju analizu genoma mikrobnih uzoraka i bez prethodne kultivacije. To je omogućilo

spoznaje o povezanosti narušene ravnoteže sastava mikrobioma kod učestalo prisutnih bolesti poput upalne bolesti crijeva, sindroma iritabilnog crijeva i karcinom debelog crijeva (Castro-Bravo i sur., 2018). Prisutnost rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* unutar intestinalnog mikrobioma doprinosi ravnoteži sastava mikrobiote i povezuje se s dobrim zdravstvenim statusom domaćina. Nisu prisutni u istim ekološkim nišama, *Lactobacillus* je prisutan i u tankom crijevu ljudi i drugih sisavaca, a *Bifidobacterium* je jedan od najzastupljenijih rodova unutar debelog crijeva ljudi, posebno u dojenčadi (Castro-Bravo i sur., 2018). Nizak udio ovih dviju bakterijskih skupina često je u korelaciji s određenim zdravstvenim poremećajima. Tako je smanjeni udio bakterija iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* ustanovljen kod pacijenata sa sindromom iritabilnog crijeva, a snižen udio *Bifidobacterium*, posebno vrste *Bifidobacterium bifidum* kod bolesnika s ulceroznim kolitisom (Castro-Bravo i sur., 2018). S druge strane, unos bifidobakterija i/ili laktobacila u obliku probiotičkog dodatka potpomažu uspostavljanje ravnoteže narušene intestinalne mikrobiote (Castro-Bravo i sur., 2018). Zbog toga se pretpostavlja kako bi ova dva roda mogli imati značajnu ulogu u održavanju ravnoteže intestinalnog ekosustava kod ljudi. Probiotički potencijal bakterija ovisi o uspješnom preživljavanju nepovoljnih uvjeta gastrointestinalnog trakta tijekom adhezije na crijevnu sluznicu, inhibicije protiv patogena i/ili blagotvornog djelovanja na ljudsko zdravlje (Servin, 2004). Probiotičke bakterije bi trebale biti otporne i na žuč, nisku pH vrijednost te bi trebale imati antimikrobnu aktivnost. Na preživljavanje probiotika u gastrointestinalnom traktu mogu utjecati i egzopolisaharidi bakterija mliječne kiseline (Caggianiello i sur., 2016).

Interakcije egzopolisaharida bakterija mliječne kiseline s drugim mikroorganizmima unutar kolona su djelomično opisane. Detaljno su proučavani antagonistički učinci egzopolisaharida prema bakterijskim patogenim sojevima i asimilacija egzopolisaharida kao supstrata za različite sojeve komensalnih bakterija. Pretpostavlja se da egzopolisaharidi bakterija mliječne kiseline imaju prebiotički potencijal (Salazar i sur., 2016). Prebiotici su supstance koje probiotički sojevi odnosno mikroorganizmi s pozitivnim učinkom na zdravlje domaćina koriste kao supstrate (Castro-Bravo i sur., 2018). Prebiotici za oralnu primjenu ne smiju se probavljati niti apsorbirati u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta već trebaju dospjeti do debelog crijeva gdje će ih iskoristiti specifični (korisni) poželjni predstavnici intestinalne mikrobiote (Castro-Bravo i sur., 2018). Pretpostavlja se da bakterijski homopolisaharidi mogu potpuno neprobavljeni dospjeti do debelog crijeva zahvaljujući kemijskoj strukturi koja je slična inulinu i fruktooligosaharidnim prebioticima. Moguće je da je enzimaska hidroliza otežana zbog velike molekularne mase ili nedostatka enzima specifične aktivnosti za ove polimere. No pojedina istraživanja upućuju na mogućnost olakšane fermentacije egzopolisaharida pomoću mikroorganizama intestinalnog trakta upravo zbog jednostavne primarne strukture.



Homopolisaharid kojeg sintetizira *Lactobacillus sanfranciscensis* ima bifidogeni učinak, što znači da selektivno potiče rast poželjnih bakterijskih vrsta i time može utjecati na modifikaciju sastava crijevne mikrobiote (Castro-Bravo i sur., 2018). Galle i Arendt (2014) su istraživali metaboliziranje homopolisaharida *L. sanfranciensis* pomoću sojeva iz roda *Bifidobacterium* tijekom fermentacije tijesta primjenom jedne vrste starter kulture kako bi se evaluirala prebiotička svojstva fermentirane hrane. Iz fermentiranog tijesta ekstrahirana je u vodi topljiva frakcija egzopolisaharida koja je zatim korištena prilikom kultivacije sojeva *Bifidobacterium*. Prema rezultatima svi ispitivani sojevi *Bifidobacterium* mogu metabolizirati  $\beta$ -fruktan (Galle i Arendt, 2014) što ukazuje na moguću upotrebu homopolisaharida kao fermentabilnih supstrata za intestinalnu mikrobiotu. Das i sur. (2014) testirali su egzopolisaharide *Lb. plantarum* koji su pokazali značajnu otpornost na hidrolizu u želudcu i tijekom probave. Probiotičke bakterije *Lb. plantarum* uspješno rastu na glukran-DM5 egzopolisaharidu dok bakterije poput *E. coli* i *E. aerogenes* ne. Stoga se egzopolisaharidi *Lb. plantarum* mogu smatrati prebioticima. Međutim, potrebno je provesti dodatna *in vitro* i *in vivo* istraživanja. Zbog složenije strukture, smatra se da su heteropolisaharidi otporniji prilikom gastrointestinalne probave, ali to nije *in vivo* dokazano. Salazar i sur. (2011) hranili su wistar štakore *B. animalis subsp. lactis* ili *B. longum* koji sintetiziraju egzopolisaharide, te su zatim analizirali sastav uzoraka crijeva i fecesa. Analizom su ustanovili porast broja intestinalnih *Bifidobacterium* vrsta što može upućivati da egzopolisaharidi ovih sojeva zadržavaju strukturu i ne razgrađuju se tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt odnosno dolaze do debelog crijeva. Leber i sur. (2010) dokazali su kako soj producent egzopolisaharida *L. rhamnosus* GG iskazuje značajniju otpornost na uvjete gastrointestinalnog trakta u usporedbi s mutantnim sojem, koji ne eksplicira i time ne sintetizira egzopolisaharide što upućuje na zaštitnu funkciju egzopolisaharida. Prema *in vitro* modelima biorazgradnja heteropolisaharida unutar crijeva ovisi o fizikalno-kemijskoj strukturi. Egzopolisaharidi jednostavnije strukture koji sadrže istovrsne ponavljajuće jedinice lakše se razgrađuju djelovanjem enzima. Kada se heteropolisaharidi ekstrahirani iz intestinalnih vrsta roda *Bifidobacterium* iz mikrobiote čovjeka primjenjuju u *in vitro* fermentacijama utječu na promjenu sastava mikrobiote (Salazar i sur., 2009). Vjerojatno su homopolisaharidi i heteropolisaharidi bakterija mliječne kiseline otporni na probavu unutar gastrointestinalnog trakta, a prisutna intestinalna mikrobiota, ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima i glikolitičkim enzimima pojedinih mikrobnih vrsta, ih može razgraditi. Osim toga, monosaharidi nastali razgradnjom egzopolisaharida mogu utjecati na sastav mikrobiote zbog mehanizama unakrsnog hranjenja (Castro-Bravo i sur., 2018). Stoga se u širem smislu pojma homopolisaharidi i heteropolisaharidi smatraju prebioticima jer su izvori ugljika koji utječu na uravnoteženi sastav intestinalne mikrobiote kod zdrave osobe.

Ovo ih čini funkcionalnim biomolekulama jer u konačnici domaćin može imati koristi od mikrobnog metabolizma egzopolisaharida (Salazar i sur., 2016).

Antagonistički potencijal bakterija mliječne kiseline producenata egzopolisaharida i izoliranih molekula egzopolisaharida prema mikrobnim patogenima istraživani su na različitim *in vitro* i *in vivo* modelima. Jedna od već tradicionalno provjeravanih fenotipskih značajki tijekom *in vitro* karakterizacije probiotika je mogućnost koagregacije s patogenima. Naime smatra se da se koagregacijom štetnih mikroorganizama s poželjnim bakterijama mliječne kiseline ograničava pristup patogena intestinalnom epitelu. Dokazana je povezanost visokog prinosa egzopolisaharida soja *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* i značajne koagregacije soja s *Escherichia coli* (Castro-Bravo i sur., 2018). Za istraživanja mehanizama antagonističkih učinaka egzopolisaharida sojeva producenata egzopolisaharida korišteni su kompleksniji eksperimentalni modeli s *in vitro* staničnim linijama ili *in vivo*. Wachi i sur. (2014) proučavali su smanjenje upalnih procesa, određivanjem intestinalnih enterocita, kao posljedica infekcije enterotoksigenom *E. Coli*, a primjenom egzopolisaharida *L. delbrueckii* TUA4408L kod svinja. Ruas-Madiedo i sur. (2010) ispitivali su mogućnost smanjenja citotoksičnog učinka uzrokovanog aktivnošću toksinima *Bacillus cereus* pomoću egzopolisaharida bakterija mliječne kiseline izoliranih iz čovjeka i mliječnih proizvoda kako bi se zadržao integritet monosloja Caco-2 kolonocita.

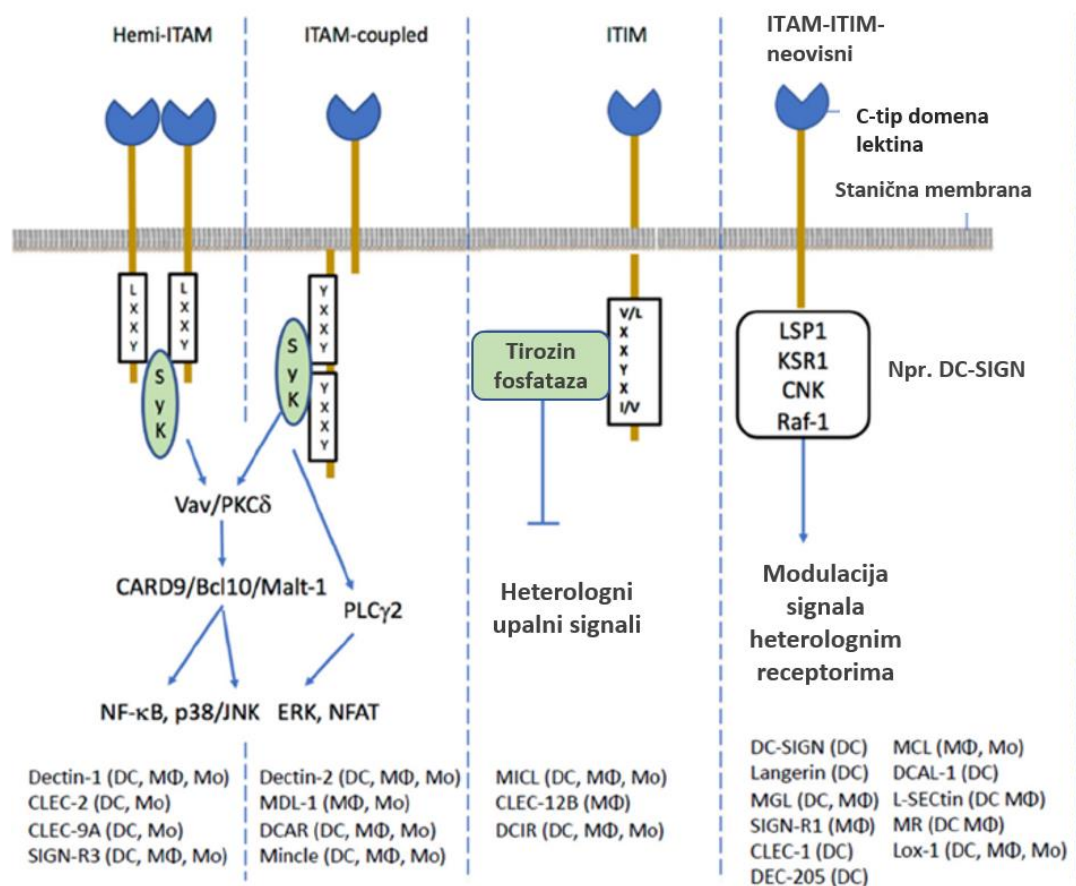
Kontinuirano se provode i istraživanja s izogenim mutantima. Uspoređuju se specifična svojstva sojeva koji proizvode egzopolisaharide s hipotetskim svojstvom funkcionalnih biomolekula s mutantnim sojevima koji ili ih ne proizvode te sojevi koji ili proizvode različite tipove egzopolisaharida, ali su iste genetičke pozadine. Usporedba aktivnosti mutantnog soja *L. rhamnosus* GG koji ne proizvodi egzopolisaharide te pročišćenih egzopolisaharida pokazuje kako bi sloj egzopolisaharida mogao biti uključen u smanjenje formacije hifa i adhezije *Candida* na epitelne vaginalne stanice (Castro-Bravo i sur., 2018). Pomoću sloja stanica HT29-MTX uspoređen je zaštitni učinak soja producenta *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 i izogenog mutanta NB1. Istraživanja su provedena sa sedam oportunističkih patogena, a dobiveni rezultati ukazuju da egzopolisaharidi vjerojatno doprinose jačanju urođene mukozne barijere jer ometaju kontakt patogena, poput *E. coli* i *Listeria monocytogenes*, s epitelnim stanicama (Živković i sur., 2016). Također je provedeno i istraživanje s modificiranim sojem *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* BGSJ2-8 koji proizvodi egzopolisaharide drugačijeg sastava od egzopolisaharida divljeg tipa. Modificirani soj nije sprječavao interakcije stanica *E.coli* s intestinalnim epitelom (Živković i sur., 2016). I sastav, odnosno struktura, sintetiziranih egzopolisaharida u potencijalnim interakcijama s patogenima je važan čimbenik.

*In vivo* ispitivanja anagonističkog učinka egzopolisaharida provedena su na različitim eksperimentalnim životinjama. Soj *L. johnsonii* FI9785 koji sintetizira dva različita tipa egzopolisaharida uspješno je suzbio kolonizaciju i rast *Clostridium perfringens* te smanjio kolonizaciju *E. coli* u tankom crijevu peradi (Dertli i sur., 2013). *B. longum subsp. infantis* 35624 sintetizira egzopolisaharid koji se sastoji od galaktoze, glukoze, galakturonske kiseline i 6-deoksi-L-taloze. Istraživanjima na miševima dokazano je da taj soj smanjuje učinak *Salmonelle* na aktivnost enzima sluznice tankog crijeva i gubitak težine kod miševa (Castro-Bravo i sur., 2018). Iako ova istraživanja dokazuju povezanost primjene egzopolisaharid producirajućih sojeva i smanjenja štetnosti određenih patogena, precizna uloga i način djelovanja egzopolisaharida ne može se jednoznačno demonstrirati. Fanning i sur. (2012) su dokazali anagonističko djelovanje egzopolisaharida usporedbom soja *B. breve* UCC2003 i njegovog izogenog mutanta ne-producenta. Demonstrirali su da površinski pričvršćeni egzopolisaharidi soja UCC2003 potpomažu održavanju bakterija u crijevima te pomažu u obrani protiv crijevnog patogena *C. rodentium* kod miševa. Tim su dokazali da egzopolisaharidi imaju pozitivni učinak na zdravlje koji se inače povezuje s probiotičkim sojevima.

### **2.3. Egzopolisaharidi probiotičkih bakterija u modulaciji imunološkog odgovora domaćina**

*In vivo* i *in vitro* istraživanja o stimulaciji ili modulaciji imunološkog odgovora domaćina uzrokovanoj egzopolisaharidima bakterija mliječne kiseline u stalnom je porastu te je opsežan za pojedinačno opisivanje (Castro-Bravo i sur., 2018). Primjer je *in vivo* studija u kojoj su miševi tri dana oralno primali izogene sojeve producente i ne-producente *Bifidobacterium breve* što je rezultiralo razlikama u populaciji mukoznih imunoloških stanica. Miševi koji su primali sojeve ne-producente imali su povišen fekalni IgA i serumski IgG što je u skladu s drugim podacima o ulozi egzopolisaharida u kolonizaciji i/ili zaštitnom učinku fagocitoze te imunološkoj aktivaciji i djelovanju antigena (Fanning i sur., 2012). Mnoga *in vitro* istraživanja uspoređivala su promjene razine citokina kao rezultat primjene sojeva producenata egzopolisaharida i sojeva ne-producenata kao i pročišćenih, ili pak purificiranih egzopolisaharida (Hidalgo-Cantabrana i sur., 2012). Kod istraživanja purificiranih egzopolisaharida značajan je stupanj čistoće polimera, budući da su u većini eksperimenata korištene standardne metode za izolaciju egzopolisaharida koje pogoduju sutaloženju drugih bakterijskih komponenti s imunogenim svojstvima. Uz to, tijekom većine istraživanja modulacije imunološkog odgovora na izolirane egzopolisaharide nisu provedeni testovi

provjere kontaminacije drugim mikrobnim molekulama, kao što su lipoteihoiniska kiselina ili lipoproteinska sidra koji mogu aktivirati imunološke stanice putem TLR2/1 i TLR2/6 receptora (Castro-Bravo i sur., 2018). Górska i sur. (2016) mjerili su induciranje sinteze citokina dendritičkih stanica koštane srži (engl. BM-DC) uslijed dodatka sojeva producenata egzopolisaharida ili pročišćenih egzopolisaharida. Samo jedan od pet pročišćenih egzopolisaharida (E142) značajno je povećao ekspresiju aktivacijskih markera BMDCa. Preostali pročišćeni egzopolisaharidi izazvali su neznatan učinak na povećanje koncentracije citokina. Poticanje imunološkog odgovora kao posljedica djelovanja egzopolisaharida E142 nije poznato, ali se pretpostavlja da je moguće da ih prepoznaju CLR receptori. U uzorku pročišćenog egzopolisaharida određena je i razina moguće kontaminacije lipopolisaharidima koja je iznosila ispod 0.1 EU (jedinica endotoksina, ~0.01 ng) po µg egzopolisaharida. Kontaminacija lipopolisaharidima je potencijalni ometajući faktor u istraživanjima imunomodulacije jer lipopolisaharidi imaju veliku mogućnost aktivirati NF-κB putem TLR4 .



**SLIKA 4.** CLR membranski receptori se kategoriziraju s obzirom na način unutarstanične signalizacije. ITAM CLR ili aktivira tirozine unutar citoplazme ili reagira s ITAM adapter proteinom. Hemi-ITAM CLR za signalizaciju zahtjeva interakciju dva CLR receptora. ITAM potiče Sky na aktivaciju CARD9/Bcl10/Malt-1 koji promiče NF-κB signale i ekspresiju upalnih gena. Dectin-1, ITAM CLR aktivira ERK i NFATR preko PLCγ2. ITIM CLR potiče tirozin fosfatazu (npr. SHP-1 ili SHP-2) koja negativno regulira heterologe signalne upalne puteve. Postoje i

ITAM-ITIM-neovisni CLR receptori. Oni mogu vezati ligand na npr. DC-SIGN što rezultira tvorbom signalnog kompleksa koji sadrži LSP1, KSR1, CNK i Raf-1 kinazu te koji modulira upalne signale acetilacijom p65 podjedinice NF- $\kappa$ B (Castro-Bravo i sur., 2018).

Poznato je da egzopolisaharidi patogenih bakterija posreduju u zaštiti antigena od antitijela i antimikrobnih peptida te da moduliraju imunološki odgovor (Castro-Bravo i sur., 2018). Pretpostavlja se da je sličan učinak i egzopolisaharida bakterija mliječne kiseline što je i ispitano na soju *Lactobacillus rhamnosus* GG (Lebeer i sur., 2010). *In vivo* u crijevima je dokazano da egzopolisaharidi bakterija komensalnog odnosa s bakterijama mliječne kiseline imaju snažne imunomodulacijske učinke. Ne-toksični soj producent egzopolisaharida *Bac. fragilis* ima učinak na vremenski i prostorni razvoj i odgovor T stanica tijekom kolonizacije *germ-free* miševa bez prisutne mikrobiote. Razlog je zwitter-ionska struktura polisaharida koja se razgrađuje oksidativnom depolimerizacijom pri čemu nastaju fragmenti koje specifično prepoznaju MHC II proteini koji ih usmjeravaju prema aktivaciji CD4<sup>+</sup> preko T-staničnog receptora (TCR). Polisaharidi posreduju u zaštiti od kolitisa mehanizmom koji uključuje indukciju regulatornih T stanica i IL-10 produkciju (Castro-Bravo i sur., 2018). Još jedan primjer egzopolisaharida koji imaju protuupalni učinak su i egzopolisaharidi soja *F. prausnitzii* HTF-F (Rossi i sur., 2015). Pročišćeni egzopolisaharidi pokazali su prema definiranim kliničkim parametrima da imaju protuupalne učinke na DSS modelu kod miševa. Pročišćeni egzopolisaharidi ne induciraju citokine te ne aktiviraju dendritičke stanice, ali snižavaju izlučivanje protuupalnog IL-12p70 i potiču nastajanje IL-10 pomoću DCa stimuliranog primjenom *L. plantarum* (Rossi i sur., 2015).

#### **2.4. Uloga egzopolisaharida kao čimbenika adhezije probiotika**

Smatra se da adhezija na intestinalni epitel, osobito u regiji kolona, omogućava probiotičkim bakterijama da se održe i koloniziraju kroz nešto duži vremenski period u crijevima što ujedno može i utjecati na otežanu kolonizaciju crijevnih patogena uslijed smanjenja dostupnih mjesta vezanja. Stoga je adhezija na stanice intestinalnog epitela ili sloj sluznice važno funkcionalno svojstvo prilikom istraživanja potencijalnih probiotičkih sojeva (Castro-Bravo i sur., 2018). Egzopolisaharidi specifičnih sojeva bakterija mliječne kiseline mogli bi doprinijeti preživljavanju tijekom prolaska kroz gastrointestinalni trakt uslijed zaštitne uloge. Pretpostavlja se da imaju funkciju i zaštitnog sloja jer su bakterijske stanice izložene stresnim ekstremnim uvjetima poput niskog pH u želudcu te žučnih soli i enzima gušterače u dvanaesniku. Nakon što sojevi producenti egzopolisaharida dospiju u debelo crijevo, ove površinske makromolekule stupaju

u interakcije s crijevnom sluznicom. I pozitivni i negativni učinci na adheziju zabilježeni su u raznim istraživanjima (Castro-Bravo i sur., 2018).

Mehanizam kojim egzopolisaharidi sudjeluju u bakterijskoj adheziji nije potpuno razjašnjen. Za *in vitro* kvantifikaciju adhezije bakterija producenata egzopolisaharida korištene su različite metode. Neke od tih metoda su: i) metaboličko obilježavanje bakterija 3H nukleotidima (Ruas-Madiedo i sur., 2006), ii) obilježavanje bakterija fluorescentnim sondama (Živković i sur., 2015), iii) ekspresija fluorescentnih proteina na bakterijskoj površini (Castro-Bravo i sur., 2017) i iv) brojanje adheziranih bakterija konvencionalnim metodama ovisnim o bakterijskoj kulturi. Za analizu adhezije i postojanosti bakterija mliječne kiseline producenata egzopolisaharida korišteni su i životinjski modeli, ali nijedan nije potvrdio sintezu polimera *in situ*. Ipak, u miševima je dokazana *in vivo* proizvodnja polisaharida *Bac. fragilis* ugradnjom male funkcionalne azidne skupine u polimer (tj. GaINaz umjesto GaINAc) koristeći endogene biosintetske puteve bakterije. Azidna skupina omogućila je ugradnju fluorescentne oznake koja je kasnije korištena za detekciju i kvantifikaciju fluorescentnih bakterija *in vivo* (Castro-Bravo i sur., 2018).

Prisutnost egzopolisaharida, pogotovo onih velike molarne mase, može smanjiti adheziju na intestinalne stanice i abiotičke površine zbog zaštitnog efekta površinskih makromolekula koje djeluju kao adhezini. Divlji tip soja *L. plantarum* Lp90 u usporedbi s deletiranim *cps2*-genomom mutanta se učinkovitije adhezira na Caco2 stanice (Lee i sur., 2016). Soj *Lactobacillus johnsonii* FI9785, koji sintetizira dvije vrste polimera EPS-1 i EPS-2 ima smanjenu sposobnost formiranja biofilma na različitim abiotičkim površinama u usporedbi s izogenim mutantom ( $\Delta$ epsE) koji ne sintetizira EPS-2. Također, spontani „glatki“ mutant koji povećano akumulira oba polimera ima manju sposobnost adhezije od divljeg tipa (Dertli i sur., 2015). Nadalje, istraživanja o adheziji ovih sojeva unutar crijeva kokoši u osnovi su dala slične rezultate prema kojima egzopolisaharidi mogu ometati molekularne interakcije s epitelnim membranama domaćina (Dertli i sur., 2015). Istraživanje na divljem tipu soja *L. johnsonii* NCC533 i izogenom mutantu nakon oralne primjene sojeva u mišu ukazuju da dulje vrijeme preživi soj ne-producent (Denou i sur., 2008). Tahoun i sur. (2017) koristili su sličan pristup za ispitivanje soja *B. longum* 105-A i konstruiranog mutanta s deletiranim *cpsD* genom. Elektronska mikroskopija putem TEM upućuje da divlji tip na površini stanice ima gusti kapsularni sloj, a mutant  $\Delta$ cpsD puno fimbrija. Mutant se bolje adhezira na Caco-2 epitelne stanice u usporedbi s divljim tipom što ukazuje da prisustvo kapsularnih egzopolisaharida negativno utječe na prisustvo adhezivnih faktora (Tahoun i sur., 2017). Castro-Bravo i sur. (2017) došli su do sličnog zaključka, ali i dokaza da je molekulska masa polimera jedan od ključnih faktora koji utječe na sposobnost adhezije različitih sojeva producenata

egzopolisaharida. Istraživanje su provodili na soju *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* DSM10140 i izogenom mutantu S89L konstruiranom s razlikom u jednom nukleotidu u genu za određivanje duljine lanca. Mutant pokazuje „nitasti“ fenotip zbog visokog prinosa egzopolisaharida bogatog ramnozom i velike molekulske mase (oko 103 kDa, 50% L-ramnoze u heksaharidnim ponavljajućim jedinicama) u usporedbi s egzopolisaharidima roditeljskog soja, a oba soja su genetički modificirana kako bi proizvodili protein mCherry. Tijekom istraživanja ispitivali su adheziju na intestinalne HT29 stanice i sposobnost tvorbe biofilma na različitim abiotičkim površinama. Kvalitativnim i kvantitativnim tehnikama dokazali su da mutirani soj S89L u odnosu na roditeljski ima smanjenu adheziju na stanice i atenuirano stvaranje biofilma na zlatnim, staklenim i polistirenskim površinama. Iz dobivenih rezultata zaključili su da prisustvo egzopolisaharida velike molekulske mase smanjuje *in vitro* kapacitet adhezije što bi moglo imati negativan učinak na crijevnu kolonizaciju (Castro-Bravo i sur., 2017). Do istog zaključka došli su Lebeer i sur. (2009) ispitujući soj *L. rhamosus* GG i mutant s deletiranim genom za specifičnu-glikoziltransferazu koji nije proizvodio dugački, galaktozom bogati egzopolisaharid. Istraživanja su provodili na Caco-2 stanicama, mucinu i polistirenu. Iako *in vitro* soj ne-producent egzopolisaharida ima dobru sposobnost adhezije, *in vivo* istraživanja pokazala su da je osjetljiviji na urođeni imunodgovor domaćina te iz tog razloga kraće preživljava unutar crijeva miša (Lebeer i sur., 2010). Slično, egzopolisaharidi soja *B. breve* UCC2003 imaju zaštitnu ulogu u preživljavanju uvjeta u gornjem gastrointestinalnom traktu i *in vivo* preživljavanju u crijevima, ali ne i kolonizaciji, zahvaljujući otpornosti na odgovor B-stanica (Fanning i sur., 2012). Također je dokazano da stanične linije makrofaga miševa RAW 264.7 mogu internalizirati delecijski mutant  $\Delta cpsD$  soja *B. longum* 105-A, te je dokazana uloga egzopolisaharida ovog soja u sprječavanju fagocitoze (Tahoun i sur., 2017). Zbog svega navedenog, i prisustvo i specifične karakteristike poput molekulske mase egzopolisaharida igraju značajnu ulogu u interakcijama bakterija mliječne kiseline s domaćinom.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Smatra se da egzopolisaharidi BMK koji su okarakterizirani kao funkcionalne biomolekule imaju potencijal primjene u farmaceutskoj industriji te se zbog toga intenzivno istražuju svojstva i biološka uloga egzopolisaharida koje sintetiziraju probiotičke bakterije. Kako bi ispitali koji sojevi bakterija mliječne kiseline uopće proizvode egzopolisaharide koriste se različite metode probira sojeva producenata. Za kvalitativnu analizu koriste se metode utemeljene na uočavanju specifičnog fenotipa koji se očituje pojavom sluzavih i mukoidnih bakterijskih kolonija, ili pak primjene kapilarne metode, ispitivanje formiranja filamentozne niti te metode bojanja. Zbog jednostavnosti izvedbe najčešće se primjenjuje metoda uočavanja sluzavih i mukoidnih kolonija. Kvantitativna karakterizacija egzopolisaharida provodi se nakon postupaka taloženja, odnosno ekstrakcije ili izolacije, sušenjem i određivanjem mase egzopolisaharida. U novije vrijeme koriste se zahtjevnije metode probira koje ujedno omogućavaju i kvantifikaciju i određivanje sastava monosaharida te određivanje teksture. Za dokazivanja biološke funkcije egzopolisaharida znanstvenici ispituju različite moguće funkcije egzopolisaharida poput interakcije s različitim mikroorganizmima, modulacije imunološkog odgovora domaćina i uloge u adheziji. Kako bi egzopolisaharidi uopće mogli stupiti u interakcije s crijevnom mikrobiotom ne smiju se razgraditi u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta što se ispituje *in vivo* na životinjama. Sojevi producenti egzopolisaharida se oralno primjenjuju u eksperimentalnim životinjama nakon čega se ispituje sastav mikrobne populacije uzorkovanjem crijeva i fecesa. U crijevima egzopolisaharide unesenih sojeva određeni mikroorganizmi mogu koristiti kao fermentabilne izvore ugljika. Za definiranje koji intestinalni mikroorganizmi mogu koristiti egzopolisaharide kao izvore ugljika, odnosno hranjive tvari, prvo se izoliraju pri čemu se koriste hranjive podloge za uzgoj različitih mikroorganizama. Antagonistički učinak na patogene ispituje se *in vitro* na staničnim linijama te ispitivanjem koagregacije s raznim patogenima. U istraživanjima se često koriste izogeni mutanti kako bi eksperimentalno dokazali različite učinke sojeva producenata egzopolisaharida i sojeva neproducenta egzopolisaharida. Izogeni mutanti se primjenjuju za usporedbu učinka različitih tipova egzopolisaharida. Ispitivanje modulacije imunološkog odgovora domaćina uključuje različite *in vitro* i *in vivo* metode. Za *in vivo* ispitivanja životinje oralno primaju razne sojeve bakterija mliječne kiseline nakon čega se ispituje populacija različitih imunoloških stanica te reakcije posredovane citokinima. Kako bi bakterije mliječne kiseline što uspješnije kolonizirale crijeva te što dulje preživjele unutar gastrointestinalnog trakta važno je da se adheziraju na crijevni epitel zbog čega se istražuje i utjecaj koji egzopolisaharidi imaju na bakterijsku adheziju.



Bakterije mliječne kiseline imaju dugu tradiciju sigurne primjene u proizvodnji fermentirane hrane i pića, a jedan od njihovih pozitivnih učinaka je poboljšanje reoloških svojstava *in situ* proizvodnjom egzopolisaharida. Egzopolisaharidi bakterija mliječne kiseline površinske su makromolekule koje sudjeluju u interakciji tih bakterija s različitim stanicama domaćina i mikrobnom zajednicom u intestinalnom lumenu što im daje svojstvo funkcionalnih biomolekula kod probiotičkih sojeva. Kako bismo razumjeli ove složene interakcije važno je opisati biosintetski put ovih makromolekula kao i određivanje ključnih svojstava koja su bitna za njihovu biološku funkciju. Kombinacija metoda koje nam omogućavaju korištenje informacija kodiranih u genomu producirajućih sojeva te analitičkih tehnika i *in vitro* modeli koji dobro odražavaju *in vivo* fiziologiju domaćina bit će ključni u određivanju funkcija na razini gena. Te spoznaje doprinose i primjeni sintetičke biologije u dobivanju egzopolisaharida ciljane strukture te s poboljšanim svojstvima koji pozitivno djeluju na zdravlje domaćina. U principu, sintetski egzopolisaharidi mogu se dobiti dizajniranjem sintetskog operona *eps* gena kombinacijom gena željenih funkcija iz različitih izvora te ekspresijom dizajniranog operona u optimiziranom domaćinu. To bi imalo veliki značaj za proizvodnju ovih polimera s obzirom na to da do sada proizvodnja pročišćenih egzopolisaharida nije ekonomična. Razlog su skupi supstrati (izvori ugljika) potrebni za uzgoj bakterijske biomase, procesi izolacije i pročišćavanja te niski prinosi. Metaboličkim inženjerstvom mogli bi se dobiti prikladni domaćini za održivu i isplativu proizvodnju egzopolisaharida, što u konačnici može dovesti do razvoja proizvoda i komercijalizacije. Osim toga, bioraznolikost prirodno sintetiziranih bakterijskih egzopolisaharida može se dodatno istražiti u svrhu otkrivanja novih biotehnoloških primjena. Zbog svega navedenog, istraživanje egzopolisaharida bakterija mliječne kiseline je značajno zbog potencijala primjene u biotehnologiji, ali i u kozmetičkoj industriji te obradi vode (Zeidan i sur., 2017). Uz to egzopolisaharidi su biokompatibilni, biorazgradivi i ne-toksični prirodni polimeri zbog čega bi u suvremenom ekološkom društvu svoju primjenu mogli naći i kao zamjena za naftne polimere.

#### **4. ZAKLJUČCI**

1. Egzopolisaharidi imaju zaštitnu ulogu i doprinose preživljavanju probiotičkih stanica prilikom izlaganja nepovoljnim uvjetima gastrointestinalnog trakta.
2. Biološka uloga egzopolisaharida određena je fizikalno-kemijskim karakteristikama.
3. Egzopolisaharidi posreduju u interakcijama probiotičkih stanica sa stanicama domaćina i intestinalnom mikrobiotom.
4. Sojevi producenti egzopolisaharida i njihovi izogeni mutanti koji ne sintetiziraju egzopolisaharide različito moduliraju imunološki odgovor domaćina.
5. Egzopolisaharidi mogu utjecati na svojstvo adhezije bakterija jer prekrivaju adhezine - druge makromolekularne strukture na površini bakterijske stanice koji posreduju u adheziji na intestinalne površine.

## 5. POPIS LITERATURE

1. Behare P., Singh R., Singh R. P. (2009) Exopolysaccharide-producing mesophilic lactic cultures for preparation of fat-free Dahi - an Indian fermented milk. *J Dairy Res* **76**: 90.
2. Caggianiello G., Kleerebezem M., Spano G. (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100(9)**: 3877-3886.
3. Cantor M., Poulsen V., Oeregaard G., Trihaas J., Sandra W. I. N. D., Derkx P. (2016) A screening method for rheological properties of milk gel. *U. S. Patent Application No.* 15/100: 787.
4. Castro-Bravo N., Hidalgo-Cantabrana C., Rodriguez-Carvajal M. A., Ruas-Madiedo 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.
5. Castro-Bravo N., Sánche B., Margolles A., Ruas-Madied P. (2018) Biological activities and applications of bifidobacterial exopolysaccharides from the bacteria and host perspective. *In Bifidobacteria and Related Organisms. Academic Press.* 177-193.
6. 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.
7. Das D., Baruah R., Goyal A, (2014) A food additive with prebiotic properties of an  $\alpha$ -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *Int. J. Biol. Macromol.* **69**: 20-16.
8. De Vuyst L., De Vin F. (2007) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria . In: Kamerling JP (ed.) *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology.* Vol. 2. Oxford: Elsevier: 477-519.
9. De Vuyst L., De Vin F., Vanningelgem F., Degeest B. (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**: 687-707.
10. De Vuyst L., Vanderveken F., Van de Ven S. **i sur.** (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 1059-1068
11. Denou E., Pridmore R. D., Berger B., Panoff J. M., Arigoni F., Brüssow H. (2008) Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the

- probiotic *Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomic and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **190**: 3161-3168.
12. Dertli E., Colquhoun I. J., Côté G. L., Gall G. L., Narbad A. (2018) Structural analysis of the  $\alpha$ -D-glucan produced by sourdough isolate *Lactobacillus brevis* E25. *Food Chem.* **242**: 45-52.
  13. Dertli E., Colquhoun I. J., Gunning A. P., Bongaerts R. J., Le Gall G., Bonev B. B., Mayer M. J., Narbad A. (2013) Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *J. Biol. Chem.* **288**: 31938-31951.
  14. Dertli E., Mayer M. J., Colquhoun I. J., Narbad A. (2016) EpsA is an essential gene in exopolysaccharide production in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *Microb. Biotechnol.* **9**: 496-501.
  15. Dertli E., Mayer M. J., Narbad A. (2015) Impact of the exopolysaccharide layer of biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *BMC Microbiol.* **15**: 8.
  16. Dierksen K. P., Sandine W. E., Trempy J. E. (1997) Expression of ropy and mucoid phenotypes in *Lactococcus lactis*. *J Dairy Sci.* **80**: 1528-1536.
  17. Dimopoulou M., Bardeau T., Ramonet P.-Y., Miot-Certier C., Claisse O., Doco T., Petrel M., Lucas P., Dols-Lafargue M. (2016) Exopolysaccharides produced by *Oenococcus oeni*: From genomic and phenotypic analysis to technological valorization. *Food microbiol.* **53**: 10-17.
  18. Fanning S., Hall L. J., Cronin M., Zomer A., MacSharry J., Goulding D., Motherway M. O., Shanahan F., Nally K., Dougan G., van Sinderen D. (2012) Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**: 2108-2113.
  19. Galle S., Arendt E. K. (2014) Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **54**: 891-901.
  20. Górska S., Sandstöm C., Wojas-Turek J., Rossowska J., Pajtasz-Piasecka E., Brzozowska E., Gamian A. (2016) Structural and immunomodulatory differences among lactobacilli exopolysaccharides isolated from intestines of mice with experimentally induced inflammatory bowel disease. *Sci. Rep.* **6**: 37613.
  21. Hajimohammadi Farimani R., Habibi Najafi M. B., Fazly Bazzaz B. S., Edalatian M. R., Bahrami A. R., Flórez A. B., Mayo B. (2016) Identification, typing and functional characterization of dominant lactic acid bacteria strains from Iranian traditional yoghurt. *Eur. Food Res. Technol.* **242**: 517-526.

22. Hidalgo-Cantabrana C., López P., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C. G., Suárez A., Margolles A., Ruas-Madiedo P. (2012) Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics Antimicro. Prot.* **4**: 227-237.
23. Hidalgo-Cantabrana C., Sánchez B., Álvarez-Martín P., López P., Martínez-Álvarez N., Delley M., Martí M., Varela E., Suárez A., Antolin M., Guarner F., Berger B., Ruas-Madiedo P., Margolles A. (2015) A single mutation in the gene responsible for the mucoid phenotype of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* confers surface and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 7960-7968.
24. Hidalgo-Cantabrana C., Sánchez B., Milani C., Ventura M., Margolles A., Ruas-Madiedo P. (2014) Genomic overview and biological functions of exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 9-18.
25. Jiang Y., Yang Z. (2018) A functional and genetic overview of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Funct. Foods.* **47**: 229-240.
26. Laine R. A. (1994) A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology.* **4**: 759-767.
27. Lamothe G. T., Jolly L., Mollet B., Stringele F. (2002) Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Arch. Microbiol.* **178**: 218-228.
28. Lebeer S., Claes I. J. J., Verhoeven T. L. A., Vanderleyden J., De Keersmaecker S. C. J. (2010) Exopolysaccharides of *Lactobacillus rhamnosus* GG from a protective shield against innate immune factors in the intestine. *Microbial. Biotechnol.* **4**: 368-374.
29. Lebeer S., Verhoeven T. L. A., Francius G., Schoofs G., Lambrichts I., Dufrêne Y., Vanderleyden J., De Keersmaecker S. C. J. (2009) Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3554-3563.
30. Lee I. C., Caggianiello G., van Swam I. I., Taverne N., Meijerink M., Bron P. A., Spano G., Kleerebezem M. (2016) Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 3959-3970.

31. Leroy F., De Vuyst L. (2016) Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. *J. Dairy Sci.* **99**: 3229-3238.
32. Ludbrook K. A., Russell C. M., Greig R. I. (1997) Exopolysaccharide production from lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *J. Food Sci.* **62**: 597-600.
33. Mende S., Peter M., Bartels K., Dong T., Rohm H., Jaros D. (2013) Concentration dependent effects of dextran on the physical properties of acid milk gels. *Carbohydr. Polym.* **98**: 1389-1396.
34. Mende S., Rohm H., Jaros D. (2016) Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *Int. Dairy J.* **52**: 57-71.
35. Mozzi F., Torino M. I., de Valdez G.F. (2001) Identification of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria. Humana Press. *Food Microbiology Protocols*: 183-190.
36. Mozzi F., Vaningelgem F., Hébert E. M., Van der Meulen R., Moreno M. R. F., de Valdez G. F., De Vuyst L. (2006) Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microb.* **72**: 4431-4435.
37. Oleksy M., Klewicka L. (2018) Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: biosynthesis and applications. *Cri. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**: 450-462.
38. Ricciardi A., Parente E., Clementi F. (1997) A simple method for the screening of lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides in liquid media. *Biotechnol. Tech.* **11**: 271-271.
39. Rossi O., Khan M. T., Schwarzer M., Hudcovic T., Srutkova D., Duncan S. H., Stolte E. H., Kozakova H., Flint H. J., Samsom J. N., Harmsen H. J. M., Wells J. M. (2015) *Faecalibacterium prausnitzii* strain HTF-F and its extracellular polymeric matrix attenuate clinical parameters in DSS-induced colitis. *PLoS one.* **10(4)**: e0123013.
40. 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.
41. Ruas-Madiedo P., Medrano M., Salzar N., de los Reyes- Gavilán C. G., Pérez P. F., Abraham A. G. (2010) Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate *in vitro* the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 2079-2986.

42. Rühmann B., Schmid J., Sieber V. (2016) Automated modular high throughput exopolysaccharide screening platform coupled with highly sensitive carbohydrate fingerprint analysis. *JoVE*. **(110)**: e53249.
43. Salzar N., Binetti A., Gueimonde M., Alonso A., Garrido P., González del Rey C., González C., Ruas-Madiedo P., de los Reyes-Gavilán C. G. (2011) Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strain *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA E44 orally administered to Wistar rats. *Int. J. Food. Microbiol.* **144**: 342-351.
44. Salzar 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.
45. Salzar N., Ruas-Madiedo P., Kolida S., Collins M., Rastall R. A., Gibson G. R., Clara G. (2009) Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human faecal microbiota in pH-controlled batch cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **135**: 260-267.
46. Sanni A. I., Onilude A. A., Ogunbanwo S. T., Fadahunsi I. F., Afolabi R. O. (2002) Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods in Nigeria. *Eur. Food Res. Technol.* **204(5)**: 405-407.
47. Servin A. L. (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews.* **28(4)**: 405-440.
48. Tahoun A., Masutani H., El-Sharkawy H., Gillespie T., Honda R. P., Kuwata K., Inagaki M., Yabe T., Nomura I., Suzuki T. (2017) Capsular polysaccharide inhibits adhesion of *Bifidobacterium longum* 105-A to enterocyte-like Caco-2 cells and phagocytosis by macrophages. *Gut Pathog.* **9**: 27.
49. Tallgren A. H., Airaksinen U., von Weissenberg R., Ojamo H., Kuusisto J., Leisola M. (1999) Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(2)**: 862-864.
50. Torino M. I., Font de Valdez G., Mozzi F. (2015) Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Front. Microbiol.* **6**: 834.
51. Van den Berg D. J. C., Smits A., Pot B., Ledebroer A. M., Kersters K., Verbake J. M., Verrips C. T. (1993) Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation processes and culture collections. *Food Biotechnology.* **7(3)**: 189-205.

52. Van Geel-Schutter G. H., Faber E. J., Smit E., Bonting K., Smith M. R., Ten Brink B., Kamerlin J. P., Vliegthart J. F. G., Dijkhuizen L. (1999) Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesis by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 3008-3014.
53. Van Geel-Schutter G. H., Flesch F., ten Brink B., Smith M. R., Dijkhuizen L. (1998) Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biot.* **65**: 697-703.
54. Vedamuthu E. R., Neville J. M. (1986) Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. *Appl. Environ. Microb.* **51**: 677-682.
55. Vijayendra S.V. N., Palanivel G., Mahadevamma S., Tharanathan R. N. (2008) Physico-chemical characterization of an exopolysaccharide produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp. CFR 2181 isolated from dahi, an Indian traditional lactic fermented milk product. *Carbohydr. Polym.* **72(2)**: 300-307.
56. Wachi S., Kanmani P., Tomosada Y., Kobayashi H., Yuri T., Egusa S., Shimazu T., Suda Y., Aso H., Sugawara M., Saito T., Mishima T., Vilena J., Kitazawa H. (2014) *Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L and its extracellular polysaccharides attenuate enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced inflammatory response in porcine intestinal epitheliocytes via ToC-like receptor-2 and 4. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**: 2080-2093.
57. 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. Biotechnol.* **100**: 1121-1135.
58. Zeidan A. A., Poulsen V. K., Janzen T., Buldo P., Derkx P. M. F., Øregaard G., Neves A. R. (2017) Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**: S168-S200.
59. Zotta T., Piraino P., Parente E., Salzano G., Ricciardi A. (2008) Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs for Cornetto, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24(9)**: 1785-1795.
60. 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-MTW. *Food Res. Int.* **74**: 199-207.
61. Živković M., Miljković M. S., Ruas-Madiedo P., Markelić M. B., Veljković 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.

## Izjava o izvornosti

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

Darija Begić

ime i prezime studenta