

Optimiranje postupaka ekstrakcije funkcionalnih biomolekula *Lactobacillus* sojeva

Karamehmedović, Belma

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:232810>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

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



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

Belma Karamehmedović
0058215472

**OPTIMIRANJE POSTUPAKA EKSTRAKCIJE
FUNKCIONALNIH BIOMOLEKULA
LACTOBACILLUS SOJEVA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Zagreb, 2022.

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Optimiranje postupaka ekstrakcije funkcionalnih biomolekula *Lactobacillus* sojeva

Belma Karamehmedović, 0058215472

Sažetak:

Površinske strukture probiotičkih bakterija su ključne molekule prilikom interakcija s mikrookolišom gastrointestinalnog trakta, te se pojedine istražuju kao funkcionalne biomolekule. Upravo predstavnici ovih biomolekula su egzopolisaharidi (EPS) koji su izvanstanični šećerni polimeri, odnosno S-proteini koji su skupina površinskih proteina koje eksprimiraju pojedini *Lactobacillus* sojevi. Funkcionalne biomolekule *Lactobacillus* sojeva se intenzivno istražuju te se prema recentnim istraživanjima definiraju kao postbiotici. Za strukturnu i funkcionalnu analizu ključno je provesti učinkovitu ekstrakciju ciljanih molekula. Upravo u ovom radu provedeno je optimiranje uvjeta ekstrakcije EPS iz odabranih *Lactobacillus* sojeva mikrobioma humanog mlijeka. EPS je ekstrahiran iz soja *Limosilactobacillus fermentum* MC1, a S-proteini iz sojeva *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13, MB20. Dijalizirani uzorci stanično vezanih EPS-b izolirani su primjenom tri različita agensa NaOH, fenol, EDTA. Najveći prinos od $Y_{EPS}=544,12$ mg/L određen je u uzorku EPS-b nakon primjene NaOH. Maksimalna deproteinizacija i koncentracija ekstracelularnih EPS (611,11 mg/L) (EPS-r), eksperimentalno je određena u uzorku ekstrahiranom u postupku pročišćavanja koji uključuje trikloroctenu kiselinu. SDS-PAGE-om površinskih proteina ustanovljena je prisutnost S-proteina kod sva četiri soja *L. brevis*. Metodom po Bradfordu određena je koncentracija ekstrahiranih S-proteina pri čemu je najveća koncentracija (27,286 mg/ μ L) određena u uzorku površinskih proteina soja *L. brevis* MB20.

Ključne riječi: *Limosilactobacillus fermentum*, *Levilactobacillus brevis*, egzopolisaharidi, S-proteini, ekstrakcija, postbiotici

Rad sadrži: 30 stranica, 6 slika, 7 tablica, 31 literaturni navod

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

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac

Datum obrane: 7. rujan, 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Optimization of extraction of functional biomolecules of *Lactobacillus* strains

Belma Karamehmedović, 0058215472

Abstract:

The surface structures of probiotic bacteria are key molecules interacting with the microenvironment of the gastrointestinal tract, and some are being investigated as functional biomolecules. The representatives of these biomolecules are extracellular sugar polymers exopolysaccharides (EPS) and S-proteins, a group of surface proteins expressed by certain strains of *Lactobacillus*. Functional biomolecules of *Lactobacillus* spp. are intensively investigated and, according to recent research, are defined as postbiotics. Efficient extraction is crucial for the structural and functional analysis of target biomolecules. In this work, the optimization of EPS extraction conditions from selected *Lactobacillus* strains of the human milk microbiome was carried out. EPS was extracted from *Limosilactobacillus fermentum* MC1, and S-proteins from *Levilactobacillus brevis* strains MB1, MB2, MB13, MB20. Dialyzed samples of cell-bound EPS-b were isolated using three different agents: NaOH, phenol, and EDTA. The highest yield of $Y_{EPS}=544.12$ mg/L was determined in the EPS-b sample treated with NaOH. The maximum concentration of extracellular EPS (611.11 mg/L) (EPS-r) was experimentally determined in a sample extracted when trichloroacetic acid (TCA) was applied. SDS-PAGE of surface proteins established the presence of S-protein in all four strains of *L. brevis*. The concentration of extracted S-proteins was determined using the Bradford method, with the highest concentration (27.286 mg/ μ L) being determined in the sample of surface proteins of the strain *L. brevis* MB20.

Keywords: *Limosilactobacillus fermentum*, *Levilactobacillus brevis*, exopolysaccharides, S-proteins, extraction, postbiotics

Thesis contains: 30 pages, 6 figures, 7 tables, 31 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Jasna Novak, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD

Thesis defended: 7th September, 2022

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak, a uz pomoć dr. sc. Katarine Butorac. Rad je izrađen u okviru projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Potencijalne terapijske biomolekule druge generacije probiotika“ (IP-2019-04-2237; 2019.-2023.) kojeg je voditeljica prof. dr. sc. Blaženka Kos.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. POTENCIJALNI POSTBIOTICI <i>LACTOBACILLUS</i> SOJEVA	2
2.2. FUNKCIONALNE BIOMOLEKULE I INTEGRITET INTESTINALNE BARIJERE.	4
2.3. EGZOPOLISAHARIDI	5
2.4. S-PROTEINI (PROTEINI S-SLOJA)	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. RADNI MIRKOORGANIZMI	9
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE	9
3.1.3. KEMIKALIJE	10
3.1.4. APARATURA I PRIBOR	11
3.2. METODE	12
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizma	12
3.2.2. Izolacija egzopolisaharida	12
3.2.2.1. <i>Detekcija sojeva producenata egzopolisaharida (EPS)</i>	12
3.2.2.2. <i>Uzgoj soja <i>L. fermentum</i> MCI i sinteza EPS-a</i>	13
3.2.2.3. <i>Optimizacija metoda za izolaciju egzopolisaharida</i>	13
3.2.2.3.1. <i>Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida vezanih na površinu bakterijske stanice</i>	13
3.2.2.3.2. <i>Izolacija egzopolisaharida otpuštenih u medij</i>	14
3.2.3. Izolacija S-proteina	14
3.2.3.1. <i>Indirektna metoda određivanja stanica</i>	14
3.2.3.2. <i>Uzgoj soja <i>L. brevis</i> i uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih stanica</i>	15
3.2.3.3. <i>Određivanje koncentracije metodom po Bradfordu</i>	15
3.2.3.4. <i>SDS-PAGE</i>	16
3.2.3.5. <i>Izolacija i pročišćavanje S-proteina</i>	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. OPTIMIRANJE IZOLACIJE EGZOPOLISAHARIDA <i>L. FERMENTUM</i>	19
4.2. EKSTRAKCIJA S-PROTEINA	23
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Lactobacillus je rod štapićastih, gram-pozitivnih, fakultativno anaerobnih bakterija koje ne stvaraju spore iz phyluma *Firmicutes*. Laktobacili metaboliziraju ugljikohidrate kako bi proizveli mliječnu kiselinu, što ih čini najbrojnijim rodovima unutar skupine bakterija mliječne kiseline (BMK) (Dempsey i Corr, 2022).

BMK su skupina gram-pozitivnih bakterija koje sudjeluju u mnogim prirodnim procesima fermentacije hrane, ali se također široko koriste u industriji proizvodnje hrane (Castro-Bravo i sur., 2018). Budući da nekoliko vrsta laktobacila ima status GRAS (engl. *Generally Regarded As Safe*), a neke od njih imaju sposobnost interakcije s crijevnim epitelnim stanicama, njihova moguća primjena kao probiotika (Mulder i sur., 1997) potakla je znanstveni interes (Jakava-Viljanen i Palva, 2007). Smatra se da *Lactobacillus* sojevi, koji se konzumiraju kao probiotici moduliraju autohtonu crijevnu mikrobiotu i poboljšavaju zdravlje putem višestrukih mehanizama djelovanja (Dempsey i Corr, 2022). Laktobacili imaju važnu ulogu u održavanju stabilnosti gastrointestinalnog trakta (GIT), u prevenciji crijevnih infekcija i, općenito, u održavanju zdravlja crijeva (Jakava-Viljanen i Palva, 2007). Specifični proteini na površini bakterijske stanice odnosno proteini S-sloja ili S-proteini su skupina proteina identificiranih kao adhezini u nekim *Lactobacillus* sojevima (Jakava-Viljanen i Palva, 2007). Ovi površinski proteini posreduju u adheziji laktobacila u GIT domaćina, jer imaju sposobnost vezanja na sloj peptidoglikana, na mukus, te epitelne stanice gastrointestinalnog sustava (Dempsey i Corr, 2022). Poznato je da nekoliko sojeva BMK sintetizira egzopolisaharide (EPS) (Wang i sur., 2014). EPS su površinski polimeri ugljikohidrata prisutni u većini bakterija koji djeluju kao zaštitni površinski sloj, ali su također u interakciji s mikookolišem (Castro-Bravo i sur., 2018). U ovom radu, ispitati će se i optimirati postupci izolacije EPS-a, i to egzopolisaharida vezanih za stanicu (EPS-b) koji blisko prijanjaju uz površinu bakterije i otpuštenih egzopolisaharida (EPS-r) koji se oslobađaju ekstracelularno u okolni medij (Wang i sur., 2014). Prema tome, cilj ovog završnog rada je optimiranje protokola za ekstrakciju S-proteina i egzopolisaharida (EPS) s obzirom da se ove molekule istražuju kao funkcionalne biomolekule *Lactobacillus* sojeva koje posreduju probiotičku aktivnost, te imaju potencijal definiranja kao postbiotika.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POTENCIJALNI POSTBIOTICI *LACTOBACILLUS* SOJEVA

Laktobacili se intenzivno istražuju i u odnosu na druge bakterijske rodove, uspješno su okarakterizirani s aspekta genomike, te s obzirom na interakcije s ljudima u smislu zdravlja i bolesti. Funkcionalne značajke vrste *Lactobacillus* temelj su njihove potencijalne primjene kao probiotika (Dempsey i Corr, 2022).

Glavne predstavnici probiotičkih vrsta iz roda *Lactobacillus* su: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* i *L. rhamnosus* te *Levilactobacillus brevis*. Mnogo je istraživanja o potencijalnim zdravstvenim dobrobitima vrste *Lactobacillus*, iako dokazi pokazuju da mnoge značajke ovih probiotičkih bakterija ovise i o vrsti i soju. Unatoč tome, primijećeno je da jedna vrsta probiotika može pokazati poboljšanje u različitim skupinama pacijenata te da niz različitih probiotika ili kombinacija probiotika može pokazati učinkovitost u istom stanju, ističući postojanje očuvanih korisnih svojstava (Dempsey i Corr, 2022).

Daljnja istraživanja istražuju načine povećanja učinkovitosti, djelotvornosti, sigurnosti i kvalitete probiotika izolacijom biomolekula izvedenih iz probiotika. Oni su opisani kao postbiotici, paraprotiotici, protiotici ubijani toplinom i drugi (Dempsey i Corr, 2022).

Međunarodna znanstvena udruga za protiotike i prebiotike (ISAPP) objavila je konsenzusnu izjavu o definiciji postprotiotika utvrđujući ih kao „pripravak neživih mikroorganizama i/ili njihovih komponenti koji daje zdravstvene dobrobiti domaćinu. Učinkoviti postprotiotici moraju sadržavati inaktivirane mikrobne stanice ili stanične komponente, sa ili bez metabolita, koji pridonose uočenim zdravstvenim prednostima (Dempsey i Corr, 2022). Postprotiotik je pojam izveden iz grčke riječi za 'post', što znači nakon, i 'bios', što znači život. Nadalje, „biotički“ pojmovi poput protiotici, prebiotici, sinbiotici i postprotiotici obuhvaćaju pojam mikroba ili njihovih supstrata (tablica 1). Stoga se pojam postprotiotik prikladno odnosi i na komponente nastale nakon što mikroorganizmi više nisu živi, odnosno, drugim riječima, neživi, mrtvi ili inaktivirani. Mikrobi koji čine postprotiotik mogu biti nežive, intaktne stanice ili mogu biti strukturni fragmenti mikroba, kao što su stanične stijenke (Vinderola i sur., 2022). Postprotiotici imaju nekoliko prednosti u odnosu na protiotike kao što su opisali Piqué i sur. (2019) : (I) Nema rizika od translokacije između lumena crijevi i krvi među ranjivim subjektima, (II) Nema rizika od stjecanja i prijenosa gena koji pružaju otpornost na antibiotike, (III) Nema

rizika od interferencije s normalnom crijevnom kolonizacijom u novorođenčadi, (IV) Oslobađanje aktivnih molekula iz disfunkcionalnih inaktiviranih stanica, izravniji prolazak kroz slojeve mukusa i stimuliranje epitelnih stanica, (V) Gubitak održivosti lizom stanice može proizvesti složenije korisne učinke i (VI) Lakše ekstrahiranje, standardiziranje, transport, skladištenje (Dempsey i Corr, 2022). Postbiotik mora biti izveden iz dobro definiranog mikroorganizma ili kombinacije mikroorganizama za kojeg su poznate genomske sekvence i koje su pripremljene korištenjem zacrtanog tehnološkog procesa proizvodnje i inaktivacije biomase, koji se može pouzdano reproducirati (Vinderola i sur., 2022).

Tablica 1. Definicije obitelji tvari „biotika“ konsenzusni paneli koje je sazvao ISAPP (prema Vinderola i sur., 2022)

POJAM	DEFINICIJA	POJEDNOSTAVLJEN OPIS	NAPOMENA
PROBIOTIK	Živi mikroorganizmi, koji kada se primjenjuju u odgovarajućoj količini, imaju zdravstveni učinak na domaćina.	Živi mikrobi koji su korisni za zdravlje domaćina	Identitet mora biti potvrđen sekvencioniranjem genoma. Učinkovita doza živih probiotika mora biti sačuvana do kraja vijeka trajanja
PREBIOTIK	Supstrat kojeg selektivno koristi domaćin. Mikroorganizmi koji imaju koristan učinak na zdravlje domaćina.	„Hrana“ za korisne mikrobe nastanjeni u ili na domaćinu koji osiguravaju zdravstveni učinak	Nisu sva vlakna prebiotici. Kandidate za prebiotike čine tvari poput polifenola, koja ne spadaju u vlakna
SINBIOTIK	Smjesa koja sadrži žive mikroorganizme i supstrat(e) koje selektivno koristi domaćin. Mikroorganizmi koji imaju koristan učinak na zdravlje domaćina	Probiotik + prebiotik, definirani kao komplementarni sinbiotik	Dvije vrste sinbiotika su definirane: komplementaran i sinergistički. Sinergistički sinbiotik sadrži žive mikrobe (ne nužno probiotik) i supstrat (ne nužno prebiotik) koje može koristiti za rast

Tablica 1. Definicije obitelji tvari „biotika“ konsenzusni paneli koje je sazvao ISAPP (prema Vinderola i sur., 2022) – nastavak

POSTBIOTIK	Priprema neživih mikroorganizama i/ili njihovih komponenata koje imaju koristan učinak na zdravlje domaćina.	Intaktni, neživi mikrobi ili dijelovi stanica, s ili bez metabolita, koji osiguravaju zdravstveni učinak na domaćina	Pročišćeni metaboliti se ne kvalificiraju kao postbiotici
-------------------	--	--	---

2.2. FUNKCIONALNE BIOMOLEKULE I INTEGRITET INTESTINALNE BARIJERE

Gastrointestinalna (GI) sluznica je najveća i jedno od najkritičnijih barijernih mjesta u tijelu gdje strani antigeni, mikrobi i potencijalni patogeni mogu doći u blizak kontakt s imunološkim sustavom domaćina. Radi se o polupropusnoj barijeri koja dopušta apsorpciju nutrijenata te imunološku osjetljivost uz ograničavanje dotoka potencijalno štetnih antigena ili mikroba. GI barijera se sastoji od četiri glavna elementa: komezalne mikrobiote, sloja mukusa, koji sadrži sekretorne IgA molekule (sIgA) i antimikrobne peptide, monosloja crijevnih epitelih stanica i limfoidnog tkiva povezanog s crijevima, koji čini različite populacije imunoloških stanica u odjeljcima duž GI trakta. Složenost regulacije polupropusne barijere ublažena je dinamičkom međuregulacijom između ovih elemenata koji zajedno rade na održavanju cjelovitosti crijevnih barijere i homeostaze. Funkcija crijevnih barijere može se poboljšati unosom nepatogenih mikroorganizama koji povećavaju fizičku barijeru sloja mukusa, pojačavaju urođenu obranu od patogena i smanjuju paracelularnu (međustaničnu) propusnost monosloja crijevnih epitelih stanica (Dempsey i Corr, 2022).

Smatra se da *Lactobacillus* sojevi koji se konzumiraju kao probiotici utječu na izvornu crijevnu mikrobiotu i pružaju zdravstveni učinak na domaćina različitim mehanizmima djelovanja. Probiotici jačaju funkciju crijevnih barijere povećanjem proizvodnje mukusa, stimuliranjem oslobađanja antimikrobnih peptida i proizvodnje sekretornog imunoglobulina A (sIgA), povećavajući cjelovitost čvrstog spoja monosloja crijevnih epitelih stanica i pružajući kompetitivnu otpornost protiv patogena (Dempsey i Corr, 2022).

Laktobacili također pomažu u otpornosti crijevnih barijere na invaziju patogena natječući se za vezna mjesta na monosloju crijevnih epitelih stanica, na glikoproteinima u sloju mukusa ili na plazminogenu izvanstaničnog matriksa (Dempsey i Corr, 2022).

Gubitak funkcije crijevne barijere impliciran je kao rani događaj u patogenezi raznih GI poremećaja poput celijakije i upalne crijevne bolesti uključujući i sistemske bolesti kao što su dijabetes tipa I, pretilost i multipla skleroza (Dempsey i Corr, 2022).

2.3. EGZOPOLISAHARIDI

Egzopolisaharidi (EPS) su egzocelularni polimeri prisutni na površini mnogih bakterija mliječne kiseline (Ruas-Madiedo i sur., 2006). EPS koje proizvode BMK predmet su sve većeg broja studija. BMK su organizmi prehrambene kvalitete, imaju status općenito priznatog kao sigurnog (GRAS) i mogu proizvesti EPS koji su potencijalno korisni kao sigurni aditivi za poboljšanje teksture i viskoznosti prirodnih fermentiranih mliječnih proizvoda te za sprječavanje sinereze (Tallon i sur., 2003). U prehrambenoj industriji EPS se koriste kao biozgušnjivači zbog svojih svojstava stabilizacije, emulgiranja ili želiranja (Wang i sur., 2014).

EPS koje proizvode bakterije mliječne kiseline mogu biti zdravstveno korisni za potrošača (Tallon i sur., 2003). U stanicama igraju ulogu u zaštiti od isušivanja, toksičnih spojeva, bakteriofaga, osmotskog stresa te omogućuju prianjanje na čvrste površine i stvaranje biofilma (Tallon i sur., 2003). Neka su istraživanja pokazala da ovi EPS mogu imati imunostimulirajuće i antitumorsko djelovanje te da fosfatne skupine u EPS-ima igraju važnu ulogu u aktivaciji makrofaga i limfocita (Tallon i sur., 2003). EPS iz sigurnih prirodnih izvora kao što u BMK mogu poslužiti kao dobra zamjena sintetskim antitumorskim lijekovima (Wang i sur., 2014). EPS se razlikuju s obzirom na staničnu lokaciju nakon sinteze u bakterijskoj stanici: egzopolisaharidi vezani za stanicu (EPS-b) koji blisko prijanjaju uz površinu bakterije i otpušteni egzopolisaharidi (EPS-r) koji se oslobađaju u okolni medij (Wang i sur., 2014). EPS probiotičkih sojeva su u interakciji s crijevnom mikrobiotom (Castro-Bravo i sur., 2018).

Mikrobiota je zajednički naziv za mikroorganizme prisutne u definiranom okolišu (Marchesi i Ravel, 2015). Crijevni ekosustav čovjeka jedan je od najgušće naseljenih i vrlo raznolikih mikrobnih okoliša poznatih do danas, sastavljen od stabilnih i promjenjivih mikrobnih skupina (Castro-Bravo i sur., 2018).

Tvrđi se da EPS imaju ključnu ulogu u interakciji laktobacila i bifidobakterija s domaćinom. Ovi polimeri (EPS) će djelovati kao jedna od efektorskih molekula uključenih u dijalog koji se uspostavlja na razini crijeva između probiotika, crijevne sluznice i mikrobiote

koja nastanjuje ovu nišu. Stoga se opsežno proučavaju i zdravstvena svojstva probiotičkih bakterija koje proizvode EPS (Castro-Bravo i sur., 2018). Dodavanje bifidobakterija i/ili laktobacila kao probiotičkog dodatka može pomoći u uravnoteženju abnormalne crijevne mikrobiote (Staudacher i sur., 2017). Općenito, prisutnost sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* unutar crijevne mikrobiote povezana je sa zdravstvenim stanjem domaćina (Castro-Bravo i sur., 2018). Površinski povezani EPS specifičnih sojeva *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* doprinose održavanju preživljavanja bakterija tijekom prolaska kroz gastrointestinalni sustav služeći kao zaštitni sloj prilikom prolaska kroz ekstremne uvjeta GIT-a, poput niskog pH u želucu i žučnih soli u kombinaciji s enzimima gušterače u dvanaesniku. Nakon što bakterije koje proizvode EPS dopiju u debelo crijevo, ove površinske makromolekule uključene su u interakciju s crijevnom sluznicom (Castro-Bravo i sur., 2018). Smatra se da prianjanje na crijevni epitel, uglavnom na razini debelog crijeva, pomaže probiotičkim bakterijama da se prolazno nastane na područje crijevnog epitela i opstanu tijekom dužih razdoblja u crijevima, što će zauzvrat otežati kolonizaciju crijevnih patogena (Castro-Bravo i sur., 2018).

2.4. S-PROTEINI (proteini S-sloja)

Kako bi se olakšale potrebne interakcije sa stanicama domaćina, *Lactobacillus* vrste posjeduju različite komponente na svojoj vanjskoj površini. One uključuju proteine stanične stijenke, proteine S-sloja, pili proteine i „moonlight“ proteine (slika 1). Ovi površinski proteini olakšavaju prianjanje laktobacila na domaćina, jer imaju sposobnost vezanja na sloj peptidoglikana, na mukus te na epitelne stanice. Nekoliko *Lactobacillus* sojeva posjeduje kristalni površinski sloj glikoproteina, također poznat kao S-sloj, nekovalentno vezan na peptidoglikansku staničnu stijenku (Dempsey i Corr, 2022).

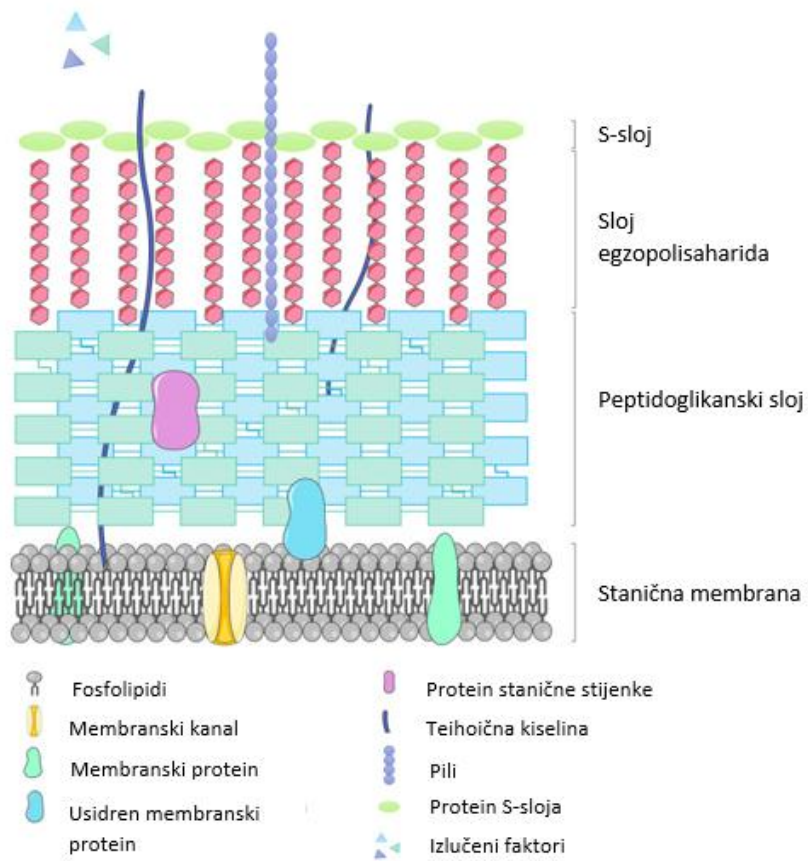
Nekoliko čimbenika pridonosi interakciji laktobacila s tkivima domaćina, kao što su hidrofobnost i autoagregacija stanične površine (Kos i sur., 2003), lipoteihoične kiseline (Granato i sur., 1999) i proteini na površini stanice (Jakava-Viljanen i Palva, 2007). Proteini na površini stanice (proteini S-sloja) su monomolekularni kristalni nizovi identificirani u nekoliko *Lactobacillus* vrsta. U nekim od ovih bakterija pokazalo se da S-slojevi funkcioniraju kao adhezini koji imaju ulogu posrednika u vezivanju stanica iz roda *Lactobacillus* na epitelne stanice domaćina i/ili u izvanstaničnom matriksu. Adhezivna svojstva S-slojeva na komponente matriksa također su povezana sa zaštitnim funkcijama

protiv invazivnosti patogenih bakterija, kao i s probiotičkim svojstvima bakterija s korisnim učinkom na zdravlje domaćina (Åvall-Jääskeläinen i Palva, 2005).

Većina S-slojeva sastavljena je od podjedinica jedne proteinske ili glikoproteinske vrste sposobne formiranja simetričnih nizova i prekrivanja površine stanice tijekom svih faza rasta (Jakava-Viljanen i sur., 2002).

Vrste *Lactobacillus*, kao što su *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus* i *L. gallinarum* te vrsta *Levilactobacillus brevis* posjeduju proteine S-sloja (Åvall-Jääskeläinen i Palva, 2005). S-slojevi su kristalni nizovi proteinskih podjedinica smještenih na krajnjem vanjskom dijelu stanične stijenke. Zbog velikog broja podjedinica površinskih proteina potrebnih za pokrivanje cijele površine stanice, proteini S-sloja predstavljaju približno 10 % ukupnih staničnih proteina (Åvall-Jääskeläinen i Palva, 2005).

Funkcije proteina S-sloja još nisu u potpunosti otkrivene, ali je predloženo da te strukture štite mikrobe od neprijateljskih okolišnih agenasa i pomažu u održavanju stanične cjelovitosti (Åvall-Jääskeläinen i Palva, 2005). Predložene su različite funkcije za S slojeve, kao što su zaštitni omotači, uloga molekularnog sita, promotori za adheziju stanica i prepoznavanje površine. Također postoji sve više dokaza da bakterije koje nose S-sloj mogu ekspresirati alternativne gene proteina S-sloja, za prilagodbu na različite faktore stresa, kao što je imunološki odgovor domaćina na patogene i drastične promjene uvjeta okoliša za nepatogene (Jakava-Viljanen i sur., 2002).



Slika 1. Prikaz specifičnih površinskih struktura stanica vrsta *Lactobacillus* i njihovih značajnih funkcionalnih biomolekula (Dempsey i Corr, 2022)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

Lactobacillus sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz mikrobioma majčinog mlijeka su pohranjeni kao bakterijske kulture Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Navedeni sojevi prikazani su u tablici 2 zajedno s pripadajućim optimalnim uvjetima rasta te hranjivom podlogom.

Tablica 2. Bakterijski sojevi iz Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura korišteni u ovom radu

BAKTERIJSKI SOJ	OZNAKA SOJA	HRANJIVA PODLOGA I UVJETI RASTA
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	MC1	MRS, 37 °C , anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB1	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB2	MRS, 37 °C , anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB13	MRS, 37 °C , anaerobno
<i>Levilactobacillus brevis</i>	MB20	MRS, 37 °C , anaerobno

3.1.2. Hranjive podloge

Korištene su hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7 H₂O 0,05; natrijev acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.

- MRS bujon istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

3.1.3. Kemikalije

- agar „Merck“, Njemačka
- 2 % glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- fenol, „Sigma“, SAD
- EDTA, „Sigma-Aldrich, SAD
- destilirana voda, PBF, Hrvatska
- etanol (96 %), „Kemika“, Hrvatska
- trikloroetena kiselina, „Fischer Scientific“, SAD
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- gvanidin hidroklorid, „AppliChem GmbH“, Njemačka
- Bradfordov reagens (Coomasie brilliant blue, fosforna kiselina, etanol, destilirana voda), PBF, Hrvatska
- kristal violet, „Kemika“, Hrvatska
- standard za elektroforezu proteina (molekulske mase 14-97 kDa), „Pharmacia“, SAD
- Tris-HCl pufer pH=8,8, PBF, Hrvatska
- akrilamid/bis-akrilamid, 30 % (w/v), „Sigma-Aldrich“, SAD
- TEMED (N, N, N', N'-tetra-metil-etilendiamin), „Bio-Rad“, SAD
- amonij-persulfat (APS); 10 %-tni (amonij-peroksodisulfat (APS), „Kemika“, Hrvatska)
- Tris-HCl pufer pH=6,6, PBF, Hrvatska
- SDS-PAGE pufer za elektroforezu (Tris, SDS, glicin, destilirana voda), PBF, Hrvatska

- Laemmli sample pufer (SDS (natrij-dodecilsulfat, „Sigma“, SAD), glicerol („Alkaloid“, Makedonija), 10 % β -merkaptoetanol („Sigma“, SAD), 0,004 % bromphenol blue (metilensko modrilo, „Sigma“, SAD), 0,125 M Tris-HCl)

3.1.4. Aparatura i pribor

- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- vaga „Technica“, Slovenija
- vortex V1 plus, „Biosan“, Latvija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- kivete, „Eppendorf“, SAD
- petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- centrifuga Centric 160, „Technica“, Slovenija
- zamrzivač, „New Brunswick Scientific“, SAD
- Erlenmeyerove tikvice, „Technische Glaswerke Ilmeau“, Njemačka
- autoklav, „Sutjeska“, Hrvatska
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- Bunsenov plamenik, „OMM Laboratory equipment“, Italija
- plasične tubice, „Eppendorf“, SAD
- kivete za centrifugiranje (15 mL, 50 mL), „Falcon“, Engleska
- staklene epruvete (16x160 mm), „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- stalci za tubice, „neoLab“, Njemačka

- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- mikrobiološke ušice, „Syntesis“, Italija
- Spektra/Por porozna membrana za dijalizu, „Spectrum Laboratories“, SAD
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- magnetna mješalica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- staklene čaše, „Technische Glaswerke Ilmeau“, Njemačka
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- komora za elektroforezu, „Bio-Rad“, SAD
- elektroforetske kadice, „Cleaver Scientific Ltd“, Velika Britanija
- igla za nanošenje proteinskih uzoraka, „Hamilton“, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizma

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u svježu hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, odnosno pri $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ prilikom sinteze egzopolisaharida.

3.2.2. Izolacija egzopolisaharida

3.2.2.1. Detekcija sojeva producenata egzopolisaharida (EPS)

Prisutnost egzopolisaharida ispitana je kod soja *L. fermentum* MC1 izoliranog iz mikrobioma majčinog mlijeka. Pozitivna indikacija proizvodnje egzopolisaharida, prema Cerning (1990), ispitana je doticanjem kolonija poraslih preko noći na MRS agaru sterilnom mikrobiološkom ušicom. Duge, rastezljive niti, formirane prilikom doticanja kolonija ukazivale su na prisutnost egzopolisaharida.

3.2.2.2. Uzgoj soja *L. fermentum* MC1 i sinteza EPS-a

Za uzgoj soja producenta egzopolisaharida korištene su MRS-agar hranjiva podloga te MRS tekuća hranjiva podloga. Prilikom uzgoja na MRS-agar hranjivoj podlozi, prekonocna kultura soja *L. fermentum* MC1 inokulirana je na MRS-agar ploču suplementiranu s 2 % glukoze (Kemika, Hrvatska) te ostavljena 3 dana u anaerobnim uvjetima pri 30 °C. Uzgoj u MRS tekućoj hranjivoj podlozi proveden je propagacijom u 500 mL MRS bujona suplementiranog s 2 % glukoze (Kemika, Hrvatska) u aerobnim uvjetima pri 30 °C.

3.2.2.3. Optimizacija metoda za izolaciju egzopolisaharida

3.2.2.3.1. Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida vezanih na površinu bakterijske stanice

Izolacija egzopolisaharida vezanih za površinu bakterijske stanice (EPS-b) prilagođena je prema Tallon i sur. (2003), Ruas-Madiedo i sur. (2006) te Wang i sur. (2014). Nakon uzgoja od 3 dana, bakterijska biomasa pokupljena je s MRS ploča primjenom sterilne destilirane vode plastičnim Drigalski štapićem (Ruas-Madiedo i sur., 2006). Pri uzgoju u MRS bujonu, talog stanica korišten je za izolaciju egzopolisaharida vezanih na površine stanica. Talogi stanica resuspendirani su u malom volumenu dH₂O te je potom izolacija egzopolisaharida provedena primjenom 3 različite metode. U prvoj metodi, suspenzija stanica tretirana je 1 vol 2 M NaOH te ostavljena na magnetnoj miješalici tijekom 24 sata (Ruas-Madiedo i sur., 2006). U drugoj metodi, suspenzija stanica tretirana je s 0,5 %-tnim fenolom te je ostavljena na magnetnoj miješalici (60 rpm) tijekom 4 sata pri 4 °C (Wang i sur., 2014). U trećoj metodi, suspenzija stanica tretirana je s 0,05 M EDTA te je ostavljena na magnetnoj miješalici (60 rpm) pri 4 °C (Wang i sur., 2014; Tallon i sur., 2003). Netopljiv stanični materijal uklonjen je centrifugiranjem pri 8000 o/min tijekom 30 minuta pri 4 °C. Egzopolisaharidi iz supernatanta istaloženi su dodatkom 4 volumena hladnog etanola (96 %) u svrhu uklanjanja lipida, nakon čega je uslijedila prekonocna inkubacija pri -20 °C gdje dolazi do poticanja taloženja egzopolisaharida. Istaloženi egzopolisaharidi centrifugirani su pri 8000 o/min na 4 °C tijekom 30 minuta te resuspendirani u sterilnoj destiliranoj vodi. Dijaliza je provedena u destiliranoj vodi u Spectra/Por membrani (10-14 Da) (Spectrum Laboratories, SAD) uz česte promjene dijalizata odnosno destilirane vode. Nakon dijalize uzorak je zamrznut preko noći pri -80

°C (New Brunswick Scientific, SAD), liofiliziran u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka) te su izvagane mase u svrhu određivanja prinosa na analitičkoj vagi (Scaltec, Njemačka).

3.2.2.3.2. Izolacija egzopolisaharida otpuštenih u medij

Izolacija egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPS-r) prilagođena je prema Tallon i sur. (2003). Nakon uzgoja bakterijske biomase u MRS bujonu, supernatant je korišten za izolaciju EPS-a otpuštenih u medij. Supernatant je tretiran s TCA (Fischer Scientific, SAD) u konačnoj koncentraciji od 20 % (w/v). Takva suspenzija inkubirana je pri 4 °C tijekom 2 sata na magnetnoj miješalici (New Brunswick Scientific, SAD). Nakon 2 sata provedeno je centrifugiranje pri 8000 o/min tijekom 30 minuta pri 4 °C u svrhu uklanjanja istaloženih proteina. Dobiveni supernatant tretiran je s 4 volumena hladnog etanola (96 %) u svrhu uklanjanja lipida, te je uslijedila prekonoćna inkubacija pri -20 °C kako bi se potaknulo taloženje egzopolisaharida. Nakon centrifugiranja, 30 minuta pri 8000 o/min (4 °C), talog je resuspendiran u sterilnoj destiliranoj vodi. Dijaliza je provedena u destiliranoj vodi u Spectra/Por membrani (cutt off 10-14 Da) (Spectrum Laboratories, SAD) uz česte promjene dijalizata odnosno destilirane vode. Nakon dijalize uzorak je zamrznut preko noći pri -80 °C (New Brunswick Scientific, SAD), liofiliziran u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka) te su izvagane mase u svrhu određivanja prinosa na analitičkoj vagi (Scaltec, Njemačka).

3.2.3. Izolacija S-proteina

3.2.3.1. Indirektna metoda određivanja stanica

Indirektna metoda određivanja broja stanica temelji se na brojanju poraslih bakterijskih kolonija nakon naciepljivanja priređenih decimalnih razrjeđenja suspenzija bakterijskih stanica na MRS-agar podlogu. 100 µL suspenzije bakterijskih stanica do 10⁻¹⁰ razrjeđenja suspendiranih u 900 µL sterilne fiziološke otopine naciepljeno je na MRS agar u obliku kapi (10 µL) u 2 paralele. Tako naciepljene MRS-agar podloge inkubirane su tijekom 48 sati pri 37 °C. Potom su izbrojane porasle kolonije te je izračunat broj živih stanica po mililitru

uzorka (engl. *Colony-forming units*, CFU).

$$\text{CFU} = (a/b) * c$$

a=broj poraslih kolonija

b= volumen upotrijebljenog uzorka

c=recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja

3.2.3.2. Uzgoj sojeva *L. brevis* i uklanjanje S-proteina s površine bakterijskih stanica

Prekonoćno uzgojene kulture sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 sterilno su inokulirane u 500 mL MRS bujona i uzgojene anaerobno preko noći pri 37 °C. Nakon centrifugiranja, 10 minuta pri 4200 o/min (4 °C), stanice su isprane s 10 mL PBS pufera pri 4 °C. Ponovno je uslijedilo centrifugiranje, 10 minuta pri 4200 o/min (4 °C), nakon kojeg je talog suspendiran u 4 mL, 5M GHCl, kako bi se uklonili proteini s površina stanica. Uzorak je stavljen na inkubaciju na ledu uz snažno miješanje tijekom 2 sata te potom centrifugiran 10 minuta pri 4200 o/min, 4 °C. Talog je ispran u PBS puferu, zamrznut na -20 °C te kuhan tijekom 10 minuta i korišten za SDS-PAGE. Supernatant je prokuhan u destiliranoj vodi te potom dijaliziran u Spectra/Por membrani (10-14 Da) (Spectrum Laboratories, SAD).

3.2.3.3. Određivanje koncentracije metodom po Bradfordu

Koncentracija ukupnih staničnih proteina iz dijaliziranih uzoraka sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13, MB20 određena je metodom po Bradfordu. Pripremljen je standard goveđeg serumskog albumina u rasponu koncentracija 0 µg/mL do 100 µg/mL u ukupnom volumenu od 100 µL uz dodatak 1 mL Bradfordovog reagensa. Otopine proteina pripremljene su tako što je u kivetu dodano 5 µL uzorka, 95 µL demineralizirane vode i 1 mL Bradfordovog reagensa. Apsorbancija je određena na 595 nm, a mjerenje je izvršeno unutar 60 minuta. Dobiveni rezultati služili su za izradu baždarnog dijagrama (slika 2) iz kojeg je određena koncentracija proteina (Bradford, 1976).

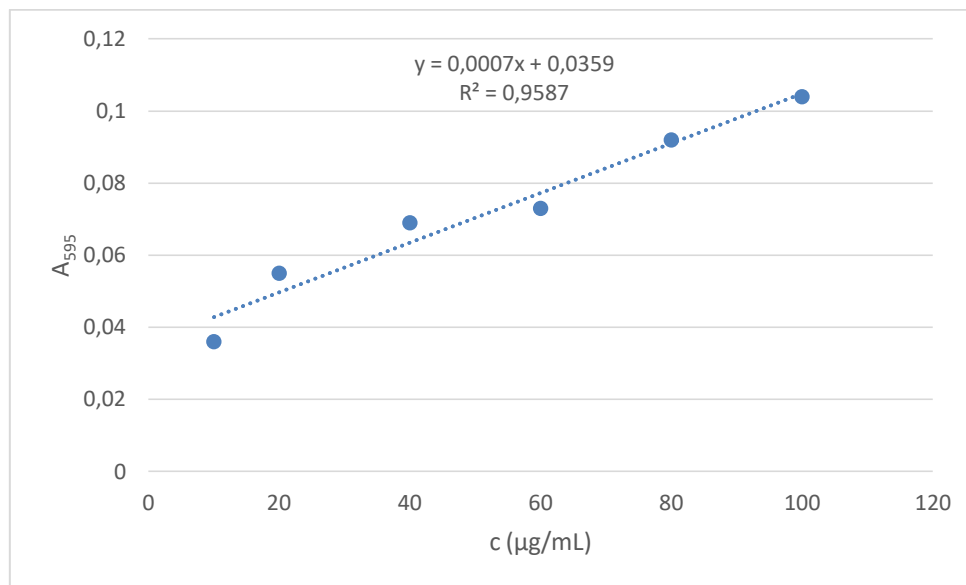
$$\gamma (\text{protein})_{\text{uzorak}} = (A_{595} - y) / a$$

γ (protein)_{uzorak} – koncentracija proteina u uzorku izražena u $\mu\text{g/mL}$

A_{595} – apsorbancija izmjerena na 595 nm

y - odsječak na osi y baždarnog dijagrama

a - koeficijent smjera pravca baždarnog dijagrama



Slika 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije staničnih proteina sojeva *L.brevis* MB1, MB2, MB13, MB20

3.2.3.4. SDS-PAGE

SDS-PAGE proveden je pri konstantnom naponu od 200 V kroz 45 min. Poliakrilamidni gel za provođenje elektroforeze sastoji se od donjeg gela (gel za separaciju, 10 %) te gornjeg gela (gel za sabijanje, 10 %) čiji sastav je prikazan u tablicama 3 i 4. Pripremljeni 10x koncentrirani pufer za elektroforezu (tablica 5) razrijeđen je u destiliranoj vodi te je dobiven 1x koncentrirani pufer potreban za elektroforezu (SDS-PAGE pufer za elektroforezu (Tris, SDS, glicin, destilirana voda), PBF, Hrvatska). Uzorci su nanjeni na 10 % poliakrilamidni gel. SDS-PAGE proveden je prema Manns (2011).

1) Tretiranje supernatanta

Dijalizati su liofilizirani preko noći, resuspendirani u 15 μL destilirane vode, dodan je jednak volumen Laemmli sample pufera. Kuhani su tijekom 10 minuta te je potom 15 μL supernatanta pomiješano s 5 μL reducirajućeg agensa i korišteno za SDS- PAGE.

2) Tretiranje taloga

U 100 μL odmrznutih taloga dodano je 100 μL Laemmli sample pufera, kuhano tijekom 2-3 min te centrifugirano 5 minuta a 13000 o/min. 15 μL supernatanta, pomiješano je s 5 μL reducirajućeg agensa i korišteno je po jažici gela za separaciju.

Tablica 3. Donji gel (gel za sabijanje, 10 %)

KEMIKALIJA	KOLIČINA
Tris-HCL pufer pH 8,8	2,5 mL
akrilamid/bisakrilamid 30 % (w/v)	3 mL
destilirana voda	2,5 mL
TEMED (N, N, N', N'-tetra-metil-etilendiamin)	5 μL
amonij-persulfat (APS); 10 %-tni	38 μL

Tablica 4. Gornjeg gela (gel za sabijanje, 10 %)

KEMIKALIJA	KOLIČINA
Tris-HCl pH 6,8	3,195 mL
akrilamid/bisakrilamid 30 % (w/v)	0,45 mL
TEMED (N, N, N', N'-tetra-metil-etilendiamin)	7,5 μL
amonij-persulfat (APS)	22,5 μL

Tablica 5. Priprema pufera za elektroforezu (10x) (SDS-PAGE pufer za elektroforezu (Tris, SDS, glicin, destilirana voda), PBF, Hrvatska)

KEMIKALIJA	100 mL
Tris (g)	3
SDS (g)	1
Glicin (g)	14,4
destilirana voda	do 100 mL

Pufer za uzorke za elektroforezu – reducirajući reagens

0,75 g Tris-a

0,095 g EDTA

2,5 g SDS-a

10 mL glicerola

0,005 % bromfenol

25 %-tni β -merkaptoetanol

3.2.3.5. Izolacija i pročišćavanje S-proteina

Supernatant je prokuhan u destiliranoj vodi te potom dijaliziran u Specra/ Por membrani (10-14 Da) (Spectrum Laboratories, SAD). Dijaliza je provedena u 200-500 puta većem volumenu PBS pufera pri 4 °C na magnetnoj mješalici (New Brunswick Scientific, SAD). PBS pufer tijekom dijalize mijenjan je svaka 2 sata. Dijalizati su zamrznuti na -80 °C (New Brunswick Scientific, SAD) te je provedena liofilizacija preko noći u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka). Mase su izvagane u svrhu određivanja prinosa na analitičkoj vagi (Scaltec, Njemačka).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OPTIMIRANJE IZOLACIJE EGZOPOLISAHARIDA *L. FERMENTUM*

Uz prepoznatu ulogu EPS-a koji se dodaju prehrambenim proizvodima za poboljšane teksture, viskoznosti, emulzifikacije i doprinos reološkim svojstvima hrane, odnosno smanjenju sinereze i kapaciteta vezanja vode, predlažu se i nove funkcije EPS-a probiotičkih BMK. Egzopolisaharidi *Lactobacillus* sojeva sadrže različite funkcionalne grupe, primjerice hidroksilnu grupu, fosfatnu grupu i karbonilnu grupu koje su vjerojatno značajne pri ispoljavanju njihove imunomodulatorne, antimikrobne, antioksidativne te antikancerogene aktivnosti. Egzopolisaharidi *Lactobacillus* sojeva mogu se koristiti i kao prehrambeni i terapijski agensi za regulaciju imunološkog sustava domaćina te čija učinkovitost doprinosi terapiji raznih zdravstvenih poremećaja i bolesti, uključujući rak, dijabetes i hipertenziju (Riaz Rajoka i sur., 2020). EPS sojevi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* mogu djelovati kao površinske efektorske makromolekule koje su direktno uključene u interakcije bakterija s različitim stanicama domaćina kao i s mikrobnom zajednicom u crijevnom lumenu. Egzopolisaharidi su primjer šećernih struktura koje su vezane na staničnu stijenkku ili se izlučuju u vanstanični medij. Unutar kolekcije BMK istraživačke grupe Laboratorija koja obuhvaća bakterijske izolate mikrobioma majčinog mlijeka ispitana je pojavnost tipičnog „ropy“ fenotipa, karakterističnog za biosintezu EPS. Između velikog broja autohtonih BMK, kod soja *L. fermentum* MC1 uočene su tipične blistave bakterijske kolonije koje na dodir mikrobiološkom ušicom formiraju filamentozne niti karakteristične za sojeve producente EPS-a, nakon prekonoćnog uzgoja na MRS hranjivom agaru obogaćenom ugljikohidratom glukozom (slika 3).



Slika 3. Pozitivna indikacija proizvodnje egzopolisaharida soja *L. fermentum* MC1

I okolišni i intrinzični čimbenici utječu na prinos i molekularnu težinu polisaharida koje proizvode BMK. Količina i molekularna težina su svojstva često povezana s tehnološko-funkcionalnim svojstvima polisaharida u različitim primjenama (Mende i sur., 2016).

Neki od radova koji također izvještavaju o „ropy“ fenotipu su Butorac i sur. (2021) te Tallon i sur. (2003). U radu Butorac i sur. (2021) soj producent EPS-a koji pokazuje svojstva „ropy“ fenotipa jest *L. fermentum* D12. U radu Tallon i sur. (2003) „ropy“ fenotip ispoljava se kod soja *L. plantarum* EP56.

U ovom radu ispitane su tri metode za ekstrakciju egzopolisaharida iz soja *L. fermentum* MC1. Cilj rada bio je optimirati postupak izolacije EPS-b (egzopolisaharidi vezani na površine stanica) i EPS-r (egzopolisaharidi otpušteni u okolni medij). S obzirom na to da se proizvodnja EPS-a može potaknuti viškom specifičnog ugljikohidrata u hranjivoj podlozi za rast, soj *L. fermentum* MC1 je uzgojen u MRS mediju kojem je dodana glukoza (Tallon i sur., 2003). Naime, prema Butorac i sur. (2021) upravo povećan udio glukoze u hranjivoj podlozi za rast soja *L. fermentum* D12, izoliranog iz mikrobioma autohtonog hrvatskog sira, u količini od 2 %, rezultirao je najvećim prinosom EPS-a.

EPS frakcije sojeva izolirane su iz stanične biomase sakupljene s agar-MRS ploča. Protokol izolacije egzopolisaharida vezanih na površini stanica (EPS-b) u kojem su korištene tri

metode ekstrakcije prilagođen je prema Tallon i sur. (2003), Ruas-Madiedo i sur. (2006) te Wang i sur. (2014). Rezultati izolacije egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPS-r) i vezanih na površini bakterijske stanice producenta (EPS-b), nakon uzgoja *L. fermentum* MC1 u tekućoj i krutoj MRS hranjivoj podlozi, prikazani su u tablici 6. U prvoj metodi suspenzija bakterijskih stanica tretirana je s 1 M NaOH te je ostvaren prinos EPS-a od 544,12 mg/L. U drugoj metodi bakterijske stanice su izložene utjecaju 0,5 % fenola te je ostvaren prinos od 403,23 mg/L. U trećoj metodi su stanice tretirane 0,05 M EDTA te je ostvaren prinos od 419,35 mg/L. S obzirom da je maksimalan prinos EPS-b izoliranih sa stanica soja *L. fermentum* MC1 uzgojenih na MRS pločama dobiven metodom ekstrakcije pomoću NaOH, za izolaciju EPS-b sa stanica soja *L. fermentum* MC1 uzgojenih u MRS bujonu također je korištena metoda NaOH (slika 4). Izolacijom EPS-b metodom NaOH sa stanica uzgojenih u MRS bujonu ostvaren je prinos od 38,6 mg/L. Izolacija EPS-r (egzopolisaharidi otpušteni u medij) provedena je prema Tallon i sur. (2003). Za izolaciju egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPS-r), supernatant je tretiran s TCA, s ciljem pročišćavanja i izdvajanja proteina, te je dobiven prinos egzopolisaharida od 611,11 mg/L. Prinos EPS-r dobiven ekstrakcijom sa stanica soja *L. fermentum* MC1 uzgojenih u tekućem mediju, ujedno je i maksimalni prinos dobiven u odnosu na sve ostale korištene metode.

Prema Adebayo-tayo i sur. (2008), aktivni proizvođači EPS-a su oni sojevi čiji je prinos proizvodnje EPS-a iznad 40 mg/L. Svi prinosi, izuzevši prinos $Y_{EPS} = 38,6$ mg/L, bili su iznad 40 mg/L, što *L. fermentum* MC1 čini aktivnim proizvođačem EPS-a.

Rezultati su u skladu s onima Tallon i sur. (2003) te Wang i sur. (2014) prema kojima su sojevi *Lactobacillus* vrste učinkoviti proizvođači EPS-a. Prema Tallon i sur. (2003), egzopolisaharidi vezani na površine stanica (EPS-b) su iz soja *Lactobacillus plantarum* EPE56 izolirani primjenom 1M NaCl te 0,05 M EDTA. Egzopolisaharidi otpušteni u medij (EPS-r) također su izolirani uz primjenu TCA (trikloroocetna kiselina) u koncentraciji od 20 %, za denaturaciju proteina. Ukupna količina EPS-a (zbroj stanično vezanih i otpuštenih frakcija EPS-a) je povećan s povećanjem broja stanica te je dosegut maksimum od 126,4 mg/L u stacionarnoj fazi. Količina EPS-b na početku stacionarne faze (od 0 do 25 h) iznosila je 73,6 mg/L, nakon čega je uslijedio pad koncentracije, kako se fermentacija privodila kraju (od 25 h do kraja fermentacije), do 44,6 mg/L. Za razliku od EPS-b, količina EPS-r rasla je kako se fermentacija privodila kraju do koncentracije od 79,3 mg/L. Prema Wang i sur. (2014) tri poznate metode za ekstrakciju EPS-b primijenjene su na stanice soja *Lactobacillus*

plantarum 70810. Nakon ultrazvučnog tretmana uzorka ekstrakta određen je najveći prinos EPS-b od 64,17 mg/L u usporedbi s druga dva ekstrakcijska protokola, tj. tretmanom 0,05 M EDTA (18,42 mg/L) i tretmanom 0,5 % fenolom (10,65 mg/L). Količina ukupnog EPS-a (EPS-b i EPS-r) povećana je nakon produženog vremena fermentacije i dosegla je maksimum od 581,03 mg/L u stacionarnoj fazi. Prinos EPS-b dosegnuo maksimalnu koncentraciju od 66,86 mg/L u 22. satu. Prinos EPS-r dosegnuo koncentraciju od 523,24 mg/L u 48. satu.

U usporedbi s rezultatima našeg rada, izolacija EPS-b metodom EDTA rezultirala je većim prinosom ($Y_{\text{EPS}} = 419,35$ mg/L) u usporedbi s prinosima EPS-a izoliranih metodom EDTA kod Tallon i sur. (2003) ($Y_{\text{EPS}} = 44,6$ mg/L) i Wang i sur. (2014) ($Y_{\text{EPS}} = 18,42$ mg/L). Također, u našem radu dobiven je veći prinos EPS-b ($Y_{\text{EPS}} = 403,23$ mg/L) izoliranih pomoću fenola nego li je dobiveno kod Wang i sur. (2014) ($Y_{\text{EPS}} = 10,65$ mg/L).

Tablica 6. Prinosi egzopolisaharida (Y_{EPS}) otpuštenih u medij (EPS-r) i vezanih na bakterijske stanice (EPS-b) nakon uzgoja *L. fermentum* MC1 u tekućoj i krutoj MRS hranjivoj podlozi uz dodatak 2 % glukoze

UZORAK	Y_{EPS} (mg/L)
EPS-b (MRS ploča); fenol	403,23
EPS-b (MRS ploča); EDTA	419,35
EPS-b (MRS ploča); NaOH	544,12
EPS-r (MRS bujon); TCA	611,11
EPS-b (MRS bujon); NaOH	38,6



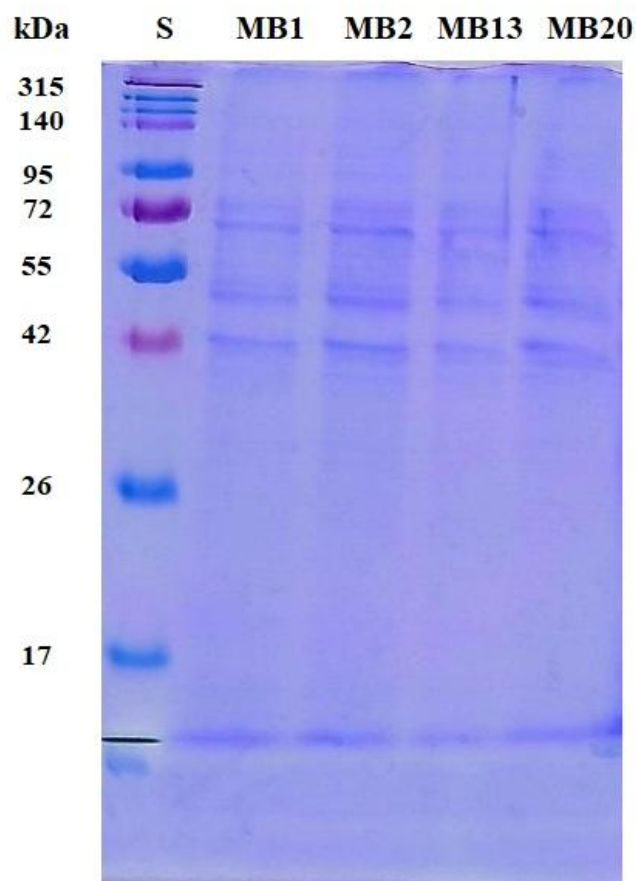
Slika 4. Liofilizirani uzorak EPS-b soja *L. fermentum* MC1 nakon ekstrakcije primjenom natrijeva hidroksida s površinskih poraslih bakterijskih kolonija na MRS agaru

4.2. EKSTRAKCIJA S-PROTEINA

Površinski S-sloj su strukture stanične ovojnice koje su sveprisutne kod gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, kao i kod arheja (Vilen i sur., 2009). S-slojevi su stanične strukture s dvodimenzionalnim nizovima koje su izgrađene od identičnih proteinskih ili glikoproteinskih podjedinica, te su molekulske mase od 40 do 200 kDa (Mobarak Qamsari i sur., 2016). Predložene su različite funkcije za S-slojeve, poput djelovanja kao molekularnih sita, zaštitnih slojeva te promotora za površinsko prepoznavanje i staničnu adheziju (Sleytr i sur., 2014). Stanične stijenke mnogih bakterija, uključujući mnoge vrste iz roda *Lactobacillus* prekrivene su parakristalnom strukturom površinskog sloja (S-sloj) (Hynönen i Palva, 2013).

S ciljem ekstrahiranja S-proteina bakterijske stanice *L. brevis* su tretirane s 5 M gvanidin hidrokloridom (GHCl). Nakon ekstrakcije GHCl-a provedena je dijaliza supernatanta za purifikaciju S-proteini. Nakon dijalize uzorci ekstrahiranih proteina su analizirani SDS-PAGE-om s ciljem detekcije proteina i procjene molekulske mase (slika 5). Kao standard su

korišteni proteini poznate molekulske mase u rasponu koji odgovara očekivanoj molekulskoj masi S-proteina. Na slici 5 su jasno vidljive proteinske vrpce veličine u rasponu od 42 kDa do 55 kDa kod svih ispitanih sojeva što nam upućuje da svi ispitani sojevi *L.brevis* eksprimiraju S-proteine. Jakava-Viljanen i sur. (2007), izvještavaju o eksprimiranim S-proteinima u 8 izolata sojeva vrste *Lactobacillus*. Prema njihovim podacima SDS-PAGE-a, dominantne proteinske vrpce su u rasponu molekulskih masa od 45 do 62 kDa što je u skladu s našim rezultatima. Prema Mobarak Qamsari i sur. (2016) dva soja pokazala su iste dominantne proteinske trake približno oko 48 kDa. Prema izvještaju Waško i sur. (2013), proteini S-sloja iz mliječnih sojeva *L. helveticus* imali su male molekularne mase u rasponu od 42 do 43,8 kDa. Navedeni rezultati u skladu su sa izvještajima Garrote i sur. (2004) i Kos i sur. (2003) koji navode da su tipične značajke proteina S-sloja iz laktobacila visok sadržaj pozitivno nabijenih ostataka, što ih čini visoko bazičnim proteinima s izoelektričnim točkama u rasponu od 9,35 do 10,4 te relativno malom molekularnom masom (u rasponu od 25 kDa do 71 kDa). Varijacije u molekularnoj masi proteina S-sloja među različitim vrstama laktobacila potvrđene su studijama drugih autora (Mobili i sur., 2009; Kos i sur., 2003; Yasui i sur.,1995).



Slika 5. SDS-PAGE površinskih proteina *L. brevis* sojeva nakon ekstrakcije s 5 M GHCl-om

Koncentracija ukupnih površinskih proteina sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13, MB20, ekstrahiranih s površine bakterijske stanica pomoću gvanidin hidroklorida, određena je metodom po Bradfordu. Mjerenje koncentracije proteina metodom po Bradfordu temelji se na činjenici da se spoj Coomasie Blue G 250 veže za arginilne i lizinske ostatke proteina, ali ne i za slobodne aminokiseline. Nakon mjerenja apsorbacije (A_{595}) pripremljenih standarda (raspon koncentracije govedeg serumskog albumina (BSA)) te uzoraka s nepoznatom koncentracijom proteina, konstruiran je baždarni dijagram iz kojeg je izračunata koncentracija proteina (Bradford, 1976). Određene koncentracije proteina prikazane su u tablici 7. Najveća koncentracija S-proteina određena je kod soja *L. brevis* MB20 te iznosi 27,286 $\mu\text{g/mL}$, dok je najniža koncentracija određena u uzorku ekstrakta proteina soja *L. brevis* MB13 koja iznosi 4,429 $\mu\text{g/mL}$.

U usporedbi s dobivenim koncentracijama ekstrahiranih S-proteina u ovom radu, pomoću 5M GHCl-a, veći prinos ostvaren je prema Eslami i sur. (2013) čija ekstrakcija S-proteina je provedena pomoću 4M GHCl-a. Prema izvještaju Eslami i sur. (2013), koncentracija ekstrahiranih S-proteina s površina stanica soja *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 upotrebom 4M gvanidin hidroklorida (GHCl), kretala se u rasponu od 0,512 do 1,15 mg/mL. Prema izvještaju Eslami i sur. (2013), također su dobivene veće koncentracije S-proteina ekstrakcijom pomoću uree i litijevog klorida (LiCl). Nakon ekstrakcije S-proteina pomoću uree određene su koncentracije u rasponu vrijednosti od 0,227 do 0,354 mg/mL, dok je koncentracija S-proteina pomoću LiCl bila u rasponu od 0,088 do 0,182 mg/mL.

Tablica 7. Izračunate koncentracije S-proteina za sojeve *L. brevis* MB1, MB2, MB13, MB20

Bakterijski soj	Koncentracija proteina ($\mu\text{g/mL}$)
<i>L. brevis</i> MB1	24,429
<i>L. brevis</i> MB2	25,857
<i>L. brevis</i> MB13	4,429
<i>L. brevis</i> MB20	27,286



Slika 6. Liofilizirani uzorci ekstrahiranih S-proteina sojeva *L. brevis* MB1, MB2, MB13, MB20

5. ZAKLJUČCI

1. Prisutnost rastezljivih filamentoznih niti dodirivanjem bakterijskih kultura poraslih na krutoj hranjivoj podlozi upućuje da je soj *Limosilactobacillus fermentum* MC1 producent egzopolisaharida..
2. Značajan čimbenik koji utječe na prinos EPS-a *Limosilactobacillus fermentum* MC1 je sastav hranjive podloga za uzgoj te eksperimentalni postupak ekstrakcije. Optimalni prinos EPS i deproteinizacija postignuta je ekstrakcijom s TCA, nakon kultivacije stanica producenta uzgojenih u tekućem MRS bujonu.
3. Gvanidin hidrokloridom su izolirani S-proteini s površine bakterijskih stanica soja *Levilactobacillus brevis* MB1, MB2, MB13, MB20.

6. LITERATURA

- Adebayo-tayo BC, Onilude AA (2008) Screening of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Some Nigerian Fermented Foods for EPS Production. *World Appl Sci J* **4(5)**, 741–747.
- Åvall-Jääskeläinen S, Palva A (2005) Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews* **29(3)**, 511-529. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.04.003>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72(1-2)**, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Butorac K, Novak J, Bellich B, Terán LC, Banić M, Leboš Pavunc A, i sur. (2021) Lyophilized alginate-based microspheres containing Lactobacillus fermentum D12, an exopolysaccharides producer, contribute to the strain's functionality in vitro. *Microbial Cell Factories* **20(1)**, <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01575-6>
- Castro-Bravo N, Wells JM, Margolles A, Ruas-Madiedo P (2018) Interactions of Surface Exopolysaccharides From Bifidobacterium and Lactobacillus Within the Intestinal Environment. *Frontiers in Microbiology* **9**, 2426. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02426>
- Cerning J (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **87(1-2)**, 113–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04883.x>
- Dempsey E, Corr SC (2022) Lactobacillus spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Immunology* **13**, 840245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>
- Eslami N, Kermanshahi RK, Erfan M (2013) Studying the Stability of S-Layer Protein of Lactobacillus Acidophilus ATCC 4356 in Simulated Gastrointestinal Fluids Using SDS-PAGE and Circular Dichroism. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR* **12**, 47–56.
- Garrote GL, Delfederico L, Bibiloni R, Abraham AG, Pérez PF, Semorile L, i sur. (2004) Lactobacilli isolated from kefir grains: Evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research* **71(2)**, 222–230. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000160>
- Granato D, Perotti F, Masserey I, Rouvet M, Golliard M, Servin A, i sur. (1999) Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of lactobacillus johnsonii la1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology* **65(3)**, 1071–1077. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.1071-1077.1999>
- Hynönen U, Palva A (2013) Lactobacillus surface layer proteins: Structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97(12)**, 5225–5243. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4962-2>
- Jakava-Viljanen M, Avall-Jaaskelainen S, Messner P, Sleytr UB, Palva A (2002) Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from Lactobacillus brevis ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions.

Journal of Bacteriology **184**(24), 6786–6795. <https://doi.org/10.1128/JB.184.24.6786-6795.2002>

Jakava-Viljanen M, Palva A (2007) Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *Veterinary Microbiology* **124**(3–4), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.029>

Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**(6), 981–987 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>

Manns JM (2011) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current Protocols in Microbiology* **22**(1), <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22>

Marchesi JR, Ravel J (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* **3**(1), <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>

Mende S, Rohm H, Jaros D (2016) Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. *International Dairy Journal* **52**, 57–71. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.08.002>

Mobarak Qamsari E, Kasra Kermanshahi R, Erfan M, Ghadam P, Sardari S, Eslami N (2017) Characteristics of surface layer proteins from two new and native strains of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Biological Macromolecules* **95**, 1004–1010. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.089>

Mobili P, de los Ángeles Serradell M, Trejo SA, Avilés Puigvert FX, Abraham AG, de Antoni GL (2009) Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **95**(4), 363–372. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9322-y>

Mulder RW, Havenaar R, Huis in't Veld JH (1997) Intervention strategies: The use of probiotics and competitive exclusion Microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry. *Probiotics* **2**, 187–207. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5860-2_8

Piqué N, Berlanga M, Miñana-Galbis D (2019) Health benefits of heat-killed (tyndallized) probiotics: An overview. *International Journal of Molecular Sciences* **20**(10), 2534. <https://doi.org/10.3390/ijms20102534>

Riaz Rajoka MS, Wu Y, Mehwish HM, Bansal M, Zhao L (2020) *Lactobacillus* exopolysaccharides: New Perspectives on Engineering Strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. *Trends in Food Science & Technology* **103**, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.003>

Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, de Los Reyes-Gavila'n CG, Gavila'n G, Salminen S (2006) Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of Food Protection*, **69**(8), 2011–

2015. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.8.2011>

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D (2014) S-layers: Principles and applications. *FEMS Microbiology Reviews* **38**(5), 823–864. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12063>

Staudacher HM, Lomer MCE, Farquharson FM, Louis P, Fava F, Franciosi E, i sur. (2017) A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome and A Probiotic Restores Bifidobacterium Species: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology* **153**(4), 936–947. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.06.010>

Tallon R, Bressollier P, Urdaci MC (2003) Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology* **154**(10), 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.09.006>

Vilen H, Hynönen U, Badelt-Lichtblau H, Ilk N, Jääskeläinen P, Torkkeli M i sur. (2009) Surface location of individual residues of SlpA provides insight into the *Lactobacillus brevis* S-layer. *Journal of Bacteriology* **191**(10), 3339–3349. <https://doi.org/10.1128/JB.01782-08>

Vinderola G, Sanders ME, Salminen S (2022) The Concept of Postbiotics. *Foods (Basel, Switzerland)* **11**(8). <https://doi.org/10.3390/foods11081077>

Wang K, Li W, Rui X, Chen X, Jiang M, Dong M (2014) Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules* **63**, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.036>

Waśko A, Polak-Berecka M, Kuzdraliński A, Skrzypek T (2014) Variability of S-layer proteins in *Lactobacillus helveticus* strains. *Anaerobe* **25**, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.11.004>

Yasui T, Yoda K, Kamiya T (1995) Analysis of S-layer proteins of *Lactobacillus brevis*. *FEMS Microbiology Letters* **133**(1-2), 181–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07881.x>

Izjava o izvornosti

Ja Belma Karamehmedović izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis