

# Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida soja *Lactobacillus fermentum* D12 nakon uzgoja u prisutnosti glukoze i saharoze kao izvora ugljika

---

Martinuš, Tihana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:388281>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Tihana Martinuš**  
**7092/BT**

**IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE EGZOPOLISAHARIDA SOJA**  
***Lactobacillus fermentum* D12 NAKON UZGOJA U PRISUTNOSTI**  
**GLUKOZE I SAHAROZE KAO IZVORA UGLJIKA**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Modul:** Biotehnologija 4

**Mentor:** Prof. dr. sc. Blaženka Kos

Zagreb, 2018.

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

## 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

### **Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida soja *Lactobacillus fermentum* D12 nakon uzgoja u prisutnosti glukoze i saharoze kao izvora ugljika**

Tihana Martinuš, 7092/BT

**Sažetak:** Egzopolisaharidi nastali kao produkt bakterija mliječne kiseline imaju brojne povoljne učinke zbog čega imaju široku primjenu u industrijama kao što su prehrambena, farmaceutska i kemijska industrija. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati proizvodnju egzopolisaharida kod određenih *Lactobacillus* sojeva uzgojenih na podlozi s glukozom i saharozom. Također su provedene određene metode kojima su nastali egzopolisaharidi izolirani iz podloge te pročišćeni. Određena je masa egzopolisaharida izlučenih u okolni medij i onih koji su ostali vezani na površini stanica, čistoća njihovih uzoraka te je provedena detekcija nastajanja biofilma nakon inkubacije koja je trajala 2 dana.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, probiotici, *Lactobacillus* sojevi, egzopolisaharidi

**Rad sadrži:** 29 stranica, 10 slika, 3 tablice, 49 referenci

**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. Blaženka Kos

**Pomoć pri izradi:** Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

**Rad predan:** 11.6.2018.

## BASIS DOCUMENTATION CARD

Završni rad

**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**

### **Isolation and purification of exopolysaccharide from *Lactobacillus fermentum* D12 strain after cultivation in the presence of glucose and sucrose as a carbon source**

Tihana Martinuš, 7092/BT

**Abstract:** Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria have many beneficial effects. That is the main reason of their appliance in many industries such as the food, pharmaceutical and chemical industry. Therefore, the aim of this thesis was to investigate production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* strains, which were cultivated on the medium with glucose and sucrose. Also, a few methods were used to isolate and purificate produced exopolysaccharides. The mass of produced exopolysaccharides (in the medium and the ones attached to the cells), purity of their samples and formation of biofilms was detected.

**Keywords:** lactic acid bacteria, probiotics, *Lactobacillus* strains, exopolysaccharides

**Thesis contains:** 29 pages, 10 pictures, 3 tables, 49 references

**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:** PhD Blaženka Kos, Full professor

**Technical support and assistance:** Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

**Thesis delivered:** 11<sup>th</sup> June 2018.

## SADRŽAJ

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. UVOD</b> .....                                                                                                                        | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....                                                                                                               | 2  |
| 2.1. BMK kao probiotici .....                                                                                                               | 2  |
| 2.2. Sastav stijenke i proizvodi BMK .....                                                                                                  | 4  |
| 2.3. Egzopolisaharidi .....                                                                                                                 | 5  |
| 2.4. Podjela egzopolisaharida .....                                                                                                         | 7  |
| 2.4.1. Homopolisaharidi (HoPS) .....                                                                                                        | 8  |
| 2.4.2. Heteropolisaharidi (HePS) .....                                                                                                      | 10 |
| 2.5. Proces proizvodnje egzopolisaharida .....                                                                                              | 11 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE RADA</b> .....                                                                                                    | 13 |
| 3.1. MATERIJALI .....                                                                                                                       | 13 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam .....                                                                                                           | 13 |
| 3.1.2. Hranjive podloge .....                                                                                                               | 13 |
| 3.1.3. Kemikalije .....                                                                                                                     | 13 |
| 3.1.4. Aparatura i pribor .....                                                                                                             | 14 |
| 3.2. METODE RADA .....                                                                                                                      | 15 |
| 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama .....                                                                                           | 15 |
| 3.2.2. Detekcija sojeva producenata egzopolisaharida (EPOL) .....                                                                           | 15 |
| 3.2.3. Uzgoj soja <i>L. fermentum</i> D12 i sinteza EPOL-a .....                                                                            | 15 |
| 3.2.4. Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida vezanih na površinu stanica (EPOL-b) i egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPOL-r) ..... | 16 |
| 3.2.5. Određivanje mase proizvedenih egzopolisaharida i određivanje čistoće UV/VIS spektrofotometrijom .....                                | 18 |
| 3.2.6. Detekcija formiranja biofilma soja <i>Lactobacillus fermentum</i> D12 .....                                                          | 19 |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....                                                                                                        | 20 |
| 4.1. Detekcija sojeva producenata egzopolisaharida (EPOL) .....                                                                             | 20 |
| 4.2. Izolacija egzopolisaharida vezanih na površinu stanica (EPOL-b) i egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPOL-r) .....                   | 21 |
| 4.3. Određivanje mase proizvedenih egzopolisaharida i određivanje čistoće UV-spektrofotometrijom .....                                      | 22 |
| 4.4. Detekcija formiranja biofilma .....                                                                                                    | 24 |
| <b>5. ZAKLJUČCI</b> .....                                                                                                                   | 25 |
| <b>6. POPIS LITERATURE</b> .....                                                                                                            | 26 |

## 1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) pripadaju grupi Gram-pozitivnih bakterija. Široko su rasprostranjene i mogu se pronaći kod biljaka, životinja i ljudi jer naseljavaju usne šupljine te mukozne površine urogenitalnog i gastrointestinalnog trakta. Osim navedenih staništa, mogu se naći i u hrani, stoga imaju i značajnu tehnološku ulogu u fermentaciji hrane. BMK su anaerobni i mikroaerofilni okruglasti ili štapičasti mikroorganizmi koji nemaju sposobnost stvaranja spora, a fermentacijom ugljikohidrata proizvode mliječnu kiselinu. To su katalaza-negativne bakterije koje imaju nizak sadržaj G+C parova baza u molekuli DNA i pokazuju sposobnost rasta u kiselim uvjetima. Brojni rodovi pripadaju skupini BMK, kao što su *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Leuconostoc*. Neki bakterijski sojevi iz roda *Lactobacillus* se koristi kao probiotici i kao takvi poboljšavaju kvalitetu života jer imaju povoljno djelovanje na domaćina, ubrzavaju rast "dobrih" bakterija i održavaju mikrobnu biofloru inestinalnog trakta. Kao starter kulture se koriste u proizvodnji različitih fermentiranih proizvoda čime poboljšavaju nutritivnu vrijednost, teksturu i okus namirnica. Te "dobre" bakterije pomažu kod probavljanja hrane i apsorpcije nutrijenata. Osim što se koriste u prehrane i zdravstvene svrhe, BMK predstavljaju i dobre vektore za proizvodnju terapijskih proteina. Mogućnost preživljavanja i rast na mnogim neuobičajenim površinama omogućen je posjedovanjem raznih proteina i ostalih komponenti u njihovoj staničnoj stijenci. Određene vrste BMK proizvode egzopolisaharide. To su biopolimeri koji služe stvaranju biofilma i za zaštitu bakterije, a njihova biosinteza ovisi o uvjetima u kojima mikroorganizam producent raste (tlak, temperatura, intenzitet svjetla). Prema građi molekule dijele se na homopolisaharide i heteropolisaharide te imaju široku primjenu u industrijama kao što su farmaceutska ili prehrambena industrija (Dilna i sur., 2015; Lee i sur., 2011). Stoga je cilj ovog rada bio ispitati sposobnost proizvodnje i koncentraciju proizvedenih egzopolisaharida kod sojeva *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus brevis* SF9B, *Lactobacillus brevis* SF15B, *Lactobacillus plantarum* SF9C, *Lactobacillus plantarum* SF15C, *Lactobacillus brevis* D6, *Enterococcus duran* D8, *Lactobacillus fermentum* D12 i *Lactobacillus plantarum* D13, uzgojenih na hranjivim podlogama s različitim izvorima ugljika (glukoza i saharoza) te izolacija nastalih egzopolisaharida, kao i detekcija formiranog biofilma nakon 2 dana.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. BMK kao probiotici

Brojne bakterijske vrste iz rodova *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc* koji pripadaju grupi BMK, koriste se kao dodaci prehrani čime se postiže cilj poboljšanja ljudskog zdravlja. Neki od tih sojeva su definirani kao probiotici. Izraz *probiotici* dolazi od grčkih riječi *pro* (prije) i *bios* (život), prevodi se "za život", a njihova prvenstvena zadaća je poboljšanje kvalitete života. Riječ *probiotici* prvi put je upotrijebljena kako bi se opisalo poboljšanje, odnosno obnova zdravstvenog stanja pothranjenih pacijenata pomoću raznih anorganskih i organskih dodataka u hrani. Hrana bogata probioticima također omogućuje postizanje ravnoteže u organizmu koja je narušena nekim antibiotskim tretmanima (Vasiljević i Shah, 2008). Bakterije mliječne kiseline, osim što doprinose okusu, nutritivnosti i teksturi fermentiranih namirnica, djeluju i kao aditivi jer inhibiraju rast štetnih i patogenih bakterija sintetizirajući različite metabolite, a između ostalih i specifične spojeve bakteriocine. BMK ubrzavaju rast mikrobne flore te imaju povoljan utjecaj na općenito zdravstveno stanje ljudi i životinja (Belhadj i sur., 2010; Holzapfel i sur., 2001), no nužno ne moraju biti stalno prisutne u intestinalnom traktu (tablica 1) (Gareau i sur., 2010). Kako bi upotreba određenih sojeva kao probiotika bila što efikasnija, važno ih je dobro selektirati. Kod odabira probiotičkih kultura koriste se razna *in vitro* istraživanja. Tijekom procesa selekcije, određivanje taksonomske klasifikacije soja provodi se kao prvi i osnovni korak što je važno zbog određivanja podrijetla, staništa i fiziologije mikroorganizma (Morelli, 2007). Kriteriji koje mikroorganizmi moraju zadovoljiti tijekom istraživanja su preživljavanje u kiselim uvjetima (nizak pH u želudcu), odnosno nepovoljnim uvjetima u intestinalnom traktu što uključuje litičko djelovanje probavnih enzima, toleranciju na žučne soli te oksidativni i hiperosmotski stres u debelom crijevu. Uz to, važni su još i stabilnost fenotipa i genotipa, stabilnost plazmida, mogućnost proizvodnje antimikrobnih tvari, antibiotska rezistentnost, sposobnost inhibicije patogena, imunogenost te sposobnost vezanja (adhezije) na crijevni epitel što je preduvjet za kolonizaciju crijevne sluznice (Tuomola i sur., 2007). Probiotičke kulture moraju imati sposobnost preživljavanja u uvjetima koji su prisutni na lokacijama gdje obitavaju. Osim toga, bitno je da su prihvaćene od strane imunostava kako ne bi došlo do proizvodnje antitijela protiv probiotika, niti ikakvih reakcija i nastalih produkata koji bi imali negativan utjecaj na probiotičku kulturu (Desai, 2008).



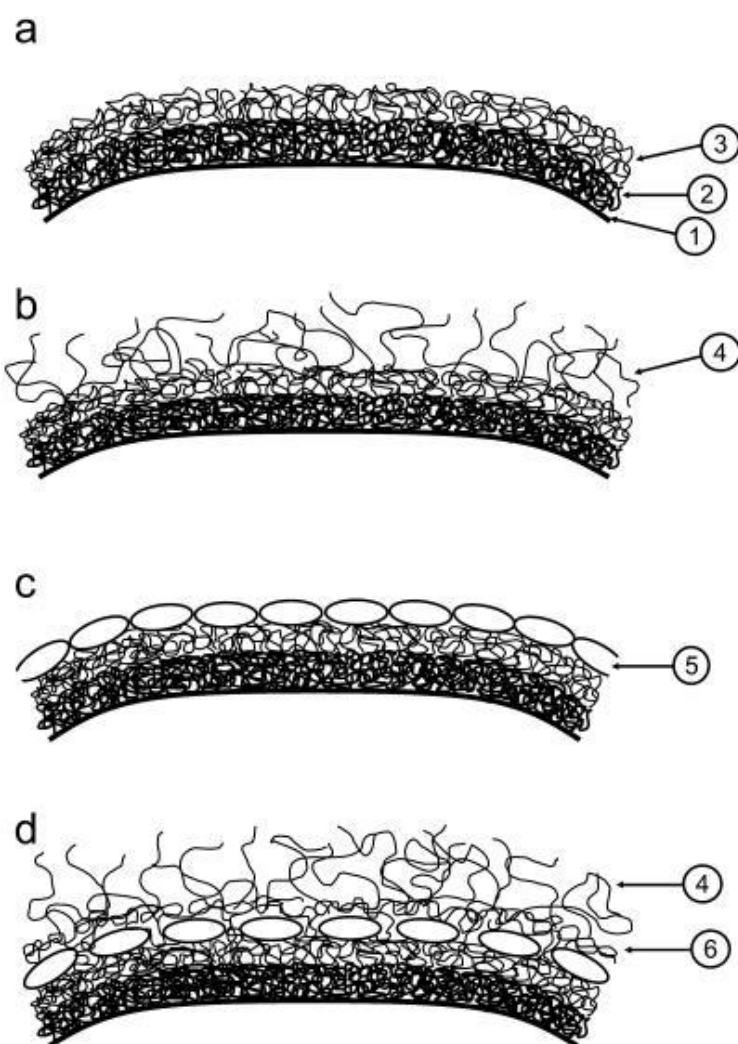
**Tablica 1.** Mikroorganizmi koji se koriste kao probiotici (Gareau i sur., 2010)

| <b>PROBIOTIK</b>                                                          | <b>Bolest kod ljudi na koju ima utjecaj</b>                | <b>Utjecaj kod životinjskih vrsta</b>                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kvasac</b>                                                             |                                                            |                                                                                          |
| <i>Saccharomyces boulardii</i>                                            | Infekcija bakterijom<br><i>Clostridium difficile</i>       | Kolitis uzrokovan bakterijom<br><i>Citrobacter rodentium</i>                             |
| <b>Gram-negativna bakterija</b>                                           |                                                            |                                                                                          |
| <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917                                       | -                                                          | Kolitis uzrokovan dekstran natrijevim sulfatom                                           |
| <b>Gram-pozitivne bakterije</b>                                           |                                                            |                                                                                          |
| <i>Bifidobacteria bifidum</i>                                             | -                                                          | Štakor s nekrotizirajućim enterokolitisom                                                |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (korišten s laktoferinom)               | Sepsa kod dojenčadi rođenih s vrlo malom tjelesnom težinom | -                                                                                        |
| <i>Lactococcus lactis</i> (proizveden tako da sintetizira interleukin 10) | Kronova bolest                                             | Miševi oboljeli od kolitisa uzrokovanog dekstran natrijevim sulfatom                     |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i>                                          | -                                                          | Visceralna hiperalgezija i kolitis uzrokovan bakterijom<br><i>Citrobacter rotendium</i>  |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                                            | Dijareja uzrokovana antibiotikom                           | -                                                                                        |
| <i>Lactobacillus casei</i>                                                | -                                                          | Kolitis uzrokovan dinitrobenzen sumpornom kiselinom                                      |
| <b>Kombinacije sojeva</b>                                                 |                                                            |                                                                                          |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG i <i>Bifidobacterium lactis</i>         | Bakterijske infekcije                                      | -                                                                                        |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> i <i>Lactobacillus helveticus</i>          | -                                                          | Kolitis uzrokovan bakterijom <i>C. rotendium</i> , kronični stres i stres u ranijoj dobi |

## 2.2. Sastav stijenke i proizvodi BMK

Podjela BMK provedena je na temelju biosintetskog puta kojim se odvija fermentacija heksoza. Homofermentativne bakterije mliječne kiseline u anaerobnim uvjetima fermentiraju 1 mol glukoze isključivo u mliječnu kiselinu. Biosintetski put kojim se provodi ovaj proces zove se Embden-Meyerhof-Parnasov put odnosno glikoliza. Rodovi homofermentativnih BMK su *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* i *Lactobacillus*. Značajnije vrste laktobacila koje pripadaju ovoj grupi bakterija su *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* i *L. salivarius*. Druga klasifikacijska grupa su heterofermentativne BMK koje koriste pentoza-fosfatni put ili pentoza fosfoketolazni put u kojem supstrat prevode u laktat ili mliječnu kiselinu kao konačne produkte fermentacije heksoza. Predstavnici ove grupe BMK su bakterije iz rodova *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella* i *Lactobacillus* od kojih su značajnije vrste *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri* te *L. reuteri*.

Veliku ulogu kod korištenja BMK u tehnološke, zdravstvene i prehrambene svrhe imaju sastav i struktura stanične stijenke koji imaju direktan utjecaj na sposobnost adhezije bakterije na površinu stanice domaćina. Glavna komponenta stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija je peptidoglikan kojeg čine lanci glikana. Lanci su izgrađeni od N-glukozamina povezanog pomoću  $\beta$ -1,4 veza s N-acetilmuraminskom kiselinom. Osim peptidoglikana, u stijenci se nalazi i teihonska kiselina koja uključuje teihonsku kiselinu stanične stijenke i lipoteihonsku kiselinu (Delcour i sur., 1999). Teihonske kiseline služe kao spremište iona u blizini stanične stijenke koji mogu zatrebati enzimima kako bi dobro funkcionirali, održavaju morfologiju bakterijskih stanica, kontroliraju autolizine, u interakciji su s imunološkim sustavom domaćina, imaju sposobnost prepoznavanja bakteriofaga te sudjeluju u kolonizaciji domaćina (Neuhaus i Baddiley, 2003). Na slici 1 može se vidjeti da se osim navedenih komponenti u stijenci nalaze i proteini, pili te brojni polisaharidi. Polisaharidi su kod bakterija podijeljeni na kapsularne polisaharide koji formiraju zaštitni omotač oko bakterije, zatim na polisaharide stanične stijenke koji se mogu, ali i ne moraju vezati na stanicu te ne čine bakterijsku kapsulu (Schär-Zammaretti i Ubbink, 2003). Treća skupina bakterijskih polisaharida su egzopolisaharidi koje bakterije izlučuju izvan stanice u okolna područja (Welman i Maddox, 2003; De Vuyst i Degeest, 1999). BMK osim ekstracelularnih polisaharida proizvode i oligosaharide koji imaju industrijsku funkciju kao zaslađivači, lijekovi protiv raka crijeva, prebiotici i nutraceutici (Patel i sur., 2012). Egzopolisaharidi dobivaju najveću pozornost i imaju veliku komercijalnu vrijednost zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava što omogućuje njihovu široku primjenu u brojnim industrijama.

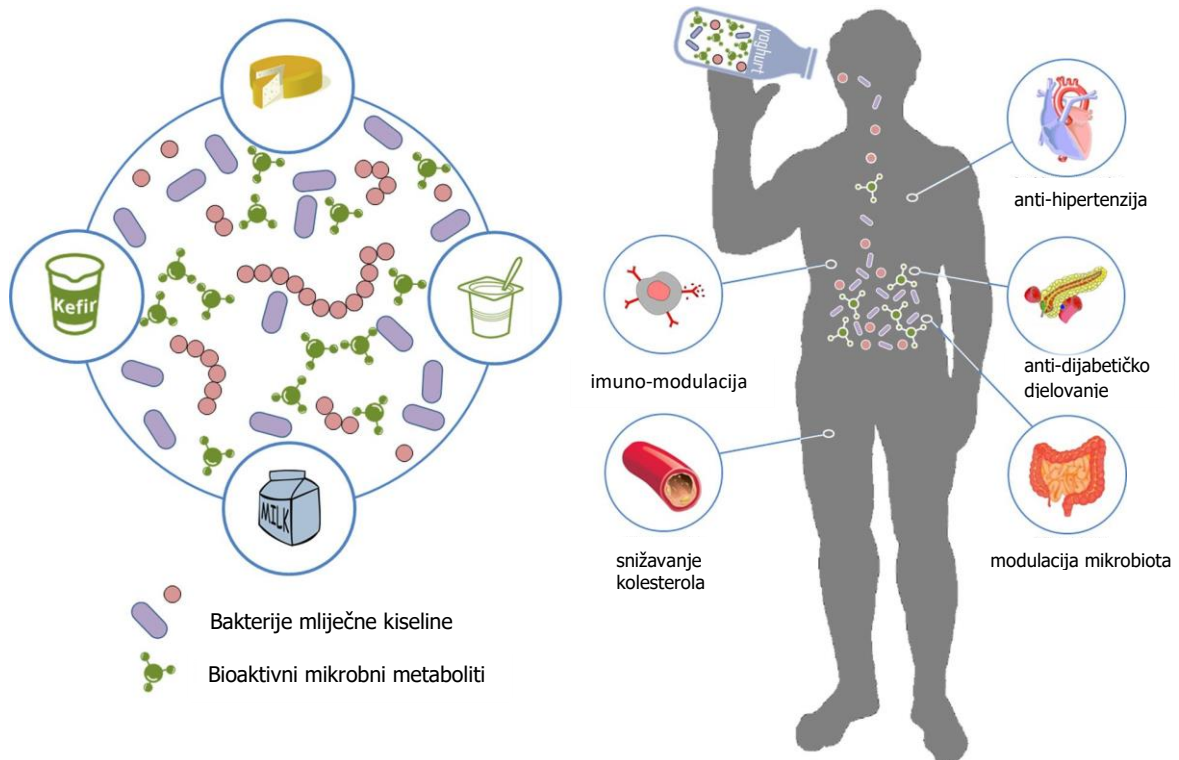


**Slika 1.** Prikaz modela stanične stijenke bakterije iz roda *Lactobacillus*; (1) Stanična membrana; (2) unutarnji sloj stanične stijenke bogat proteinima; (3) vanjski sloj stanične stijenke u kojem se nalaze razni polimeri kao što su polisaharidi i lipoteihonska kiselina; (4) egzopolisaharidi i ostali polimeri vezani za stijenku; (5) površinski proteini; (6) umreženi polimerni sloj koji sadrži površinske proteine izvan sloja (Schär-Zammaretti i Ubbink, 2003)

### 2.3. Egzopolisaharidi

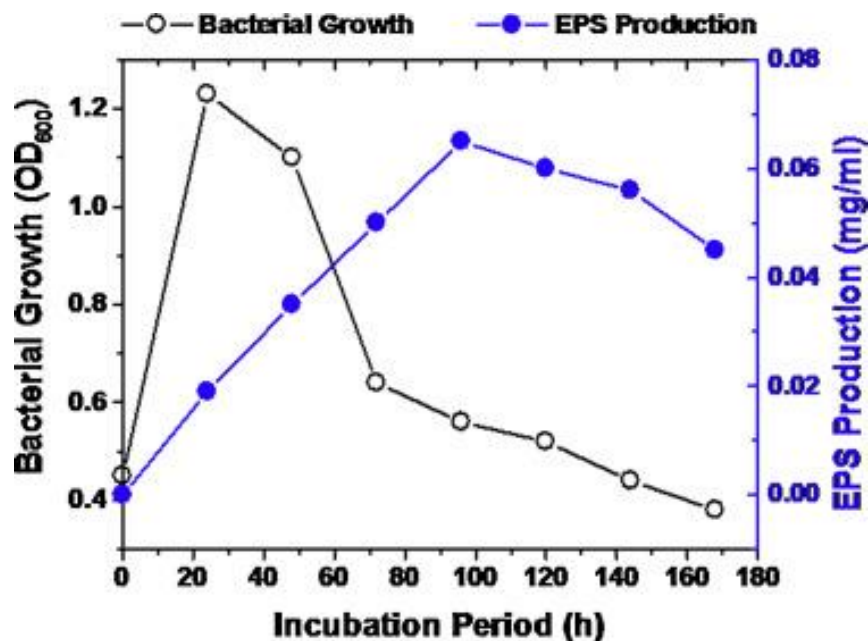
Ekstracelularni polisaharidi ili egzopolisaharidi predstavljaju biopolimere sintetizirane od strane velikog broja bakterija, a njihovu strukturu čine međusobno povezane monosaharidne jedinice i njihovi derivati. Karakterizira ih velika molekulska masa kao i sposobnost biodegradacije (Dilna i sur., 2015). Ovisno o mjestu na kojem se nalaze u stanici dijele se na kapsularne egzopolisaharide (cEPS) koji se vežu na površinu bakterijske stanice i na slobodne egzopolisaharide (fEPS) koji se ispuštaju u okolni medij stanice (Fontana i sur., 2015; Wang i

sur., 2014). Osim bakterija proizvode ih i plijesni, alge te biljke, a najveću pozornost kao mikroorganizmi producenti privukle su bakterije mliječne kiseline zbog GRAS statusa (Generally Recognised as Safe). Velik značaj u industriji imaju egzopolisaharidi proizvedeni upravo od BMK zbog povoljnog utjecaja na svojstva namirnica u koje su dodani te zbog pozitivnih posljedica konzumacije na ljudsko zdravlje. Pokazuju antitumorsku i antioksidativnu aktivnost, stimuliraju aktivnost imunostava te snižavaju razinu kolesterola u krvi (slika 2) (Giraffa, 2012). Koriste se kao bioflokulatni, bioapsorbensi, kao tvari za uklanjanje teških metala, a u prehrambene svrhe koriste se kao dodaci hrani koji poboljšavaju teksturu, nutritivnu vrijednost i senzorske karakteristike (Zajsek i sur., 2013; Kim i sur., 2010). Veliku ulogu imaju u fermentiranim mliječnim proizvodima kao što su sir, jogurti, vrhnje te razni deserti na mliječnoj bazi jer poboljšavaju teksturu i viskoznost ovih namirnica. Osim spomenutih mliječnih proizvoda, zbog istog efekta dodaju se i u povrće te mesne proizvode. Unatoč svim pozitivnim učincima i velikom potencijalu u industrijskoj primjeni, egzopolisaharidi pokazuju i negativne učinke. Mogu uzrokovati kvarenje hrane, a tijekom fermentacije vina i octa negativno utječu na reološka svojstva proizvoda. Stvaranje biofilma tijekom proizvodnje egzopolisaharida iz BMK uzrokuje biorazgradnju, a u mliječnoj industriji tom pojavom lako dolazi do higijenskih i tehničkih poteškoća (Poulsen, 1999).



**Slika 2.** Konzumiranje fermentiranih mliječnih proizvoda bogatih bakterijama mliječne kiseline koje proizvode egzopolisaharide te njihov povoljan učinak na zdravlje čovjeka (Giraffa, 2012)

Količina egzopolisaharida koju će BMK proizvesti ovisi o fiziološkim svojstvima mikroorganizma producenta, uvjetima biosinteze te o sastavu hranjive podloge. Uvjeti koji utječu na konačni prinos proizvoda su temperatura, pH vrijednost podloge, vrijeme trajanja biosinteze, količina dostupnog kisika te agitacija (miješanje i aeracija podloge). Za proizvodnju je također bitno osigurati optimalnu količinu minerala, vitamina i faktora rasta u podlozi koja osim navedenog sadrži i izvore ugljika te dušika, a najveći prinos egzopolisaharida omogućuju kompleksne podloge (Zajsek i sur., 2013). Na slici 3 može se vidjeti da koncentracija egzopolisaharida raste tijekom svih stadija ciklusa rasta bakterije *Bacillus circulans* i postiže maksimum kod 96 sati kultivacije, nakon čega proizvodnja počinje padati (Vidhyalakshmi i sur., 2016).



**Slika 3.** Krivulje koje pokazuju brzinu rasta mikroorganizma *Bacillus circulans* i koncentraciju proizvedenih egzopolisaharida u ovisnosti o vremenu trajanja inkubacije na podlozi koja je sadržavala glukozu, fruktozu, manozu i verbaskozu kao izvore ugljika (Vidhyalakshmi i sur., 2016)

#### 2.4. Podjela egzopolisaharida

Razgranate molekule egzopolisaharida izgrađene su od ponavljajućih ugljikohidratnih jedinica i njihovih derivata.

S obzirom na monomernu jedinicu od kojih su izgrađeni te s obzirom na put biosinteze, izvršena je podjela na homopolisaharide i heteropolisaharide (Jolly i sur., 2002).

#### 2.4.1. Homopolisaharidi (HoPS)

Kao što im i naziv govori, homopolisaharidi su građeni od jedne vrste monosaharidnih ponavljajućih jedinica. Njihova molekulska masa može iznositi do  $10^7$  Da (Kristo i sur., 2011). Podijeljeni su na glukane i fruktane, ovisno o tome jesu li građevne jedinice u formi D-glukoze ili D-fruktoze. Neki od predstavnika ove skupine egzopolisaharida su dekstran, mutan, reuteran, pululan, levan, inulin, kurdlan te poligalaktani. Biosinteza zahtjeva specifični supstrat kao što je saharoza, a ukupni prinos proizvodnih polisaharida kod BMK kao proizvođača je manji u odnosu na prinose egzopolisaharida proizvedenih iz drugih bakterija. BMK koje proizvode  $\alpha$ -D-glukane kao što su dekstran, mutan, alternan i reuteran, uz prisustvo ekstracelularne glukan sukraze, su *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus reuteri*.  $\beta$ -D-glukane proizvode *Pediococcus spp.* i *Streptococcus spp.* Kod proizvodnje fruktana aktivan je enzim fruktan sukraza pri čemu kao produkti nastaju levan i inulin, a bakterije producenti su *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc citreum* i *Lactobacillus reuteri*. Neuobičajeni homopolisaharidi poligalaktani su pentameri koji sadrže ponavljajuće galaktozne jedinice, a kao produkti su detektirani kod bakterijskih sojeva *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H414 i *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (CRL 406 i 142) (Torino i sur., 2015).

- Dekstran

Razgranati homopolisaharid dekstran ima veliku važnost i široku primjenu u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Osim izvornog oblika dekstrana primjenjuju se i djelomično razgrađeni dekstrani te njihovi derivati. Njihova primjena u pojedinoj industriji ovisi o podrijetlu i strukturi dekstrana. *Leuconostoc mesenteroides* je BMK čiji izlučeni enzim dekstran sukraza katalizira hidrolizu saharoze u dekstran. Glavni lanac molekule dekstrana čine monosaharidne jedinice povezane  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama. Stupanj grananja ovisi o podrijetlu enzima, a građevne jedinice na mjestima grananja vezane su  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 i  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama (Robyt, 1995). Zbog dobre topljivosti koja je omogućena radi visokog udjela od 95% linearnih veza u strukturi molekule, veliku zastupljenost u industriji nalazi dekstran proizveden pomoću dekstran sukraze iz bakterije *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F (Purama i Goyal, 2005). Soj *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146 proizvodi razgranati dekstran koji ima poroznu strukturu nalik mreži i služi kao matriks u kolonama za provođenje kromatografije. U medicini dekstrani mogu služiti kao terapijski agensi, omogućuju lakši protok krvi, povećavaju razinu šećera

u krvi, imaju ulogu u sintezi dekstran sulfata čime se onemogućuje zgrušavanje krvi, koriste se i kao osmotski agensi te kod nedostatka željeza za liječenje anemije. U prehrambenoj industriji imaju ulogu stabilizatora hrane i poboljšavaju svojstva tijesta (De Vuyst i sur., 2001). U industriji se koriste kao dijelovi biosenzora te osiguravaju prevlaku kako ne bi došlo do oksidacije metalnih nanočestica (Baurista i sur., 2005). Nedostaci primjene dekstrana zanemarivi su u odnosu na pozitivne učinke korištenja, no bitno ih je spomenuti, a to su plućni i cerebralni edem, anafilaksija, opasnost od zatajenja bubrega te disfunkcija trombocita.

- Reuteran

Reuteran je glukan čija molekulska masa iznosi do 40 MDa, a zbog dobre topljivosti u vodi našao je primjenu u pekarstvu (Arendt i sur., 2007). Proizvode ga sojevi laktobacila; *Lactobacillus reuteri* LB 121, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 i *Lactobacillus reuteri* 35–5 uz pomoć enzima reuteran sukraze. Monosahardine jedinice koja ga izgrađuju povezane su  $\alpha$ -1,4 vezama, koje su najzastupljenije (udio ovih veza iznosi 70%), te  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama. Na mjestima grananja prisutne su 4,6-disupstituirane  $\alpha$ -glukozilne jedinice, čija zastupljenost je 16% u odnosu na ukupan broj veza u strukturi (Kralj i sur., 2005).

- Levan

Levan je fruktan koji nastaje u reakciji prijenosa D-fruktozilnih jedinica iz fruktoze uz katalitičko djelovanje levan sukraze. Mikroorganizmi producenti su *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH 2590 i *Lactobacillus reuteri* LB 121. Levan pokazuje antitumorska svojstva, pomaže u slučaju snižavanja kolesterola, koristi se kao ekološko sredstvo za adheziju (ljepilo) (De Vuyst i sur., 2001), a u prehrambenoj industriji koristi se kao biološko sredstvo za zgušnjavanje. Ima malu viskoznost i veliku molekulsku masu. Levan proizveden iz soja *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH 2590 koristi se kao probiotik (Korakli i sur., 2003).

- Alternan

Ovaj egzopolisaharid našao je primjenu u industriji zahvaljujući svojoj strukturi koja mu omogućuje otpornost prema enzimskoj hidrolizi, dobro je topljiv spoj i male je viskoznosti. Dodaje se u kozmetičke proizvode, a koristi se i u prehrambenoj industriji jer obogaćuje namirnice. Alternan se može depolimerizirati uz djelovanje enzima alternanaze pri čemu nastaju oligosaharidi koji se zatim koriste kao probiotici (Cote,

2009) i zaslađivači s niskim glikemijskim indeksom (Leathers i sur., 2003). U strukturi alternana, građevne jedinice povezane su  $\alpha$ -1,3 i  $\alpha$ -1,6-glukozilnim vezama, a na mjestima grananja prisutne su  $\alpha$ -1,3 veze. Proizvode ih bakterije *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, *L. mesenteroides* NRRL B-1501 i *L. mesenteroides* NRRL B-1498.

- Inulinski tipovi

Ovaj tip egzopolisaharida proizveden je djelovanjem enzima inulin sukraze, a BMK *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 za njegovu proizvodnju troši saharozu. Osim spomenute bakterijske vrste, ovaj fruktan proizvode i sojevi *Streptococcus mutans* JC2, *Leuconostoc citreum* CW28 i *Lactobacillus reuteri* 121. Inulinski tip fruktana dodaje se u hranu jer stabiliziraju i zadržavaju teksturu namirnica, imaju sposobnost geliranja te kod ljudi i životinja djeluju kao probiotici. Povoljan učinak na organizam imaju i inulinski tipovi fruktooligosaharida. Oni sintetiziraju butiran koji hrani enterocite, sprječavaju prihvaćanje patogena na određene stanice i snizuju pH vrijednost lumena (Sartor, 2004).

#### 2.4.2. Heteropolisaharidi (HePS)

Građa ove skupine egzopolisaharida nešto je složenija od građe homopolisaharida. Molekule heteropolisaharida, koje mogu biti linearne i razgranate, načinjene su od ponavljajućih monomernih jedinica različitih struktura. Molekulska masa kreće se u rasponu od  $10^4$  do  $10^6$  Da (De Vuyst i Degeest, 1999), što je znatno manje od molekulske mase homopolisaharida. Strukturu može tvoriti od tri do osam ponavljajućih jedinica, a taj slijed sadrži dvije ili više vrsta monosaharida (Ryan i sur., 2015). Najčešće monosaharidne jedinice koje se pojavljuju u strukturi su D-glukoza, D-galaktoza i L-ramnoza. Proizvedeni heteropolisaharidi dolaze u krutom obliku ili nalik na sluz, a vrsta i količina proizvedenih heteropolisaharida ovisi o uvjetima biosinteze. Sastav strukture i vrstu veza u molekuli diktiraju sastav hranjive podloge, uvjeti kultivacije i soj mikroorganizma producenta. Proizvode ih različite vrste mezofilnih i termofilnih BMK (tablica 2) (Bajpai i sur., 2016). Prinosi heteropolisaharida pri optimalnim uvjetima biosinteze iznose od 0,15 do 0,6 g/L HePS (Cerning i Marshall, 1999). Najveći prinosi proizvoda zabilježeni su kod proizvodnje s bakterijama *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595 (2275 mg/L) i *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B (2500 mg/L). Predstavnici heteropolisaharida su ksantan, kefiran i gelan (Ruas-Madiedo i sur., 2002).



- Kefiran

Molekule kefirana čine glukozne i galaktozne jedinice u jednakom omjeru (Micheli i sur., 1999). Dobro je topljiv u vodi, a proizvode ga *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. kefir* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ima antimikrobno djelovanje, pomaže u zacjeljivanju rana, snižava krvni tlak i razinu kolesterola, usporava rast tumora, održava homeostazu u inestinalnom traktu, povećava razinu imunoglobulina (IgA), a oslobađanjem citokina u krv povoljno utječe na imunost (Piermaria i sur., 2009).

**Tablica 2.** Prikaz termofilnih i mezofilnih vrsta BMK koje proizvode heteropolisaharide (Bajpai i sur., 2016)

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

## 2.5. Proces proizvodnje egzopolisaharida

Biosinteza homopolisaharida i heteropolisaharida razlikuje se po tome što je proces nastanka heteropolisaharida nešto složeniji, no oba puta biosinteze zahtijevaju velik broj enzima i molekule potrebne za regulaciju procesa (Patel i sur., 2012). Biosinteza egzopolisaharida koju provode BMK se može rastaviti na 4 koraka:

- 1) prijenos šećera u citoplazmu
- 2) sinteza šećera s vezanom fosfatnom grupom na prvom ugljikovom atomu u molekuli
- 3) povezivanje ponavljajućih građevnih jedinica – polimerizacija
- 4) transport produkta izvan stanice (Becker, 2015).

Kod procesa sinteze homopolisaharida, enzim glikan sukraza kao supstrat koristi saharozu. Nakon reakcije povezivanja D-glukopiranozil jedinica na akceptor nastaju glikozidne veze, a reakcije provode enzimi glukoziltransferaze i fruktoziltransferaze. Provođenjem ovih reakcija ne dolazi do aktivnog transporta tvari, ne postoji potreba za biosintezom ekstracelularnih enzima i ne dolazi do potrošnje energije. To nije slučaj pri odvijanju reakcija sinteze heteropolisaharida (Juvonen i sur., 2015). koja zahtjeva energiju pri čemu se troše 3 molekule

ATP; za konverziju molekule šećera u molekulu šećera s vezanim fosfatom, zatim za sintezu svake nukleotidne jedinice koja gradi lanac te za fosforilaciju nosača lipida (Madhuri i Prabhakar, 2014; Harutoshi, 2013).

### 3. MATERIJALI I METODE RADA

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizam

#### SOJEVI:

- 1) *Lactobacillus helveticus* M92
- 2) *Lactobacillus brevis* ZG1
- 3) *Lactobacillus brevis* SF9B
- 4) *Lactobacillus brevis* SF15B
- 5) *Lactobacillus plantarum* SF9C
- 6) *Lactobacillus plantarum* SF15C
- 7) *Lactobacillus brevis* D6
- 8) *Enterococcus durans* D8
- 9) *Lactobacillus fermentum* D12
- 10) *Lactobacillus plantarum* D13

##### 3.1.2. Hranjive podloge

U radu je korištena hranjiva podloga za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1;  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara

##### 3.1.3. Kemikalije

- Agar, „Merck“, Njemačka
- Amonijev oksalat, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Destilirana voda
- Etanol (95%), „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Glukoza, „Kemika“, Hrvatska

- Kristal violet, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Kvašček ekstrakt, „Difco“, SAD
- Magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija
- Mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija
- „Nuclease free“ voda, „Nalgene“, SAD
- Natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Octena kiselina 33% (v/v), „J.T. Baker“, Njemačka
- Pepton, „Biolife“, Malazija
- Saharoza, „Kemika“, Hrvatska
- Triklorooctena kiselina, „Fisher Scientific“, SAD
- Tween 80, „Sigma“, SAD

#### 3.1.4. Aparatura i pribor

- Analitička vaga, „Scaltec“, Njemačka
- Autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- Automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Centifuga s hlađenjem J-21B, „Beckman Coulter“, Njemačka
- Centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- Centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- Centrifuga s hlađenjem 6K 15, „Sigma“, SAD
- Čitač mikrotitarskih pločica BioTek Synergy H1 Hybrid, „BioTek Instruments Inc.“, USA
- Eppendorf kivete (1,5 i 2 ml)
- Epruvete
- Hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- Kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml, 500 ml
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- Magnetska mješalica, „IKA-Werke GmbH & Co“, Njemačka
- Mikrobiološke ušice
- Mikrotitarske pločice, „Sarstedt“, Njemačka
- Petrijeve zdjelice

- Pinceta
- Spektra/Por porozna membrana za dijalizu, „Spectrum Laboratories“, SAD
- Stalci za Eppendorf kivete
- Stalci za epruvete (15 i 50 ml)
- Termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 60 H, „Elma“, Njemačka
- UV/VIS spektrofotometar, „Pharmacia Biotech“, SAD
- Vaga, „Sartorius“, Njemačka
- Vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- Zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri -80°C (New Brunswick Scientific, SAD) u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola (Alkaloid, Makedonija). Dan prije eksperimenta sojevi su inokulirani u svježju hranjivu podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta (37°C), odnosno pri 30°C prilikom sinteze egzopolisaharida.

### 3.2.2. Detekcija sojeva producenata egzopolisaharida (EPOL)

Prisutnost egzopolisaharida (EPOL-a) ispitana je kod raznovrsnih autohtonih vrsta bakterija mliječne kiseline (BMK) izoliranih iz različitih izvora, kao što su: fermentirano mlijeko (*L. helveticus* M92), svježi sir (*L. brevis* ZG1), kiseli kupus (*L. brevis* SF9B, *L. brevis* SF15B, *L. plantarum* SF9C, *L. plantarum* SF15C) i dimljeni sir (*L. brevis* D6, *E. durans* D8, *L. fermentum* D12, *L. plantarum* D13). Prema Cerning (1990) potencijalna prisutnost EPOL-a ispitana je doticanjem kolonija poraslih preko noći na MRS agaru sterilnom mikrobiološkom ušicom. Ukoliko prilikom doticanja kolonija dolazi do formiranja dugih rastezljivih niti, to je pozitivna indikacija proizvodnje egzopolisaharida.

### 3.2.3. Uzgoj soja *L. fermentum* D12 i sinteza EPOL-a

Prekonoćna kultura soja *L. fermentum* D12 uzgojena je propagacijom u 400 ml tekuće MRS hranjive podloge suplementirane s 2% izvora ugljika (glukoze i saharoze) pri 30°C. Nakon

inkubacije, suspenzije stanica i supernatanta odvojene su centrifugiranjem 15 min pri 7500 g (4°C).



**Slika 4.** Prikaz porasle kulture *L. fermentum* D12 nakon dvodnevne inkubacije pri 30°C u 400 ml MRS bujona uz dodatak različitih izvora ugljika (2% w/v glukoze i saharoze)

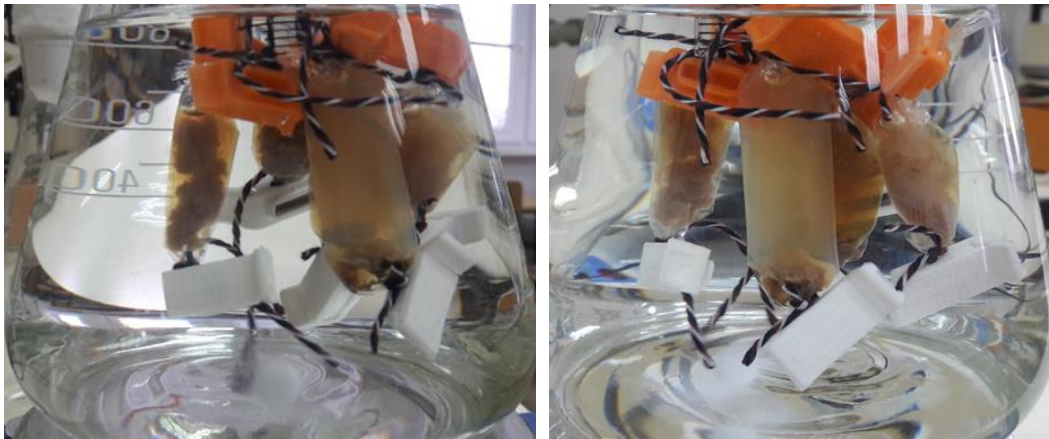
3.2.4. Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida vezanih na površinu stanica (EPOL-b) i egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPOL-r)

Izolacija egzopolisaharida vezanih na površinu stanica i onih otpuštenih u medij, prilagođena je prema Tallon i sur. (2003) i Toba i sur. (1991).

3.2.4.1. Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPOL-r)

Supernatant dobiven centrifugiranjem tretiran je trikloroocetnom kiselinom (Fisher Scientific, SAD) u konačnoj koncentraciji 20%, te inkubiran 2 sata na 4°C uz lagano miješanje na magnetnoj miješalici (New Brunswick Scientific, SAD). Nakon inkubacije provedeno je centrifugiranje 45 min pri 8000 g (4°C) s ciljem uklanjanja istaloženih proteina. Dobiveni supernatant tretiran je dodatkom 4 volumena hladnog etanola (95%) s ciljem uklanjanja lipida, te inkubiran tijekom noći na -20°C pri čemu dolazi do poticanja taloženja egzopolisaharida. Nakon preonoćne inkubacije supernatant je centrifugiran 30 minuta pri 6000 g (4°C) nakon čega je dobiveni talog resuspendiran u 2 ml destilirane vode. Provedena je dijaliza suspenzije EPOL-a otopljenog u destiliranoj vodi u Spectra/Por membrani (10-14 kDa) (Spectrum Laboratories, SAD) 1 dan uz 4 promjene 0,1 M otopine NaCl-a i tijekom 2 dana uz česte

promjene dijalizata odnosno destilirane vode. Nakon dijalize uzorak je liofiliziran u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“.



**Slika 5.** Prikaz dijalize suspenzije egzopolisaharida otopljene u destiliranoj vodi, izoliranih iz supernatanta prekonocne kulture *L. fermentum* D12 uzgojene u MRS podlozi uz dodatak različitih izvora ugljika (2% w/v glukoze i saharoze)

#### 3.2.4.2. Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida vezanih na površinu stanica (EPOL-b)

Talog dobiven centrifugiranjem suspenzije stanica resuspendiran je u 250 ml sterilne fiziološke otopine nakon čega je provedeno centrifugiranje 30 min pri 6000 o/min (4°C). Dobiveni talog resuspendiran je u 50 ml sterilnog 1 M NaCl-a. S ciljem odvajanja potencijalnih EPOL-a vezanih na površinu stanica, suspenzija je sonificirana 1 min pri 550 W (20°C) u ultrazvučnoj kupelji Elmasonic S 60 H, „Elma“. Netopljivi stanični materijali uklonjeni su centrifugiranjem 30 min pri 6000 g (4°C). Egzopolisaharidi iz supernatanta istaloženi su dodatkom 4 volumena hladnog etanola, nakon čega je uslijedila prekonocna inkubacija pri 4°C. Nakon centrifugiranja, 30 min pri 6000 g (4°C), talog je resuspendiran u 2 ml destilirane vode. Provedena je dijaliza suspenzije EPOL-a otopljenog u destiliranoj vodi u Spectra/Por membrani (10-14 kDa) (Spectrum Laboratories, SAD) 1 dan uz 4 promjene 0,1 M otopine NaCl-a i tijekom 2 dana uz česte promjene dijalizata odnosno destilirane vode. Nakon dijalize uzorak je liofiliziran u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“.



**Slika 6.** Prikaz dijalize suspenzije egzopolisaharida otopljene u destiliranoj vodi, izoliranih s površine stanica prekonocne kulture *L. fermentum* D12 uzgojene u MRS podlozi uz dodatak različitih izvora ugljika (2% w/v glukoze i saharoze)

### 3.2.5. Određivanje mase proizvedenih egzopolisaharida i određivanje čistoće UV/VIS spektrofotometrijom

Nakon liofilizacije egzopolisaharida izoliranih s površine stanica i iz supernatanta, izračunata je masa egzopolisaharida proizvedenih prilikom uzgoja u MRS hranjivoj podlozi suplementiranoj s različitim izvorima ugljika (2% w/v glukoze i saharoze).

S ciljem provjere prisutnosti proteina, pripremljena je koncentracija svakog uzorka u konačnoj koncentraciji od 1 mg/mL. Uzorci su centrifugirani 10 min pri 13 000 o/min, a supernatant je razrijeđen 3 puta s „Nuclease free“ vodom. Razrijeđenim uzorcima izmjerena je apsorbancija na UV/VIS spektrofotometru (Pharmacia Biotech, SAD) pri valnim duljinama od 190 do 350 nm, pri čemu je kao slijepa proba korištena samo „Nuclease free“ voda.



### 3.2.6. Detekcija formiranja biofilma soja *Lactobacillus fermentum* D12

Prekonoćna kultura soja *L. fermentum* D12 razrijeđena je u MRS tekućoj hranjivoj podlozi u omjeru 1:10 i 1:20, nakon čega je izmjerena apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica BioTeK Synergy H1 Hybrid (BioTek Instruments Inc., SAD) pri 600 nm (MRS bujon je korišten kao slijepa proba). Iz dobivenih rezultata izračunato je razrjeđenje koje odgovara apsorbanciji od 0,013 odnosno koncentraciji bakterija od  $10^6$  CFU/ml. 200  $\mu$ L pripremljene otopine koncentracije  $10^6$  CFU/ml, odnosno apsorbancije od 0,013, nanešeno je u jažice 2 mikrotitarske pločice u 8 paralela, te je kao kontrola korišten MRS bujon. Pratio se indeks formiranja biofilma tijekom 1 i 2 dana, tako da je jedna mikrotitarska pločica inkubirana 24 h, a druga tijekom 48 h pri 30°C. Nakon 24 sata izmjerena je apsorbancija bakterija jedne mikrotitarske pločice pri 590 nm, nakon čega je medij s planktonskim bakterijama, odnosno s bakterijama koje nisu vezane na površinu, zajedno s MRS bujonom uklonjen s mikrotitarske pločice. Jažice su isprane 3 puta s 300  $\mu$ L fiziološke otopine. Mikrotitarska pločica je zatim inkubirana tijekom 1 h pri 60°C, s ciljem dodatnog pričvršćivanja adheziranih bakterija na površinu jažica. Adhezirane stanice su zatim obojane dodatkom 250  $\mu$ L otopine kristal violeta (1,5%) (Sigma-Aldrich, SAD) otopljenog u etanolu i destiliranoj vodi (1:5) uz dodatak amonijevog oksalata (0,8% m/v) (Sigma-Aldrich, SAD) u svaku jažicu, te je pločica ostavljena u mraku tijekom 15 min. Otopina kristal violeta (1,5%) uklonjena je ispiranjem destiliranom vodom, a pločica je ostavljena okrenuta naopačke, preko noći na sobnoj temperaturi. Dodatkom 300  $\mu$ L octene kiseline (33%) (J.T. Baker, Njemačka) dolazi do uklanjanja kristal violeta (1,5%) koji se vezao na adhezirane stanice, a intezitet obojenja nakon inkubacije od 15 min u mraku je izmjeren pri 570 nm.

Isti postupak je ponovljen s mikrotarskom pločicom kojoj je praćen indeks formiranja biofilma nakon 48 sati.

Indeks biofilma je izračunat prema dolje navedenoj formuli:

$$\text{biofilm index} = \frac{\text{Apsorbancija biofilma (570 nm)} - \text{Apsorbancija slijepe probe (570 nm)}}{\text{Apsorbancija bakterija (590 nm)} - \text{Apsorbancija slijepe probe (590 nm)}}$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Detekcija sojeva producenata egzopolisaharida (EPOL)

Ovim radom provedeno je ispitivanje mogućnosti sinteze egzopolisaharida kod određenih sojeva bakterija mliječne kiseline izoliranih iz fermentiranih proizvoda kao što su kiseli kupus, fermentirano mlijeko te svježi i dimljeni sir. Ispitivanjem potencijalne sposobnosti proizvodnje egzopolisaharida (EPOL-a) prema Cerning (1990), jedini soj koji je dao pozitivan rezultat odnosno kod kojeg je došlo do formiranja dugih rastezljivih niti prilikom doticanja kolonija sterilnom mikrobiološkom ušicom, bio je soj *L. fermentum* D12. Prikaz pozitivnog rezultata, odnosno sluzavih rastezljivih niti kolonija soja D12 prikazan je na slici 7.



**Slika 7.** Prikaz sluzavih, rastezljivih kolonija soja *Lactobacillus fermentum* D12

#### 4.2. Izolacija egzopolisaharida vezanih na površinu stanica (EPOL-b) i egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPOL-r)

Porasle kolonije uzgajane su na MRS podlogama koje su sadržavale 2% glukoze i saharoze kao izvor ugljika. Nakon inkubacije odvojene su suspenzije stanica i supernatanta metodom centrifugiranja u trajanju od 15 minuta. Dodatkom određenih agenasa i dodatnim centrifugiranjem uklonjeni su lipidi i proteini. Provedena je dijaliza egzopolisaharida koji su izolirani iz supernatanta i s površine stanica prekonoćne kulture *L. fermentum* D12, a potom je izvršena liofilizacija uzoraka.

Nakon liofilizacije dobiven je uzorak nalik pamuku (fluffy, white, cotton-like) (slika 8).



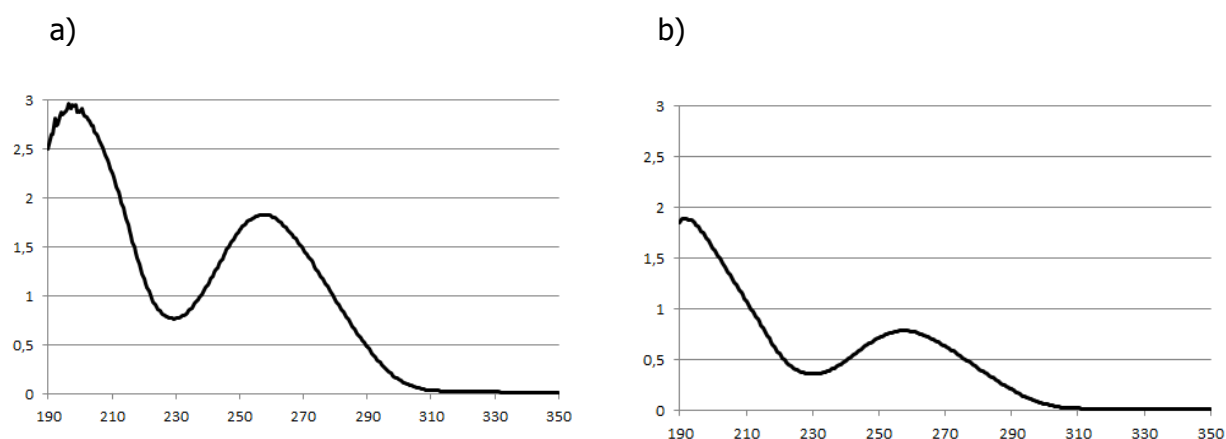
**Slika 8.** Prikaz uzoraka egzopolisaharida dobivenih nakon liofilizacije

#### 4.3. Određivanje mase proizvedenih egzopolisaharida i određivanje čistoće UV-spektrofotometrijom

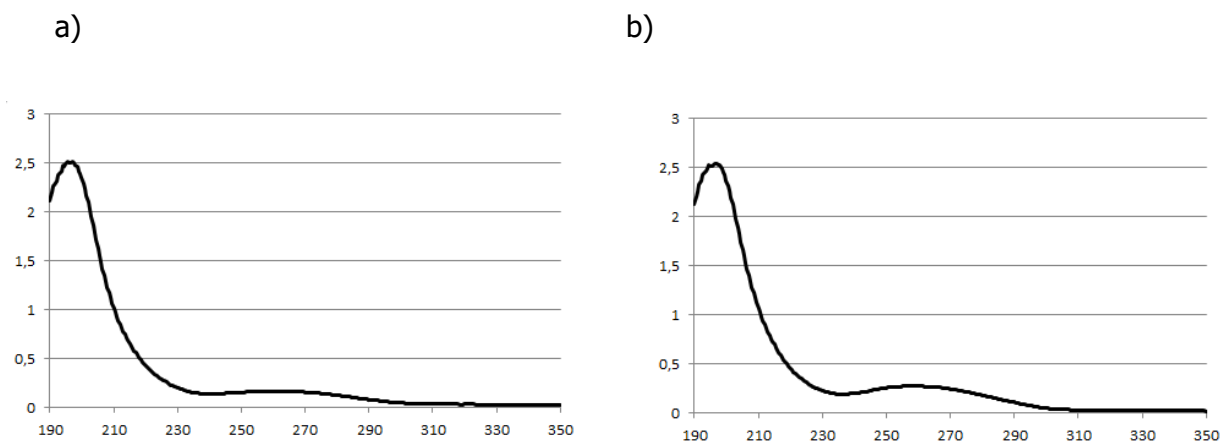
Liofilizacijom uzoraka dobivene su mase egzopolisaharida koji su ostali vezani na stanice te onih koji su izlučeni u okolni medij.

**Tablica 3.** Prikaz masa proizvedenih egzopolisaharida prilikom uzgoja u MRS hranjivoj podlozi (suplementiranoj s glukozom i saharozom kao izvorima ugljika), koji se nalaze na površini stanica i onih otpuštenih u medij, izračunata nakon procesa liofilizacije

| EPS na površini stanica |                            | EPS izlučeni u medij |                            |
|-------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|
| Uzorak                  | Masa egzopolisaharida (mg) | Uzorak               | Masa egzopolisaharida (mg) |
| Glukoza                 | 0,9                        | Glukoza              | 80,1                       |
| Saharoza                | 2,2                        | Saharoza             | 67                         |



**Slika 9.** Prikaz izmjerene apsorbancije pomoću UV-spektrofotometra, pri valnim duljinama od 190 do 350 nm, uzoraka egzopolisaharida izoliranih s površine stanica tijekom uzgoja soja *L. fermentum* D12 u MRS hranjivoj podlozi suplementiranoj sa različitim izvorima ugljika; a) glukoza i b) saharoza.



**Slika 10.** Prikaz izmjerene apsorbancije pomoću UV-spektrofotometra, pri valnim duljinama od 190 do 350 nm, uzoraka egzopolisaharida izoliranih iz medija tijekom uzgoja *L. fermentum* D12 u MRS hranjivoj podlozi suplementiranoj sa različitim izvorima ugljika; a) glukoza i b) saharoza.

Rezultati pokazuju da je veća masa egzopolisaharida koji se nalaze u okolnom mediju od egzopolisaharida vezanih na stanice. Masa nastalih polisaharida u podlozi s glukozom iznosila je 80,1 mg, dok je u podlozi sa saharozom kao izvorom ugljika u okolni medij izlučeno 67 mg egzopolisaharida. Razlog tome je i efektivan učinak centrifugiranja prilikom čega dolazi do bržeg pucanja interakcija između egzopolisaharida i stanica s obzirom da se radi o elektrostatskim silama, a ne o kovalentnim vezama. Do istog zaključka može se doći uspoređivanjem rezultata dobivenih kod istraživanja koje su proveli Tallon i suradnici (2003) tijekom izolacije i pročišćavanja egzopolisaharida proizvedenih od soja *Lactobacillus plantarum* EP56. Na količinu proizvedenih egzopolisaharida utječe i izvor ugljika u podlozi. Kao i kod Tallon i sur., u ovom istraživanju rezultati određivanja mase nastalih polisaharida ukazuju na glukozu kao bolji izvor ugljika kod egzopolisaharida izlučenih u okolni medij.

Kako bi se odredila čistoća uzoraka, odnosno prisutnost proteina u uzorcima, provedena je spektrofotometrijska analiza. Određivanjem čistoće, mjerenjem UV-spektrofotometrije, vidljiva je prisutnost proteina („peak“ od oko 260 nm) kod uzoraka egzopolisaharida izoliranih s površine stanica i kod onih otpuštenih u medij. S obzirom da je „peak“ izraženiji kod uzorka izoliranog s površine stanica, odnosno veća je koncentracija proteina, jasno je da je uzorak egzopolisaharida koji je izoliran iz okolnog medija efikasnije pročišćen.

#### 4.4. Detekcija formiranja biofilma

S obzirom da kod većine sojeva producenata egzopolisaharida, egzopolisaharidi imaju ključnu ulogu u formiranju biofilma, ispitana je sposobnost formiranja biofilma soja producenta egzopolisaharida *L. fermentum* D12. Prema Naves i sur. (2008) ukoliko je vrijednost indeksa formiranja biofilma manja od 0,35, soj nema sposobnost formiranja biofilma, što je slučaj kod ispitivanog soja *L. fermentum* D12 gdje su vrijednosti formiranja biofilma nakon dva dana 0,02824.

#### **Indeks biofilma mikrotitarske pločice koja je bila na inkubaciji 2 dana**

$$biofilm\ index = \frac{0,1129 - 0,0735}{1,7394 - 0,3441}$$

**biofilm indeks = 0,02824**

## 5. ZAKLJUČCI

1. Nakon uzgoja bakterija iz roda *Lactobacillus*, pojavom rastezljivih niti dodirivanjem poraslih kultura dokazana je proizvodnja egzopolisaharida kod soja *Lactobacillus fermentum* D12.
2. Rezultati pokazuju da je veća masa egzopolisaharida izlučenih u okolni medij, nego onih koji su ostali vezani na stanicama. Uzgojem kulture na podlozi s glukozom nastalo je više egzopolisaharida koji su izlučeni van stanice u odnosu na uzgojenu kulturu na podlozi koja je sadržavala saharozu kao izvor ugljika.
3. "Peakovi" vidljivi oko 260 nm ukazuju na veću koncentraciju proteina u uzorcima izoliranih s površine stanica pa možemo zaključiti da je veća čistoća uzoraka egzopolisaharida koji su izlučeni u okolni medij.
4. Indeks formiranog biofilma izračunat je nakon inkubacije mikrotitarske pločice s adheziranim bakterijama koja je trajala 48 sati. Prema navedenoj formuli dobiveni rezultat za indeks biofilma iznosi 0,02824.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Arendt E. K., Ryan L. A. M., Bello FD (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol* **24**: 165–174.
2. Bajpai V. K., Rather I. A., Majumder R., Shukla S., Aeron A. (2016) Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh J Pharmacol* **11**: 1-23.
3. Bautista M. C., Bomati-Miguel O., Morales M. P., Serna C. J., Veintemillas-Verdaguer S. (2005) Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. *J Magn Magn Mater* **293**: 20–27.
4. Becker A. (2015) Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Front Microbiol* **6**: 687.
5. Belhadj H., Harzallah D., Khennouf S., Dahamna S., Bouharati S., Baghiani A. (2010) Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from Algerian honeybee collected pollen. *Acta Hort (ISHS)* **854**: 51 – 58.
6. Cerning J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **7**: 113-130
7. Cerning J., Marshall V. M. E. (1999) Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Recent Res Dev Microbiol* **3**: 195–209.
8. Cote G.L. (2009) Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness. *Carbohydr Res* **344**: 187–190.
9. Delcour J., Ferain T., Deghorain M., Palumbo E., Hols P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 159–184.
10. Desai A. (2008) Strain Identification, Viability And Probiotics Properties Of *Lactobacillus casei*. School of Biomedical and Health Sciences, Victoria University, Victoria, Australia.
11. De Vuyst L., Degeest B. (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 153–177.
12. De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F., Degeest B. (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* **11**: 687–707.
13. Dilna S.V., Surya H., Aswathy R.G., Varsha K.K., Sakthikumar D.N. (2015) Characterization of an exopolysaccharide with potential healthbenefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT Food Sci Technol* **64**: 1179-1186.



14. Fontana C., Li S., Yang Z., Widmalm G. (2015) Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. *Carbohydr Res* **402**: 87-94.
15. Gareau M. G., P. M. Sherman and W. A. Walker (2010). Probiotics and the Gut Microbiota in Intestinal Health and Disease. *Nature Rev Gastroenterology Hepatology* **7**, 503-514.
16. Giraffa G. (2012). Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Eng Life Sci* **12**: 391–398.
17. Harutoshi T. (2013) Exopolysaccharides of Lactic Acid Bacteria for Food and Colon Health Applications. *INTECH Open Access Publisher, Croatia*.
18. Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *Am J Clin Nutr* **73**: 365S-373S.
19. Jolly L., Vincent S. J., Duboc P., Neeser J. R. (2002) Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 367–374.
20. Juvonen R., Honkapää K., Maina N. H., Shi Q., Viljanen K. (2015) The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (*Daucus carota* L.). *Int J Food Microbiol* **207**: 109-118.
21. Kim Y., Oh S., Yun H. S., Oh S., Kim S. H. (2010) Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Lett Appl Microbiol* **51**: 123-130.
22. Korakli M., Pavlovic M., Ganzle M. G., Vogel R. F. (2003) Exopolysaccharide and ketose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH 2590. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2073–2079.
23. Kralj S., Stripling E., Sanders P., Van Geel-Schutten G. H., Dijkhuizen L. (2005) Highly hydrolytic reuteransucrase from probiotic *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3942–3950.
24. Kristo E., Miao Z., Corredig M. (2011) The role of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in structure formation and recovery of acid milk gels. *Int Dairy J* **21**: 656-662.
25. Leathers T. D., Nunnally M. S., Ahlgren J. A., Cote G. L. (2003) Characterization of a novel modified alternan. *Carbohydr Polym* **54**: 107–113.

26. Lee S. J., Kim J. H., Jung Y. W., Park S. Y., Shin W. C. (2011) Composition of organic acids and physiological functionality of commercial makgeolli. *Korean J Food Sci Technol* **43**: 206-212.
27. Madhuri K. V., Prabhakar K. V. (2014) Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. *Orient J Chem* **30**: 1401-1410.
28. Micheli L., Ucelletti D., Palleschi C., Crescenzi V. (1999) Isolation and characterization of a ropy *Lactobacillus strain* producing the exopolysaccharide kefiran. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**: 69–74.
29. Morelli L. (2007). In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int Dairy J* **17**: 1278–1283.
30. Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodríguez-Cerrato, V., Ponte, M.C., Soriano, F. (2008) Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol* **105**: 585-590.
31. Neuhaus F. C., Baddiley J. (2003) A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**: 686–723.
32. Patel S., Majumder A., Goyal A. (2012) Potentials of exopolysaccharides from lactic Acid bacteria. *Indian J Microbiol* **52**: 3-12.
33. Piermaria J. A., Pinotti A., Garcia M. A., Abraham A. G. (2009) Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains: development and characterization. *Food Hydrocoll* **23**: 684–690.
34. Poulsen L. V. (1999) Microbial biofilm in food processing. *Food Sci Technol* **32**: 321–326.
35. Purama R. K., Goyal A. (2005) Dextranase production by *Leuconostoc mesenteroides*. *Indian J Microbiol* **2**: 89–101.
36. Robyt J. F. (1995) Mechanisms in the glucanase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **51**:133–168.
37. Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P. (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int Dairy J* **12**: 163-171.
38. Ryan M. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Caplice N. M, Stanson C. (2015) Sugarcoated: exopolysaccharides producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Funct* **6**: 679-693.

39. Sartor R.B (2004) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *J Gastroenterol* **126**: 1620–1633.
40. Schär-Zammaretti, Ubbink (2003) The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. *Biophys J* **85(6)**: 4076–4092.
41. Tallon R., Bressollier P., Urdaci C. M. (2003) Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Res Microbiol* **154(10)**: 705-712.
42. Toba T., Kotani T., Adachi S. (1991) Capsular polysaccharide of a slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LAPT 3001 isolated from Swedish fermented milk 'langfil'. *Int J Food Microbiol* **12**: 167-171.
43. 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.
44. Tuomola E., Crittenden R., Playne M., Isolauri E., Salminen S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* **73**: 393S -398S.
45. Vasiljevic, Shah N. P. (2008) Review: probiotics — from Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J* **18**: 714–728.
46. Vidhyalakshmi R., Valli, Nachiyar C., Narendra, Kumar, G., Sunkar, Swetha (2016) *Bacillus circulans* exopolysaccharide: Production, characterization and bioactivities. *Int J Biolog Macromolecules* **87**: 405-414.
47. Wang K., Li W., Rui X., Chen X., Jiang M. (2014) Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int J Biol Macromol* **63**: 133-139.
48. Welman A. D., Maddox I. S. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**: 269–274.
49. Zajsek K., Gorsek A., Kolar M. (2013) Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chem* **139**: 970-977.

## Izjava o izvornosti

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

---

Ime i prezime studenta