

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

---

**Pušek, Anita**

**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:159:695544>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-10**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij**

**Biotehnologija**

Anita Pušek

7070/BT

**IZOLACIJA I PROČIŠĆAVANJE EGZOPOLISAHARIDA SOJA**  
***Lactobacillus fermentum* D12 NAKON UZGOJA U PRISUTNOSTI**  
**FRUKTOZE I GALAKTOZE KAO IZVORA UGLJIKA**

ZAVRŠNI RAD

**Mentor:** doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

**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 doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, 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 fruktoze i galaktoze kao izvora ugljika

Anita Pušek, 7070

**Sažetak:** U proizvodnji egzopolisaharida (EPOL) u posljednje vrijeme se posebno istražuju bakterije mliječne kiseline (BMK) s ciljem poboljšanja svojstava proizvoda i unaprjeđenja kvalitete ljudskog zdravlja. Također, neki sojevi bakterija mliječne kiseline sintezom egzopolisaharida pridonose poboljšanju teksture i viskoznosti fermentiranih proizvoda. Stoga je cilj ovog završnog rada bio ispitati sposobnost različitih sojeva BMK da sintetiziraju egzopolisaharide u MRS hranjivoj podlozi suplementiranoj s različitim izvorima ugljika (2% w/v fruktoza, galaktoza). Soj *Lactobacillus fermentum* D12 se pokazao kao najbolji producent egzopolisaharida. Nakon provedenog uzgoja *L. fermentum* D12, slijedila je izolacija egzopolisaharida s površine stanica *L. fermentum* D12 te iz supernatanta ove bakterijske kulture nakon čega je izračunata masa egzopolisaharida. Čistoća egzopolisaharida na prisutnost proteina se provjerila UV-spektrofotometrijom pri valnoj duljini od 190 do 350 nm. Koncentracija prisutnih proteina kod uzoraka egzopolisaharida izoliranih s površine stanica bila je puno veća, u odnosu na one izolirane iz supernatanta kulture.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, *Lactobacillus fermentum* D12, egzopolisaharidi

**Rad sadrži:** 29 stranica, 9 slika, 3 tablice, 38 referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica

Prehrambeno biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

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

**Rad predan:** 11. lipnja 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

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

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

**Isolation and purification of the exopolysaccharides of *Lactobacillus fermentum* D12 in the presence of fructose and galactose as a carbon sources**

Anita Pušek, 7070

**Summary:** In the recent years, lactic acid bacteria (LAB) have been specifically investigated in the frame of the exopolysaccharide production, because of its impact in improving product properties and improving the quality of human health. In addition, several lactic acid bacterial species, that synthesis exopolysaccharides, contribute to improving texture and viscosity of fermented products. Therefore, the aim of this final study was to examine the ability of several LAB to synthesis exopolysaccharides in MRS nutrient medium supplemented with different carbon sources (2% w/v fructose, galactose). *Lactobacillus fermentum* D12 has been shown, as the best exopolysaccharides producer among tested strains. After producing cultivation of *L. fermentum* D12, isolation and mass calculation of the exopolysaccharides from the cell surface and from the culture supernatant, was performed. The purity of the exopolysaccharides on the presence of the proteins was verified by UV spectrophotometry at wavelennghthsfrom 190 to 350 nm. The concentration of proteins of exopolysaccharides samples isolated from the surface of the cell was much higher than those isolated from the culture supernatant.

**Keywords:** bacterial lactic acid, *Lactobacillus fermentum* D12, exopolysaccharides

**Thesis contains:** 29 pages, 9 pictures, 3 tables, 38 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:**

Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor

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

**Defence date:** 11<sup>th</sup> June, 2018

# Sadržaj

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. UVOD</b> .....                                                                                                                        | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....                                                                                                               | 3  |
| 2.1. Bakterije mliječne kiseline .....                                                                                                      | 3  |
| 2.2. Polisaharidi .....                                                                                                                     | 4  |
| 2.3. Mikrobni egzopolisaharidi (EPOL) .....                                                                                                 | 4  |
| 2.3.1. Podjela egzopolisaharida .....                                                                                                       | 5  |
| 2.3.1.1. Homopolisaharidi.....                                                                                                              | 5  |
| 2.3.1.2. Heteropolisaharidi .....                                                                                                           | 6  |
| 2.3.2. Biosinteza heteropolisaharida s bakterijama mliječne kiseline .....                                                                  | 7  |
| 2.3.3. Optimalni parametri i kinetika proizvodnje EPOL-a pomoću BMK.....                                                                    | 9  |
| 2.3.4. Uloga egzopolisaharida .....                                                                                                         | 10 |
| <b>3. MATERIJALI I METODE RADA</b> .....                                                                                                    | 12 |
| 3.1. MATERIJALI .....                                                                                                                       | 12 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam .....                                                                                                           | 12 |
| 3.1.2. Hranjive podloge .....                                                                                                               | 12 |
| 3.1.3. Kemikalije .....                                                                                                                     | 13 |
| 3.1.4. Aparatura i pribor .....                                                                                                             | 13 |
| 3.2. METODE RADA.....                                                                                                                       | 14 |
| 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama .....                                                                                           | 14 |
| 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 |
| 3.2.4.1. Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida otpuštenih u medij (EPOL-r).....                                                        | 16 |
| 3.2.4.2. Izolacija i pročišćavanje egzopolisaharida vezanih na površinu stanica (EPOL-b).....                                               | 17 |

|                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 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 .....                                       | 18        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>                                                                                     | <b>20</b> |
| 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>                                                                                                | <b>25</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                                                                                               | <b>26</b> |

## **1. UVOD**



Bakterije mliječne kiseline (BMK) predstavljaju heterogenu skupinu srodnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili samo u anaerobnim uvjetima te proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. BMK su auksotrofi i za svoj rast zahtijevaju bogate podloge, koje sadrže vitamine (vitamin B<sub>2</sub> ili riboflavin, pantotenska i folna kiselina, biotin i vitamin B<sub>1</sub> ili tiamin) i aminokiseline. U prirodi, BMK su široko rasprostranjene kao dio epifitne mikroflore na biljkama, članovi su kompleksnih zajednica mikroorganizama usne šupljine te gastrointestinalnog trakta.

Rod *Lactobacillus* široka je i heterogena taksonomska grupa koja sadrži preko sto vrsta koje se razlikuju po fenotipu te biokemijskim i fiziološkim osobinama. Laktobacili su rod Gram-pozitivnih štapićastih bakterija, koje ugljikohidrate razgrađuju do mliječne kiseline fermentativnim putem. Nepokretni su i ne formiraju spore. Ovaj rod BMK se može podijeliti u tri grupe, na osnovu prisustnosti ili odsustnosti ključnih enzima u metabolizmu ugljikohidrata. Kandler i Weiss (1986) su dali sljedeću podjelu:

1. Obligatno homofermentativni laktobacili, koji fermentiraju heksoze do mliječne kiseline, dok pentoze ne fermentiraju. Predstavnici ove grupe su: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* i *Lactobacillus helveticus*
2. Fakultativno heterofermentativni laktobacili, koji fermentiraju heksoze do mliječne kiseline. Predstavnici ove grupe su: *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus plantarum*
3. Obligatno heterofermentativni laktobacili, koji fermentiraju heksoze do mliječne i octene kiseline, etanola i ugljikovog dioksida. Predstavnici ove grupe su: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus buchneri* i *Lactobacillus fructosus*.

Sposobnost biosinteze polisaharida široko je rasprostranjena među bakterijama. Mikroorganizmi mogu sintetizirati polisaharide koji služe za skladištenje (glikogen u citoplazmi) i strukturne polisaharide (peptidoglikan i lipopolisaharidi). Neke bakterije sintetiziraju kapsularne polisaharide (CPOL), koji čine kapsulu, tj. čvršći sloj polisaharida kovalentno vezan za staničnu površinu, kao i egzopolisaharide (EPOL) koji formiraju sloj slabije vezan za površinu ili se izlučuju u okolinu. Osnovni faktori koji utječu na sintezu EPOL-a su temperatura, vrijeme trajanja fermentacije, pH, sastav medija (izvor ugljika i dušika), prisustvo kisika, mangana, kalcija, purinskih i pirimidinskih baza. Još uvijek nije jasno definirana fiziološka uloga EPOL-a, ali s obzirom da se koristi velika količina energije za njegovu sintezu, EPOL bi trebali povećati ekološku prednost soja koji ga proizvodi. Glavno

tehnološko svojstvo EPOL je da poboljšava viskozitet i teksturu konačnog proizvoda, npr. sira ili jogurta. EPOL povećavaju zadržavanje vlage, a njihov kemijski sastav, dužina lanca, molekulska masa i radijus okretanja doprinose specifičnim fizikalnim osobinama kao što je topljivost.

Cilj ovog završnog rada je bio ispitati veliki broj sojeva bakterija mliječne kiseline pohranjenih u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na sposobnost biosinteze egzopolisaharida. Cilj je također bio izolacija i purifikacija proizvedenih egzopolisaharida sa sojem *Lactobacillus fermentum* D12.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline predstavljaju specifičnu skupinu srodnih bakterija prirodno prisutnih na supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, razgradni biljni materijal i u humanom gastrointestinalnom traktu. To su Gram-pozitivne, nesporogene, mezofilne bakterije, kemoorganotrofi, katalaza-negativne, nemaju citokroma, ne sintetiziraju porfirine, a rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama (Šušković i sur., 2010).

Podijeljene su u jedan red te šest porodica i pripadaju koljenu Firmicutes. U bakterije mliječne kiseline pripadaju rodovi *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Vagococcus*. Prema načinu fermentacije izvora ugljika, najčešće ugljikohidrata, razlikuju se homofermentativne BMK i heterofermentativne BMK. Homofermentativne BMK su bakterije u čijim se stanicama odvija razgradnja ugljikohidrata do isključivo mliječne kiseline, dok heterofermentativne vrste proizvode osim mliječne kiseline i neke druge krajnje proizvode katabolizma npr. etanol, octenu kiselinu, acetoin i ugljikov dioksid (John i sur., 2007). Vrste iz rodova *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus* pripadaju homofermentativnim BMK, dok su vrste iz rodova *Leuconostoc* i *Betabacteria* heterofermentativne BMK (Carr i sur., 2002).

BMK su industrijski vrlo važni mikroorganizmi jer imaju GRAS status (Generally Recognized As Safe) prema US FDA, odnosno QPS status (Qualified Presumption of Safety) prema regulativi EU te se zbog toga najčešće upotrebljavaju kao starter kulture za industrijsku proizvodnju različitih fermentiranih proizvoda. Posebice značajnu primjenu imaju BMK kao probiotičke bakterije (probiotički koncept) te u kombinaciji s probioticima (sinbiotički koncept) (Uroić, 2014; Leboš Pavunc, 2012; Beganović, 2008; Frece, 2007; Kos, 2001; Šušković i sur., 2001; Šušković, 1996; Brkić, 1995). Pojam probiotik označava jednu ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi i životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković, 1996). Kao starter kulture u proizvodnji fermentiranih mliječnih, mesnih i povrtnih proizvoda koriste se *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Carnobacterium* (Rattanachaiakunsopon i Phumkhachorn, 2010). BMK kao radni mikroorganizmi uglavnom se koriste za biotehnološku proizvodnju mliječne kiseline. Velik broj poželjnih svojstava intestinalne mikroflore pripisuje se pojedinim vrstama BMK koje uglavnom pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

BMK se koriste diljem svijeta s ciljem poboljšavanja senzorskih svojstava, nutritivne vrijednosti te očuvanja velikog broja proizvoda poput mlijeka, mesa i povrća. Relativno jednostavna fiziologija, BMK čini pogodnim za primjenu metaboličkog inženjerstva s ciljem unaprjeđenja kvalitete hrane i ljudskog zdravlja. Primjenom starter kultura u industrijskoj proizvodnji povećava se higijenska ispravnost hrane, nutritivna vrijednost, poboljšavaju se senzorska svojstva (arome, boje, teksture), ujednačava se i poboljšava kvaliteta proizvoda, produljuje se trajnost i ubrzava se proizvodnja. Fermentacijom ugljikohidrata, organske kiseline i masti bakterije mliječne kiseline stvaraju brojne aroma komponente koje pozitivno utječu na senzorska svojstva fermentiranih proizvoda. Također, nekoliko vrsta sojeva BMK pridonosi poboljšanju teksture i viskoznosti fermentiranih produkata sintezom egzopolisaharida (EPOL).

## **2.2. Polisaharidi**

Polisaharidi su polimeri ugljikohidrata sastavljeni od velikog broja ponavljajućih monosaharidnih jedinica povezanih glikozidnim vezama. BMK, kao i mnoge druge bakterije, mogu proizvesti nekoliko vrsta polisaharida koji su klasificirani prema njihovom mjestu u odnosu na stanicu. Dakle, polisaharide se mogu podijeliti na intracelularne polisaharide i ekstracelularne polisaharide ili egzopolisaharide. Intracelularni polisaharidi opskrbljuju stanicu energijom (škrob, inulin, glikogen), a mikrobnog egzopolisaharidi sintetiziraju se u mikrobnim stanicama te se izlučuju u izvanstanični prostor u obliku kapsule ili egzopolisaharidnog biofilma (Donot i sur., 2012). Nadalje, polisaharidi mogu biti podijeljeni u strukturalne i nestrukturalne. Strukturalni polisaharidi služe kao građevni materijal kod biljaka, insekata i bakterija (celuloza, pektin, hitin, murein). Nestrukturalni polisaharidi imaju ulogu skladištenja energije kod eukariota (škrob, glikogen, inulin). Takve polisaharide mogu sintetizirati ne samo biljke i alge već i veliki broj mikroorganizama uključujući plijesni, kvasce i bakterije.

## **2.3. Mikrobnog egzopolisaharidi (EPOL)**

Mikrobnog egzopolisaharidi su vrsta biopolimera koju proizvode mnoge vrste Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija te isto tako i drugi mikroorganizmi kao što su gljive i neke vrste algi (Sutherland, 1999). Tijekom fermentacije, bakterije mliječne kiseline mogu proizvesti između 50 i 600 mg/L egzopolisaharida, u ovisnosti o sastavu startera i uvjeta fermentacije (pH, temperatura). EPOL su vrlo raznolika grupa polimera, čija je uloga

definirana strukturom i to: molekulskom masom, vrstom veza, stupnjem grananja i kemijskim sastavom. Također, osim različite kemijske strukture, mikrobní EPOL su vodotopljivi polimeri i posjeduju velike molekulske mase (10 do 30 kDa) (Kumar i sur., 2007). Na ovu vrstu polisaharida se sve više obraća pozornost zbog širokog spektra fizikalnih i kemijskih svojstava zbog kojih je moguća njihova primjena u različitim industrijama kao što su farmaceutska, prehrambena industrija te medicina.

### **2.3.1. Podjela egzopolisaharida**

Ovisno o mjestu sinteze, EPOL se mogu podijeliti na kapsularne, koji su smješteni na staničnoj površini te ekstracelularne koji se u obliku sluzi oslobađaju u podlogu. EPOL se sastoje od ponavljajućih jedinica šećera pričvršćenih na lipidni nosač i mogu biti povezani s organskim i anorganskim spojevima, lipidima, proteinima i metalnim ionima (Mishra i Jha, 2013), a mogu se podijeliti na homopolisaharide i heteropolisaharide (Donot i sur., 2012; Laws i sur., 2001).

#### **2.3.1.1. Homopolisaharidi**

Homopolisaharidi su EPOL građeni od jedne vrste monosaharidnih jedinica. Sastoje se od glukoznih (glukana) ili fruktoznih (fruktana) jedinica s različitim načinima vezanja i stupnjevima grananja. Specifični enzimi sintetiziraju homopolisaharide izvan stanice uz prisustvo donorske molekule, najčešće saharoze i akceptorske molekule npr. neka rastuća polimerna molekula, saharoza, rafinoza ili voda. U biosintetskom putu homopolisaharida kao što je prikazano u tablici 1 sudjeluje samo jedan specifični enzim, što čini glavnu razliku u odnosu na biosintetski put heteropolisaharida (Laws i sur., 2001). Dekstran, kurdlan, pululan i levan pripadaju takvoj vrsti polisaharida. Homopolisaharidi su često velike molekulske mase (do  $10^7$  Da), različitog stupnja i tipa grananja te dužine lanaca (van Hijum i sur., 2006).

**Tablica 1.** Razlike u sintezi i konformaciji bakterijskih homopolisaharida i heteropolisaharida (Laws i sur., 2001)

| <b>EPOL</b>                     | <b>HETEROPOLISAHARIDI</b>                                                                     | <b>HOMOPOLISAHARIDI</b>    |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| <b>Proizvedena količina</b>     | <b>malo (mg/L)</b>                                                                            | <b>puno (g/L)</b>          |
| <b>Građevne jedinice</b>        | <b>ramnoza, fruktoza, arabinoza, ksiloza, manoz, galaktoza, glukoza, glukuronska kiselina</b> | <b>glukoza, fruktoza</b>   |
| <b>Izvor građevnih jedinica</b> | <b>aktivirani šećeri</b>                                                                      | <b>saharoza</b>            |
| <b>Enzimi</b>                   | <b>nekoliko vrsta unutarstaničnih membranskih</b>                                             | <b>jedan izvanstaničan</b> |

### 2.3.1.2. Heteropolisaharidi

Heteropolisaharidi su građeni od ponavljajućih oligosaharidnih jedinica, koji sadrže između tri i osam ostataka. Dva ili više različitih monosaharida sačinjavaju ponavljajuću strukturnu jedinicu koja je međusobno povezana različitim vrstama veza (Laws i sur., 2001). Ksantan i gelan guma pripadaju heteropolisaharidima. Sinteza heteropolisaharida započinje nakupljanjem jednostavnih šećera te sastavljanjem pentasaharidnih podjedinica pričvršćenih na lipidni nosač, zatim slijedi polimerizacija i izlučivanje polisaharida (Whitfield i sur., 1993). Heteropolisaharidi najčešće sadrže D-glukozu, D-galaktozu i L-ramnozu. U sastavu heteropolisaharida mogu biti i fruktoza, riboza, N-acetilglukozamin, kao i fosfat, acetat i glicerol (de Vuyst i sur., 2001; de Vuyst i Degeest, 1999). Sintetiziraju se u citoplazmatskoj membrani pomoću enzima glukoziltransferaze, koristeći energetske visokovrijedne prekursori sintetizirane u stanici. Ti prekursori su aktivirani ugljikohidrati koji opskrbljuju energijom reakciju polimerizacije. Biosintetski putevi heteropolisaharida imaju neke sličnosti s biosintezom komponenata stanične stijenke kao na primjer: lipopolisaharida, peptidoglikana i teihonskih kiselina (Laws i sur., 2001).

Mikroorganizmi koji proizvode heteropolisaharide su:

a) Mezofilne BMK (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus rhamnosus*);

b) Termofilne BMK (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* i *Streptococcus thermophilus*)

EPOL proizvedeni s pomoću termofilnih BMK od posebnog su interesa u reologiji, teksturi i okusu fermentiranih mliječnih proizvoda, a uglavnom se razlikuju po sastavu, strukturi, molekulskoj masi i funkciji, što može biti svojstvo za pojedini soj. EPOL proizvedeni s pomoću BMK općenito imaju veliki tehnološki potencijal u razvoju novih i kvalitetnijih prehrambenih proizvoda.

### **2.3.2. Biosinteza heteropolisaharida s bakterijama mliječne kiseline**

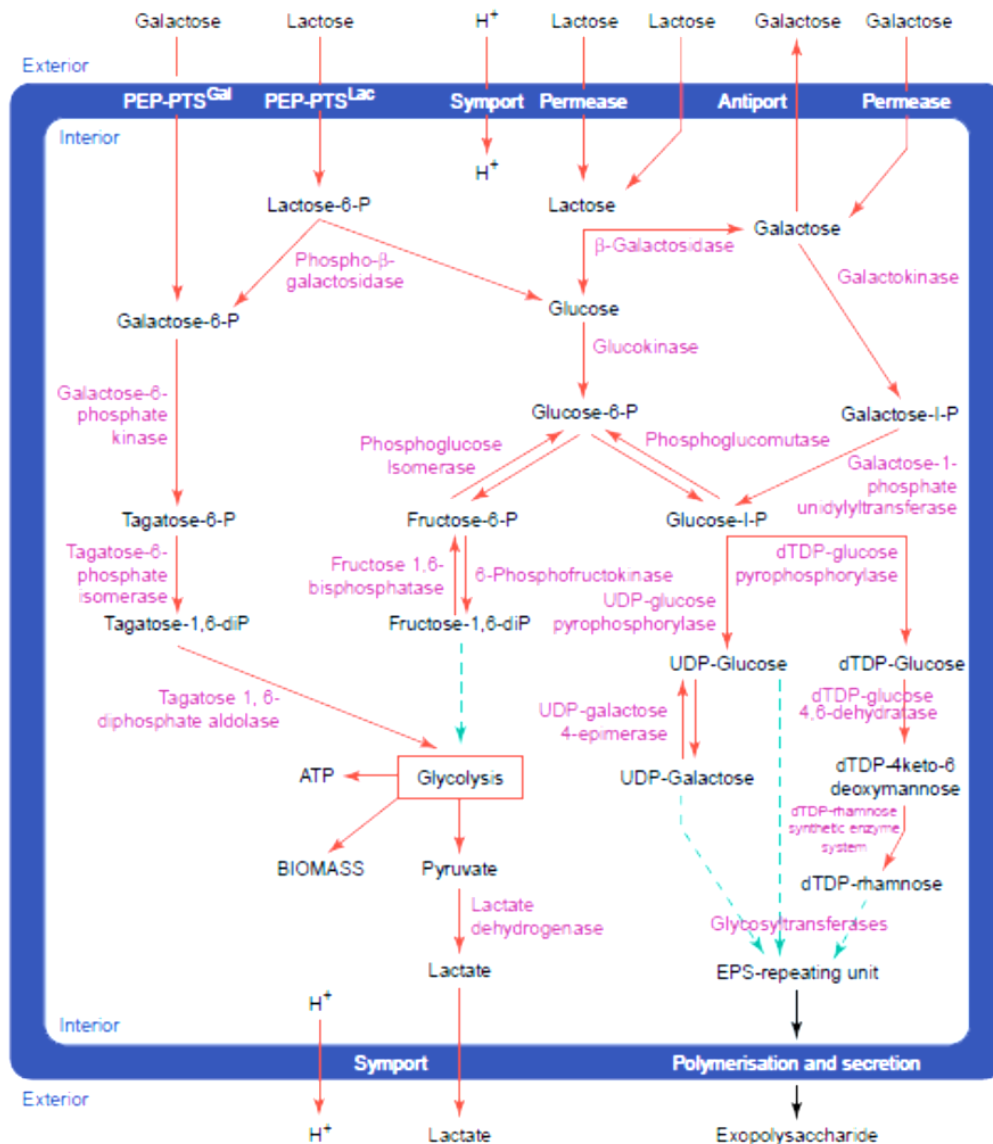
Početak sinteze heteropolisaharida započinje formiranjem ponavljajućih građevnih jedinica intracelularno, u citoplazmi. Nekoliko različitih enzima je uključeno u biosintezu i izlučivanje više različitih tipova EPOL-a. Šećerni nukleotidi nastali od glukoza-1-fosfata, imaju važnu ulogu u sintezi heteropolisaharida zbog aktivacije šećera koja je nužna za monosaharidnu polimerizaciju (De Vuyst i Degeest, 1999).

Ključni intermedijer koji povezuje anaboličke puteve proizvodnje EPOL-a i kataboličke puteve razgradnje šećera jest glukoza-6-fosfat, pri čemu tijek ugljika ide od formiranja fruktoza-6-fosfata do produkata glikolize, glukoze, biomase i dobivanja ATP-a i šećernih nukleotida koji su prekursori sinteze EPOL-a (slika 1) (Welman i Maddox, 2003). Fosfoglukomutaza, enzim koji sudjeluje u pretvorbi glukoza-6-fosfata u glukoza-1-fosfat, potencijalno ima važnu ulogu u tijeku reakcija između anaboličkog i kataboličkog puta.

Glukoza-1-fosfat je mjesto grananja sinteze šećernih nukleotida UDP-glukoze i dTDP-glukoze djelovanjem UDP-glukoza pirofosforilaze i dTDP-glukoze pirofosforilaze. UDP-glukoza i dTDP-glukoza su prekursori za mnoge polisaharide u stanici, stoga mogu ići u reakcije katalizirane istim enzimima. Posljednji stupanj sinteze EPOL-a u BMK, je stvaranje monosaharidnih građevnih jedinica i vrši se preko nekoliko specifičnih EPOL enzima (Stingele i sur., 1996). Mehanizam polimerizacije ponavljajućih građevnih jedinica te konačna proizvodnja EPOL-a u BMK i njihov transport van stanice nije sasvim razjašnjen. Visok stupanj homologije između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih mikroorganizama s obzirom na



sintezu ponavljajućih građevnih jedinica, znači vrlo vjerojatno da slični mehanizmi djeluju u stupnju polimerizacije EPOL-a i njihovog transporta izvan stanice (Laws i sur., 2001).



**Slika 1.** Opći dijagram pretvorbe laktoze, galaktoze i glukoze u smjeru glikolize i sinteze EPOL kod bakterija mliječne kiseline (Welman i Maddox, 2003)

U sintezi heteropolisaharida sudjeluje nekoliko specifičnih enzima: glikozil-1-fosfat transferaza (primarna glikoziltransferaza) koja provodi prijenos prvog monomera (npr. UDP-glukozu) na fosforilirani lipidni nosač, jedna ili više glikoziltransferaza koje sekvencijalno dodaju nove monomere na rastuću ponavljajuću jedinicu, dodatni regulatorni proteini koji sudjeluju u regulaciji *epoI* gena, proteini koji provode membransku translokaciju ponavljajućih jedinica i polimerizaciju/kontrolu dužine lanca (Broadbent i sur., 2003). Dodatni

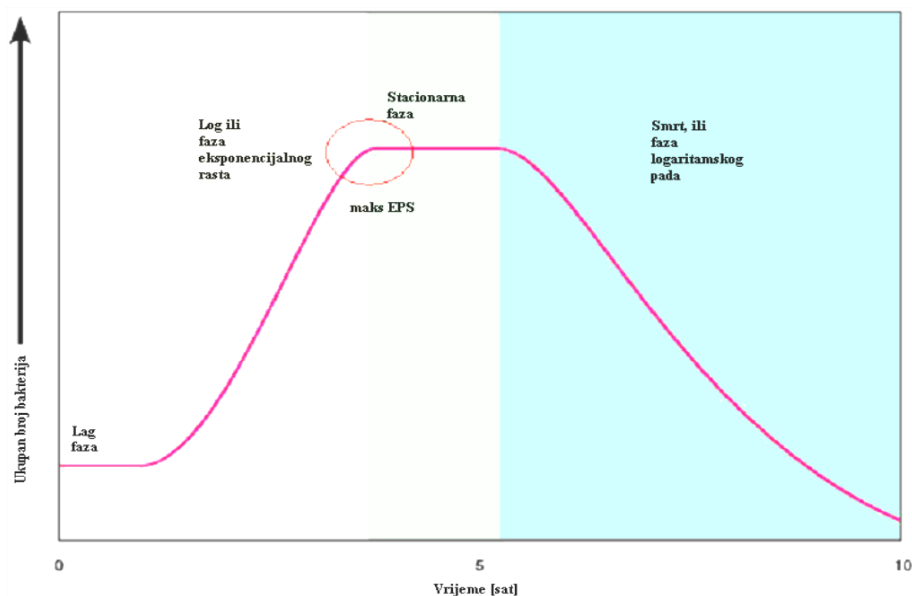
enzimi iz centralnog metabolizma osiguravaju npr. glukoza-1-fosfat kao ključni metabolit za početak sinteze EPOL-a (Ramos i sur., 2001). Velika strukturna raznovrsnost EPOL-a je posljedica bogatstva specifičnih glikoziltransferaza koje formiraju glikozidne veze između donorskih i akceptorskih molekula.

### **2.3.3. Optimalni parametri i kinetika proizvodnje EPOL-a pomoću BMK**

Biosinteza i izlučivanje EPOL-a s BMK odvija se tijekom različitih faza rasta, a vrsta i količina sintetiziranih EPOL-a ovisi o samom mikroorganizmu te uvjetima rasta mikroorganizma. Količina EPOL-a sintetiziranih u BMK ovisi o sastavu hranjive podloge, naročito o ugljikovim i dušikovim spojevima. Također, količina EPOL-a ovisi o uvjetima fermentacije: temperaturi, vremenu trajanja i pH vrijednosti. Sinteza intracelularnih EPOL-a s pomoću različitih BMK kreće se između 0,045 - 0,350 g/L u uvjetima koji nisu optimalni do 0,150 - 0,600 g/L u optimalnim uvjetima uzgoja.

Za sada postoje neusklađeni podaci o utjecaju fizikalnih parametara na biosintezu EPOL-a. Većina BMK sintetizira više EPOL-a na višim temperaturama i u reguliranom pH području uzgoja. Ipak, brojni su literaturni navodi o povećanoj proizvodnji EPOL-a pri nižim temperaturama. Optimalni pH za sintezu EPOL-a je oko 6,0. Sinteza EPOL-a veća je pri nižim koncentracijama kisika, pa čak i u anaerobnim uvjetima, dok povećana koncentracija kisika i miješanje djeluju nepovoljno.

Termofilne vrste BMK optimalno rastu pri višim temperaturama (od 37 - 45°C) i znatno brže proizvode kiselinu nego mezofilne bakterije. Kod termofilnih BMK, sinteza EPOL-a povezana je sa rastom bakterija jer je količina nastalih EPOL-a najveća pri uvjetima optimalnim za rast. Mezofilni sojevi BMK sintetiziraju maksimalnu količinu EPOL-a u nepovoljnim uvjetima uzgoja. U termofilnih vrsta BMK, kod kojih je sinteza EPOL-a povezana sa rastom bakterija, sinteza EPOL-a počinje simultano s rastom i dostiže svoj maksimum na vrhu log faze i na početku stacionarne faze kao što je prikazano na slici 2 (Tortora i sur., 2004). Nakon maksimalno postignute biosinteze EPOL-a slijedi smanjenje količine EPOL-a. Nepreciznom određivanju količine sintetiziranih EPOL-a svakako pridonosi i degradacija EPOL-a koja se javlja kod produžene inkubacije. Uzrok tome vrlo vjerojatno je aktivnost glikohidrolaze. S prolaskom vremena fermentacije, smanjenje količine EPOL-a ovisi o soju bakterije te kemijskim i fizikalnim uvjetima.



**Slika 2.** Faze rasta termofilnih bakterija (Tortora i sur., Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 2004)

#### 2.3.4. Uloga egzopolisaharida

Fiziološka uloga egzopolisaharida ovisi o staništu na kojem se mikroorganizmi nalaze, a proizvodnja ovisi o različitim ekološkim uvjetima kao što su temperatura, intenzitet svjetla ili tlak (Otero i Vincenzini, 2003; Dudman, 1977). EPOL imaju ulogu zaštititi mikrobnu stanicu od sušenja, fagocitoze, antibiotika, osmotskog tlaka ili otrovnih tvari za stanicu (npr. metali ioni, sumporni dioksid, etanol), stvarajući zaštitni biofilm oko stanice. Biofilm je zajednica mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani na površinu, međufazu ili nešto drugo, koji su uklopljeni u matriks ekstracelularne polimerne supstancije i koji pokazuju izmijenjeni fenotip u odnosu na brzinu rasta i transkripciju gena (Donlan i Costerton, 2002). Uloge EPOL-a osim formiranja biofilma su i prihvaćanje na površinu, a važnu ulogu imaju pri adaptaciji bakterija na različite fizikalne i kemijske uvjete u okolišu. Sloj EPOL-a koji okružuje bakteriju posjeduje velik sadržaj vode što pridonosi zaštiti same bakterije, a osim toga anionska priroda EPOL-a omogućuje zadržavanje bitnih minerala i nutrijenata (Donot i sur., 2012). Određene bakterije mogu biti otporne na surfaktante i antibiotike zbog utjecaja biofilma na biocide direktnom inaktivacijom.

Fruktani kao jedna od vrsta egzopolisaharida sudjeluju u regulaciji staničnog stresa te mehanizmima zaštite i stabilizacije stanične membrane kod biljaka.

EPOL dekstran iz *Leuc. mesenteroides* štiti stanicu tijekom gladovanja u lužnatoj i kiseloj sredini (Kim i sur., 2000). Malo je vjerojatno da EPOL služe i kao skladišta hranjivih tvari s obzirom da bakterije većinom nemaju mogućnost razgradnje EPOL-a (Cerning, 1990).

Velika raznovrsnost polimera omogućuje različitu primjenu EPOL-a u industriji, većinom u prehrambenoj i farmaceutskoj. U prehrambenoj industriji EPOL se koriste kao zgušnjivači, emulgatori, stabilizatori, sredstva za inkapsulaciju, sredstva za snižavanje sinergije zbog pseudoplastičnih reoloških svojstava i kapaciteta vezanja vode i sl. Visoka viskoznost i jedinstvena reološka svojstva koja EPOL daju fermentiranom mlijeku, čak i pri vrlo niskim koncentracijama, čine EPOL potencijalno važnim sastojcima prehrambenih proizvoda. Njihova uporaba u prehrambenoj industriji je ograničena, prvenstveno zbog visoke cijene izolacije iz medija. Ksantan je EPOL koji se najviše koristi zbog dobrih reoloških karakteristika i relativno male cijene proizvodnje, a proizvodi se s pomoću visoko produktivne bakterije *Xanthomonas campestris*. Međutim, ova bakterija nema GRAS status tj. nije pogodna za primjenu u prehrambenoj industriji. Stoga će u ovom radu biti detaljnije opisano i dokazano da BMK, prehrambeno sigurni mikroorganizmi i vrste, imaju sposobnost proizvodnje EPOL u većim količinama i imaju veliki potencijal za zamjenu biljnih EPOL-a te ksantana koji se trenutno primjenjuju u prehrambenoj industriji.

Također, neki EPOL mogu pridonijeti ljudskom zdravlju. Dokazano je njihovo prebiotičko, antitumorno te imunostimulativno djelovanje kao i mogućnost snižavanja kolesterola (De Vuyst i Degeest, 1999).

### **3. MATERIJALI I METODE RADA**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom radu korišteni su sojevi bakterija mliječne kiseline, prikazani u tablici 2. Navedeni sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

**Tablica 2.** Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu

| Bakterijski sojevi              | Oznaka soja |
|---------------------------------|-------------|
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | M92         |
| <i>Lactobacillus brevis</i>     | ZG1         |
| <i>Lactobacillus brevis</i>     | SF9B        |
| <i>Lactobacillus brevis</i>     | SF15B       |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>  | SF9C        |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>  | SF15C       |
| <i>Lactobacillus brevis</i>     | D6          |
| <i>Enterococcus durans</i>      | D8          |
| <i>Lactobacillus fermentum</i>  | D12         |
| <i>Lactobacillus plantarum</i>  | D13         |

#### 3.1.2. Hranjive podloge

Tijekom rada korištene su hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar sljedećeg sastava (g/l destilirane vode): pepton 10 g/L; mesni ekstrakt 10 g/L; kvaščev ekstrakt 5 g/L; glukoza 20 g/L; Tween 80 1 g/L ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,1 g/L;  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05 g/L; natrijev-acetat 5 g/L; agar 20 g/L. 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 (96%), „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- fruktoza, „Merck“, SAD
- galaktoza, „Kemika“, Hrvatska
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Kristal violet, „Sigma-Aldrich“, SAD
- kvaščev 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
- trikloroctena 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
- centrifuga 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.“, SAD

- 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 svježu 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 (galaktoza, fruktoza) pri 30°C. Nakon inkubacije, suspenzije stanica i supernatanta odvojene su centrifugiranjem 15 min pri 7500 g (4°C).



**Slika 3.** 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 fruktoze, galaktoze)

### 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) te 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 četiri volumena hladnog etanola (95%) s ciljem uklanjanja lipida, te inkubiran tijekom noći na -20°C pri čemu dolazi do poticanja taloženja egzopolisaharida. Nakon prekonoćne 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 četiri 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“.

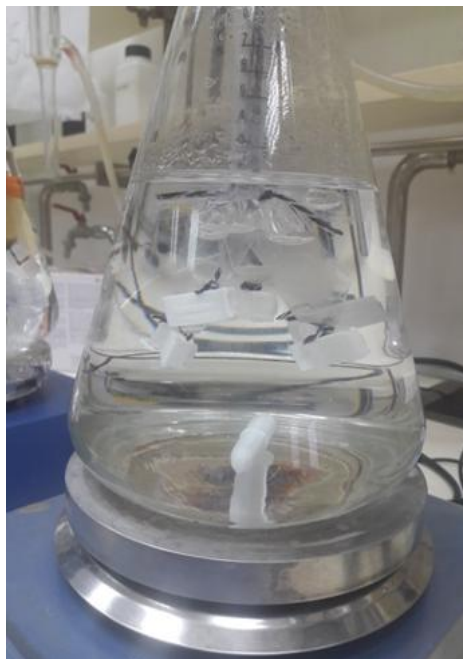


**Slika 4.** Prikaz dijalize suspenzije egzopolisaharida otopljene u destiliranoj vodi, izoliranih iz supernatanta prekonoćne kulture *L. fermentum* D12 uzgojene u MRS podlozi uz dodatak različitih izvora ugljika (2% w/v fruktoze, galaktoze)

### 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 1M 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 četiri volumena hladnog etanola, nakon čega je uslijedila prekonoćna 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 četiri 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 s površine stanica prekonoćne kulture *L. fermentum* D12 uzgojene u MRS podlozi uz dodatak različitih izvora ugljika (2% w/v fruktoze, galaktoze)

### **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 sa različitim izvorima ugljika (2% w/v fruktoza, galaktoza).

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 „nuclase 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 „nuclase 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, nanoseno je u jažice dvije 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 tri 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.

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)

Tijekom proteklih 30 godina provedena su mnoga istraživanja o mogućnostima sinteze EPOL-a pomoću mikroorganizama. BMK, koje uključuju bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Streptococcus*, sintetiziraju brojne vrste homopolisaharida (glukana i fruktana) i heteropolisaharida, različite molekulske mase, topljivosti i stupnja razgranjenja. Sposobnost mikroorganizama da sintetiziraju EPOL-e otvara mogućnost njihove višestruke potencijalne primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Prehrambena industrija koristi polisaharide iz biljaka i morskih trava zbog njihovih svojstava zgušnjavanja i geliranja, ali potražnja daleko nadmašuje proizvodnju. Razina proizvodnje EPOL-a kod BMK je relativno niska (40-800 mg/L) u usporedbi sa ksantanskom gumom (10-25 g/L) koju proizvodi *X. campestris*. BMK su općeprihvaćene kao sigurne za prehranu, a EPOL izolirani iz BMK pružaju alternativni izvor za primjenu u industriji.

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 6.



**Slika 6.** 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)

Liofilizacija ili sušenje proizvoda u zamrznutom obliku je postupak sušenja kojim se tekući dio materijala odvodi sublimacijom. Proces se sastoji od dvije faze: zamrzavanja materijala u tankom sloju pri temperaturi od  $-15^{\circ}\text{C}$  do  $-70^{\circ}\text{C}$  i sušenja zamrznutog materijala u vakuumu pri niskim temperaturama (sublimacija) (Šušković, 2009).

Liofilizacijom (engl. „*freeze-drying*“) se izbjegava denaturacija uzrokovana zagrijavanjem proizvoda na način da ga se održava u zamrznutom obliku tijekom postupka sušenja. Prednosti postupaka liofilizacije uključuju redukciju kontaminacije, minimalno oštećenje i gubitak aktivnosti kod termolabilnih materijala, brzinu i cjelovitost rehidracije, mogućnost točnog i sterilnog doziranja konačnih proizvoda u spremnike itd. (Snowman, 1988). Obzirom na veliku osjetljivost prema dehidraciji, kao i značaj BMK u prehrambenoj industriji, liofilizacija je preporučljiva metoda sušenja ovih bakterija, unatoč dugom vremenu sušenja, velikom utrošku energije i skupoj opremi koja liofilizaciju kao metodu sušenja opravdava samo ako se proizvode pripravci velike vrijednosti i kvalitete. Nakon liofilizacije dobiven je uzorak nalik pamuku (fluffy, white, cotton-like) (slika 7).



**Slika 7.** Prikaz uzoraka egzopolisaharida dobivenih nakon liofilizacije



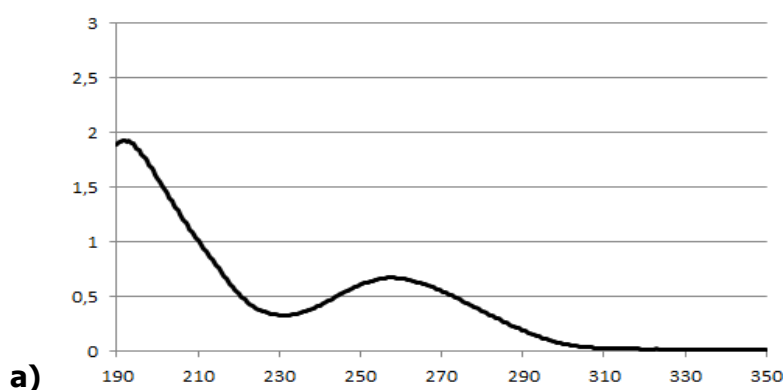
### 4.3. Određivanje mase proizvedenih egzopolisaharida i određivanje čistoće UV-spektrofotometrijom

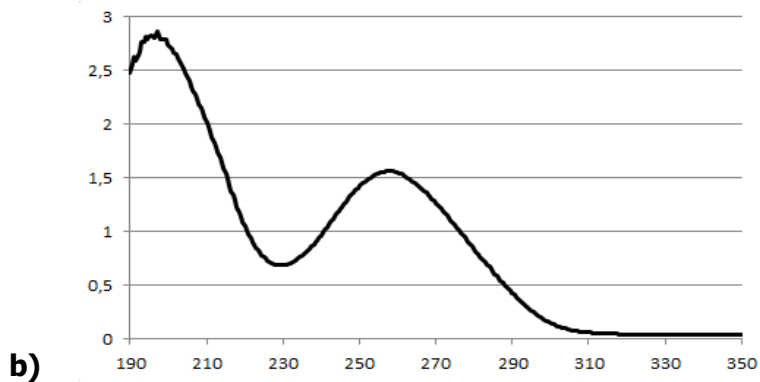
Nakon liofilizacije egzopolisaharida otpuštenih u medij i vezanih za površinu, izračunata je masa egzopolisaharida proizvedenih prilikom uzgoja u MRS hranjivoj podlozi suplementiranoj s različitim izvorima ugljika (2% w/v fruktoza, galaktoza). Rezultati su prikazani u tablici 3.

**Tablica 3.** Prikaz mase proizvedenih egzopolisaharida prilikom uzgoja u MRS hranjivoj podlozi suplementiranoj s različitim izvorima ugljika (fruktoza - Fru, galaktoza - Gal) koji se nalaze na površini stanica (oznaka P) i onih otpuštenih u medij (oznaka S) izračunata nakon procesa liofilizacije

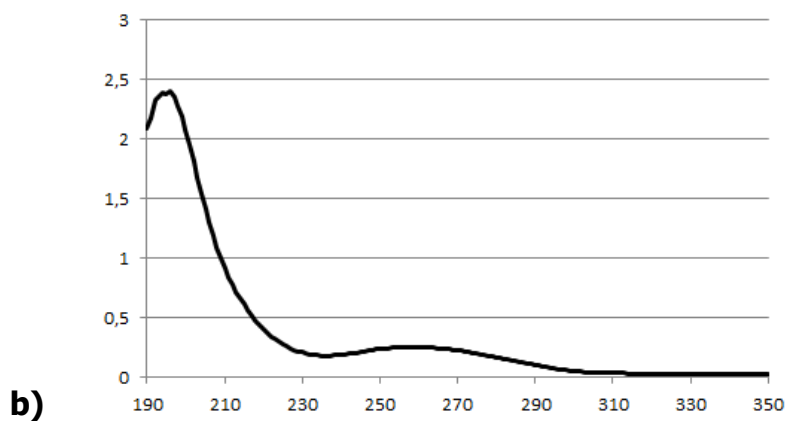
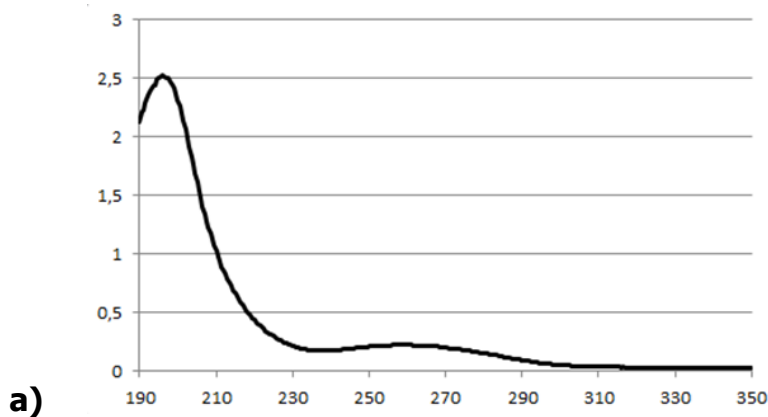
| Uzorak | M <sub>EPOL</sub> |
|--------|-------------------|
| FruP   | 0,6 mg            |
| GalP   | 0,7 mg            |
| FruS   | 77,6 mg           |
| GalS   | 66,3 mg           |

Kako bi se provjerila prisutnost proteina, pripremljene su otopine svih uzoraka u konačnoj koncentraciji od 1 mg/mL. Provedeno je centrifugiranje uzoraka kroz 10 min pri 13 000 o/min. Supernatan je razrijeđen 3 puta s „nuclase 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 „nuclase free“ voda.





**Slika 8.** 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 s različitim izvorima ugljika; a) fruktoza – Fru, b) galaktoza - Ga



**Slika 9.** 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 s različitim izvorima ugljika; a) fruktoza – Fru, b) galaktoza - Gal

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. Kod uzoraka izoliranih s površine stanica, koncentracija proteina je puno veća, u odnosu na one izolirane iz medija.

#### **4.4. Detekcija formiranja biofilma**

Prekretnicu u proučavanju biofilma predstavlja 1978. godina, kada su Costerton i suradnici prvi put definirali biofilm i postavili teoriju o mehanizmima uključenim u njegovo formiranje. Biofilm su definirali kao strukturnu zajednicu ćelija mikroorganizama koji su vezani za inertne, žive površine ili međufazu i uklopljeni u polimerni matriks (ekstracelularnu supstancu) koji same stvaraju (Costerton i sur., 1978). Isti autori su dopunili definiciju 2002. godine činjenicom da mikroorganizmi koji rastu u biofilmu pokazuju izmijenjeni fenotip s aspekta brzine rasta i transkripcije gena, u odnosu na iste koji rastu u suspenziji (Donlan i Costerton, 2002).

Indeks biofilma mikrotitarske pločice koja je bila na inkubaciji 1 dan izračunat je prema ranije navedenoj formuli.

#### **Indeks biofilma mikrotitarske pločice koja je bila na inkubaciji 1 dan**

$$biofilm\ index = \frac{0,07375 - 0,06088}{1,6959 - 0,3358}$$

$$\underline{biofilm\ indeks} = 9,4625 \cdot 10^{-3}$$

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Prema Cerning (1990) dokazana je potencijalna sposobnost proizvodnje egzopolisaharida kod soja bakterije mliječne kiseline *L. fermentum* D12.
2. Nakon procesa liofilizacije masa proizvedenih egzopolisaharida prilikom uzgoja u MRS hranjivoj podlozi suplementiranoj s različitim izvorima ugljika (2% w/v fruktoza, galaktoza) koji su otpušteni u medij bila je veća od onih koji se nalaze na površini stanica.
3. Određivanjem čistoće, mjerenjem UV-spektrofotometrije, vidljiva je prisutnost proteina kod uzoraka egzopolisaharida izoliranih s površine stanica i kod onih otpuštenih u medij. Kod uzoraka izoliranih s površine stanica, koncentracija proteina je puno veća, u odnosu na one izolirane iz medija.

## **6. LITERATURA**

Beganović, J. (2008) Primjena proteomike i drugih molekularnih metoda u definiranju funkcionalnih svojstava probiotičkih bakterija. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Brkić, B. (1995) Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline. *Magisterij*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., Moineau, S. (2003) Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J Dairy Sci* 86: 407-423.

Carr F. J., Hill D., Maida N. (2002) The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Rev Microbiol* 28: 281 – 370.

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

Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238: 86–95.

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

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

Donlan R. M., Costerton J. W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiol Rev* 15,(2): 167-193.

Donot F., Fontana A., Baccou J. C., Schorr-Galindo S. (2012) Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr Polym* 87: 951-962.

Dudman, W. F. (1977) The role of surface polysaccharides in natural environments. U: I. W. Sutherland (ured.), *Surface carbohydrates of the prokaryotic cell* (str. 357–454). London: Academic Press.

Frece, J. (2007) Sinbiotički učinak bakterija: *Lactobacillus acidophilus* M92, *Lactobacillus plantarum* L4 i *Enterococcus faecium* L3 *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

John, R. P., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 524-534.

Kandler, O. Weiss, N. (1986) Regular, non-sporing Gram-positive rods, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2 (P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, i J. G. Holt, ured.), Williams and Wilkins, Baltimore, str. 1208-1234.

Kim J. H., Kim M. R., Lee J. H., Lee J. W., Kim S. K. (2000) Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* using glucosamine. *Biotechnol Lett* 22: 987–990.

Kos, B. (2001) Probiotički koncept: *in vitro* istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

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

Laws, A., Marshall, V. M. (2001) The relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermentation with ropy strains of lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11: 709-721.

Leboš Pavunc, A. (2012) Fenotipska i genotipska karakterizacija sojeva bakterija mliječne kiseline u svrhu proizvodnje probiotika i funkcionalnih starter kultura. *Disertacija*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Mishra A., Jha B. (2013) Microbial Exopolysacchrides. U: *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*, (Rosenberg E., DeLong E. F., Thompson F., Lory S., Stackebrandt E., ured.), 4th ed. Springer Berlin Heidelberg, str. 179–192.

Otero A., Vincenzini M. (2003) Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *J Biotechnol* 102: 143–152.



Ramos, A., Boels, I. C., de Vos, W. M., Santos, H. (2001) Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 67: 33- 41.

Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals Biol Res* 1: 218 – 228.

Snowman, J. W. (1988) Downstream Processes: Equipment and Techniques, 8. izd, Alan R. Liss, New York, str. 315-351.

Stinglele, F., and Mollet, B., (1996) Identification and characterization of the EPS gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J Bacteriol* 178: 1680-1690.

Sutherland, I. W. (1999) Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydr Polym* 38: 319-328.

Šušković, J. (2009) Probiotici kao živi lijekovi, predavanje iz kolegija "Probiotici i starter kulture", Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial Activity – the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol Biotechnol* 48: 296-307.

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

Šušković J., Kos B., Matošić S. (1998) Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend? *Mljekarstvo* 48: 165 – 176.

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

Toba, T., Kotani, T., Adachi, S. (1991) Capsular polysaccharide of slime-forming *Lactococcus lactis* subs. *Cremoris* LAPT 3001 isolated from Swedish fermented milk "langfil". *Int J Food Microbiol* 12: 167-172.

Tortora, G. J., Funke B. R., Case, C. L. (2004) *Microbiology: an introduction*. 8th Ed. Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings, Microbial Growth: chapter 6.

Uroić, K. (2014)

van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., van Geel-Schutten, I. G. H. (2006) Structure- function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 157-176.

Welman, A. D., Maddox, I. S. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol* 21: 269-274.

Whitfield C., Valvano M. A., Rose A. H. (1993) Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology. Academic Press*. str. 135–246.

## **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