

# Uloga egzopolisaharida u probiotičkoj aktivnosti soja producenta *Lactobacillus fermentum* D12

---

Jaković, Lorena

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:719891>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Preddiplomski studij**

**Biotehnologija**

Lorena Jaković

7315/BT

**ULOGA EGZOPOLISAHARIDA U PROBIOTIČKOJ AKTIVNOSTI SOJA PRODUCENTA**  
***Lactobacillus fermentum* D12**

**ZAVRŠNI RAD**

**Naziv znanstveno-istraživačkoga projekta:** „Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009)

**Mentor:** prof. dr. sc. *Jagoda Šušković*

**Zagreb, 2019.**

# 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

## Uloga egzopolisaharida u probiotičkoj aktivnosti soja producenta *Lactobacillus fermentum* D12

Lorena Jaković, 0058209309

**Sažetak:** Egzopolisaharidi, poznati kao mikrobnj polisaharidi sintetizirani od strane određenih vrsta bakterija mliječne kiseline, pronašli su primjenu u raznim područjima zbog mnogih povoljnih učinaka. U ovom radu se istražilo kako koncentracija sintetiziranih mikrobnj biopolimera, soja producenta *Lactobacillus fermentum* D12, utječe na adhezijska svojstva i zaštitu stanica prilikom stresnih uvjeta. Usporedba preživjelih stanica prije i nakon liofilizacije te prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta, omogućila je donošenje zaključka o mogućoj probiotičkoj aktivnosti egzopolisaharida. Iako su rezultati liofilizacije pokazali veće preživljavanje uz prisustvo EPOL-a, razlike u rezultatima nisu bile značajne. Kod ispitivanja preživljavanja u uvjetima GIT-a vidljivo je veće preživljavanje stanica kod EPOL-a 0,2 mg/mL, ali ujedno i inhibicija rasta stanica kod EPOL-a 1 mg/mL. Na temelju izmjerene apsorbancije dobiveni su rezultati autoagregacije i adhezije na mucin za pojedine koncentracije egzopolisaharida te je vidljiv pozitivan učinak. Rezultati sposobnosti adhezije na Caco-2 stanice ukazuju da određena koncentracija EPOL-a omogućuje preživljavanje stanica.

**Ključne riječi:** bakterije mliječne kiseline, egzopolisaharidi, probiotička aktivnost

**Rad sadrži:** 30 stranica, 7 slika, 4 tablice, 42 literaturna navoda

**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. Jagoda Šušković

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

**Datum obrane:** 15. srpnja 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**Bachelor thesis**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Biotechnology**

**Department of biochemical engineering**

**Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Biotechnology**

**The role of exopolysaccharide in probiotic activity from *Lactobacillus fermentum*  
D12 strain**

*Lorena Jaković, 0058209309*

**Abstract:** Exopolysaccharides, known as microbial polysaccharides synthesized from specific types of lactic acid bacteria, are frequently used in variety of areas because of its favourable effects. This study explored how the concentration of synthesized microbial biopolymers of producer strain *Lactobacillus fermentum* D12, influences adhesive properties and cell protection during stressful conditions. Comparing surviving cells before and after lyophilization and going through simulated conditions of the gastrointestinal tract, enabled us to make conclusions about possible probiotic activity of exopolysaccharides. Although the results of lyophilization showed greater survival in the presence of EPOL, the difference in results was not significant. After survival studies in GIT conditions, better survival of cells was with 0.2 mg/mL EPOL, but also inhibition of cell growth with 1 mg/mL EPOL. Based on measured absorbency the results of autoaggregation and mucin-adhesion for different concentrations of exopolysaccharides had positive effect. The results of adherence to Caco-2 cells indicate that a certain concentration of EPOL allows cell survival.

**Keywords:** *exopolysaccharides, lactic acid bacteria, probiotic activity*

**Thesis contains:** 30 pages, 7 figures, 4 tables, 42 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 Jagoda Šušković, Full professor

**Technical support and assistance:** Katarina Butorac, mag. ing. biotech.

**Defence date:** July 15<sup>th</sup> 2019

# SADRŽAJ

1	<b>UVOD</b> .....	1
2	<b>TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1	Probiotici i bakterije mliječne kiseline .....	2
2.2	Polisaharidi .....	4
2.3	Mikrobni egzopolisaharidi .....	4
2.4	Podjela mikrobnih egzopolisaharida.....	5
2.4.1	Homopolisaharidi.....	5
2.4.2	Heteropolisaharidi.....	8
2.5	Važnost i primjena egzopolisaharida.....	9
2.5.1	Primjena egzopolisaharida u industrijama .....	9
2.5.2	Probiotička i prebiotička aktivnost egzopolisaharida .....	10
3	<b>MATERIJALI I METODE RADA</b> .....	12
3.1	MATERIJALI.....	12
3.1.1	Radni mikroorganizam .....	12
3.1.2	Stanične linije .....	12
3.1.3	Hranjive podloge .....	12
3.1.4	Kemikalije.....	12
3.1.5	Aparatura i pribor .....	13
3.2	METODE RADA .....	14
3.2.1	Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija .....	14
3.2.2	Izolacija egzopolisaharida (EPOL-a).....	14
3.2.3	Priprema otopina egzopolisaharida različitih koncentracija.....	14
3.2.4	Ispitivanje protektivnog učinka EPOL-a tijekom liofilizacije soja <i>Lactobacillus fermentum</i> D12 .....	15
3.2.5	Ispitivanje preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta .....	15
3.2.6	Analiza utjecaja EPOL-a na autoagregacijska svojstva soja <i>Lactobacillus fermentum</i> D12 .....	16

3.2.7	Adhezija bakterijskih stanica na mucin .....	16
3.2.8	Adhezija na Caco-2 epitelne stanice .....	17
4	<b>REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	19
4.1	Ispitivanje protektivnog učinka različitih koncentracija EPOL-a .....	19
4.2	Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija EPOL-a na adhezijska svojstva soja producenta <i>Lb. fermentum</i> D12.....	22
5	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	26
6	<b>LITERATURA</b> .....	27

# 1 UVOD

Bakterije mliječne kiseline zbog probiotičkog djelovanja još od davnina imaju važnu ulogu u živom organizmu. Istaknule su se zahvaljujući brojnim pozitivnim učincima koji su na kraju rezultirali poboljšanim zdravljem domaćina. Poznato je da određene vrste bakterija mliječne kiseline (BMK) imaju sposobnost sinteze egzopolisaharida koji se izlučuju izvan stanice u obliku biofilma ili u kapsularnom obliku. Ovisno o vrsti monosaharidne jedinice koja gradi mikrobnii biopolimer, provedena je klasifikacija na homopolisaharide i heteropolisaharide. Pošto ekstracelularni polisaharidi često pronalaze primjenu u raznim industrijama kao što su prehrambena, kemijska i farmaceutska industrija, provedena su mnoga istraživanja koja su potvrdila njihov mogući probiotički učinak. Da bi se određena bakterijska kultura mogla nazvati probiotičkim proizvodom, potrebno je zadovoljiti niz kriterija. Neki od tih kriterija ispitivani su u ovome radu na način da je praćen utjecaj koncentracije egzopolisaharida na preživljavanje stanica tijekom njihovog izlaganja različitim uvjetima. Jedan od takvih uvjeta odnosio se na preživljavanje stanica nakon provedene liofilizacije u stresnim uvjetima. Da bi BMK došla do ciljanog mjesta djelovanja, potreban je njezin uspješan prolazak kroz gastrointestinalni trakt budući je poznato da želučane sokove karakterizira izrazito niska pH vrijednost. Osim toga, važno je istaknuti kako je za probiotičku aktivnost potrebno vezanje bakterijske kulture na stanice crijevnog epitela te na proteine sluznice kao što je to mucin. Pošto su egzopolisaharidi poznati po svojoj mogućoj antitumorskoj aktivnosti, ispitivao se i njihov učinak u adheziji na Caco-2 stanice. Ovim provedenim eksperimentima željelo se istražiti pružaju li sintetizirani egzopolisaharidi protektivni učinak stanici te kakva su im adhezijska svojstva.

## 2 TEORIJSKI DIO

### 2.1 Probiotici i bakterije mliječne kiseline

Važnu ulogu u ljudskom i životinjskom organizmu imaju probiotici kao „dobre bakterije“. Latinsko podrijetlo riječi probiotik označava da se radi o nečemu što nam je potrebno za život. Pod pojmom probiotik podrazumijeva se niz živih i korisnih mikroorganizama kojima je cilj pozitivno djelovati na domaćina, odnosno poboljšati svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković, 1996). Da bi se neka kultura živih stanica smatrala probiotikom, moraju biti zadovoljena određena svojstva.

Kriteriji se mogu podijeliti u opće, tehnološke i funkcionalne. Opći kriteriji podrazumijevaju poznavanje, odnosno točnu taksonomsku identifikaciju odabranog mikroorganizma pri čemu on ne smije iskazivati toksičnost, a nužna je njegova otpornost prema niskim pH vrijednostima i žučnim kiselinama kako bi mogao preživljavati u gastrointestinalnom traktu. Osim toga, važno je da takav mikroorganizam bude genetički stabilan i da bude humanog podrijetla ukoliko se koristi u čovjekovu svrhu. Tehnološki kriteriji obuhvaćaju svojstva kao što su brzo i lako razmnožavanje, izdvajanje te preživljavanje tijekom samog čuvanja probiotika. Također, mora biti zadovoljen uvjet da postoji velik broj živih bakterijskih stanica u konačnom probiotičkom proizvodu. Odabrani probiotički sojevi moraju iskazivati prilagodbu na uvjete i preživljavanje u ciljanom mjestu organizma, moraju imati mogućnost vezanja na stanice crijevnog epitela i pri tome eliminirati sve patogene mikroorganizme. Istovremeno, u mogućnosti su konkurirati bakterijama normalne mikroflore. Navedene značajke pripadaju funkcionalnim kriterijima za izbor probiotičkog soja.

Kao što je već poznato, crijevna mikroflora ima važnu ulogu u sprječavanju naseljavanja patogenih mikroorganizama i njihovog štetnog djelovanja. Upravo iz tog razloga, važno je osigurati njezinu stabilnost i ravnotežu. Ukoliko je crijevna mikroflora uništena, probiotici preuzimaju funkciju prirodne flore s ciljem njezine obnove. Narušavanje stabilnosti crijevne mikroflore može biti potaknutno endogenim i egzogenim čimbenicima. Endogeni čimbenici, koji su uzrok poremećaja u crijevima, vezani su uz probavljivost hranjivih tvari, vrstu hrane, dijareju te uz pH vrijednost i redoks potencijal. Drugu skupinu čimbenika čine poremećaji uzrokovani stresom, starenjem, operacijskim zahvatima te oslabjelim imunološkim sustavom. Također, ovdje pripada i antibiotska terapija koja je na neki način i potaknula istraživanje i razvoj probiotika.



Probiotički proizvodi se mogu klasificirati kao bioterapeutici i probiotičke kulture (Sleator i Hill, 2008). Bioterapeutici su zapravo proizvodi čija je svrha prevencija bolesti, a probiotičke kulture se odnose na proizvode koji promoviraju zdravlje (funkcionalna hrana i dodaci hrani).

Upotreba pojma probiotik najčešće podrazumijeva korištenje bakterija mliječne kiseline (BMK) u koje spada oko 50 različitih vrsta bakterija klasificirane u rodove *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* itd. Prirodno su prisutne u probavnom traktu zdravih ljudi i životinja, stoga nose važnu metaboličku ulogu. Osim toga, provode biotehnoške procese kao što su proizvodnja različitih mliječnih proizvoda te konzerviranje hrane pri čemu doprinose samoj teksturi, okusu i nutritivnoj vrijednosti dobivenih proizvoda. Leroy i sur. (2004) navode da BMK, osim što produciraju mliječnu kiselinu, mogu producirati i octenu kiselinu, etanol, bakteriocine, egzopolisaharide te sastojke arome. BMK pripadaju Gram pozitivnim, nesporulirajućim, mezofilnim bakterijama koje nemaju citokroma, katalaza su negativne i rastu isključivo na kompleksnim hranjivim podlogama (Šušković i sur., 2010). Mogu se podijeliti s obzirom na dobiveni proizvod razgradnje izvora ugljika (heksoze). Homofermentativne bakterije provode razgradnju šećera biosintetskim putem glikolize, pri čemu se kao konačni produkt fermentacije u najvećoj koncentraciji dobiva mliječna kiselina. Poznato je da se u procesu glikolize razgradnjom šećera dobiva piruvat koji se dalje u anaerobnim uvjetima prevodi u laktat djelovanjem enzima laktat dehidrogenaze. Suprotno njima, heterofermentativne bakterije, pentozna fosfatnim putem, uz mliječnu kiselinu produciraju i etanol, octenu kiselinu te ugljikov dioksid (John i sur., 2007).

Probiotička aktivnost bakterija mliječne kiseline uvelike ovisi o uvjetima koji prevladavaju unutar gastrointestinalnog trakta. Njihovu sposobnost preživljavanja onemogućuje niski pH želuca, žučne soli, lizozim, pepsin te enzimi gušterače. BMK imaju nekoliko mehanizama djelovanja u cilju poboljšanja zdravlja domaćina. Jedan od načina djelovanja jest da inhibiraju rast mikroorganizama koji nisu poželjni u gastrointestinalnom traktu pri čemu mogu konkurirati za mjesto vezanja, za hranjive tvari ili mogu imati antagonističko djelovanje. Osim toga, imaju sposobnost modifikacije metaboličkih procesa u probavnom sustavu koja se postiže djelovanjem na enzimsku aktivnost (Šušković i sur., 1998). U mogućnosti su, ili smanjiti enzimsku aktivnost onih enzima koji potiču pojavu kancerogenih procesa, ili povećati enzimsku aktivnost nekih enzima koji su poželjni u probavnom sustavu. Posljednji način kojim bakterije mliječne kiseline iskazuju svoje probiotičko djelovanje je da stimuliraju imunološki sustav domaćina. Poboljšanje imuno sustava postiže se povećanjem

koncentracije protutijela te povećanjem makrofagne aktivnosti. Lemme-Dumit i sur. (2016) u svom radu opisuju istraživanje koje se baziralo na intestinalnim epitelnim stanicama za koje se zna da su važne za imunološki odgovor. Štoviše, ističu i važnost makrofaga čija je sposobnost razgradnja štetnih tvari i njihovo uklanjanje iz organizma.

## **2.2 Polisaharidi**

Polisaharidi su molekule sastavljene od velikog broja monosaharidnih jedinica koje su međusobno povezane glikozidnim vezama. Dije se na kapsularne polisaharide, lipopolisaharide i egzopolisaharide. Osim što polisaharidi imaju važnu ulogu u skladištenju energije, omogućuju i komunikaciju između stanica te pružaju potporu stanicama i tkivima. BMK su u mogućnosti producirati polisaharide te se dijele na intracelularne i ekstracelularne, odnosno egzopolisaharide. Intracelularni polisaharidi se izlučuju unutar stanice te imaju važnu ulogu u opskrbi stanice energijom u obliku škroba ili glikogena. Ekstracelularni polisaharidi se sintetiziraju u mikrobnim stanicama te imaju sposobnost izlučivanja izvan stanice u kapsularnom obliku ili u obliku biofilma (Suresh Kumar i sur., 2007). Za razliku od oblika biofilma, kapsularni oblik predstavlja vezanje polisaharida na površinu stanice čvrstom kovalentnom vezom.

## **2.3 Mikrobnii egzopolisaharidi**

Posljednjih godina mikrobnii egzopolisaharidi (EPS) predstavljaju vrlo istraživane biopolimere radi niza prednosti primjene u područjima kao što su prehrambena i farmaceutska industrija te medicina. Upravo je GRAS (Generally Recognized As Safe) status, kojeg posjeduju BMK, omogućio razvoj i istraživanje tih bakterija kao potencijalnih sojeva producenta egzopolisaharida. Egzopolisaharidi tako mogu biti producirani od strane prokariota i eukariota (npr. Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, alge, gljive, biljke, životinje...), no međutim samo neke vrste BMK mogu biti njihovi producenti. Količina egzopolisaharida koja se može sintetizirati ovisi o nekoliko čimbenika. Prije svega ovisi o soju producentu i uvjetima rasta, sastavu medija (izvori dušika i ugljika), pH vrijednosti, temperaturi, koncentraciji kisika te vremenu trajanja inkubacije (Gerwig, 2018).

EPS su građeni od ponavljajućih jedinica šećera kao što su glukoza, galaktoza i ramnoza te njihovih derivata pri čemu su povezani  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozidnom vezom. To su dugolančane, vodotopljive molekule čija molekulska masa iznosi oko 10-1000 kDa (Patel i sur., 2010). Mogu se naći u lineranom, ali i razgranatom obliku te imaju mogućnost izlučivanja u prostor kao slobodni egzopolisaharidi (fEPS).

Kapsularni egzopolisaharidi (cEPS), kao što sama riječ govori, formiraju kapsulu vezanjem na površinu bakterijske stanice kovalentom vezom. Osim što egzopolisaharidi mogu biti povezani međusobno, mogu stupati u interakciju s drugim molekulama kao što su proteini, lipidi, organski i anorganski spojevi.

## **2.4 Podjela mikrobnih egzopolisaharida**

Razlika u vrsti monosaharidne jedinice kao gradivnog dijela egzopolisaharida, te u samom načinu biosinteze, omogućuje klasifikaciju na homopolisaharide (HoPS) i na heteropolisaharide (HePS) (Welman i Maddox, 2003) (slika 1, Oleky i Klewicka, 2016).

### **2.4.1 Homopolisaharidi**

Homopolisaharidi se mogu definirati kao polimeri isključivo jedne vrste jednostavnih šećera, ili glukoze ili fruktoze, pa ih se prema tome dijeli na glukane i fruktane. Neki od rodova bakterija koji pripadaju homopolisaharidima su *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Mogu biti velike molekulske mase (veće od HePS), različite duljine lanaca i načina povezivanja te različitog stupnja grananja (Oleksy i Klewicka, 2016). Biosintetski put im je vrlo složen te se odvija ekstracelularno pomoću samo jednog enzima za kojeg kodira samo jedan gen. Supstrat za sintezu je saharoza, a enzim koji katalizira reakciju hidrolize je glikan sukraza. Ovisno o tome želimo li kao produkt reakcije dobiti glukran ili fruktan, koriste se enzimi transglukozidaza ili transfruktozidaza.  $\alpha$ -D-glukanima pripadaju dekstran, mutan i reuteran, a fruktanima levan i inulin čija će važnost biti malo detaljnije opisana.

- **DEKSTRAN**

Dekstran je jedan od razgranatih homopolisaharida koji nalazi široku primjenu u medicini, prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji. Korištena vrsta BMK (*Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc amelibiosum*, *Lactobacillus curvatus* itd.) će u sintezi dekstrana utjecati na njegova svojstva, a time i na primjenu u različitim područjima života. Također, na primjenu će utjecati i oblik u kojem se nalazi. Može se koristiti u svom izvornom obliku, razgrađenom obliku ili u obliku derivata. Dok se u prehrambenoj industriji može koristiti kao sredstvo za zgušnjavanje, u medicini ima suprotni učinak, odnosno djeluje kao antikoagulans (sredstvo za sprječavanje zgrušavanja krvi) u formi dekstran sulfata. Omogućuje bolji protok krvi i ima antitrombotsku aktivnost (Saadat i sur., 2019). Također, koristi se u kapljicama za oči (kao lubrikant), u infuzijskoj otopini te u liječenju anemije kod

ljudi i životinja. Dekstran i njegovi derivati mogu se pronaći u kozmetičkim proizvodima radi poželjnog hidratacijskog učinka na kosu i kožu. Ima anti-age učinak te dobra svojstva u tretiranju grube i ispucale kože. Što se tiče njegove upotrebe u kemijskoj industriji, koristi se kao matriks u kromatografskim kolonama (Sephadex). U prehrambenoj industriji ističe se kao poboljšivač teksture, mekoće i volumena pekarskih proizvoda te kao aditiv u sladoledu i slatkišima (Bhavani i Nisha, 2010). Unatoč brojnim pozitivnim učincima dekstrana, postoje i oni koji bi mogli djelovati nepovoljno. Npr. prisutan je u formiranju zubnog plaka jer upravo netopljivi dekstran pogoduje prijanjanju bakterija na zubima. Može biti štetan za dijabetičare te postoji opasnost od zatajenja bubrega. Postoji mogućnost kvarenja kod suhomesnatih proizvoda i u proizvodnji ruma (Kothari i sur., 2014). Ipak, do nepovoljnih učinaka dolazi puno rjeđe pa tako dekstran i dalje ostaje često korišten homopolisaharid.

- **MUTAN**

Glukozne jedinice, koje izgrađuju mutan, povezane su u većini slučajeva  $\alpha$ -1,3 glikozidnom vezom te se tada nalazi u obliku ne topljivom u vodi (Wiater i sur., 2002). Pobočni lanci često su vezani  $\alpha$ -1,6 glikozidnim vezama koje su uzrok ljepljive strukture tih egzopolisaharida. Najčešće ga producira *Streptococcus mutans* pa od tud i ime dobivenog homopolisaharida. Mutan je poznati uzročnik zubnog karijesa.

- **REUTERAN**

Vodotopljivi glukan svoju primjenu pronalazi u pekarskoj industriji. Proizvode ga sojevi *Lactobacillus*, a monosaharidne jedinice međusobno su povezane  $\alpha$ -1,4 i  $\alpha$ -1,6 glikozidnim vezama. Reuteran se zajedno s dekstranom koristi u proizvodnji kiselih tijesta koja danas imaju niz prednosti u proizvodnji pekarskih proizvoda, na primjer poboljšavanje reoloških svojstava, povećanje volumena, pojačavanje arome te duži vijek svježine kruha (Galle i sur., 2011).

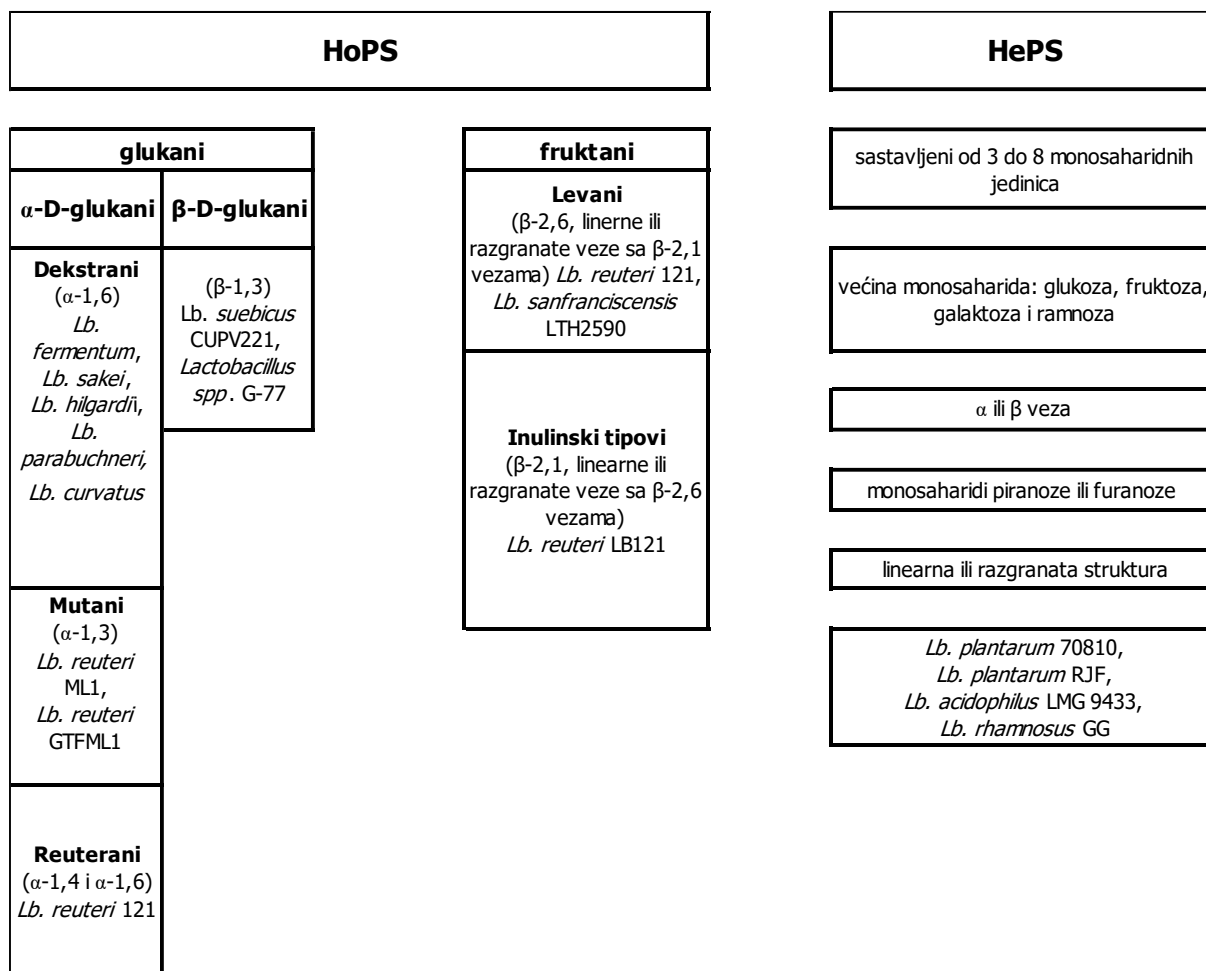
- **LEVAN**

Levan pripada razgranatim homopolisaharidima te se sastoji od D-fruktozilnih jedinica međusobno povezanih  $\beta$ -2,6 glikozidnom vezom. Na mjestima grananja može se pronaći  $\beta$ -2,1 glikozidna veza (Mishra i Jha, 2013). Najčešće bakterijske vrste koje sintetiziraju levan su *Lactobacillus reuteri* i *Lactobacillus sanfranciscensis*. Kao i većina prethodno navedenih egzopolisaharida, levan se koristi u kemijskoj industriji, farmaceutskoj industriji te u

kozmetici. Također, dodatak je hrani za životinje i čovjeka pa ima važnu prebiotičku funkciju. Potpomaže rast bifidobakterija u probavnom traktu što onda ima povoljni zdravstveni učinak.

- **INULIN**

Inulinski tipovi također pripadaju fruktanima kao i levan, međutim suprotne su strukture. Glikozidne veze koje su bile na mjestima grananja u levanu sada se nalaze kod inulinskih tipova u glavnom lancu. Za proizvodnju ovog egzopolisaharida odgovoran je enzim inulin sukraza. Primjenu je pronašao u prehrambenoj industriji kao zamjena za masnoću i šećer te kao poboljšivač teksture namirnica. Osim toga, ima sposobnost geliranja te prebitičku važnost u ljudskom i animalnom životu (Shoaib i sur., 2016). Posjeduje funkciju dijetalnih vlakna jer olakšava rješavanje problema konstipacije. Štoviše, njegova primjena smanjuje rizik od obolijevanja crijeva pa tako i raka debelog crijeva.



**Slika 1.** Klasifikacija egzopolisaharida sintetiziranih pomoću *Lactobacillus* sp. (Oleksy i Klewicka, 2016)

## 2.4.2 Heteropolisaharidi

Heteropolisaharidi su druga vrsta ekstracelularnih polisaharida koji se sastoje od mogućih ponavljajućih jedinica D-glukoze, D-galaktoze, fruktoze ili L-ramnoze, no mogu se sastojati i od nekih drugih molekula koje nisu šećeri (Ruas-Madiedo i sur., 2001). Strukturna raznolikost heteropolisaharida postoji radi različite vrste i broja monosaharida (3-8 različitih ostataka), različitih veza između monomera te mogućnosti sinteze linearnih i razgranatih biopolimera. Upravo njihova složena građa, manja molekulska masa i unutarstanična biosinteza predstavljaju ključne razlike u odnosu na homopolisaharide. Također, ovdje postoji nekoliko vrsta enzima koji su odgovorni za prevođenje supstrata (aktivirani šećer) u konačni produkt, dok je u biosintezi HoPS-a ključnu ulogu imao samo jedan enzim. Sinteza jest puno složenija te započinje transportom šećera u citoplazmu koji je reguliran s nekoliko proteina. Zatim se odvija sinteza šećera pri čemu je na prvom ugljikovom atomu vezana fosfatna grupa. Nakon toga dolazi do povezivanja građevnih jedinica, odnosno polimerizacije, a završni korak je vraćanje takvog dobivenog produkta iz citoplazme u ekstracelularni prostor. BMK koje imaju sposobnost sinteze ovih polisaharida pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* te *Bifidobacterium* (Lynch i sur., 2018). Heteropolisaharidima pripadaju ksantan guma, gelan guma i kefiran o kojima će detaljnije biti riječ u nastavku.

- **KSANTAN GUMA**

Ksantan guma predstavlja visokomolekularni mikrobn polisaharid dobiven fermentacijom glukoze i djelovanjem gram negativne bakterije *Xanthomonas campestris*. Netoksičnost, vodotopljivost, visoka viskoznost pri niskim koncentracijama, stabilnost u širokom rasponu temperature, pH vrijednosti i ionske jakosti, samo su neke od prednosti primjene ksantan gume u raznim područjima. Koristi se kao prirodni zgušnjivač i stabilizator te povećava viskoznost prehrambenih proizvoda. Također, primjenu pronalazi i u pakiranju hrane, u kozmetici kao dodatak gelovima za tuširanje i šamponima, ali i u naftnoj industriji te preradi nafte.

- **GELAN GUMA**

Molekule koje su dio strukture gelan gume su D-glukoza, L-ramnoza te glukuronska kiselina, a sintetizira ju *Sphingomonas elodea* (Gelinsky, 2018). Zhang i sur. (2014) navode da gelan guma nije citotoksična pa se može ubrizgavati u tkivo. U prisustvo metalnih kationa formira jako mekani gel. U prehrambenoj industriji, kao i većina egzopolisaharida, primjenjuje se kao

sredstvo za zgušnjavanje i želiranje, odnosno kao stabilizator. Često se koristi u kombinaciji s ksantan gumom.

- **KEFIRAN**

Kefiran pripada vodotopljivim mikrobnim egzopolisaharidima te se sastoji od podjednakog broja jedinica glukoze i galaktoze. Mogućnost njegove sinteze ima *Lactobacillus kefiranofaciens*, ali isto tako i ostale vrste laktobacila. Primjenu pronalazi u prehrambenoj industriji kao aditiv te je u mogućnosti formirati gelove tijekom kriogenog tretmana, odnosno tijekom zamrzavanja, čuvanja na niskoj temperaturi te konačnog odmrzavanja (Piermaria i sur., 2007). Osim toga, pozitivno djeluje na imunološki sustav, ima mogućnost snižavanja krvnog tlaka te može usporiti rast tumorskih stanica.

## **2.5 Važnost i primjena egzopolisaharida**

Istraživanje egzopolisaharida tijekom niza godina i saznanje o brojnim pozitivnim učincima, dovelo je do današnje primjene u mnogim industrijama. Njihova fiziološka uloga, a time i područje primjene, ovisit će o staništu mikroorganizma. EPS omogućuju zaštitu mikrobne stanice radi mogućnosti tvorbe biofilma koji sprječava isušivanje stanice, a ujedno fiksira hranjive tvari i enzime. Također, štiti bakterijsku stanicu od stresnih uvjeta kao što su temperatura, pH vrijednost te osmotski stres.

### **2.5.1 Primjena egzopolisaharida u industrijama**

Prehrambena industrija u današnje vrijeme puno toga nudi, bilo da je riječ o zadovoljavajućim ili manje zadovoljavajućim prehrambenim proizvodima. Egzopolisaharidi su upravo u ovom području pronašli čestu primjenu pa se koriste u proizvodnji fermentirane hrane (jogurt, sir, vrhnje), a isto tako i u povrću i mesu. Pridonose kvaliteti proizvoda na način da poboljšavaju teksturu i konzistenciju, povećavaju viskoznost te ostavljaju „poseban i bogat“ okus u ustima. Tako npr. jogurt koji ima niski udio masti, uz EPS poprima puno bolji okus nego što bi ga imao bez njihovog prisustva (Güler-Akin i sur., 2009). Reološka svojstva proizvoda ovisit će o nizu čimbenika kao što su: molekulska masa mikrobnog polisaharida, struktura, vrsta glikozidne veze kojom su monosaharidne jedinice povezane, grupe u pobočnim ograncima. Također, egzopolisaharide možemo nazvati prirodnim zgušnjivačima, stoga predstavljaju vrlo dobru zamjenu za aditive, a umanjuju i učinak sineraze koja nikako nije poželjna u prehrambenoj industriji. Kurdlan kao egzopolisaharid već pri maloj koncentraciji ima mogućnost formiranja gelova i iskazuje pozitivne učinke u prehrambenoj

industriji. Ovisno u uvjetima temperature, proizvodi različite oblike gelova te iskazuje stabilnost kako na visokim, tako i na niskim temperaturama. Upravo zato se može primjenjivati tijekom prženja hrane ili pri niskim temperaturama zamrzavanja (McIntosh i sur., 2005). Gelovi kurdšana predstavljaju potencijalnu važnost u razvoju novih prehrambenih tehnologija i proizvodnji niskokalorične hrane, ali čestu primjenu nalaze i u farmaceutskoj industriji. Kako su teški metali danas sve više prisutni u hrani, njihovo nakupljanje u organizmu može rezultirati bolestima kao što su rak, zatajenje bubrega, oralni ulkus. Egzopolisaharidi predstavljaju moguće rješenje jer metalni kationi stupaju u interakciju s negativno nabijenim funkcionalnim skupinama egzopolisaharida. Time se postiže adsorpcija teških metala kao što su olovo, arsen, krom, kadmij itd. Usprkos ovim pozitivnim učincima egzopolisaharida, javlja se problem njihove sinteze jer se izlučuju u jako malim količinama. Osim toga, njihova primjena u vinu, cideru, pivu ili pakiranom mesu može dovesti do kvarenja proizvoda.

### **2.5.2 Probiotička i prebiotička aktivnost egzopolisaharida**

Heteropolisaharidi češće imaju probiotičku funkciju radi izravnog djelovanja na domaćina (njegov imunološki sustav), dok je prebiotička aktivnost vezana uz homopolisaharide. Prema Gibsonu i Robertfroid-u (1995) prebiotik se može definirati kao neprobavljivi sastojak hrane koji pozitivno djeluje na domaćina stimulirajući rast probiotičkih bakterija u debelom crijevu. Najpoznatiji prebiotici koji su ujedno i mikrobnj polisaharidi su inulin, levan i  $\beta$ -glukani. Prebiotici zapravo služe kao hrana probioticima, čime potiču probiotičku aktivnost što na kraju rezultira pozitivnim učinkom na zdravlje organizma. *Lactobacillus sanfranciscensis* producira egzopolisaharid levan koji potiče rast bifidobakterija u probavnom sustavu. Drugi fruktan, inulin, također nastoji povećati broj korisnih bakterija u probavi (Ruas-Madiedo i sur., 2008).

Rodovi bakterija *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* prepoznati su kao važni mikroorganizmi koji omogućuju kolonizaciju crijeva. Stanična stijenka Gram pozitivnih bakterija predstavlja osnovu interakcije probiotika i receptora domaćina. Kao što je već rečeno, EPS imaju sposobnost formiranja biofilma koji osigurava otpornost na gastrointestinalne uvjete čime je zadovoljen probiotički kriterij. Nadalje, inhibiraju rast patogenih mikroorganizama te imaju sposobnost da izazovu imunološki odgovor koji je različit između vrsta i sojeva. Probiotička aktivnost egzopolisaharida vezana je uz mnoge povoljne učinke na zdravlje domaćina i time nosi važnu ulogu u medicini i farmaceutskoj industriji. EPS zahvaljujući imunomodulacijskim svojstvima mogu poticati aktivnost i jačati imunološki sustav. To se postiže stimulacijom



rasta imunoloških stanica kao što su T i B limfociti, aktivacijom makrofaga pomoću *Lactobacillus casei* ili lučenjem protuupalnih citokina. Međutim, nisu svi egzopolisaharidi u mogućnosti izazvati imunološki odgovor, već njihova kemijska struktura predstavlja bitan čimbenik. Tako npr. fosfatne grupe heteropolisaharida djeluju kao stimulator imuno sustava. EPS kefiran pokazao je probiotičko djelovanje na miševima potičući rast stanica imunoglobulina A koji ima važnu ulogu u zaštiti intestinalnog trakta od virusnih infekcija (Vinderola i sur., 2006). Glukozne i manozne jedinice, kao građevni dio mikrobnih polisaharida, predstavljaju izvor antitumorske aktivnosti (Li i sur., 2015). Dakle, neki sojevi producenti egzopolisaharida mogu inhibirati rast tumorskih stanica. Sljedeća važna uloga u ljudskom i animalnom organizmu je antioksidativna aktivnost koju egzopolisaharidi mogu posjedovati. Ona podrazumijeva micanje slobodnih radikala iz organizma. Naime, slobodni radikali kisika reagiraju s nekim drugim molekulama u organizmu i na taj način dolazi do oštećenja makromolekula kao što su DNA, RNA, lipidi, proteini. Njihovo oštećenje može dalje dovesti do oštećenja stanica, tkiva, a naposljetku i do pojave bolesti (Saadat i sur., 2019). Kao što Perez-Ramos i suradnici (2016) navode, istraživanje je pokazalo da soj koji producira manju količinu egzopolisaharida, ima veći oksidativni učinak na intestinalne stanice, nego onaj koji može producirati puno veću količinu egzopolisaharida. Nadalje, egzopolisaharidi imaju važnu ulogu u snižavanju kolesterola u krvi. Iako nije poznat točan mehanizam djelovanja, neke bakterijske vrste sintetiziraju egzopolisaharide koji imaju sposobnost vezanja slobodnih žučnih kiselina. Njihovo izlučivanje nakon obavljene probave se povećava te se na taj način smanjuje koncentracija kolesterola u krvi pošto je potrebniji za sintezu novih žučnih soli u jetri (Ruas-Madiedo i sur., 2008).

## **3 MATERIJALI I METODE RADA**

### **3.1 MATERIJALI**

#### **3.1.1 Radni mikroorganizam**

U ovom radu je korišten soj bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus fermentum* D12. Taj soj je dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

#### **3.1.2 Stanične linije**

Caco-2 stanična linija– kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene humane tumorske stanice kolorektalnog epitela; Caco-2 stanice su priređene u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković te pripremljene za provođenje eksperimenta u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### **3.1.3 Hranjive podloge**

Tijekom provođenja eksperimenta korištena je hranjiva podloga za uzgoj odabranog radnog mikroorganizma te medij za uzgoj Caco-2 stanica.

a) podloge za uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS (Man-Rogosa-Sharpe) agar sastava: pepton 10 g/L; mesni ekstrakt 10 g/L; kvašćev ekstrakt 5 g/L; glukoza 20 g/L; Tween 80 1 g/L ; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,1 g/L; MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 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 MRS agar, ali bez dodatka agara

b) hranjiva podloga za kultivaciju staničnih linija

- Reduced Serum Medium 1x (MEM) (Gibco)

#### **3.1.4 Kemikalije**

- Agar, „Merck“, Njemačka
- Destilirana voda, PBF
- Etanol (95%), „Kemika“, Hrvatska
- Glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- Goveda žuč (oxgall), „Difco“, SAD

- Kloridna kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- Kristal violet, „Sigma-Aldrich“, SAD
- Kvašičev ekstrakt, „Difco“, SAD
- Limunska kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- Magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija
- Mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija
- Mucin, BioChemika“, Fluka, Švicarska
- Natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev bikarbonat, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev citrat, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev karbonat, „Kemika“, Hrvatska
- Natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- Pankreatin (165 U/mg) iz svinjske gušterače, „BioChemika“, Fluka, Švicarska
- Pepsin (P-700), „Sigma“, SAD
- Pepton, „Biolife“, Malazija
- Tween 20, „Sigma“, SAD
- Tween 80, „Sigma“, SAD
- Trikloroctena kiselina, „Fisher Scientific“, SAD
- Triton X-100, „Sigma“, SAD

### **3.1.5 Aparatura i pribor**

- Automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- Čitač mikrotitarskih pločica „Tecan Infinite F PLEX“
- Eppendorf kivete
- Epruvete
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“
- Magnetna miješalica, „IKA-Werke GmbH & Co“, Njemačka
- Mikrotitarske pločice, „Sarstedt“, Njemačka
- Penicilinke
- Petrijeve zdjelice
- Pinceta
- Stalci za epruvete i Eppendorf kivete
- Termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska

- Vibromješač, „Kartell“, Italija
- Zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

## **3.2 METODE RADA**

### **3.2.1 Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija**

Soj bakterije mliječne kiseline, *Lactobacillus fermentum* D12 je čuvan pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta soj je inokuliran u svježu hranjivu podlogu te inkubiran pri 37°C. Stanice Caco-2 stanične linije su čuvane u minimalnom esencijalnom mediju (MEM) pri 37°C u 5%-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub>, sa dodatkom 10% (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma.

### **3.2.2 Izolacija egzopolisaharida (EPOL-a)**

Soj producent egzopolisaharida (EPOL), *Lactobacillus fermentum* D12, uzgojen je propagacijom u 500 mL MRS bujona suplementiranog s 2% izvora glukoze tijekom 3 dana pri 30°C. Izolacija i pročišćavanje EPOL provedeno je prema Tallon i sur. (2003). Nakon inkubacije suspenzija stanica ( $1,22 \cdot 10^9$  CFU/mL) je odvojena centrifugiranjem tijekom 30 min na 4200 o/min pri 4°C. Supernatant je tretiran dodatkom trikloroetene kiseline (TCA, Fisher Scientific, SAD) u konačnoj koncentraciji od 20% (w/v) tijekom 2 sata na magnetnoj miješalici s ciljem taloženja proteina. Uklanjanje istaloženih proteina provedeno je centrifugiranjem tijekom 30 min pri 9000 o/min (4°C). Uklanjanje lipida i taloženje egzopolisaharida iz dobivenog supernatanta provedeno je dodatkom 4 volumena hladnog etanola (95%), nakon čega je uslijedila inkubacija preko noći pri -20°C. Nakon prekonoćne inkubacije istaloženi egzopolisaharidi odvojeni su centrifugiranjem tijekom 30 min pri 4°C. U cilju uklanjanja TCA i etanola, provedena je dijaliza tijekom dva dana u destiliranoj vodi na magnetnoj miješalici uz mijenjanje vode svaka 2 sata. Pročišćeni dijalizat EPOL-a koncentriran je liofiliziranjem pri čemu je dobiven uzorak nalik na pamuk.

### **3.2.3 Priprema otopina egzopolisaharida različitih koncentracija**

Obzirom da je prinos EPOL-a soja *Lb. fermentum* D12 tijekom uzgoja u hranjivoj podlozi suplementiranoj dodatkom 2% izvora glukoze bio 200,25 mg/mL, u cilju ispitivanja potencijalnog učinka EPOL-a na probiotičku aktivnost soja producenta, pripremljene su 3 različite koncentracije otopina egzopolisaharida. Prva otopina je koncentracija koja odgovara prinosu proizvedenog EPOL-a ( $c = 0,2$  mg/mL), a druga i treća su 0,5 mg/mL i 1 mg/mL. Otopine su pripremljene suspendiranjem odgovarajuće mase EPOL-a u PBS puferu (pH=7,2).

### **3.2.4 Ispitivanje protektivnog učinka EPOL-a tijekom liofilizacije soja *Lactobacillus fermentum* D12**

Svrha ovog pokusa bila je ispitivanje protektivnog učinka različitih koncentracija EPOL-a tijekom stresnih uvjeta liofilizacije. Liofilizacija je postupak sušenja u zamrznutom stanju, odnosno podrazumijeva hlađenje na jako nisku temperaturu te uklanjanje vode procesom sublimacije u vakuumu. Bakterijske stanice prekončne kulture soja producenta EPOL-a *Lb. fermentum* D12, isprane su dva puta u PBS puferu (pH=7,2) te nakon drugog ispiranja, stanice su suspendirane u odgovarajućim otopinama PBS pufera i EPOL-a (0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL i 1 mg/mL). Kao kontrola korištene su bakterijske stanice suspendirane samo u PBS puferu, bez dodatka egzopolisaharida. Nakon pripreme bakterijskih suspenzija određen je broj živih stanica, a nakon toga zamrzavanje pri -80°C i liofilizacija u liofilizatoru. Nakon završene liofilizacije, određen je broj stanica koje su preživjele stresne uvjete.

### **3.2.5 Ispitivanje preživljavanja u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta**

- **Priprava simuliranog želučanog soka i soka tankog crijeva**

Simulirani želučani sok pripravlja se suspendiranjem pepsina (3 mg/mL) u 0,5% (w/v) sterilnoj otopini natrijevog klorida, kojoj je pH podešen na 2,0 s koncentriranom kloridnom kiselinom. Simulirani sok tankoga crijeva pripravljen je suspendiranjem pankreatina (1 mg/mL) i žučnih soli (3,0 mg/mL govede žuči) u 0,5% (w/v) sterilnoj otopini natrijeva klorida, kojoj je pH podešen na 8,0 s natrijevom lužinom.

- **Inkubacija bakterijskih stanica u simuliranim sokovima gastrointestinalnog sustava**

Provedeno je ispitivanje utjecaja EPOL-a na preživljavanje soja producenta *Lb. fermentum* D12 u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Prekončna bakterijska kultura soja D12 je isprana dva puta sterilnom fiziološkom otopinom, nakon čega je suspendirana u fosfatnom puferu s dodanim EPOL-a u različitim koncentracijama (0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL i 1 mg/mL). Kao kontrola korištene su bakterijske stanice suspendirane samo u PBS puferu. Broj živih bakterijskih stanica je određen indirektnom metodom prije i nakon izlaganja simuliranom želučanom soku (2 h, 37°C). Nakon toga, bakterijske stanice su izložene djelovanju simuliranom soku tankog crijeva tijekom 4 sata pri 37°C. Ponovno je određen broj živih bakterijskih stanica indirektnom metodom, na način da su iz uzorka koji sadrži bakterijske stanice, pripremljena odgovarajuća decimalna razrjeđenja u sterilnoj destiliranoj vodi. Petrijeve zdjelice s MRS hranjivom podlogom naciepljene su sa po 10 µL

odgovarajućeg razrjeđenja. Nakon 48 h inkubacije pri 37°C izbrojane su porasle kolonije i proračunat je broj živih stanica po mililitru uzorka (CFU/mL) (Uroić i sur., 2014). Eksperiment je ponovljen tri puta.

### **3.2.6 Analiza utjecaja EPOL-a na autoagregacijska svojstva soja *Lactobacillus fermentum* D12**

Autoagregacijska svojstva uzgojenih bakterijskih stanica soja *Lb. fermentum* D12 ispitana su nakon prekonocnog uzgoja u MRS-bujonu. Prekonocne bakterijske kulture su centrifugirane pri 4200 o/min tijekom 15 min. Stanice su isprane fosfatnim puferom pH 7,2, ponovno centrifugirane i suspendirane u istom pufer uz dodatak različitih koncentracija EPOL-a (0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL i 1 mg/mL). Kao kontrola korišten je uzorak bakterijskih stanica suspendiran u PBS puferu bez dodatka EPOL-a. Suspenzije uzoraka bakterijskih stanica sa i bez dodatka EPOL-a (4 mL) otpipetirane su u Penicilinke te su izmiješane na vibromješaču. Uzorci za ispitivanje bakterijske autoagregacije uzete su u nultom satu te svaki sat tijekom 4h inkubacije pri sobnoj temperaturi. Mjerenje je provedeno tako da je s površine suspenzija, koje su ostavljene mirovati, u određenom vremenu uzet uzorak od 100 µL te je prenesen u jažice na mikrotitarskoj pločici (Buck i sur., 2005; Kos i sur., 2003). Autoagregacija je određena mjerenjem apsorbancije uzoraka pri 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan Infinite F PLEX). Eksperiment je ponovljen tri puta.

Postotak autoagregacije izračunat je iz formule:

$$\text{Autoagregacija (\%)} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) * 100$$

gdje je:

$A_t$  - apsorbancija u vremenu (nakon 4 sata)

$A_0$  - apsorbancija u vremenu 0.

### **3.2.7 Adhezija bakterijskih stanica na mucin**

Ispitivanje utjecaja EPOL-a na adheziju soja producenta *Lb. fermentum* D12 na mucin u *in vitro* uvjetima provedeno je na mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica. Mikrotitarska pločica je prethodno pripremljena na način da su jažice tretirane otopinom mucina (100 µL) koncentracije 10 mg/mL u karbonat/bikarbonatnom puferu (50 mmol/L, pH=9,6) te su inkubirane preko noći pri 4°C. Kultura odabranog soja *Lb. fermentum* D12 uzgojena je u MRS bujonu. Prekonocna kultura je centrifugirana i isprana 2 puta u fosfatnom puferu. Koncentracija stanica je podešena do postizanja optičke gustoće  $A_{620}=1$  s otopinom odgovarajućih koncentracija EPOL-a (0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL i 1 mg/mL) u PBS puferu, pri

čemu su kao kontrola poslužile stanice suspendirane samo u PBS puferu. Jažice s mucinom isprane su tri puta sa 100  $\mu$ L fosfatnog pufera te je nakon toga u svaku jažicu dodano po 100  $\mu$ L fosfatnog pufera (PBS) s 1% Tween 20. Provedena je inkubacija tijekom jednog sata pri sobnoj temperaturi kako bi se mucin imobilizirao. Iz jažica je pažljivo izvađen PBS s Tweenom i nakon toga je u svaku jažicu dodano po 100  $\mu$ L prethodno pripremljenih suspenzija soja D12 u tri paralele. Osim u jažice s mucinom, suspenzije su dodane i u jažice bez mucina za kontrolu adhezije. Kao slijepa proba korišten je fosfatni pufer i tako pripremljene pločice su inkubirane preko noći pri 37°C. Nakon prekonoćne inkubacije, neadhezirane stanice su uklonjene ispiranjem 3 puta s 200  $\mu$ L 0,05% Tween 20 u fosfatnom puferu (PBST). Pločica je ostavljena da se posuši 1h nakon čega su detektirane adhezirane stanice dodatkom 100  $\mu$ L kristal violeta (1 mg/ml) u svaku jažicu tijekom 45 min. Zatim su jažice isprane tri puta fosfatnim puferom (200  $\mu$ L). Dodatkom 100  $\mu$ L citratnog pufera (50 mM, pH 4,0) provedeno je otpuštanje bojila vezanog na adhezirane stanice i izmjerena je apsorbancija na čitaču mikrotitarskih pločica „Tecan Infinite F PLEX“ pri 620 nm (Antikainen i sur., 2002). Eksperiment je ponovljen tri puta.

### **3.2.8 Adhezija na Caco-2 epitelne stanice**

Stanice Caco-2 stanične linije uzgojene su u MEM mediju sa serumom u T-boci volumena 25 cm<sup>3</sup> i održavane su pri 37°C i 5%-tnoj atmosferi CO<sub>2</sub>. Stanice su čuvane u opisanim uvjetima i svaka 2 dana im je dodan svježi medij. Za ispitivanje utjecaja EPOL-a na adheziju soja producenta EPOL-a *Lb. fermentum* D12, Caco-2 stanice su inokulirane u plastične pločice s 24 jažice u koncentraciji od 1x10<sup>5</sup> stanica/mL i inkubirane tjedan dana uz izmjenu medija svaka 2 dana. Prije primjene, Caco-2 stanice su isprane 3 puta fosfatnim puferom. Prekonoćna kultura soja producenta EPOL-a *Lb. fermentum* D12 uzgojena je u tekućoj MRS hranjivoj podlozi. Stanice su isprane centrifugiranjem pri 4,000 g tijekom 10 min kako bi se uklonio višak hranjive podloge te mogući učinci niskih pH vrijednosti ili izvanstaničnih proteina u supernatantu kulture. Nakon ispiranja, optička gustoća stanica je podešena na vrijednost OD=1 suspendiranjem u RPMI mediju uz dodatak različitih koncentracija EPOL-a (0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL), pri čemu su kao kontrola korištene bakterijske stanice suspendirane samo u RPMI mediju. Prije dodatka suspenzija bakterijskih stanica na Caco-2 stanice, određen je početni broj stanica (CFU/mL) indirektnom metodom, tj. naciepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja u Petrijevim zdjelicama s MRS agarom. Nakon 48 sati anaerobne inkubacije pri 37°C, izbrojane su porasle kolonije i rezultat je izražen kao CFU/mL. Caco-2 stanicama svake jažice dodano je 1 mL priređene suspenzije bakterijskih stanica u tri paralele, nakon čega je uslijedila inkubacija tijekom 1 h pri 37°C. Caco-2 stanice isprane su

tri puta fosfatnim puferom kako bi se uklonile bakterije koje se nisu adhezirale. Nakon ispiranja uslijedila je inkubacija tijekom 10 min u 0,05% (vol/vol) otopini Triton X-100. Sadržaj svake jažice je centrifugiran te su iz dobivene biomase adheziranih stanica priređena decimalna razrjeđenja u fiziološkoj otopini. Broj adheziranih stanica provjeren je indirektnom metodom na ranije opisani način (Goh i sur., 2010).



## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Ispitivanje protektivnog učinka različitih koncentracija EPOL-a

U svrhu ispitivanja probiotičke aktivnosti egzopolisaharida, provedeno je istraživanje preživljavanja stanica soja *Lb. fermentum* D12 bez prisustva EPOL-a i u prisustvu različitih koncentracija EPOL-a. Kako proces liofilizacije predstavlja stresne uvjete za navedeni soj, željelo se istražiti kakav će utjecaj egzopolisaharidi imati u takvim uvjetima.



**Slika 2.** Uzorci suspenzija bakterijskih stanica soja producenta EPOL-a *Lb. fermentum* D12 suspendiranih u PBS puferu (kontrola) i u PBS puferu uz dodatak različitih koncentracija EPOL-a prije (lijevo) i nakon (desno) procesa liofilizacije

**Tablica 1.** Broj živih stanica soja producenta egzopolisaharida *Lb. fermentum* D12 (CFU/mL) u uzorcima **prije liofilizacije**

Uzorak	D12+PBS	D12+PBS + EPOL (0,2 mg/mL)	D12+PBS + EPOL (0,5 mg/mL)	D12+PBS + EPOL (1 mg/mL)
Broj živih stanica (CFU/mL)	$6,33 \cdot 10^9$	$1,14 \cdot 10^{10}$	$6,53 \cdot 10^9$	$4,125 \cdot 10^9$

**Tablica 2.** Broj živih stanica soja producenta egzopolisaharida *Lb. fermentum* D12 (CFU/mL) u uzorcima **nakon liofilizacije**

Uzorak	D12+PBS	D12+PBS + EPOL (0,2 mg/mL)	D12+PBS + EPOL (0,5 mg/mL)	D12+PBS + EPOL (1 mg/mL)
Broj živih stanica (CFU/mL)	$1,73 \cdot 10^8$	$6,43 \cdot 10^8$	$4,95 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8$

**Tablica 3.** Smrtnost stanica *Lb. fermentum* D12 nakon procesa liofilizacije

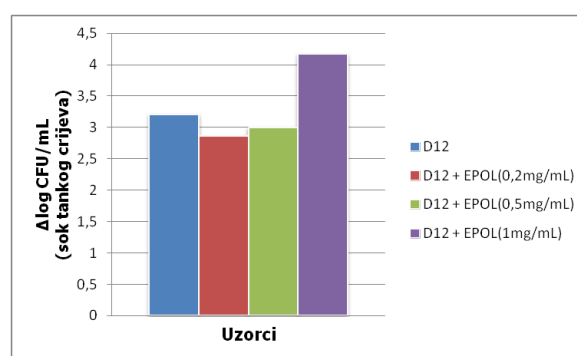
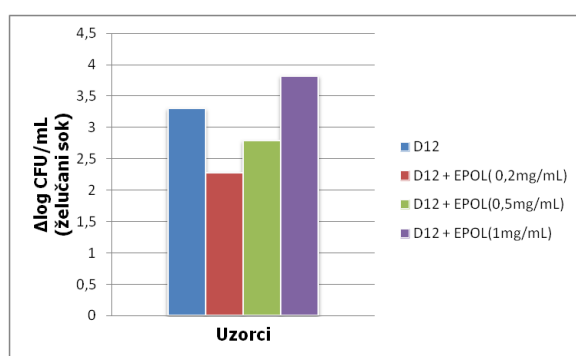
<b>Uzorak</b>	<b>log (CFU/mL) prije liofilizacije</b>	<b>log (CFU/mL) nakon liofilizacije</b>	<b><math>\Delta</math>log [(CFU/mL) prije i poslije liofilizacije]</b>
<b>D12</b>	9,8	8,24	1,56
<b>D12+ EPOL (0,2 mg/mL)</b>	10,06	8,81	1,25
<b>D12+ EPOL (0,5 mg/mL)</b>	9,81	8,69	1,12
<b>D12+ EPOL (1 mg/mL)</b>	9,62	8,7	0,92

Liofilizacija se često koristi u industriji za čuvanje mikroorganizama. Primjenom liofilizacije želi se postići održivost, odnosno dugotrajnost samog proizvoda, a time i njegove kvalitete. Najviše poraslih stanica prije liofilizacije izbrojano je na Petrijevoj zdjelici na kojoj je naciepljen soj D12 s koncentracijom egzopolisaharida od 0,2 mg/mL (tablica 1). Nakon liofilizacije, također je dobiveno najviše živih stanica kod soja D12+EPOL (0,2 mg/mL) (tablica 2). Međutim, iz izračunatih vrijednosti logaritma CFU/mL za pojedine koncentracije egopolisaharida, može se uočiti da nakon procesa liofilizacije za odabrani soj *Lb. fermentum* D12 dolazi do smrtnosti stanica (tablica 3). Iako je smrtnost stanica najveća kod soja D12 bez prisustva EPOL-a, a najmanja kod soja D12+EPOL (1 mg/mL), dobivene razlike su jako male.

Osim protektivnog učinka različitih koncentracija egzopolisaharida tijekom liofilizacije, ispitao se i protektivni učinak egzopolisaharida u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta. Kao što je već poznato, jedna od važnih probiotičkih aktivnosti vezana je uz preživljavanje nepovoljnih uvjeta kao što je niska pH vrijednost želuca, djelovanje žučnih kiselina te uspješan prolazak, kako kroz gornji dio crijevnog trakta, tako i kroz samo tanko crijevo.

**Tablica 4.** Preživljavanje stanica *Lb. fermentum* D12 tijekom izlaganja simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta

Uzorak	Početan broj stanica D12	Broj živih stanica D12 nakon inkubacije u simuliranom želučanom soku	Broj živih stanica D12 nakon inkubacije u simuliranom soku tankog crijeva
D12	$2,83 \cdot 10^9$	$1,41 \cdot 10^6$	$1,74 \cdot 10^6$
D12 + EPOL (0,2mg/mL)	$9,33 \cdot 10^8$	$4,85 \cdot 10^6$	$1,29 \cdot 10^6$
D12 + EPOL (0,5mg/mL)	$2,26 \cdot 10^9$	$3,65 \cdot 10^6$	$2,24 \cdot 10^6$
D12 + EPOL (1mg/mL)	$3,52 \cdot 10^9$	$5,37 \cdot 10^5$	$2,41 \cdot 10^5$



**Slika 3.** Preživljavanje stanica *Lb. fermentum* D12 tijekom prolaska kroz simulirane uvjete gastrointestinalnog trakta

Određivanjem početnog broja stanica prije samog suspendiranja u simuliranom želučanom soku, dobivena vrijednost živih stanica je bila najveća kod koncentracije EPOL-a 1 mg/mL (tablica 4). Uspoređujući rezultate početnog broja stanica i živih stanica dobivenih nakon izlaganja simuliranim uvjetima želučanog soka, može se vidjeti da najveću mogućnost preživljavanja ima soj D12 s koncentracijom EPOL-a od 0,2 mg/mL (slika 3). Tijekom suspendiranja soja D12 u simuliranim uvjetima soka tankog crijeva, najmanja smrtnost stanica se vidi kod korištenja EPOL-a koncentracije 0,2 mg/mL (slika 3). U oba slučaja, najveća koncentracija egzopolisaharida dovela je do najvećeg pada preživljavanja stanica (tablica 4). Ostale upotrijebljene koncentracije EPOL-a omogućile su broj živih stanica veći od  $1 \times 10^6$  CFU/mL što je minimalna koncentracija za osiguravanje probiotičke aktivnosti. Bao i sur. (2010) su u svojem istraživanju donijeli zaključak da preživljavanje nepovoljnih uvjeta gastrointestinalnog trakta *Lb. fermentum* ovisi o korištenom soju budući da svi sojevi

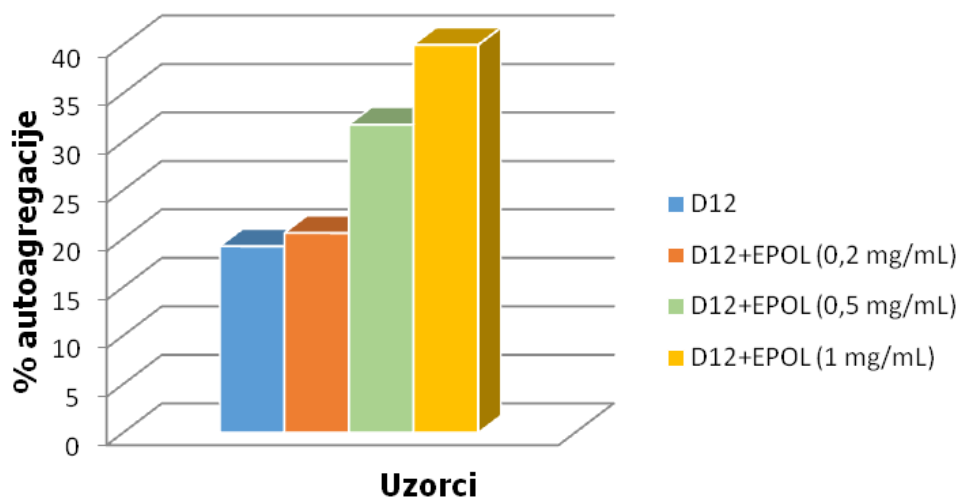
iste vrste nemaju istu mogućnost preživljavanja. Također, provedena su i neka istraživanja u kojima dobiveni rezultati nisu ukazivali na veliku razliku u otpornosti na gastrointestinalne uvjete *Pediococcus parvalus* 2.6 u prisutnost i bez prisustva EPOL-a (de Palencia i sur., 2009). Moguće je da je soju *Lb. fermentum* D12 bila dovoljna određena koncentracija egzopolisaharida za preživljavanje uvjeta u GIT-u, a u većoj koncentraciji su počeli inhibirati rast stanica.

#### **4.2 Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija EPOL-a na adhezijska svojstva soja producenta *Lb. fermentum* D12**



**Slika 4.** Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija EPOL-a na autoagregacijska svojstva soja producenta *Lb. fermentum* D12

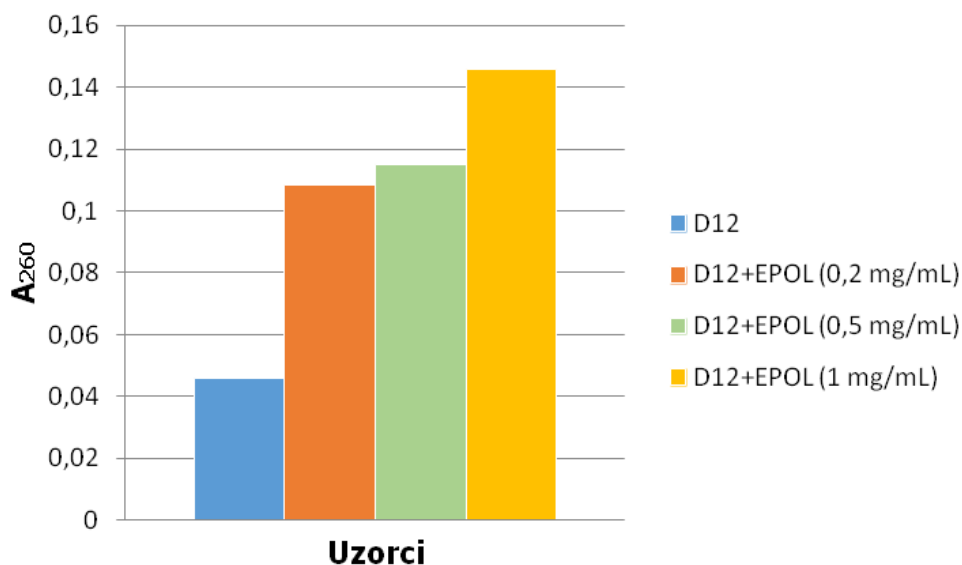
Provedeno je još jedno ispitivanje probiotičkog učinka egzopolisaharida kod prethodno navedenog soja. Ispitivao se utjecaj različite koncentracije egzopolisaharida na sposobnost adhezije na intestinalne epitelne stanice, na mucin te na Caco-2 stanice.



**Slika 5.** Utjecaj različitih koncentracija egzopolisaharida (EPOL-a) na autoagregacijska svojstva soja *Lb. fermentum* D12

Pod pojmom autoagregacije podrazumijeva se kolonizacija (u ovom slučaju *Lb. fermentum* D12) crijevnog epitela, a sam postupak provodio se kroz 4 sata pri čemu se pratio utjecaj koncentracije EPOL-a. Na temelju izmjerene apsorbancije i korištenjem prethodno navedene formule, dobiveni su postoci autoagregacije za pojedine koncentracije EPOL-a (slika 5). Iako između soja bez prisustva EPOL-a i soja s 0,2 mg/mL EPOL-a ne postoji velika razlika u sposobnosti autoagregacije, ipak se može vidjeti da s povećanjem koncentracije egzopolisaharida raste i sposobnost bakterijskog soja da se veže na intestinalne epitelne stanice. Uspoređujući dobivene postotke autoagregacije za D12 i D12+EPOL (1 mg/mL), vidi se skoro dvostruko veća sposobnost vezanja. Živković i sur. (2016) u svom radu također navode pozitivan utjecaj EPOL-a producenta *Lactobacillus paracasei* u adheziji na epitelne stanice crijeva.

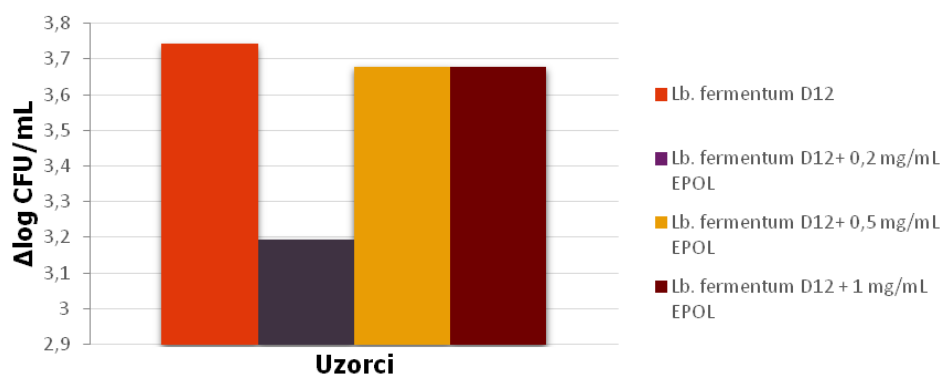
Važnu ulogu u gastrointestinalnom traktu ima sluzni sloj koji pruža zaštitu od oštećenja i patogena te istovremeno osigurava hranjive tvari. Mucin pripada glikoproteinima, odnosno jedna je od strukturnih komponenti sluzi koja prekriva epitelne stanice. Sinteza mucina je vrlo dinamičan proces koji se odvija u vrčastim stanicama. Upravo adhezija na površinu sluznice predstavlja važan korak u kolonizaciji crijeva (Nishiyama i sur., 2016).



**Slika 6.** Utjecaj različitih koncentracija egzopolisaharida (EPOL-a) na adheziju soja *Lb. fermentum* D12 na mucin

Provedena su neka istraživanja koja su pokazala da preživljavanje prolaska bakterije kroz gastrointestinalni trakt potiče sposobnost adhezije na mucin. Stresni uvjeti uzrokovali su promjene na bakterijskoj površini te su doveli do povećanog pridržavanja za crijevni epitel (Bengoa i sur., 2017). Dobiveni rezultati sposobnosti adhezije na mucin u proporcionalnom su odnosu s koncentracijom EPOL-a. Vidljiv je potencijalni probiotički učinak iako razlike u dobivenoj apsorbanciji nisu toliko značajne.

Kao što je poznato, važnost probiotičke aktivnosti vezana je i uz mogućnost antitumorskog djelovanja. Upravo zato se provodilo istraživanje utjecaja EPOL-a na adheziju Caco-2 stanica koje predstavljaju intestinalne stanice izolirane iz humanog karcinoma debelog crijeva.



**Slika 7.** Utjecaj različitih koncentracija egzopolisaharida (EPOL-a) na adheziju soja *Lb. fermentum* D12 na Caco-2 stanice

Dobiveni rezultati adhezije na Caco-2 stanice izraženi su razlikom logaritma CFU/mL. Kao što je vidljivo iz slike 7 najmanje preživljavanje stanica bilo je kod soja D12 bez prisustva EPOL-a, a najveće preživljavanje stanica omogućila je koncentracija EPOL-a 0,2 mg/mL. Postoje neka istraživanja koja navode pozitivan učinak npr.  $\beta$ -glukana u interakciji bakterijskih stanica s Caco-2 stanicama (de Palencia i sur., 2009) ili istraživanje u kojem je dokazana veća mogućnost adhezije na Caco-2 stanice *Bifidobacterium breve* A28 s većom koncentracijom EPOL-a, u odnosu na *Bifidobacterium bifidum* A10 s manjom koncentracijom EPOL-a (Alp i sur., 2010). Međutim, dobiveni rezultati za *Lb. fermentum* D12 pokazuju da egzopolisaharidi imaju neki mali utjecaj na sposobnost adhezije na Caco-2 stanice pa i dalje predstavljaju potencijalne biopolimere u smanjenju tumorske aktivnosti.

## 5 ZAKLJUČCI

1. Iako je uočljiva bolja sposobnost preživljavanja uvjeta liofilizacije *Lactobacillus fermentum* D12 uz prisustvo različitih koncentracija egzopolisaharida, dobivene razlike su premale da bismo mogli sa sigurnošću reći da egzopolisaharidi pružaju protektivni učinak tijekom takvih stresnih uvjeta.
2. Najveću sposobnost preživljavanja u simuliranim uvjetima želučanog soka i soka tankog crijeva soj producent egzopolisaharida *Lb. fermentum* D12 je pokazao uz koncentraciju EPOL-a od 0,2 mg/mL. Međutim, soj producent najveće koncentracije EPOL-a (1 mg/mL) je dao sasvim suprotni učinak i doveo do veće smrtnosti stanica u odnosu na korišteni soj bez dodatka EPOL-a.
3. Nastala količina EPOL-a pozitivno djeluje na autoagregacijska svojstva *Lb. fermentum* D12.
4. Sposobnost adhezije na protein sluznice mucin proporcionalno raste s povećanjem koncentracije EPOL-a iako nema značajno velike razlike u rezultatima.
5. Adhezijska svojstva *Lb. fermentum* D12 na Caco-2 stanice najveća su kod koncentracije EPOL-a 0,2 mg/mL. To ukazuje da ipak određena koncentracija sintetiziranih egzopolisaharida može imati utjecaj na preživljavanje stanica.



## 6 LITERATURA

1. Alp G., Aslim B., Suludere Z., Akca G. (2010) The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells in vitro. *Microbiology and Immunology* **54**: 658 - 665.
2. Antikainen J., Anton L., Sillanpaa J., Korhonen T. K. (2002) Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Molecular Microbiology* **46(2)**: 381 - 394.
3. Bao Y., Zhang Y., Zhang Y., Liu Y., Wang S., Dong X., Zhang H. (2010) Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* **21(5)**: 695 - 701.
4. Bengoa A. A., Zavala L., Carasi P., Trejo S. A., Bronsoms S., de los Angeles Serradell M., Garrote G. L., Abraham A. G. (2017) Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International* **103**: 462 – 467.
5. Bhavani A. L., Nisha J. (2010) Dextran- The polysaccharide with versatile uses. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **1(4)**: 569 - 573.
6. Buck B. L., Altermann E., Svingerud S., Klaenhammer T. R. (2005) Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8344 - 8351.
7. de Palencia P. F., Werning M. L., Sierra-Filardi E., Dueñas M. T., Irastorza A., Corbí A. L., López P. (2009) Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-beta-D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology* **75(14)**: 4887 - 4891.
8. Galle S., Schwab C., Dal Bello F., Coffey A., Gänzle M., Arendt E. (2012) Comparison of the impact of dextran and reuteran on the quality of wheat sourdough bread. *Journal of Cereal Science* **56**: 531 - 537.
9. Gelinsky M. (2018) Biopolymer hydrogel bioinks. U: 3D Bioprinting for Reconstructive Surgery: Techniques and Applications, 1. izd., Thomas D. J., Jessop Z. M., Whitaker I. S., eds., Elsevier, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom, str. 125 – 136.
10. Gerwig G. J. (2018) Structural Analysis of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. U: Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols, 1. izd., Kanauchi M., ed., Springer, Humana Press, New York, U.S.A., str. 67 – 84.
11. Gibson G. R., Robertfroid M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition* **125(6)**: 1401 - 1412.

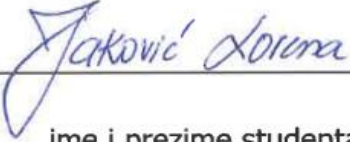
12. Goh Y. J., Klaenhammer T. R. (2010) Functional roles of aggregation-promoting like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* **76(15)**: 5005 - 5012.
13. Güler-Akin M., Serdar Akin M., Korkmaz A. (2009) Influence of different exopolysaccharide-producing strains on the physicochemical, sensory and syneresis characteristics of reduced-fat stirred yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* **62**: 422 – 430.
14. John R. P., Madhvavan Nampoothiri K., Pandey A. (2007) Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**: 524 - 534.
15. Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 981 – 987.
16. Kothari D., Das D., Patel S., Goyal A. (2014) Dextran and Food Application. U: Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology, 1. izd., K. G. Ramawat, J-M Mérillon, eds., Springer International Publishing, Udaipur, India, str. 735 – 752.
17. Lemme-Dumit J. M., Polti M. A., Perdigon G., Maldonado Galdeano C. (2016) Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality. *Beneficial Microbes* **9(1)**: 153 – 164.
18. Leroy F., De Vuyst L. (2004) Functional lactic acid bacteria starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15(2)**: 67 - 78.
19. Li W., Tang W., Ji J., Xia X., Rui X., Chen X., Jiang M., Zhou J., Dong M. (2015) Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**: 3454 – 3463.
20. Lynch K. M., Zannini E., Coffey A., Arendt E. K. (2018) Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Food and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology* **9**: 155 - 176.
21. McIntosh M., Stone B. A., Stanisich V. A. (2005) Curdlan and other (1→3)-β-D-glucans. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**: 163 - 173.
22. Mishra A., Jha B. (2013) Microbial Exopolysaccharides. U: The Prokaryotes- Applied Bacteriology and Biotechnology, 4. izd., Rosenberg E., DeLong E. F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., eds., Springer, New Delhi, India, str. 179 – 192.
23. Nishiyama K., Sugiyama M., Mukai T. (2016) Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms* **4(3)**: 1 – 18.

24. Oleksy M., Klewicka E. (2016) Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **58(3)**: 450 - 462.
25. Patel A. K., Michaud P., Singhamia R. R., Soccol C. R., Pandey A. (2010) Polysaccharides from Probiotics: New Developments as Food Additives. *Food Technology and Biotechnology* **48**: 451 - 463.
26. Pérez-Ramos A., Nácher-Vázquez M., Notararigo S., López P., Luz Mohedano M. (2016) Current and Future Applications of Bacterial Extracellular Polysaccharides. U: Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: bioactive foods in health promotion, 1. izd., Watson R. R., Preedy V. R., (eds.), Elsevier, Academic Press, San Diego, SAD, str. 329 – 344.
27. Piermaria J. A., de la Canal M. L., Abraham A. G. (2007) Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained of kefir grain. *Food Hydrocolloids* **22**: 1520 - 1527.
28. Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P. (2001) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **12**: 163 - 171.
29. Ruas-Madiedo P., Abraham A. G., Mozzi F., De los Reyes-Gavilan C. G. (2008) Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. U: Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications., Mayo B., Lopez P., Pérez-Martínez G., eds., Research Singpost, Kerala, India, str. 137 - 166.
30. Saadat Y. R., Khosroushahi A. Y., Gargari B. P. (2019) A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **217**: 79 - 89.
31. Shoaib M., Shehzad A., Omar M., Rakha A. Raza H., Sharif H. R., Shakeel A., Ansari A., Niazi S. (2016) Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers* **147**: 444 - 454.
32. Sleator R. D., Hill C. (2008) New frontiers in probiotic research. *Letters in Applied Microbiology* **46**: 143 - 147.
33. Suresh Kumar A., Mody K., Jha B. (2007) Bacterial exopolysaccharides- a perception *Journal of Basic Microbiology* **47**: 103 - 117.
34. Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet
35. Šušković J., Kos B., Matošić S. (1998) Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend? *Mljekarstvo* **48**: 165 - 176.

36. 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 Technology and Biotechnology* **48**: 296 - 307.
37. Tallon R., Bressollier P., Urdaci M. C. (2003) Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology* **154**: 705 – 712.
38. Uroić K., Nikolić M., Kos B., Leboš Pavunc A., Beganović J., Lukić J., Jovčić B., Filipić B., Miljković M., Golić N., Topisirović Lj., Čadež N., Raspor P., Šušković J. (2014) Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Croatian Fresh Soft Cheese and Serbian White Pickled Cheese. *Food Technology and Biotechnology* **52(2)**: 232 – 241.
39. Vinderola G., Perdigon G., Duarte J., Farnworth E., Matar C. (2006) Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine* **36**: 254 - 260.
40. Živković M., Miljković M. S., Ruas-Madiedo P., Markelić M. B., Veljović K., Tolinački M., Golić N. (2016) EPS-SJ Exopolisaccharide Produced by the Strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 Is Involved in Adhesion to Epithelial Intestinal Cells and Decrease on *E. coli* Association to Caco-2 Cells. *Frontiers in Microbiology* **7(286)**: 1 - 14.
41. Welman A. D., Maddox I. S. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* **21**: 269 - 274.
42. Wiater A., Szczodrak J., Rogalski J. (2002) Hydrolysis of mutan and prevention of its formation in streptococcal films by fungal  $\alpha$ -D-glucanases. *Process Biochemistry* **39**: 1481 - 1489.

## **Izjava o izvornosti**

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

  
ime i prezime studenta